



HAL
open science

Diversité chimique et potentialités antivirales d'Euphorbiacées tropicales

Simon Remy

► **To cite this version:**

Simon Remy. Diversité chimique et potentialités antivirales d'Euphorbiacées tropicales. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2019. Français. NNT : 2019SACLS374 . tel-02401818

HAL Id: tel-02401818

<https://theses.hal.science/tel-02401818>

Submitted on 10 Dec 2019

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.

Diversité chimique et potentialités antivirales d'Euphorbiacées tropicales

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

Ecole doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : chimie des substances naturelles

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 23 octobre 2019, par

SIMON REMY

Composition du Jury :

Dominique Laurain-Mattar Professeure, Université de Lorraine	Rapporteur
Joëlle Quetin-Leclercq Professeure, Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Erwan Poupon Professeur, Université Paris-Sud	Président
Jean-Claude Guillemot Professeur, Université Aix-Marseille	Examineur
Marc Litaudon Ingénieur de Recherche, ICSN - CNRS	Directeur de thèse
David Touboul Chargé de Recherche, ICSN - CNRS	Co-directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, sous la direction du Dr. Marc Litaudon et du Dr. David Touboul, au sein des équipes Métabolites de Plantes et Micro-organismes Associés et Spectrométrie de Masse.

Je voudrais en premier lieu remercier le Dr. Marc Litaudon, dont l'exemplarité a grandement contribué à forger mon caractère de chercheur. Marc m'a enseigné qu'un bon scientifique exerce son art selon une vision précise, dans la transparence et l'honnêteté. En bon leader, il m'a permis de suivre des pistes de ma propre initiative tout en guidant mes choix. Enfin, que ce soit au détour d'un chemin en Guyane, dans un train vers l'Autriche ou au laboratoire, je garde en mémoire nos discussions passionnées sur l'origine des espèces et l'avenir du métier. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude et mon amitié.

Je remercie chaleureusement le Dr. David Touboul pour sa patience alors que je découvrais la spectrométrie de masse, ses précieux conseils et son expertise. La richesse de nos échanges m'a permis d'avancer efficacement dans mon travail.

Je remercie le Pr. Joëlle Quetin-Leclercq et le Pr. Dominique Laurain-Mattar d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et pour les riches discussions menées lors de la soutenance. Je tiens à remercier le Pr. Erwan Poupon d'avoir présidé ce jury de thèse, et également pour sa gentillesse, ses encouragements et pour m'avoir transmis sa passion des processus biosynthétiques lors de cours captivants.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. Sandy Desrat, un fin chimiste dont l'humour n'a d'égal que la gentillesse. Son calme (sauf sur un terrain de squash) sa bienveillance et sa logique ont été des éléments essentiels de mon bien-être à l'ICSN durant ces trois années.

Mme Cécile Apel est l'élément moteur du laboratoire de phytochimie. D'une efficacité et d'une précision redoutables Cécile m'a appris à "tenir" un laboratoire. Incollable sur les techniques séparatives et analytiques, elle s'est rendue disponible à tous les moments de ma thèse. Je la remercie sincèrement pour ses précieux conseils et également pour son accent : un petit bout de Lorraine en région parisienne qui m'a fait me sentir chez moi dès le premier jour !

J'exprime ma sincère reconnaissance au Dr. Florent Olivon pour avoir été un parrain hors pair en m'initiant à la phytochimie, aux réseaux moléculaires, et également en me traînant aux apéros du Bar 12 (merci Philippe !) et en me faisant découvrir tous les recoins de l'ICSN...

Je tiens à remercier le Dr. Fanny Roussi d'avoir tout mis en œuvre pour m'accueillir au sein de l'équipe Métabolites de Plantes et Micro-organismes Associés. Sa bienveillance, ses nombreux encouragements et ses conseils avisés m'ont permis d'évoluer dans une atmosphère sereine où mon travail était apprécié.

Je remercie les membres de l'équipe AFMB de Marseille pour leur accueil chaleureux. Je suis notamment très reconnaissant au Pr. Jean-Claude Guillemot d'avoir permis cette collaboration, pour le temps qu'il m'a accordé et pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Je témoigne toute ma gratitude au Dr. Cécilia Eydoux, qui a réussi à m'initier à la production de protéines et au criblage biologique en seulement quelques mois. Je la remercie pour sa disponi-

bilité, sa patience et pour la relecture attentive de ce manuscrit. Je remercie également le Pr. Johan Neyts, le Pr. Pieter Leyssen et le Dr. Charlotte Vanderheydt de l'Université Catholique de Louvain pour les tests d'inhibition du Chikungunya.

Je souhaite remercier toutes les personnes avec qui j'ai interagit à l'ICSN : M. Jean-François Gallard pour les analyses RMN, le Dr. Pascal Retailleau et le Dr. Florent Blanchard pour les analyses cristallographiques, le Dr. Guillaume Loire et M. David Lê pour avoir mis à ma disposition les ressources informatiques dont j'avais besoin. Enfin, je remercie le Dr. Odile Thoison, le Dr. Nathalie Hue et M. Vincent Steinmetz du service HPLC et M. Nicolas Elie de l'équipe spectrométrie de masse pour leur aide précieuse.

Par ailleurs, je voudrais saluer tous ceux qui m'ont permis de décompresser et avec qui j'ai partagé des moments mémorables, en cours de Master 2 : Charlotte, Valentin, Chloé, puis à l'ICSN : Gwenaëlle, Morgane, Laure, Julie, Eddy, Céline, Oriane, Les Daubans...

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnés tout au long de ces années. Je suis redevable à mes parents Claudine, Thierry et mon beau-père Raffi, pour leur soutien moral et matériel, leur amour et leur confiance indéfectible dans mes choix. Je remercie mon frère et confident Armand dont l'esprit formaté science humaine a fait prendre une autre dimension à la science dure que j'affrontais au quotidien. Je remercie ma sœur Kelly, mon beau-frère Bobby, mon filleul Léo et ma nièce Léna qui m'ont maintes fois rappelé qu'il y a un monde à l'extérieur du labo et "qu'on aimerait bien que tu viennes plus souvent". Je remercie mon meilleur ami Simon avec qui je partage un goût prononcé pour la nourriture, le vin, la musique et faire perdre les autres aux jeux de sociétés. Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour ma compagne adorée, Caroline qui me comble d'amour et me fait chaque jour prendre le recul nécessaire pour pouvoir avancer.

Je dédie cette thèse à Claudine et Raffi

Table des matières

Avant-propos	xiii
Liste des tableaux	xix
Abréviations	xxi
Partie I Introduction	1
Chapitre 1 Les Euphorbiaceae	3
1.1 Introduction	3
1.2 Description	5
1.2.1 L'appareil reproducteur	5
1.2.2 L'appareil végétatif	5
1.2.3 Les laticifères	7
1.3 Intérêt pharmaceutique des diterpènes d'Euphorbiaceae	7
1.3.1 Activité anti-"Multi-Drug-Resistance" (MDR)	7
1.3.2 Modulation de l'activité des PKCs	9
1.3.3 Autres activités	13
Chapitre 2 Biosynthèse des diterpènes	15
2.1 Les métabolites précurseurs	16
2.1.1 La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)	16
2.1.2 La voie du mévalonate (MVA)	16
2.2 Les voies de biosynthèse	17
2.3 Les différents squelettes	19
2.3.1 Les cembranes et les casbanes	19
2.3.2 Les lathyranes et leurs dérivés	21
2.3.3 Les jatrophanes et leurs dérivés	23
2.3.4 Les phorboïdes et leurs dérivés	25

Chapitre 3 Les stratégies de lutte contre les virus du chikungunya, de la dengue et du Zika	33
3.1 Généralités	34
3.1.1 Structures moléculaires des virus	34
3.1.2 Transmission et symptomatologie	34
3.2 Epidémiologie	37
3.2.1 DENV	37
3.2.2 ZIKV	37
3.2.3 CHIKV	38
3.3 Lutte contre les vecteurs	39
3.3.1 Les approches de réduction de la population de moustique	40
3.3.2 Les approches de modification de la population de moustique	40
3.4 Développement de vaccins : progrès et challenges	42
3.4.1 Développement de vaccins anti-CHIKV	42
3.4.2 Développement de vaccins anti-DENV	42
3.4.3 Développement de vaccins anti-ZIKV	43
3.5 Inhibiteurs des flavivirus : DENV et ZIKV	45
3.5.1 Inhibiteurs de la protéase NS3	45
3.5.2 Inhibiteurs de l'ARN polymérase NS5	46
3.6 Inhibiteurs du CHIKV	48
Chapitre 4 Les phorboïdes anti-CHIKV : implication des Protéines Kinases	49
C	49
4.1 Les tiglianes et ingénanes	49
4.1.1 Relations structure-activité	51
4.1.2 Inhibition de la réplication du VIH	51
4.2 Les daphnanes	54
4.3 Les PKC, des cibles potentielles des esters de phorbol anti-CHIKV	56
Chapitre 5 Les réseaux moléculaires	61
5.1 Acquisition des données LC-MS/MS	61
5.2 Traitement des données de LC-MS/MS	62
5.3 Annotation des données MS/MS	64
5.3.1 Comparaison aux bases de données spectrales	64
5.3.2 Comparaison aux bases de données structurales	66
5.3.3 Annotation des motifs structuraux : "MS2LDA"	68
5.3.4 Annotation de la classe chimique : "ClassyFire"	69

5.4	Les réseaux moléculaires	69
5.4.1	GNPS	71
5.4.2	MetGem	72
5.4.3	Cartographie de métadonnées : priorisation des extraits de plantes	72
5.5	Annotation du réseau moléculaire	73
5.5.1	Network Annotation Propagation	73
5.5.2	MolNetEnhancer	74
5.5.3	Anticipation des structures chimiques : "MetWork" et "C-NAP"	74

Partie II Résultats 77

Chapitre 6 Études phytochimiques de *Sandwithia guyanensis* et *Sagotia racemosa* 79

6.1	Description des plantes	79
6.2	Activités biologiques des extraits	80
6.3	Extraction et purification	81
6.4	Caractérisation structurale des diterpènes de <i>S.guyanensis</i>	81
6.4.1	Les phénanthrènes	83
6.4.2	Les dérivés de l'euphoractine B	84
6.4.3	Les dérivés de l'euphoractine A	87
6.4.4	Le sikkimenoïde E et l'euphactine G	89
6.4.5	Les lathyranes	90
6.5	Caractérisation structurale des phénanthrènes de <i>S.racemosa</i>	96
6.6	Identification de phorboïdes antiviraux	98
6.6.1	Fragmentations caractéristiques des esters de phorbol	98
6.6.2	Annotation du réseau moléculaire de <i>S.guyanensis</i>	98
6.6.3	Annotation du réseau moléculaire de <i>S.racemosa</i>	99
6.7	Discussion	102
6.8	Conclusion	103

Chapitre 7 Inhibiteurs de DENV-2 et ZIKV : 1. Criblage d'extraits d'Euphorbiaceae 105

7.1	Test de l'activité polymérase de la NS5	106
7.1.1	Principe	106
7.1.2	Mise en œuvre	106
7.2	Production de la protéine non-structurale 5	108
7.2.1	Transformation	108

7.2.2	Cultures des bactéries	108
7.2.3	Purification par affinité métallique	109
7.2.4	Purification par exclusion stérique	112
7.2.5	Contrôles et Bilan	112
7.3	Criblage des extraits d'Euphorbiaceae	115
7.3.1	Description des extraits	115
7.3.2	Analyse des résultats	115

Chapitre 8 Inhibiteurs de DENV-2 et ZIKV : 2. Isolements ciblés de composés d'intérêt **119**

8.1	Création d'un réseau moléculaire multi-informatif	119
8.1.1	Cartographie des résultats du criblage	120
8.1.2	Cartographie de la taxonomie	120
8.1.3	Interprétation	120
8.2	Composés d'intérêt de <i>Cordia peltatum</i>	121
8.2.1	Description de la plante	121
8.2.2	Isolement ciblé	121
8.2.3	Caractérisation structurale	121
8.2.4	Activités biologiques	124
8.3	Composés d'intérêt de <i>Koilocarpus longifolium</i>	126
8.3.1	Description de la plante	126
8.3.2	Isolement ciblé et caractérisation	126
8.4	Discussion	128
8.5	Conclusion	130

Partie III Matériels et méthodes **131**

Chapitre 9 Biological assays **133**

9.1	Zika and Dengue RNA-polymerase inhibition assessment	133
9.1.1	Products and Reagents	133
9.1.2	Expression and Purification of Zika and Dengue 2 NS5 Recombinant Proteins	133
9.1.3	Principle of the Assay	134
9.1.4	Screening Assay Determination Based on the Fluorescent Picogreen Assay	134
9.1.5	IC ₅₀ Determination Based on Fluorescent Picogreen Assay	135

9.1.6	Apparent Kd Determination of Compounds by a Fluorescence Polarization Assay	135
9.2	Virus-Cell-Based Anti-Chikungunya Assay	136
Chapitre 10	Phytochemical studies	139
10.1	General Experimental Procedures	139
10.2	Plant Material	140
10.2.1	<i>S.guyanensis</i>	140
10.2.2	<i>C. peltatum</i>	140
10.2.3	<i>S. racemosa</i>	140
10.2.4	<i>K.longifolium</i>	140
10.3	Extraction and isolation	141
10.3.1	<i>S.guyanensis</i>	141
10.3.2	<i>C. peltatum</i>	142
10.3.3	<i>S. racemosa</i>	142
10.3.4	<i>K.longifolium</i>	142
Chapitre 11	LC-MS/MS analysis	143
11.1	Data Dependent LC ESI HRMS ² Analysis	143
11.2	MZmine 2 Data Preprocessing Parameters.	144
11.2.1	<i>S. guyanensis</i>	144
11.2.2	<i>C. peltatum</i>	144
11.2.3	<i>S. racemosa</i>	145
11.2.4	<i>K. longifolium</i>	145
11.3	Molecular Network Analysis	146
11.3.1	<i>S. guyanensis</i>	146
11.3.2	<i>C. peltatum</i>	146
11.3.3	<i>S. racemosa</i>	146
11.3.4	<i>K.longifolium</i>	147
Partie IV	Discussion et conclusion	149
	Discussion	151
	Conclusion générale	157
	Bibliographie	159

Annexes	177
Production scientifique	187

Avant-propos

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

Le papyrus Ebers est l'un des plus vieux documents décrivant l'usage des substances naturelles pour soulager les maux. Un grand nombre de plantes sont décrites dans ce manuscrit regroupant plus de 700 remèdes et formules magiques parmi lesquels des préparations à base de Ricin (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). Au 1^{er} siècle après JC, Dioscoride détaille plus de 600 plantes médicinales dans son livre "De Materia Medica". Cette collection de remèdes résulte de l'expérience acquise au fil des siècles et bon nombre d'informations ne peut être interprété qu'au regard des connaissances de cette époque. Cependant, de nombreuses plantes ont longtemps été utilisées en médecine traditionnelle, à l'image de la digitale pourpre, l'opium ou l'écorce de quinquina qui ont été remplacés dès le début du XIX^{ème} siècle par leur principe actif isolé, la digitoxine, la morphine, la quinine...

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

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

des substances naturelles avec les plateformes de recherche haut débit.

La formidable diversité chimique des produits naturels dépasse de loin la créativité des chimistes. Leur point fort réside notamment dans une structure tridimensionnelle qui s'oppose à la planéité de nombreux composés synthétiques. Toutefois, c'est également un inconvénient. En plus de leur faible accessibilité, du fait de leur complexité, la pharmacomodulation est souvent difficile et coûteuse si bien que les compagnies pharmaceutiques hésitent à investir dans leur optimisation. Néanmoins, du point de vue des interactions cible-ligand, les produits naturels, qu'ils soient issus de plantes, d'organismes marins ou de micro-organismes, demeurent d'excellents candidats. En effet, durant leur biosynthèse, tous les métabolites spécialisés ont déjà "vu" le site de reconnaissance d'une protéine ; ainsi, leurs caractéristiques structurales et leurs propriétés orientent l'interaction avec les protéines et par extension l'activité biologique. Sélectionnées par des millions d'années d'évolution, ces métabolites originaux, aux structures complexes possèdent des propriétés pour la santé et le bien-être de l'Homme. Elles ont, à de nombreuses reprises, inspiré l'industrie pharmaceutique et sont sans nul doute la meilleure source de molécules thérapeutiques.

Cette thèse est divisée en 3 parties (Introduction, Résultats, Matériels et méthodes). La partie introductive est consacrée à la présentation des plantes de la famille des Euphorbiaceae et leurs intérêts en thérapeutique, l'origine des métabolites spécialisés qu'elles produisent, les stratégies de lutte contre les trois virus considérés et enfin la présentation des outils informatiques qui sont à la base de cette étude. Dans la partie Résultats, l'étude phytochimique de deux plantes guyanaises montrant un fort potentiel inhibiteur de la mort cellulaire induite par le virus du chikungunya est présentée. Dans une seconde partie l'isolement ciblé d'inhibiteurs du virus Zika et de la dengue grâce à des outils basés sur la spectrométrie de masse est détaillé. Puisque les noms de nombreux paramètres sont issus de la langue anglaise, la partie Matériels et méthodes est rédigée en anglais. Dans ces travaux la famille des Euphorbiaceae est considérée au sens large, c'est à dire en incluant les Phyllanthaceae.

Liste des figures

1.1	Les grands groupes de plantes.	4
1.2	Schéma de l'inflorescence d' <i>Euphorbia</i> . ⁵	6
1.3	Schéma du cyathe d' <i>Euphorbia</i> . ⁵	6
1.4	<i>Euphorbia lagascae</i>	8
1.5	Exemple de molécules inhibitrices de la MDR	9
1.6	<i>Croton tiglium</i>	10
1.7	Exemple de DM modulateurs des PKCs	11
1.8	<i>Homalanthus nutans</i>	12
1.9	Mécanisme d'action du mébutate d'ingénol. ¹⁴	13
1.10	Mécanisme d'action anti-tumoral de l'EBC46. ³⁷	14
2.1	Structure du paclitaxel (taxol).	16
2.2	Biosynthèse des précurseurs des terpènes chez les plantes. ⁴⁷	18
2.3	Les deux types de cyclisation d'un tetraprenyl phosphate.	19
2.4	<i>Ricinus communis</i>	20
2.5	Schéma biosynthétique des squelettes cembrane et casbane.	21
2.6	Schéma biosynthétique du squelette jokinol C à partir du casbène.	22
2.7	Voie de biosynthèse possible des jatrophanes à partir des lathyranes.	23
2.8	Voie de biosynthèse possible des crotofolanes à partir des jatrophanes.	23
2.9	Hypothèses biosynthétiques du squelette jatrophane.	24
2.10	Hypothèse biosynthétique du squelette <i>abeojatrophane</i> à partir du squelette jatro- phane.	24
2.11	Voie de biosynthèse possible des paralianes, des pépluanes et des ségétanes à partir des jatrophanes. ^{66,67}	25
2.12	Exemples de phorboïdes	26
2.13	Relations topologiques entre les phorboïdes et les autres DM.	27
2.14	Hydroxylation du C-13 d'un tigliane, hydroxylation opposée à la jonction des cycles A et B entre un tigliane et un lathyrane, double liaison 12-13 empêchant la cyclisation entre les positions 8 et 14 d'un lathyrane.	27
2.15	Analyse rétrobiosynthétique du squelette tigliane.	28

2.16	Transposition allylique menant du GGPP au GLPP	29
2.17	Voies de biosynthèse possibles des lathyranes et des tiglianes	29
2.18	Voie de biosynthèse possible des ingénanes	30
2.19	Voie de biosynthèse possible des rhamnofolanes	30
2.20	Voie de biosynthèse possible des daphnanes à partir des tiglianes	31
3.1	Structure du génome des flavivirus et des protéines virales.	35
3.2	Schéma de réplication des flavivirus - Sept protéines non structurales, ainsi que des protéines hôtes (non montrées), forment le complexe de réplication. La protéine NS5 possède une activité ARN-polymérase ARN-dépendante. ⁷⁶	35
3.3	Distribution d' <i>A. albopictus</i> en Europe selon l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)	39
3.4	Modification de la population de moustique <i>via</i> une bactérie endosymbiotique, d'après Flores <i>et al.</i> ¹¹⁰	41
4.1	Structure des tiglianes et des ingénanes	55
4.2	Structure des daphnanes	57
5.1	Représentation vectorielle de deux spectres hypothétiques (A et B) dans un espace tri-dimensionnel (chaque spectre comporte trois <i>m/z</i> , 1, 2, et 3) adapté d'après Wan <i>et al.</i> ²²³	65
5.2	Quatre principales approches de calcul pour exploiter les bases de données de structure sur la base des données de MS/MS Hufsky <i>et al.</i> ²²⁷	68
5.3	Processus de classification chimique par ClassyFire. ²³⁸	70
5.4	Une réaction virtuelle : Le bloc de construction est connecté au linker <i>via</i> le groupement R1 formant un produit intermédiaire et un sous-produit virtuel A-R1 (négligé). Le groupement A du produit intermédiaire subit ensuite une réaction avec le groupement R1 du squelette chimique donnant le produit de réaction final et un second sous-produit A-R1 (également négligé). ²⁴⁷	76
6.1	Structures des diterpènes macrocycliques et phénanthrènes isolés de <i>S.guyanensis</i> et <i>S.racemosa</i>	82
6.2	Schéma de fragmentation de l'extrait brut de <i>S. guyanensis</i> , purification par HPLC préparative ou analytique en phase inverse (sauf *, par chromatographie flash en phase normale)	83
6.3	Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) des composés 67 et 68 . Vue ORTEP du composé 69	85
6.4	Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé 73 et structure de l'euphoractine B. Vue ORTEP des composés 70 - 72	86

6.5	Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé 74	88
6.6	Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) des composés 78 et 79	90
6.7	Vue ORTEP du composé 80 (gauche) et corrélations NOESY du composé 81 (droite).	92
6.8	Vue ORTEP du composé 82	92
6.9	Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé 83	93
6.10	Hypothèse biosynthétique de la formation de l'euphoractane 74 à partir du lathyrane 81	94
6.11	Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) des composés 86 à 88	96
6.12	Fragmentation des PE et dPE en ESI(+).	99
6.13	(A) Réseau moléculaire des fractions F3-F6 de l'extrait de <i>S.guyanensis</i> . (B) Famille moléculaire correspondant à des analogues du phorbol. La quantification relative de chaque ion dans les fractions est représentée par des diagrammes circulaires dépendants de l'aire des pics HPLC. (C) Le spectre du nœud C correspondant à un analogue du TPA issu des bases de données spectrales de GNPS. (D, E, et F) spectres des nœuds D, E, et F montrant les fragments et les pertes de chaînes acyles caractéristiques des phorboïdes.	100
6.14	Annotation du réseau moléculaire des fraction F1-F12 de l'extrait de <i>S.racemosa</i> . La tableau indique les cosines scores entre les spectres expérimentaux et des spectres d'analogues d'esters de phorbol (EP) provenant des bases de données de GNPS et les scores consensus issus du NAP incluant la comparaison aux spectres issus de la fragmentation <i>in silico</i> de bases de données structurales. La quantification relative de chaque ion dans F5 est représentée par des diagrammes circulaires dépendants de l'aire des pics HPLC. Les spectres MS/MS des nœuds A-E montrent des fragments et des pertes de neutres caractéristiques des phorboïdes.	101
6.15	Famille moléculaire d'esters de phorbol retrouvée au sein d'extraits d'écorces de <i>S.guyanensis</i> récoltés à plusieurs périodes de l'année	103
7.1	Schéma de la structure de la protéine NS5 des flavivirus (haut) et principe du test d'évaluation de l'activité ARN polymérase (bas)	107
7.2	Mise en œuvre du test d'inhibition de la NS5 polymérase. Mix Enz. : solution contenant l'enzyme et la chaîne Poly(U) ; Mix Nt : solution contenant l'ATP . . .	107
7.3	Mécanisme de l'induction de l'expression d'un gène par l'IPTG dans une bactérie	109
7.4	Production, purification et test d'activité de la protéine NS5 de ZIKV et DENV-2	113
7.5	Contrôle des différentes étapes de purification de la Full NS5 de ZIKV par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	114

7.6	Résultat des tests d'activité ARN-polymérase	115
7.7	Description de la banque d'extraits d'Euphorbiaceae : nombre d'extraits par genre (en haut), pourcentage des parties de plantes, nombre d'extraits par pays de récolte (en bas)	116
7.8	Régression résiduelle montrant la proportion relative des extraits actifs par genre botanique.	118
8.1	A. Réseaux moléculaire multi-informatif global ; B et C. Cartographie des Pourcentages d'inhibition de la NS5 polymérase de ZIKV (A) et de DENV-2 (B), sous-réseaux de familles moléculaires présentes dans des extraits inhibant les deux polymérases. D. Cartographie de la taxonomie, famille moléculaire retrouvée uniquement chez <i>Codiaeum</i>	122
8.2	Schéma ²⁹¹ et photo de <i>Codiaeum</i> spp. 1. extrémité florifère mâle 2. fleur femelle 3. fleur mâle 4. graine 5. infructescence 6. feuilles jeunes 7. extrémité d'un rameau portant une inflorescence mâle et une inflorescence femelle	123
8.3	Structure des composés 89 - 94 et corrélations HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) clés du composé 89	124
8.4	Schéma ²⁹¹ et photo de <i>Koilodepas longifolium</i> a. extrémité florifère b. bord du limbe montrant un nectaire extrafloral c. fleur mâle (bourgeon staminé) d. bourgeon staminé, avec un sépal en moins montrant les étamines e. une étamine f. fleur femelle (pistillée) g. Fruit h. columelle après déhiscence i. graine	127
8.5	A. Réseaux moléculaire de l'extrait de fruit de <i>Koilodepas longifolium</i> ; B. Chromatogramme UV de l'extrait montrant les deux pics majoritaires ; C. Famille moléculaire annotée. Les liens en violet indiquent un motif partagé par les spectres. D. Spectre MS/MS du composé 96 montrant les fragments (violet) composant le motif commun à la famille moléculaire (acide hydroxycinnamique).	129

Liste des tableaux

1.1	Lignée taxonomique des Euphorbiaceae	5
4.1	Activité Anti-CHIKV des tiglianes et des ingénanes (μM)	52
4.2	Activité Anti-CHIKV des daphnanes (μM)	56
6.1	Données RMN ^1H des composés 67 - 69 (500 MHz, CDCl_3).	84
6.2	Données RMN ^1H des composés 70 à 73 (500 MHz, MeOD (70), CDCl_3 (71 à 73)).	87
6.3	Données RMN ^1H des composés 74 à 77 (500MHz CDCl_3)	88
6.4	Données RMN ^1H des composés 78 et 79 (500MHz, CDCl_3)	89
6.5	Données RMN ^1H des composés 80 à 83 (500MHz CDCl_3)	91
6.6	Données RMN ^{13}C des composés 67, 71, 75, 77 - 80, 83 (125 MHz, MeOD), 68, 69, 72 - 74, 76, 81, 82 (75 MHz CDCl_3) δ_{C} en ppm	95
6.7	Données RMN ^1H et ^{13}C (150 MHz) des composés 86 (600 MHz, CDCl_3), 87 (500 MHz, CDCl_3) et 88 (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$), J en Hz)	97
7.1	Protéines, types de bactéries et de plasmides utilisés	108
7.2	Description des tampons pour la purification de la NS5 de ZIKV (en noir) et de DENV-2 (en gris)	111
7.3	Description et concentration des additifs au tampon de lyse	112
7.4	Bilan de la production et de la purification	114
8.1	Données RMN ^1H et ^{13}C des composés 89 et 90 (600 MHz et 150 MHz, MeOD)	125
8.2	Activité Anti-DENV et Anti-ZIKV des composés 95 et 96 (μM)	128

Abréviations

ACN : acétonitrile

AcOEt : acétate d'éthyle

ADN : acide déoxyribonucléique

Ampi : ampicilline

CAF : chloramphénicol

CBS : casbène synthase

CHIKV : virus du chikungunya

CI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

CYP450 : cytochrome P450 monooxygénase

DAG : diacylglycérol

DM : diterpènes macrocycliques

DMAPP : diméthylallyl diphosphate

dPE : esters de 4-déoxyphorbol

DXP : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate

ESI(+)-HRMS : high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry

FNR : protéines non fixées à la résine d'affinité métallique

Fpel : culot du lysat bactérien

FS : surnageant du lysat bactérien

Ftot : lysat bactérien

GGPP : géranylgéranyl diphosphate

GLPP : géranyllinalyl diphosphate

HMBC : heteronuclear multi-bond connectivity

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

IPP : isopentenyl diphosphate

IPTG : Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside

Mass2Motif : bloc de fragments et de pertes de neutres récurrent observé lors de la décomposition d'un spectre MS/MS par MS2LDA

Abréviations

MDR : Multi-Drug-Resistance

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

MVA : mévalonate

NS5 : Non Structural Protein 5

PE : Phorbol ester

Pgp : glycoprotéine P

PKCs : protéines kinases C

Pool Co : solution contenant la protéine issue de la purification sur résine de cobalt

SI : indice de selectivité

TPA : tétradécanoylphorbol-13-acétate

TX : Triton X-100

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Les Euphorbiaceae

Sommaire

1.1	Introduction	3
1.2	Description	5
1.2.1	L'appareil reproducteur	5
1.2.2	L'appareil végétatif	5
1.2.3	Les laticifères	7
1.3	Intérêt pharmaceutique des diterpènes d'Euphorbiaceae	7
1.3.1	Activité anti-"Multi-Drug-Resistance" (MDR)	7
1.3.2	Modulation de l'activité des PKCs	9
1.3.3	Autres activités	13

1.1 Introduction

Les Euphorbiaceae sont une famille de plantes appartenant à l'ordre des Malpighiales au sein des Angiospermes Eudicotylédones (FIGURE 1.1). Elle est divisée en 4 sous-familles : les cheilosoideae, les acalyphoideae, les crotonoideae et les euphorbioideae (Tableau 1.1). 6547 espèces d'Euphorbiaceae réparties dans 228 genres sont répertoriées à l'heure actuelle. Les genres les plus représentés sont *Euphorbia* et *Croton*.¹ Les Euphorbiaceae sont réparties sur tous les continents à l'exception de l'Arctique et de l'Antarctique. Elles sont mieux représentées dans les régions tropicales où elles possèdent une grande diversité par zone d'habitat. En Guyane française, la majorité des Malpighiales répertoriées sont représentées par les Euphorbiaceae *sensu lato* (*i.e* incluant les Phyllanthaceae). En Nouvelle-Calédonie, les genres *Phyllanthus*, *Cleidion* et *Bocquillonia* sont les plus représentés. Plusieurs espèces présentent une très grande importance économique comme *Hevea brasiliensis* (dont le latex donne le caoutchouc), ou le manioc (*Manihot esculenta*). En horticulture, il existe également les crotons aux feuilles panachées et l'*Euphorbia*

1. TPL. *The Plant List. Euphorbiaceae* 2019. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/> (visité le 01/08/2019).

pulcherrima également appelée Poinsettia ou Étoile de Noël. L'utilisation traditionnelle des Euphorbiaceae est très variée. Elle est due à la diversité de ses métabolites spécialisés dont la un grand nombre est toxique. Cette famille de plante abrite notamment une des substances les plus toxique connue à l'heure actuelle, la ricine, une protéine produite par *Ricinus communis*. En Guyane française, l'huile extraite des graines de *Jatropha curcas*, est utilisée comme purgatif chez les Créoles. Les Palikur et les Wayapi (deux des six peuples autochtones amérindiens de Guyane Française) utilisent son latex comme analgésique dentaire. Les parties aériennes de *Phyllanthus amarus* sont utilisées par les Créoles en tisane comme fébrifuge, diurétique et cholagogue. Enfin, les Wayapi appliquent la sève extraite des tiges de *Omphalea diandra* sur le front pour calmer les maux de tête.² De nombreuses Euphorbiaceae ont également été décrites comme anti-bactériennes, anti-virales, anti-fongiques, insecticides, nématocides ou anti-leishmaniques.³

Les métabolites spécialisés majoritairement retrouvés au sein des Euphorbiaceae sont des dérivés terpéniques et phénoliques. Au sein des terpènes, les diterpènes sont bien représentés (plus de 250 composés décrits) et constituent un intérêt majeur en thérapeutique du fait de leur diversité chimique et de leurs nombreuses activités biologiques.⁴

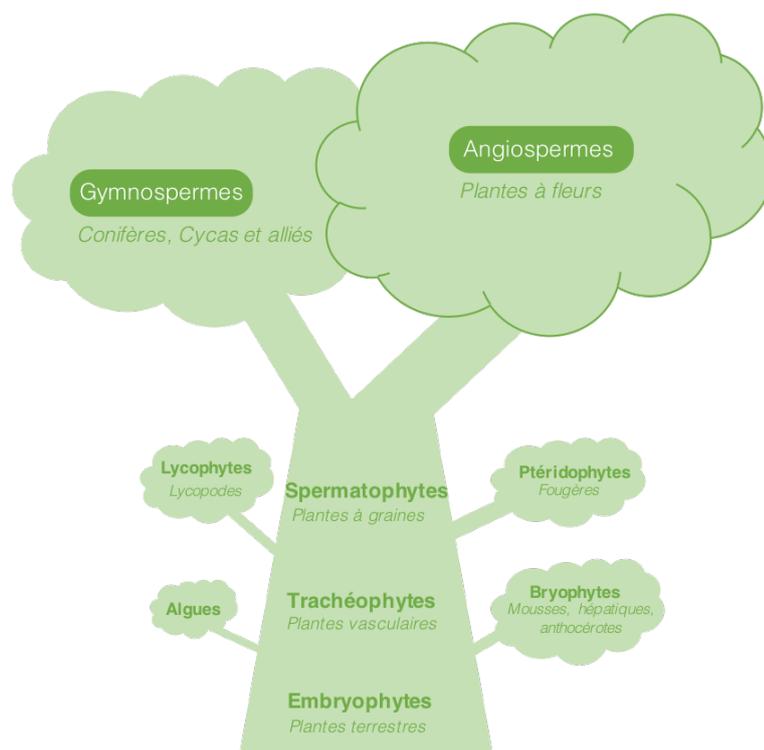


FIGURE 1.1 – Les grands groupes de plantes.

2. GRENAND, P. et al. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane* 1^{re} éd. (éd. IRD (INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT)) **3** (Paris, 2004).

3. MWINE, J. T. & DAMME, P. V. *J. Med. Plants Res.* **5**, 652-662 (2011).

4. VASAS, A. & HOHMANN, J. *Chem. Rev.* **114**, 8579-8612 (2014).

Tableau 1.1 – Lignée taxonomique des Euphorbiaceae

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

1.2 Description

1.2.1 L'appareil reproducteur

Ces plantes n'ont pas de fleur au sens commun du terme, mais elles ont développé une structure florale hautement spécialisée, appelée un cyathe (du grec *kyathos* = coupe) (FIGURE 1.2 et FIGURE 1.3).⁵ Il consiste en un réceptacle en forme de petite coupe contenant les fleurs. Le cyathe peut être unisexué ou bisexué. Lorsqu'il est unisexué, il est composé soit d'une seule fleur femelle, soit de plusieurs fleurs mâles. Le cyathe bisexué quant à lui, contient une fleur femelle entourée de nombreuses fleurs mâles. Autour de ce système, cinq lobes alternent avec cinq nectaires ou glandes. La forme de ces glandes varie en fonction des espèces et c'est leur teinte qui donne sa couleur au cyathe. Des bractées pouvant être colorées entourent le cyathe et participent à l'aspect attractif de l'inflorescence des Euphorbiaceae. Le cyathe bisexuel est le plus commun, tandis que le cyathe unisexué est considéré comme le plus évolué du fait de vestiges de fleurs femelles retrouvés dans les cyathes mâles.⁶ Le fruit est généralement une capsule à trois loges contenant chacune une seule graine. Les graines sont albuminées (huileuse ou renfermant des huiles) et pourvues d'une caroncule, petite expansion charnue appréciée des insectes et autres animaux et favorisant la dissémination des graines.

1.2.2 L'appareil végétatif

L'appareil végétatif des Euphorbiaceae est très varié. Ce sont des arbres, arbustes, herbes, lianes, plantes cactiformes ou encore des herbes aquatiques flottantes. Leurs tiges sont parfois succulentes et leurs racines parfois tubéreuses. Les feuilles sont également très variables mais elles sont souvent longuement pétiolées et alternes.⁷

5. *About the genus Euphorbia* http://www.euphorbiaceae.org/pages/about{_}euphorbia.html (visité le 01/08/2019).

6. PRENNER, G. & RUDALL, P. J. *Am. J. Bot.* **94**, 1612-1629 (2007).

7. WFO. *World Flora Online. Euphorbiaceae* 2019. <http://www.worldfloraonline.org/> (visité le 01/08/2019).

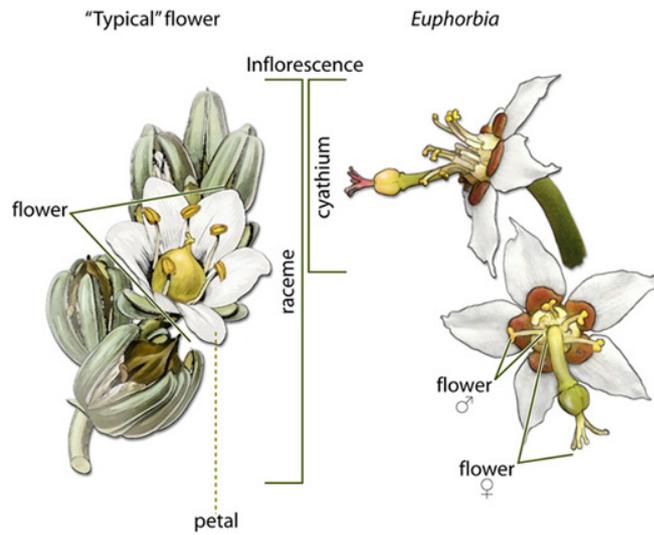


FIGURE 1.2 – Schéma de l'inflorescence d'*Euphorbia*.⁵

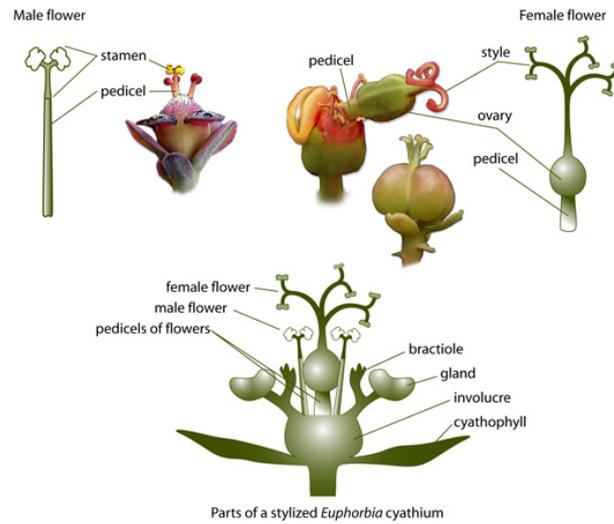


FIGURE 1.3 – Schéma du cyathe d'*Euphorbia*.⁵

1.2.3 Les laticifères

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

- La forme articulée s'organise en vaisseaux constitués de nombreuses cellules jointives. Ces vaisseaux peuvent s'anastomoser pour former des réseaux complexes.
- La forme non-articulée⁸ constituée d'une cellule individuelle multinucléée pouvant s'étendre des racines jusqu'au sommet de la tige.⁹

La composition du latex est un mélange complexe de terpènes, de composés phénoliques, de protéines, et de sucres, etc. À l'heure actuelle, le rôle biologique du latex ne fait pas consensus bien que bon nombre d'auteurs s'accorde sur des fonctions défensives. Le latex permettrait en effet de repousser les animaux et les insectes brouteurs,¹⁰ de tuer ou contrôler la croissance des phytopathogènes et de réparer les blessures de la plante.¹¹

1.3 Intérêt pharmaceutique des diterpènes d'Euphorbiaceae

Les sumériens et les akkadiens connaissaient les propriétés toxiques d'*E. heliosopa* et les propriétés médicinales de l'"euphorbium" (gomme provenant d' *E. resinifera*) sont documentées dans les ouvrages d'Hippocrate, Galien et Dioscoride.¹² Au 18^{ème} siècle, Carl Linnée décrit le genre *Euphorbia* et ses indications dans le traitement des affections de la peau et comme purgatif gastro-intestinal. Plus tard, l'intérêt des diterpènes macrocycliques (DM) d'Euphorbiaceae bioactifs a débuté avec l'isolement et la caractérisation d'esters de phorbol cytotoxiques provenant de *C. tigilium*,¹³ puis la découverte des propriétés antivirales de la prostratine isolée d'*Homalanthus nutans*. Récemment, la découverte de le mébutate d'ingénol (Picato®), un DM isolé d' *E. peplus*, a stimulé la recherche de nouveaux DM d' Euphorbiaceae.¹⁴ Un aperçu des nombreuses propriétés des DM est présenté dans cette section.

1.3.1 Activité anti-"Multi-Drug-Resistance" (MDR)

MDR désigne un phénomène au cours duquel la résistance à un médicament s'accompagne de résistances à différentes classes de médicaments. Le développement de la MDR est une des premières causes d'échec des traitements anti-tumoraux, anti-bactériens et anti-fongiques. Le mécanisme principal de la MDR est la surexpression des glycoprotéines P (Pgp) dans la membrane

8. MAHLBERG, P. *et al.* *Bot. J. Linn. Soc.* **94**, 165-180 (1987).

9. PINTUS, F. *et al.* *Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.* **144**, 381-391 (2010).

10. *Plant-derived Natural Products* (éd. OSBOURN, A. E. & LANZOTTI, V.) (Springer US, New York, NY, 2009).

11. KONNO, K. *Phytochemistry* **72**, 1510-1530 (2011).

12. ERNST, M. *et al.* *J. Ethnopharmacol.* **176**, 90-101 (2015).

13. HECKER, E. *Cancer Res.* **28**, 2338-2348 (1968).

14. ROSEN, R. H. *et al.* *J. Am. Acad. Dermatol.* **66**, 486-493 (2012).

plasmique des cellules résistantes.^{15, 16, 17}

Les Pgp sont des protéines transmembranaires d'efflux appartenant à la superfamille des transporteurs ABC. Ces pompes énergie-dépendantes provoquent la diminution de la concentration intracellulaire des xénobiotiques et induisent la résistance de la cellule au traitement.¹⁵



FIGURE 1.4 – *Euphorbia lagascae*.

Une des stratégies les plus étudiées pour surmonter la MDR est la co-administration d'agents permettant de restaurer l'efficacité des molécules thérapeutiques par inhibition des pompes d'efflux.¹⁸ Un nombre considérable de réverseurs de la MDR ciblant les Pgp a été décrit. Cependant, malgré des résultats encourageants *in vitro*, aucun n'est commercialisé à ce jour du fait de leur manque de spécificité (*e.g.* verapamil et cyclosporine), de leur toxicité (*e.g.* zosuguidar et tariquidar) ou de leur mauvaise biodisponibilité (*e.g.* dexverapamil et elacridar).¹⁹

Ces dernière années, la recherche de substances naturelles modulatrices de la MDR a permis de mettre en évidence la capacité des DM à restaurer la sensibilité des cellules MDR aux agents cytotoxiques²⁰ (FIGURE 1.5) parmi lesquelles les lathyranes et les jatrophanes sont les

15. COLABUFO, N. A. *et al. J. Med. Chem.* **53**, 1883-1897 (2010).

16. WHITE, T. C. *et al. Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 382-402 (1998).

17. LI, X.-Z. & NIKAIDO, H. *Drugs* **69**, 1555-1623 (2009).

18. ECKFORD, P. D. W. & SHAROM, F. J. *ChemInform* **40**, 2989-3011 (2009).

19. ZHU, J. *et al. J. Med. Chem.* **59**, 6353-6369 (2016).

20. DEWANJEE, S. *et al. Molecules* **22**, 871 (2017).

plus représentés. Ces deux genres structuraux possèdent des systèmes cycliques 5/12 et 5/11/3, respectivement, et sont généralement substitués par de nombreux groupement acyles. Les "euphorbia factor" L_{7a} et L₂ isolés d'*E. lathyris* montrent un taux de réversion de la résistance cinq fois supérieur au composé de référence, le verapamil.²¹ Les latilagascenes G, H et I, provenant d'*E. lagascae* (FIGURE 1.4) et l'euphotuckeyanol, un ester de jatrophane isolé d'*E. tuckeyana*, possèdent des interactions synergiques avec l'épirubicine *in vitro*.²² Des travaux récents^{23, 24} montrent également que certains esters de jatrophane peuvent inhiber des transporteurs impliqués dans l'efflux des antifongiques chez *Candida albicans*. Dernièrement, des études approfondies de structure-activité des lathyranes et des jatrophanes¹⁹ ont permis d'élaborer des composés anti-MDR prometteurs dont l'hydrophobie constitue une caractéristique clé.

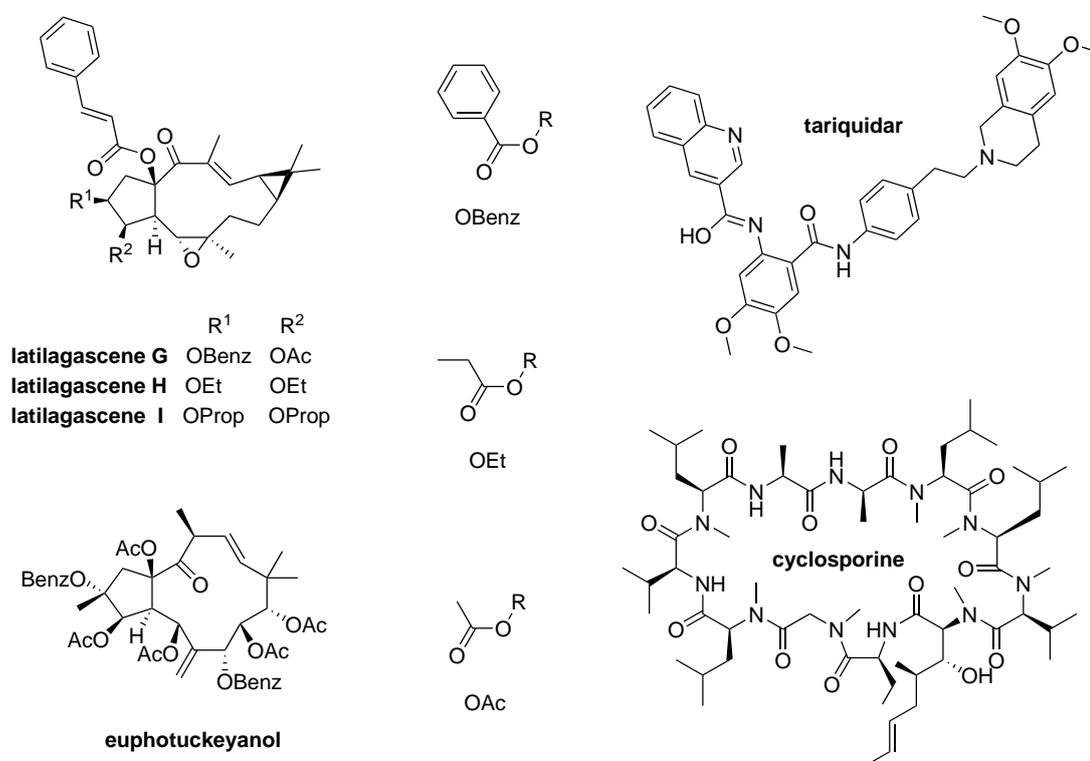


FIGURE 1.5 – Exemple de molécules inhibitrices de la MDR

1.3.2 Modulation de l'activité des PKCs

Les phorboïdes possèdent des propriétés irritantes et pro-tumorales liées à leur capacité à moduler l'activité des protéines kinases C (PKCs)²⁵.

21. JIAO, W. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4786-4792 (2009).
22. DUARTE, N. *et al. Bioorganic Med. Chem.* **16**, 9323-9330 (2008).
23. ESPOSITO, M. *et al. J. Nat. Prod.* **80**, 479-487 (2017).
24. RAWAL, M. K. *et al. J. Nat. Prod.* **77**, 2700-2706 (2014).
25. DAS, J. & RAHMAN, G. M. *Chem. Rev.* **114**, 12108-12131 (2014).

Les PKCs constituent une superfamille de protéines de type sérine-thréonine kinase qui jouent un rôle central dans la transduction de signaux cellulaires. Elles régulent de nombreuses fonctions des cellules telles que leur croissance, leur différenciation et l'apoptose. Physiologiquement, elles sont activées par le calcium et le diacylglycérol (DAG). Les PKCs sont constitués de quatre domaines (C1 à C4) parmi lesquels C1 joue un rôle crucial dans l'activation des PKCs en liant le DAG.²⁵

Propriétés antivirales : le TPA et la prostratine

Le **TPA** ou 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate, est un diester de phorbol isolé de *C. tiglium* (FIGURE 1.6). Sa chaîne tétradécanoate mime les chaînes grasses du DAG faisant du TPA un puissant agoniste des PKCs et un puissant promoteur de tumeur (FIGURE 1.7).



FIGURE 1.6 – *Croton tiglium*.

Durant les années 1990, des études ont montré que le TPA stimulait la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) tout en inhibant la formation des virions.^{26, 27} Ces constatations d'apparence contradictoire sont en fait dues à l'activation des PKC par le TPA (CI₅₀

26. HARADA, S. *et al. Virology* **154**, 249-258 (1986).

27. HOSSAIN CHOWDHURY, M. I. *et al. Virology* **176**, 126-132 (1990).

anti-VIH-1 = 1 nM) qui a deux conséquences principales :

- la diminution de la population des récepteurs CD4, des protéines membranaires nécessaires à l'infection des cellules saines et à la production de nouvelles particules virales.
- l'activation de la voie NF- κ B induisant l'acétylation des histones et donc la transcription du génome viral latent.^{28, 29}

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

La prostratine ou 12-déoxyphorbol-13-acétate (FIGURE 1.7) est un tigliane analogue du TPA isolé pour la première fois des écorces de *Pimelea prostrata* (Thymelaeaceae) puis d'*Homalanthus nutans*³⁰ (FIGURE 1.8). Malgré une CI_{50} anti-VIH-1 (1,3 μ M) environ mille fois supérieure, la prostratine possède le même mécanisme d'action que le TPA²⁹ mais n'exerce pas d'effet protumoral.³¹ Ce profil toxicologique intéressant, lui a valu d'entrer en phase clinique en 2014 pour le traitement du VIH.³² Toutefois aucune information récente n'est disponible sur l'avancée des études. D'autre part, le TPA et la prostratine possèdent également des propriétés inhibitrices de la réplication du virus du chikungunya (CHIKV) bien que ce virus soit différent du VIH.³³ Le chapitre 4 est consacré à cet aspect.

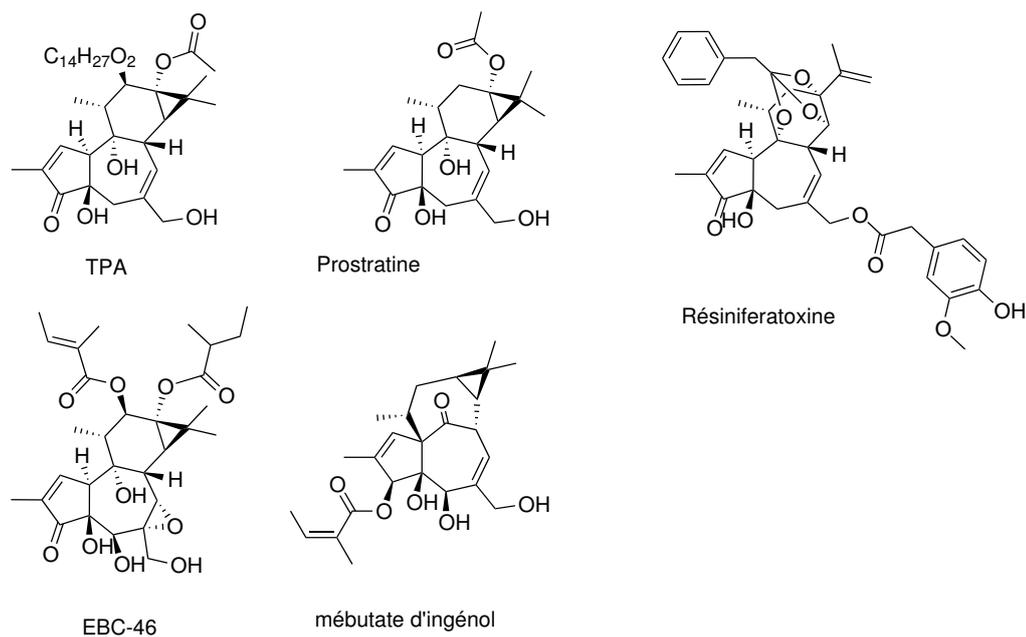


FIGURE 1.7 – Exemple de DM modulateurs des PKCs

28. JIANG, G. & DANDEKAR, S. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **31**, 4-12 (2014).

29. WARRILLOW, D. *et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 854-864 (2006).

30. CASHMORE, A. *et al. Tetrahedron Lett.* **17**, 1737-1738 (1976).

31. SANCHEZ-DUFFHUES, G. *et al. Curr. Drug Targets* **12**, 348-356 (2011).

32. WENDER, P. A. *et al. Science* **320**, 649-652 (2008).

33. BOURJOT, M. *et al. J. Nat. Prod.* **75**, 2183-2187 (2012).



FIGURE 1.8 – *Homalanthus nutans*.

Activité anti-tumorale : le mébutate d'ingénol, l'EBC-46

Le mébutate d'ingénol est un produit naturel identifié à partir du latex d'*Euphorbia peplus*,³⁴ qui est utilisé comme gel topique (Picato®) pour le traitement des kératose actiniques.³⁴ Son profil pro-inflammatoire dénué d'effet promoteur de tumeur lui a valu d'être le sujet d'études approfondies mettant en évidence son pouvoir inducteur de l'apoptose dans les tumeurs de la peau. L'effet pro-apoptotique causé par l'activation des PKCs, associé au recrutement des neutrophiles lors de l'application cutanée, conduit à une nécrose du tissu puis à sa guérison (FIGURE 1.9).³⁵

L'EBC-46 ou tigilanol tiglate est un tigliane anticancéreux de la société QBiotics, en développement pour le traitement local des tumeurs solides. La molécule est isolée à partir des baies de *Fontainea picrosperma*, une Euphorbiaceae australienne. L'EBC-46 est un activateur des protéines kinases C (PKCs) qui, lorsqu'il est injecté dans les tumeurs solides, provoque une nécrose hémorragique induisant une mort rapide des cellules tumorales et la destruction définitive de la tumeur.³⁶

QBiotics a récemment terminé la première étude d'innocuité chez l'Homme. Cette étude clinique de phase I/IIA a été menée chez 22 patients atteints de tumeurs solides cutanées et sous-cutanées réfractaires. Les résultats ont montré une bonne tolérance après injection intratumorale. Les effets indésirables se sont généralement limités à un gonflement transitoire du site tumoral (dû à l'inflammation). De plus, des signes encourageants d'efficacité ont été démontrés dans

34. HOU, J. J. *et al. Chin. J. Nat. Med.* **15**, 766-774 (2017).

35. CHALLACOMBE, J. M. *et al. J. Immunol.* **177**, 8123-8132 (2006).

36. MILLER, J. *et al. Front. Vet. Sci.* **6**, 106 (2019).

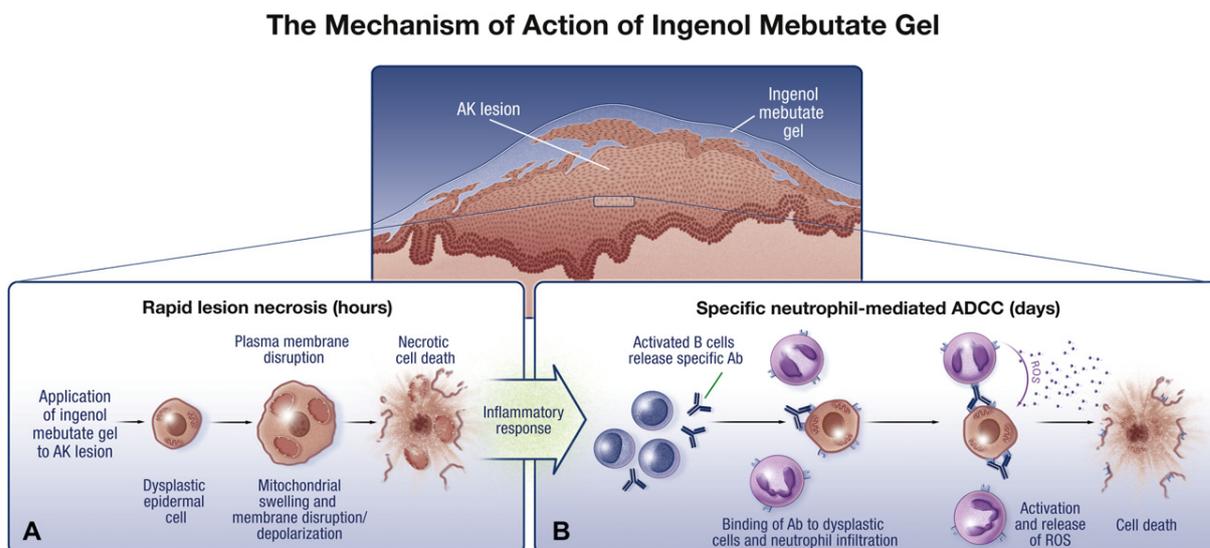


FIGURE 1.9 – Mécanisme d'action du mébutate d'ingénol.¹⁴

tous les types de tumeurs, la destruction complète de la tumeur ayant été observée chez les patients dont la dose atteignait 50% du volume de la tumeur. Enfin, une bonne cicatrisation du site d'injection a été observée et la dose maximale tolérée n'a pas été atteinte. Les résultats de cette étude encouragent la poursuite du développement du médicament. QBiotics procède actuellement à un essai pilote de phase IIA dans le cancer de la tête et du cou et prévoit deux essais exploratoires de phase IIA.³⁷

La société QBiotics, mène également des études chez le chat, le chien et le cheval pour le traitement de tumeurs solides inopérables. La société prévoit ainsi de commercialiser des préparations topiques et injectables pour le secteur vétérinaire.

1.3.3 Autres activités

La résiniferatoxine, un DM à squelette daphnane isolé d'*Euphorbia resinifera* est un activateur de TRPV1, un récepteur ionotrope impliqué dans la perception de la douleur. Il s'agit donc d'une molécule intéressante pour le développement d'analgésique à longue durée d'action.³⁸

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

- inhibition de la topoisomérase II
- de la synthèse de l'ADN

37. QBiotics Group <https://qbiotics.com> (visité le 27/05/2019).

38. KISSIN, I. & SZALLASI, A. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2159-2170 (2011).

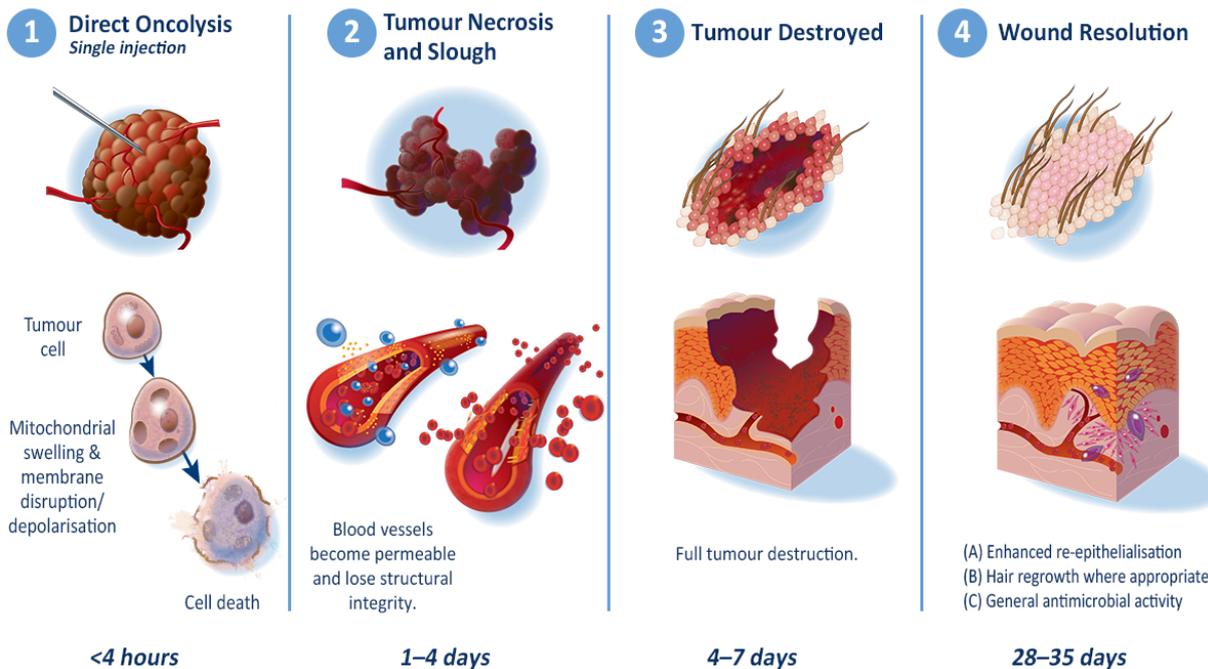


FIGURE 1.10 – Mécanisme d'action anti-tumoral de l'EBC46.³⁷

- modulation des PKC
- induction de l'apoptose soit par l'inhibition de IL-6 et STAT3 ou par l'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B.⁴

Sur des modèles *in vitro* de vasoconstriction, certains lathyranes possèdent également la capacité à relaxer le muscle lisse de façon comparable à celle du verapamil.³⁹ Des myrsinanes et pré-myrsinanes ont démontré des activités neuroprotectrices *in vitro* et certains DM possèdent des propriétés immunomodulatrices, anti-bactériennes et pesticides.^{4, 40}

39. TIAN, Y. *et al.* *J. Nat. Prod.* **74**, 1221-1229 (2011).

40. XU, J. *et al.* *Fitoterapia* **83**, 1205-1209 (2012).

Chapitre 2

Biosynthèse des diterpènes

Sommaire

2.1 Les métabolites précurseurs	16
2.1.1 La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)	16
2.1.2 La voie du mévalonate (MVA)	16
2.2 Les voies de biosynthèse	17
2.3 Les différents squelettes	19
2.3.1 Les cembranes et les casbanes	19
2.3.2 Les lathyrane et leurs dérivés	21
2.3.3 Les jatrophanes et leurs dérivés	23
2.3.4 Les phorboïdes et leurs dérivés	25

Les terpènes sont des hydrocarbures aux structures très variées. Ils constituent la plus grande famille de produits naturels avec plus de 35 000 composés connus. Ils dérivent d'unités isoprènes assemblées de manière "tête-à-queue" donnant des squelettes carbonés typiques en $(C_5)_n$. Les terpènes sont classés selon le nombre d'unité isoprène en hémiterpène (C_5), monoterpène (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), triterpènes (C_{30}), et tétraterpènes (C_{40}). Les plus légers sont les composants principaux des huiles essentielles, tandis que les polymères les plus lourds sont retrouvés dans les latex, les gommages et les résines. Leur nom fait référence à la térébenthine, une oléorésine isolée d'un pin connue pour ses propriétés antiseptiques et décongestionnantes. L'isoprène est considéré comme l'unité de base des terpènes car il s'agit de leur produit de décomposition. Cependant, il n'est pas directement impliqué dans la formation de ces composés. Les précurseurs biochimiquement actifs sont en fait des esters de diphosphate (pyrophosphate), le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) et l'isopentenyl diphosphate (IPP) qui se condensent par addition électrophile. La majorité des terpènes subissent ensuite des réactions de cyclisation ; ce qui explique la rareté des terpènes linéaires (*e.g.* géraniol, squalène). Dans de nombreux cas des réarrangements et des fonctionnalisations ont lieu à tel point qu'il est parfois difficile de reconnaître l'arrangement linéaire des unités isopréniques (FIGURE 2.1).⁴¹ Les diterpènes sont des composés

41. DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach : Third Edition* 1-539 (2009).

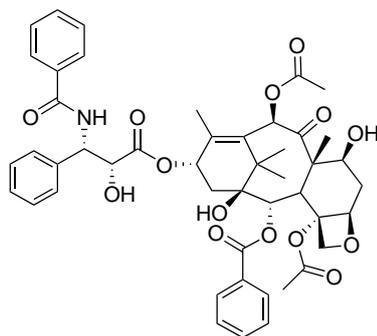


FIGURE 2.1 – Structure du paclitaxel (taxol).

issus de l'assemblage de quatre unités isopréniques et la grande majorité sont cycliques. Ils sont classés en deux catégories en fonction du type de cyclisation : les diterpènes polycycliques et les diterpènes macrocycliques (DM). La distribution des DM est limitée aux Euphorbiaceae et aux Thymelaeaceae tandis que les diterpènes polycycliques sont retrouvés dans de nombreuses autres familles de plantes.⁴ Le premier DM d'Euphorbiaceae, l'euphorbiasteroïde a été isolé en 1937 de l'huile de graine d'*Euphorbia lathyris*. Sa structure basée sur un squelette lathyrane a été élucidée en 1970.⁴² Actuellement, les diterpènes isolés de plantes comptent plus de 10 000 structures.⁴³

2.1 Les métabolites précurseurs

Dans les plantes, l'IPP et le DMAPP peuvent être synthétisés selon deux voies compartimentées (FIGURE 2.2) :

2.1.1 La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)

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

2.1.2 La voie du mévalonate (MVA)

La voie du MVA a lieu dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et les péroxisomes. La condensation de trois molécules d'acétyl-CoA donne d'abord le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA réductase réalise ensuite la transformation irréversible de l'HMG-CoA en MVA menant à la formation de l'acide mévalonique qui est ensuite converti en IPP. Contrairement à la voie MEP, la voie MVA ne produit que l'IPP. Or le cation allylique issu du

42. ADOLF, W. *et al.* *Tetrahedron Lett.* **11**, 2241-2244 (1970).

43. ZERBE, P. *et al.* *Plant Physiol.* **162**, 1073-1091 (2013).

DMAPP est essentiel aux réactions d'élongation de la chaîne isoprényle. L'IPP produit par la voie du MVA doit donc être converti en DMAPP par l'intermédiaire des IPP isomérases de type 1 et 2.^{44, 45}

Les hommes, les animaux, les champignons, les archeae et quelques bactéries Gram+ dépendent exclusivement de la voie du MVA tandis que la plupart des bactéries utilisent uniquement la voie MEP pour la synthèses des terpènes. Les IPP isomérases sont donc indispensables aux organismes ne possédant que la voie MVA. Les plantes, quant à elles, peuvent emprunter l'une ou l'autre de ces voies. Cette particularité est due à l'acquisition de la voie MEP par l'endosymbiose d'une cyanobactérie au cours de l'évolution, ce qui expliquerait le confinement de la voie MEP dans les plastes au sein des plantes.^{46, 47}

Les plastes sont des organites semi-autonomes possédant un ADN propre. Ils sont retrouvés dans pratiquement toutes les plantes et algues. Les plastes jouent des rôles clés dans la photosynthèse (chloroplastes), la synthèse des lipides et des acides-aminés (protéino-plaste), le stockage de l'amidon et des huiles (amyloplaste et élaio-plaste respectivement), la couleur des fruits et des fleurs, voir la perception de l'environnement. Ils sont retrouvés dans toutes les parties de la plante, notamment les laticifères d'où la présence de nombreux DM dans le latex d'Euphorbiaceae.^{48, 49}

2.2 Les voies de biosynthèse

La cyclisation du précurseur tetraprényl, le géranylgeranyl diphosphate (GGPP) médiée par la formation d'un carbocation, puis de potentiels réarrangements de Wagner-Meerwein, permet la production d'une grande diversité de squelettes carbonés notamment au sein des Euphorbiaceae. Les diterpènes peuvent être classés selon le type de cyclisation de leur précurseur (FIGURE 2.3) :

- Les diterpènes polycycliques dérivent de la cyclisation en cascade du GGPP sous l'action de cyclases de type 2. Ils sont représentés principalement par les abiétanes, les pimaranes, les kauranes, les atisanes et les trachylobanes.
- Les DM dérivent de la cyclisation de type tête-à-queue du GGPP sous l'action des cyclases de type 1. Le mécanisme implique la formation d'un cation et différentes étapes de cyclisation formant des composés monocycliques dérivés du cembrane, bicycliques dérivés du casbane (section 2.3.1) tricycliques dérivés du lathyrane (section 2.3.2).⁵⁰

Les DM possèdent d'importants intérêts économiques et pharmaceutiques. Les progrès récents en génomique et biotechnologie fournissent des solutions efficaces pour la production des terpènes structurellement complexes. La reproduction des voies biosynthétiques par bio-ingénierie

44. ROHMER, M. in *Compr. Nat. Prod. II Chem. Biol.* (éd. MANDER, L. & LIU, H. W.) 2^e éd., 517-555 (Elsevier Ltd, 2010).

45. KUZUYAMA, T. *et al.* in *Compr. Nat. Prod. II* 493-516 (2010).

46. FRANK, A. & GROLL, M. *Chem. Rev.* **117**, 5675-5703 (2017).

47. ARENDT, P. *et al.* *Plant J.* **87**, 16-37 (2016).

48. CASTELBLANQUE, L. *et al.* *Plant Physiol.* **172**, 1032-1044 (2016).

49. WISE, R. R. in *Struct. Funct. Plast.* (éd. WISE, R. R. & HOOBER, J. K.) 3-26 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2006).

50. APPENDINO, G. in *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2**, 1-90 (2016).

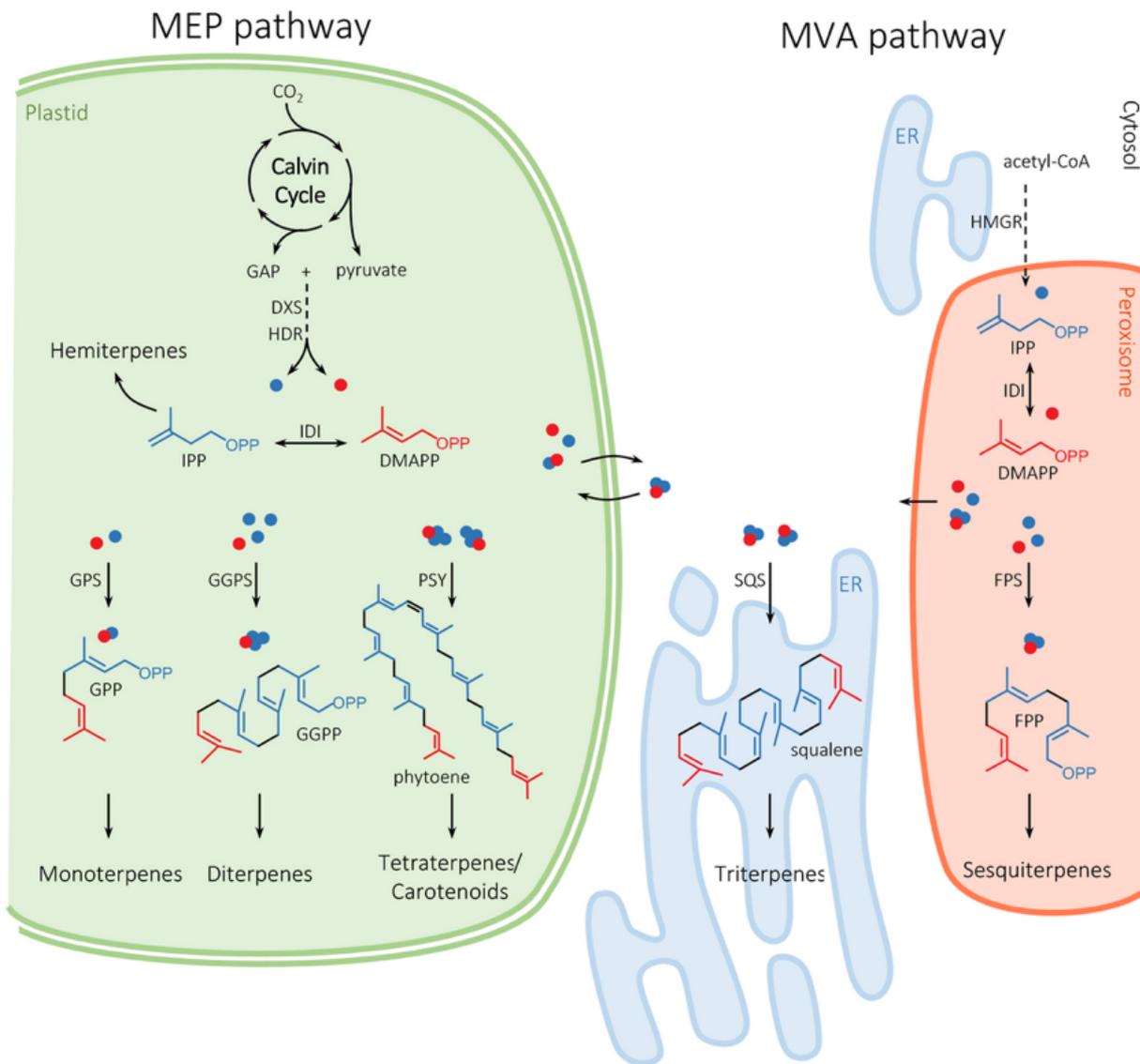


FIGURE 2.2 – Biosynthèse des précurseurs des terpènes chez les plantes.⁴⁷

implique leur connaissance approfondie, cependant, elles restent à l'heure actuelle très peu décrites. La section 2.3 présente les voies de biosynthèse des principaux squelettes de DM proposées dans la littérature.

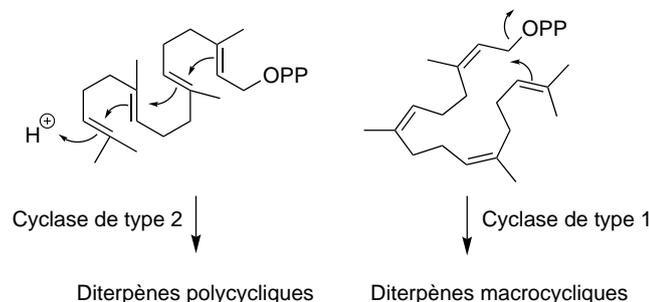


FIGURE 2.3 – Les deux types de cyclisation d'un tetraprenyl phosphate.

2.3 Les différents squelettes

2.3.1 Les cembranes et les casbanes

Le squelette cembrane consiste en un macrocycle de 14 carbones substitué par un groupement isopropyle en position 1 et trois méthyles en positions 4, 8 et 12. Les cembranes naturels sont fonctionnalisés par des sucres, des alcools, des lactones. Isolée pour la première fois d'un pin en 1926, la structure du squelette cembrane n'a pu être établie formellement qu'en 1962.⁵¹ Le cation cembrène est considéré comme l'intermédiaire commun à la production de tous les squelettes de DM par différentes séquences enzymatiques.⁵² Le squelette casbane se distingue du cembrane, par le remplacement du groupe isopropyle par un cyclopropane, substitué par un groupement gem-diméthyle. Isolé pour la première fois en 1970, le casbène issu de la cyclisation du cembrène est un diterpène bicyclique servant de phytoalexine chez *Ricinus communis* (FIGURE 2.4).⁵³ Peu d'informations sont disponibles quant aux voies de biosynthèse menant aux dérivés du casbène. Cependant, il est admis que le groupement diphosphate du GGPP est d'abord clivé pour former un cation délocalisé, qui interagit ensuite avec la double liaison 14-15 pour conduire au cation cembrène macrocyclique. Enfin, la formation du cyclopropane par perte d'un proton donne le casbène (FIGURE 2.5).

La casbène synthase

La séquence décrite ci-dessus est catalysée par une seule enzyme appelée casbène synthase (CBS). La casbène synthase a été purifiée de *Ricinus communis* en 1978 et peut être identifiée

51. WEINHEIMER, A. J. *et al.* in *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* (éd. HERZ, W., GRISEBACH, H. AND KIRBY, G. W.) 285-387 (Springer Vienna, Vienna, 1979).

52. ADOLF, W. & HECKER, E. *Isr. J. Chem.* **16**, 75-83 (1977).

53. ROBINSON, D. R. & WEST, C. A. *Biochemistry* **9**, 70-79 (1970).



FIGURE 2.4 – *Ricinus communis*

comme l'enzyme catalysant la biosynthèse du casbène à partir du GGPP.⁵⁴ Un cation divalent est probablement crucial pour le clivage enzymatique du diphosphate allylique au début du cycle catalytique mais le mécanisme n'a pas encore été élucidé. Pendant longtemps ce fut le seul rapport de la caractérisation d'une enzyme catalysant les réactions de cyclisation menant aux squelettes carbonés des DM. C'est seulement récemment que les équipes de Demura puis Keasling ont réussi à isoler et cloner des homologues de la casbène synthase chez un *Jatropha* sp. et des *Euphorbia* spp., respectivement. N'ayant pas réussi à isoler d'autres diterpènes synthases, chez les espèces produisant des squelettes plus complexes que le casbane (*i.e.* phorboïdes et lathyranes), les auteurs confirment le rôle critique de la CBS dans la biosynthèse des DM et suggèrent l'implication des cytochromes P450 monooxygénases (CYP450) dans la production des DM fonctionnalisés. Par ailleurs, ils caractérisent la néocembrène synthase chez *R. communis* qui catalyse la formation du néocembrène via le cation cembrène. Il s'agit de la première description du gène de la néocembrène synthase mais son rôle dans la biosynthèse des diterpènes d'Euphorbiaceae reste à clarifier.^{55, 56}

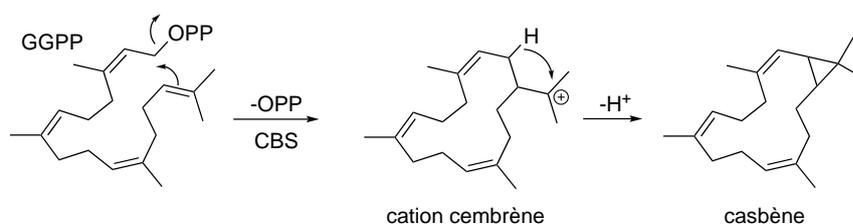


FIGURE 2.5 – Schéma biosynthétique des squelettes cembrane et casbane.

2.3.2 Les lathyranes et leurs dérivés

Les lathyranes

Les lathyranes sont caractérisés par une structure de type 5/11/3, un cyclopentane fusionné à un macrocycle à 11 carbones portant lui-même un cyclopropane. Le squelette lathyrane isolé pour la première fois d'*E. lathyris* suscite l'intérêt du fait de la capacité de cette famille de molécules à inhiber les transporteurs ABC, les protéines d'efflux responsables de la perte d'efficacité des traitements des cancers multirésistants⁵⁷ (section 1.3.1). Le casbène a été proposé comme le premier intermédiaire des DM plus complexes retrouvés au sein des Euphorbiaceae dont le squelette lathyrane. Cependant, les mécanismes de cyclisation intramoléculaires et les réarrangements menant aux lathyranes restent hypothétiques. Les lathyranes possèdent des degrés d'oxydation supérieurs à ceux des casbènes de sorte que les cyclisations intramoléculaires semblent avoir lieu

54. DUEBER, M. T. *et al. Plant Physiol.* **62**, 598-603 (2008).

55. NAKANO, Y. *et al. Plant Biotechnol.* **29**, 185-189 (2012).

56. KIRBY, J. *et al. Phytochemistry* **71**, 1466-1473 (2010).

57. KING, A. J. *et al. ChemBioChem* **17**, 1593-1597 (2016).

selon des voies communes contrôlées par les CYP450.⁵⁸ Cette relation entre cyclisation et degré d'oxydation peut fournir des informations clés dans la formation des DM. C'est ainsi que l'équipe de King a démontré que les CYP450 ne sont pas uniquement responsables de la décoration des squelettes de DM mais qu'ils initient des cyclisations intramoléculaires⁵⁷.

La conversion du casbène en lathyrane implique la création d'une liaison entre les positions 6 et 10 (numérotation des casbanes, 4 et 15 : numérotation des lathyranes). Cette cyclisation requiert l'activité de deux CYP450 pour former un intermédiaire 6-hydroxy-5,9-dicétocasbène dont un des tautomères (9-hydroxy-5,6-dicétocasbène) peut subir une aldolisation (FIGURE 2.6).

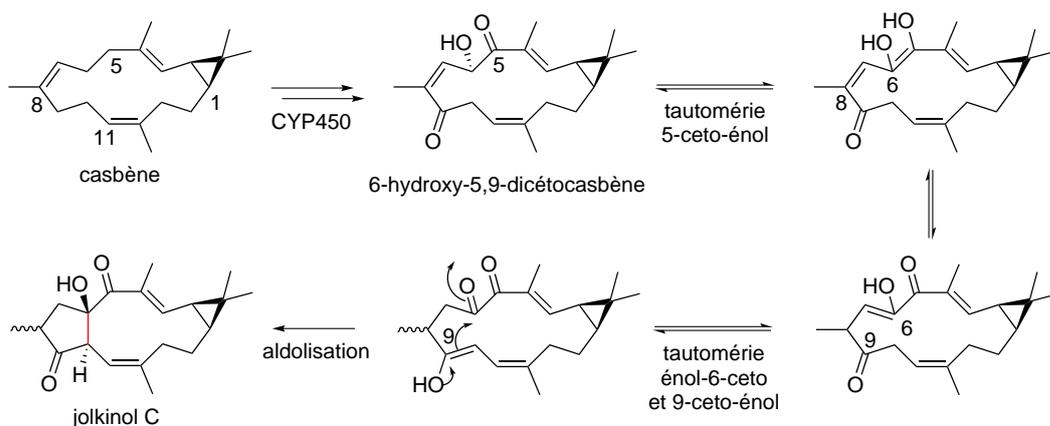


FIGURE 2.6 – Schéma biosynthétique du squelette jokinol C à partir du casbène.

Les Jatrophanes et les (iso)crotofolanes

Les jatrophanes sont des diterpènes rares caractérisés par un système tétracyclique 5/6/7/3 isolés pour la première fois de *Jatropha gossypifolia* puis de *Jatropha elliptica* et *Jatropha curcas*. Selon Duarte *et al.*, ils pourraient dériver des lathyranes dont l'oxydation de la position 13 permettrait la fermeture transannulaire du macrocycle entre les positions C-5 et C-12 (FIGURE 2.7).²²

Le squelette crotofolane a été isolé et caractérisé pour la première fois en 1975 à partir de *Croton corylifolius*.⁵⁹ Le mécanisme de biosynthèse proposé, consiste en l'ouverture du cyclopropane du squelette jatrophanes, pour conduire au squelette crotofolane et le squelette isocrotofolane selon la nature du clivage de la liaison 10-11 ou de la liaison 9-10, respectivement (FIGURE 2.8).⁶⁰

58. LUO, D. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5082-5089 (2016).

59. CHAN, W. R. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4437-4439 (1975).

60. CHÁVEZ, K. *et al. Nat. Prod. Commun.* **8**, 1934578X1300801 (2019).

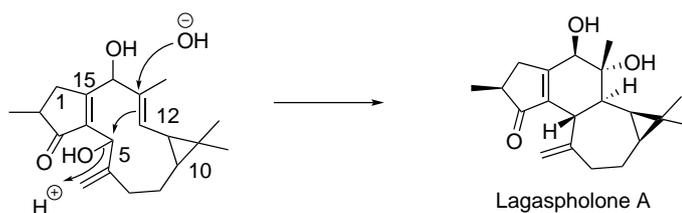


FIGURE 2.7 – Voie de biosynthèse possible des jatropholanes à partir des lathyranes.

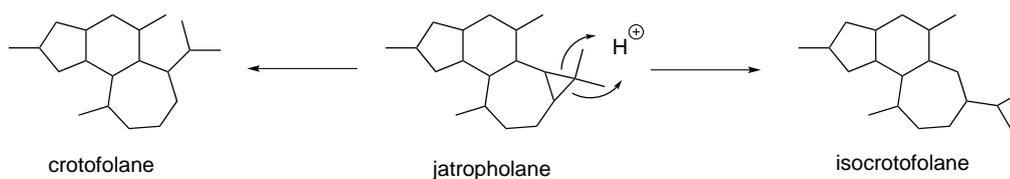


FIGURE 2.8 – Voie de biosynthèse possible des crotofolanes à partir des jatropholanes.

2.3.3 Les jatrophanes et leurs dérivés

Les jatrophanes et les *abeo*-jatrophanes

Les jatrophanes sont caractérisés par une structure de type 5/12 : un cyclopentane hautement fonctionalisé et fusionné à un macrocycle à 12 carbones. Ils existent exclusivement chez les Euphorbiaceae en général sous forme de polyesters. La jatrophone, première molécule de type jatropane, a été isolée de *Jatropha gossypifolia*.⁶¹ Les jatrophanes ne possèdent pas le cyclopropane présent chez les lathyranes ou les casbanes. Les informations concernant la biosynthèse des jatrophanes sont rares. Néanmoins, trois hypothèses ont été proposées pour expliquer la formation du squelette jatropane :

- le macrocycle peut provenir du cembrène cationique par une séquence de réarrangements de Wagner-Meerwein.
- il pourrait également provenir du casbène si la formation du cyclopentane intervient après l'ouverture du cyclopropane.
- il pourrait être formé à partir du lathyrane si la formation du cyclopentane intervient avant l'ouverture du cyclopropane.⁶²

Le squelette de type 1(15→14)*abeo*-jatropane diffère du squelette jatropane par la transformation de la liaison 1-15 en liaison 1-14. Cette extension de cycle peut être le résultat du réarrangement [13-14] α -cétol (pinacolique) d'un jatropane oxydé en positions 14 et 15 (FIGURE 2.10).⁶³

61. KUPCHAN, S. M. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 2295-2300 (1976).

62. LANZOTTI, V. in *Nat. Prod.* (éd. RAMAWAT, K. G. & MERILLON, J.-M.) 3173-3191 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013).

63. ALBERTO MARCO, J. *et al.* *Phytochemistry* **47**, 1621-1630 (1998).

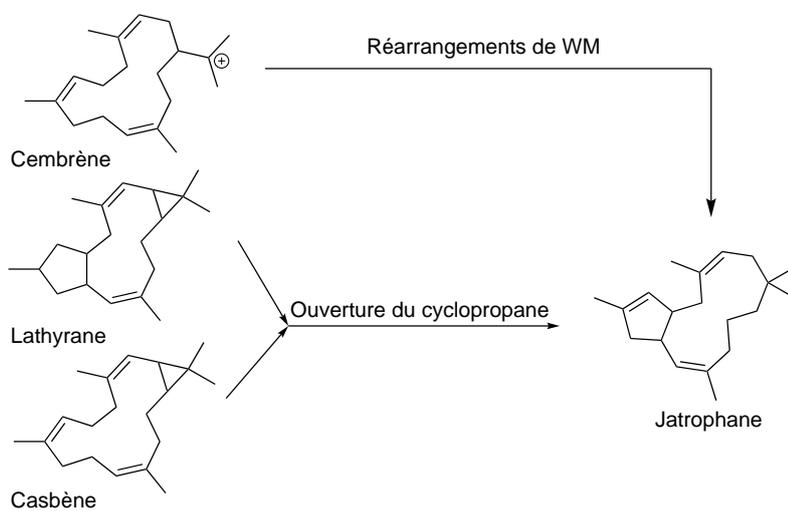


FIGURE 2.9 – Hypothèses biosynthétiques du squelette jatrophane.

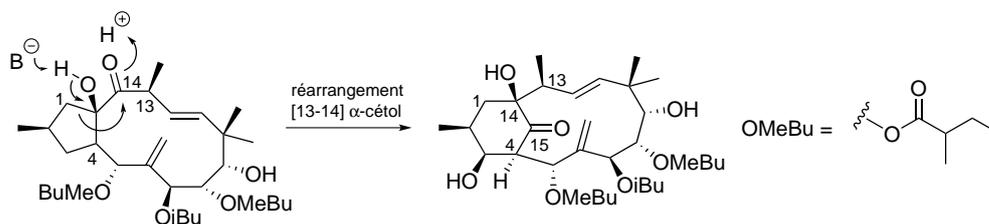


FIGURE 2.10 – Hypothèse biosynthétique du squelette *abeojatrophane* à partir du squelette jatrophane.

Les paralianes, les pépluanes et les ségétanes

Les paralianes isolés pour la première fois d'*Euphorbia paralias* en 1998 sont des systèmes tétracycliques 5/6/5/5 rares, probablement formés par une cyclisation transannulaire des jatrophanes.⁶⁴ Cette hypothèse s'appuie sur le fait que des jatrophanes sont systématiquement co-isolés.⁶⁵ L'introduction d'un alcool primaire sur le gem-diméthyle, suivi d'une expansion de cycle, complète la formation du squelette pépluane (5/6/5/6). Le diol vicinal acétylé (C-8 et C-9) retrouvé chez tous les pépluanes connus, peut être expliqué par une époxydation enzymatique (Δ^{8-9}) suivie d'une ouverture de l'époxyde. Les ségétanes découverts en 1997 à partir d'*E. segetalis* peuvent de la même manière dériver d'un jatropane époxydé en (Δ^{6-17}) 4 (FIGURE 2.11).^{66, 67}

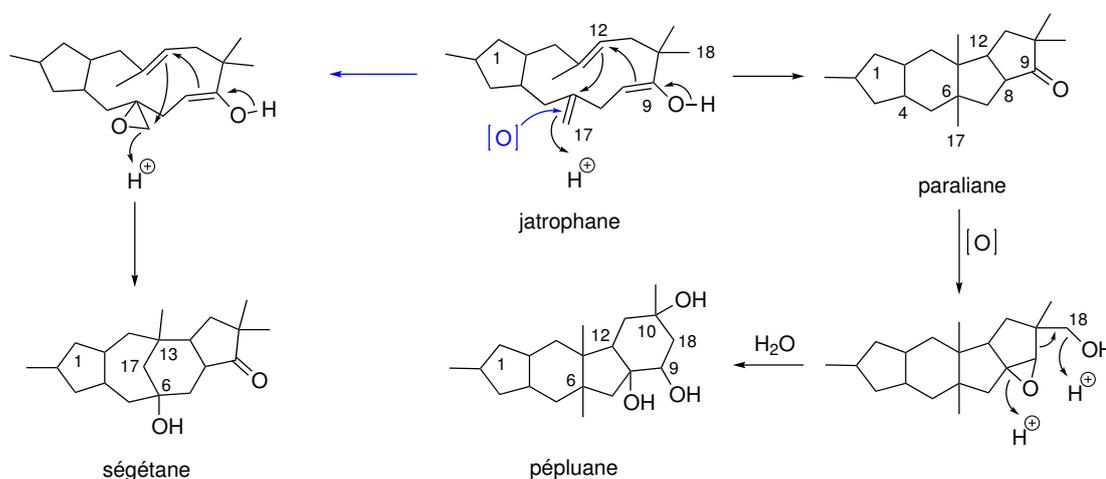


FIGURE 2.11 – Voie de biosynthèse possible des paralianes, des pépluanes et des ségétanes à partir des jatrophanes.^{66,67}

2.3.4 Les phorboïdes et leurs dérivés

Les phorboïdes sont une famille de diterpènes polycycliques structurellement reliés au squelette tigiane du phorbol et incluent les ingénanes comme l'ingénol-palmitate et les daphnanes comme la daphnétoxine (FIGURE 2.12). Le tigiane a été isolé pour la première fois en 1934. Le squelette ingénane quant à lui, a été découvert bien plus tard en 1967 du fait d'une distribution limitée, d'une instabilité chimique et d'une faible concentration dans les plantes. Enfin le premier daphnane a été isolé et caractérisé en 1970.⁶⁸

64. JAKUPOVIC, J. M. *Phytochem.* **47**, 1611-1620 (1998).

65. ZHOU, B. *et al. J. Nat. Prod.* **79**, 1952-1961 (2016).

66. BARILE, E. & LANZOTTI, V. *Org. Lett.* **9**, 3603-3606 (2007).

67. JAKUPOVIC, J. *et al. Phytochemistry* **47**, 1583-1600 (1998).

68. HECKER, E. in *Pharmacogn. Phytochem.* (éd. H. WAGNER, L. H.) 147-165 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011).

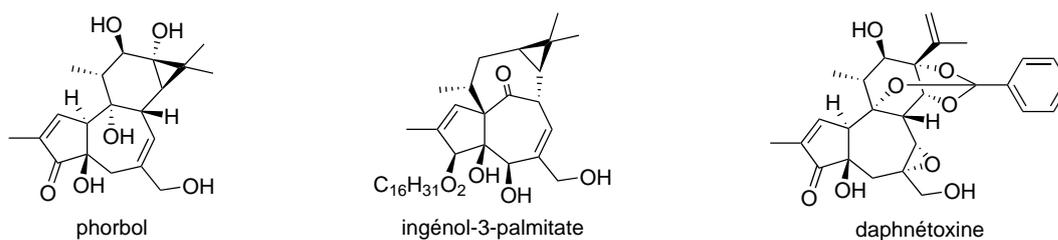


FIGURE 2.12 – Exemples de phorboïdes

D'un point de vue structural, les phorboïdes sont des diterpènes polycycliques, mais d'un point de vue biosynthétique, ils dérivent de précurseurs macrocycliques. Même si il n'y a pas consensus, une vaste majorité des auteurs s'accorde sur le fait que les phorboïdes seraient le résultat de la cyclisation des lathyranes. Cependant, malgré des similarités entre le squelette lathyrane et le squelette tigiane, la relation entre les phorboïdes et les autres DM reste énigmatique. Les tiglianes peuvent théoriquement être convertis dans d'autres types de phorboïdes par des réarrangements cationiques typiques de la chimie des isoprènes et les incertitudes concernant ces mécanismes résident dans la formation de la liaison 8-14 qui différencie les phorboïdes des lathyranes. Cette section explique la théorie de Jakupovic décrite par Appendino concernant l'origine des phorboïdes.⁵⁰

Les lathyranes et les phorboïdes : une relation contestée

Malgré une connectivité carbone-carbone similaire entre les lathyranes et les tiglianes, plusieurs problèmes remettent en question une relation directe entre ces deux classes de composés (FIGURE 2.13) :

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

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

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

D. La plupart des lathyranes contiennent au moins une double liaison endocyclique (*E*), ce

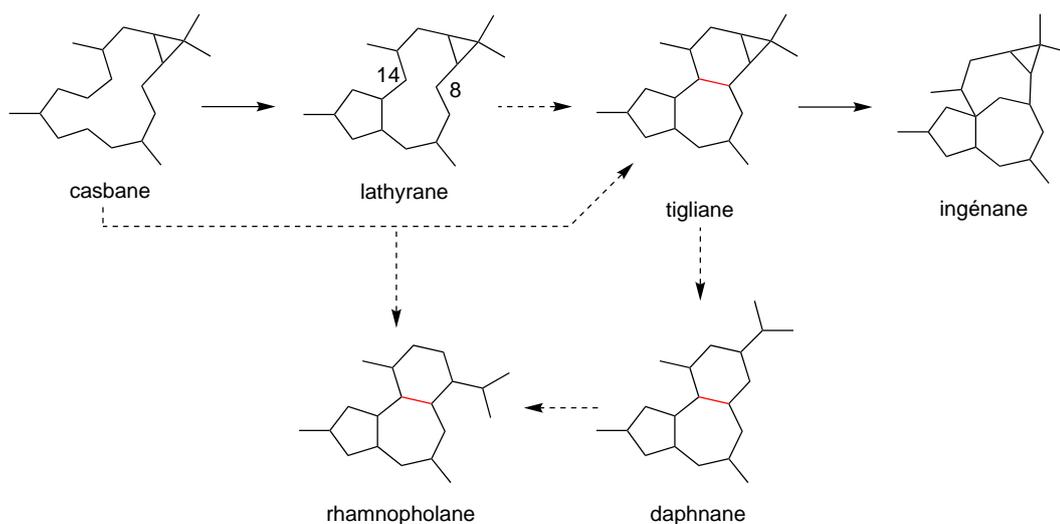


FIGURE 2.13 – Relations topologiques entre les les phorboïdes et les autres DM.

qui d'une part, empêche l'interaction spatiale entre C-8 et C-14, et d'autre part, fait que la cyclisation en tigliane est impossible car les doubles liaisons (*E*) ne peuvent exister que dans les cycles à plus de 8 carbones. La cyclisation cationique des lathyranes permet le réarrangement en une grande variété de squelettes de diterpènes, dont aucun ne ressemble au squelette tigliane.⁶⁹

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

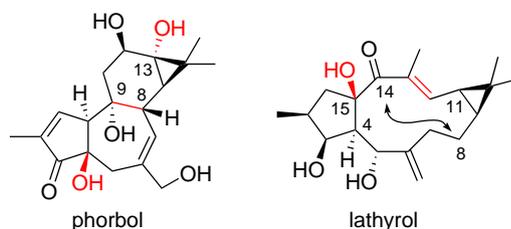


FIGURE 2.14 – Hydroxylation du C-13 d'un tigliane, hydroxylation opposée à la jonction des cycles A et B entre un tigliane et un lathyrane, double liaison 12-13 empêchant la cyclisation entre les positions 8 et 14 d'un lathyrane.

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

La proposition de Jakupovic

Afin d'expliquer l'origine du squelette tigliane, Jakupovic a proposé une analyse rétrosynthétique suivant la règle de l'isoprène selon laquelle les unités isopréniques s'assemblent de manière

69. APPENDINO, G. *et al. Org. Lett.* **3**, 1609-1612 (2001).

tête-à-queue (FIGURE 2.15). Ainsi, l'ouverture du cyclopropane par protonation du C-13 (voie A) connecte sans ambiguïté le squelette tigliane au cation cembranyl. L'ouverture alternative du cyclopropane par protonation en C-14 est en revanche incompatible avec la règle de l'isoprénoïde⁵⁰ (voies B, E et F, FIGURE 2.15).

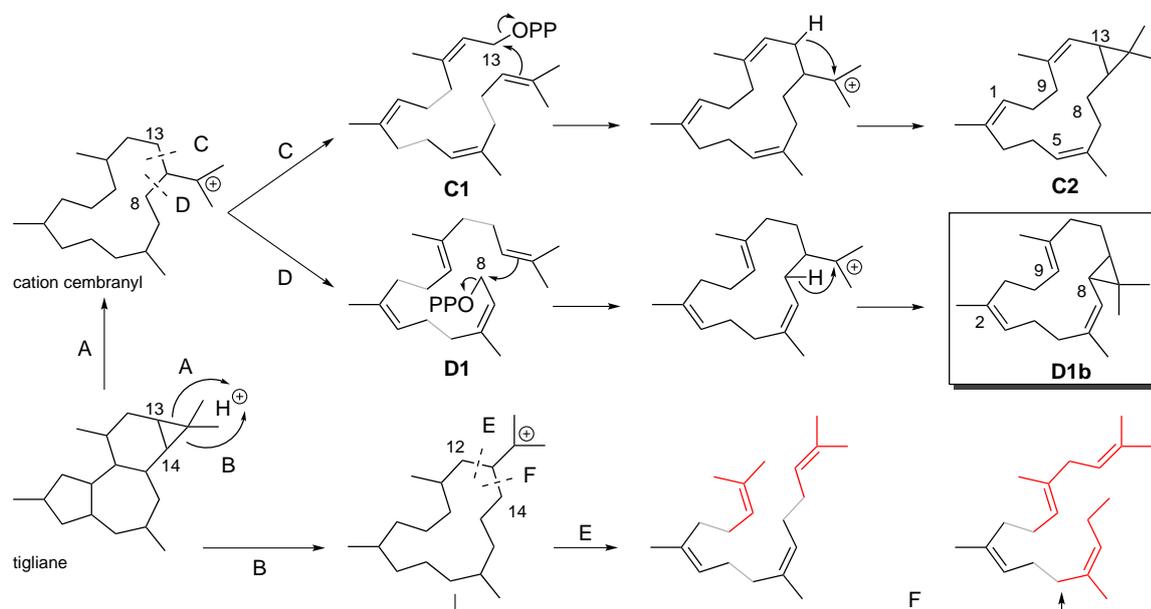


FIGURE 2.15 – Analyse rétrosynthétique du squelette tigliane.

Le cation cembranyl peut être généré à partir du précurseur tétraprényl acyclique selon deux repliements distincts. La voie C (FIGURE 2.15) semble être la plus probable, car elle place correctement le cyclopropane sur le cycle C du squelette tigliane (**C2**). Au contraire, la voie D impliquant l'insertion du cation en C-8 paraît contre-intuitive car elle produirait un composé avec une mauvaise localisation du cyclopropane et un réarrangement serait nécessaire pour obtenir son emplacement naturel en C-13 (**D1b**). Cependant, ce réarrangement est au cœur de la proposition de Jakupovic et donne une explication mécanistique à toutes les incompréhensions de la biogenèse des phorboïdes. La voie C requiert un précurseur tétraprényl all-(*Z*) (**C1**) qui va mener à un composé non fonctionnalisé (en position 8 et 9) incompatible avec la formation la jonction de cycle B,C.⁵⁰

La double liaison 6-7 du précurseur GGPP (**D1**) est allylique au groupement phosphate qui peut donc subir une transposition allylique classique pour mener au géranylinalyl diphosphate (GLPP) (**D2**, FIGURE 2.16). Après hydroxylation de la position 4 (voir section 2.3.2), le GLPP (**D2**) pourrait finalement être le précurseur commun (**D2b**) des tiglianes et des lathyranes (FIGURE 2.17).⁷⁰ L'attaque électrophile sur l'une ou l'autre des faces de la double liaison terminale générerait :

70. GLEIZES, M. *et al. Phytochemistry* **21**, 2641-2644 (1982).

- un composé (**D3**) possédant une double liaison 6-7 de configuration (*E*) dont le cyclopropane est orienté en α et qui après formation du cyclopentane donne un squelette tricyclique insaturé en positions 5 et 12 possédant une configuration typique des lathyranes (**D4**).
- Un composé (**D5**) possédant une double liaison 6-7 de configuration (*Z*) dont le cyclopropane est orienté en β et qui, après formation du cyclopentane et oxydation de la position 13 (**D6**), peut former le squelette tigliane (**D7**).

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

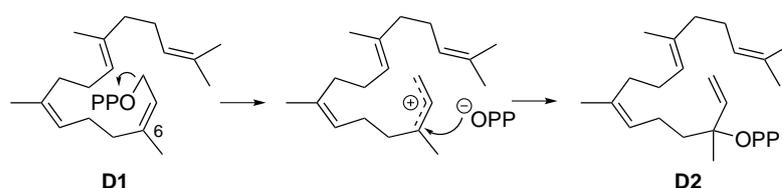


FIGURE 2.16 – Transposition allylique menant du GGPP au GLPP

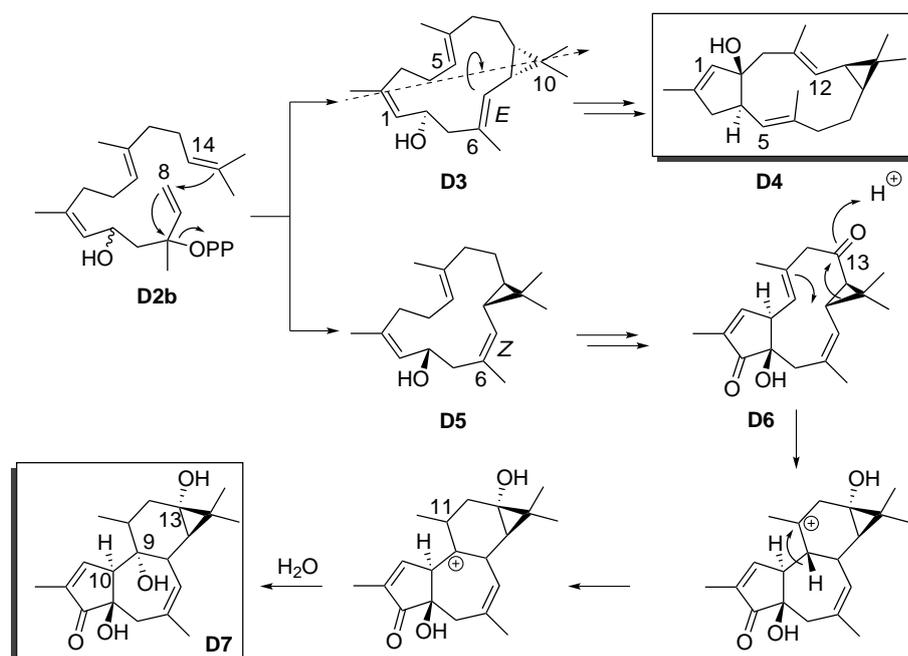


FIGURE 2.17 – Voies de biosynthèse possibles des lathyranes et des tiglianes

Les ingénanes

Pour les ingénanes tels que l'ingéanol, qui ne possèdent pas de groupement hydroxyle en position 13, la migration du cyclopropane pourrait être déclenchée par la formation d'un ion oxonium

en C-13 (FIGURE 2.18). Contrairement aux tiglianes, le cation C-9 ne serait pas neutralisé par l'eau mais par une hybridation 1,2 menant au cation **D8**. Celui-ci subirait ensuite une expansion de cycle⁵⁰ médiée par un réarrangement 1,2-alkyl, conduisant au cation ingényl (**D9**). Une étude détaillée du réarrangement des tiglianes en ingénane pendant la synthèse totale de l'ingénol de Baran a mis en évidence l'importance de la présence du groupement hydroxyle en C-9 pour surmonter la barrière thermodynamique qu'implique la réaction, Il est donc improbable que les lathyranes (non fonctionnalisés en position 9) soit des précurseurs directs des ingénanes.⁷¹

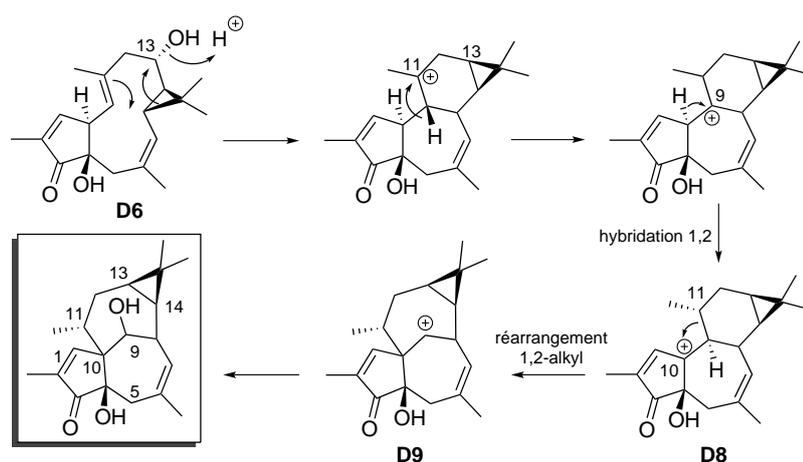


FIGURE 2.18 – Voie de biosynthèse possible des ingénanes

Les rhamnofolanes

Finalement l'oxydation de **D6** en C-16 (numérotation tiglianes) pourrait déclencher un mode d'ouverture du cyclopropane différent⁵⁰ formant le cycle C typique des rhamnofolanes via l'attaque du côté opposé du C-8 cyclopropylique par la double liaison (FIGURE 2.19).

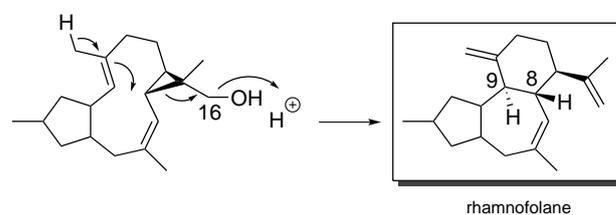


FIGURE 2.19 – Voie de biosynthèse possible des rhamnofolanes

71. JORGENSEN, L. *et al. Science* **341**, 878-882 (2013).

Les daphnanes

Les daphnanes sont des molécules caractérisées par un tricycle 5/7/6 qui dériverait du squelette tigliane par ouverture du cyclopropane. Ils sont souvent très fonctionnalisés et principalement isolés sous forme d'orthoester.⁷²

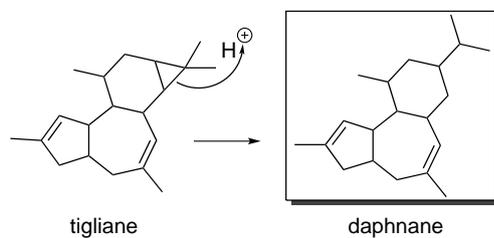


FIGURE 2.20 – Voie de biosynthèse possible des daphnanes à partir des tiglianes

72. SCHMIDT, R. J. *Bot. J. Linn. Soc.* **94**, 221-230 (1987).

Chapitre 3

Les stratégies de lutte contre les virus du chikungunya, de la dengue et du Zika

Sommaire

3.1 Généralités	34
3.1.1 Structures moléculaires des virus	34
3.1.2 Transmission et symptomatologie	34
3.2 Epidémiologie	37
3.2.1 DENV	37
3.2.2 ZIKV	37
3.2.3 CHIKV	38
3.3 Lutte contre les vecteurs	39
3.3.1 Les approches de réduction de la population de moustique	40
3.3.2 Les approches de modification de la population de moustique	40
3.4 Développement de vaccins : progrès et challenges	42
3.4.1 Développement de vaccins anti-CHIKV	42
3.4.2 Développement de vaccins anti-DENV	42
3.4.3 Développement de vaccins anti-ZIKV	43
3.5 Inhibiteurs des flavivirus : DENV et ZIKV	45
3.5.1 Inhibiteurs de la protéase NS3	45
3.5.2 Inhibiteurs de l'ARN polymérase NS5	46
3.6 Inhibiteurs du CHIKV	48

3.1 Généralités

3.1.1 Structures moléculaires des virus

Le DENV et ZIKV, appartenant au genre *Flavivirus*, sont des virus à ARN monocaténaire à sens positif d'une taille d'environ 11 kb. Leur génome comprend 10 gènes qui sont directement traduits en une polyprotéine (FIGURE 3.1), laquelle est ensuite découpée en 10 protéines de plus faible taille, dont trois protéines structurales (capside (C), membrane (M) et enveloppe (E)) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, et NS5). Le génome est flanqué aux deux extrémités par des UTR (UnTranslated Region) permettant la régulation de l'expression des gènes.^{73,74} Les virus ont une structure sphérique d'un diamètre de 50 nm. La protéine C constitue la nucléocapside, qui est entourée par l'enveloppe virale. L'enveloppe est une bicouche lipidique dérivée de l'hôte qui contient également plusieurs protéines virales E et M régulant le processus de pénétration du virus dans les cellules hôtes humaines.⁷⁵ Après l'entrée du flavivirus dans une cellule par endocytose, la particule virale est libérée dans le cytoplasme. L'ARN génomique viral est traduit en protéines et répliqué grâce au complexe de réplication (FIGURE 3.2), et l'assemblage du virus a lieu à la surface du réticulum endoplasmique (RE). Les particules virales bourgeonnent dans le RE et se développent au fur et à mesure qu'elles sont transportées dans la voie sécrétoire pour être libérées par exocytose.⁷⁶

Le virion CHIKV, appartenant au genre *Alphavirus*, est caractérisé par un génome d'ARN linéaire, monocaténaire à sens positif de taille d'environ 11-12 kb. Le génome est polyadénylé à l'extrémité 3', et possède une coiffe 7-méthylguanosine à l'extrémité 5'. Il contient deux cadres de lecture ouverts, dont le premier code pour une polyprotéine non structurale qui est transformée en quatre protéines non structurales (nsP1 à 4). La protéine non structurale 4 correspond à l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) et permet la réplication du génome viral.⁷⁷ Le second cadre de lecture code pour une polyprotéine structurale donnant une protéine de capsid et deux glycoprotéines d'enveloppe (E1 et E2).⁷⁸

3.1.2 Transmission et symptomatologie

Les trois virus sont des arbovirus transmis par voie sanguine *via* les moustiques femelles du genre *Aedes*, principalement *A. aegypti* et *A. albopictus*, dont les œufs nécessitent une alimentation sanguine. Ils provoquent des symptômes similaires proche d'un état grippal.⁷⁹

73. HUANG, Y. J. S. *et al. Viruses* **6**, 4703-4730 (2014).

74. YUN, S.-I. & LEE, Y.-M. *J. Microbiol.* **55**, 204-219 (2017).

75. LINDENBACH, B. D. *et al.* in *Fields Virol.* (éd. KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M.) 5^e éd., 1101-1113 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).

76. SHI, P.-Y. *Science* **343**, 849-850 (2014).

77. PIETILÄ, M. K. *et al. Virus Res.* **234**, 44-57 (2017).

78. STRAUSS, J. H. & STRAUSS, E. G. *Microbiol. Rev.* **58**, 491-562 (1994).

79. HIGUERA, A. & RAMÍREZ, J. D. *Acta Trop.* **190**, 99-111 (2019).

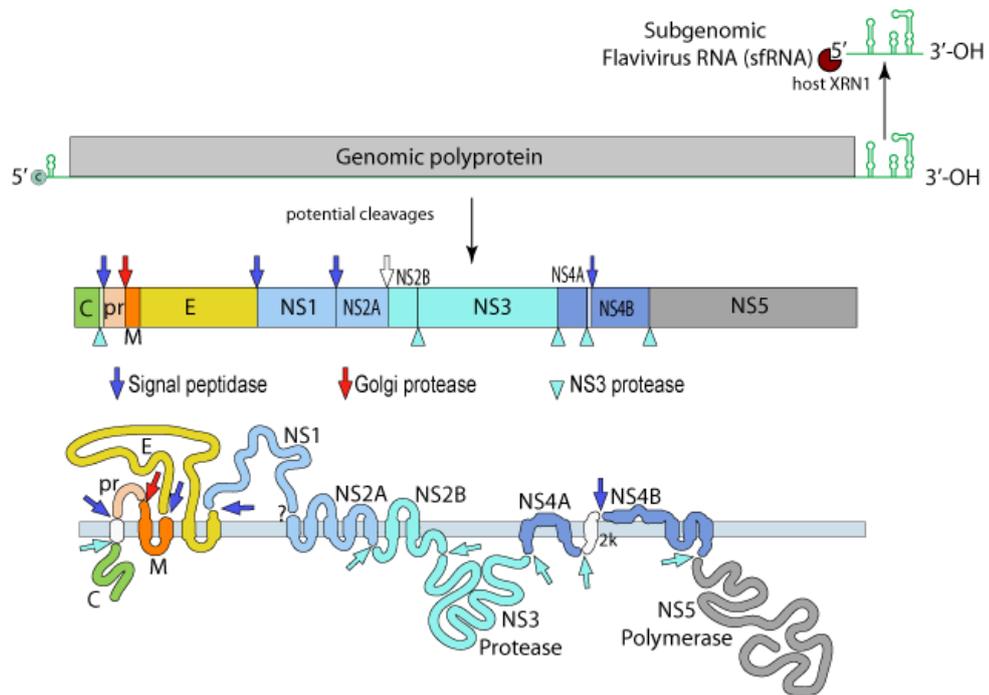


FIGURE 3.1 – Structure du génome des flavivirus et des protéines virales.

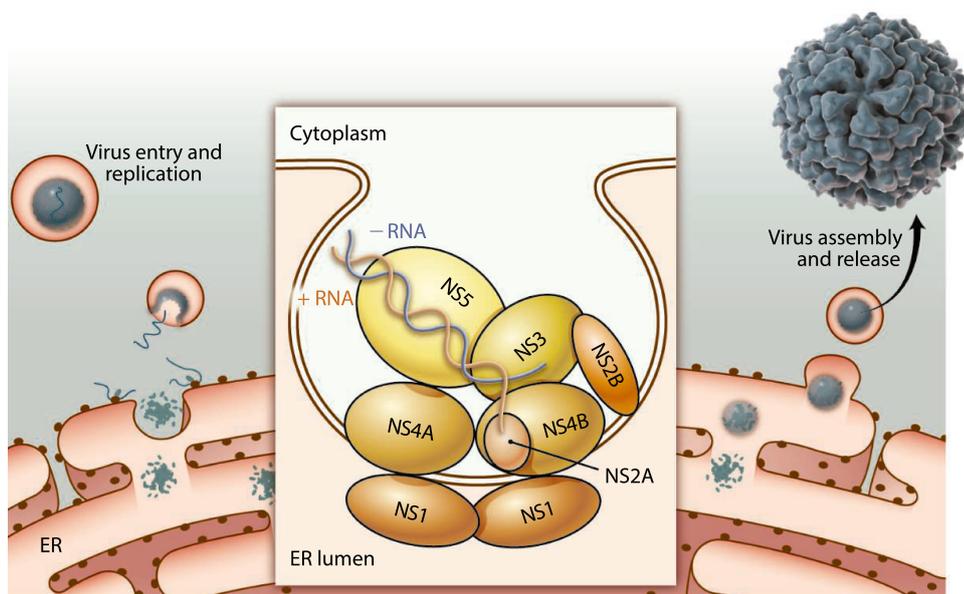


FIGURE 3.2 – Schéma de répliation des flavivirus - Sept protéines non structurales, ainsi que des protéines hôtes (non montrées), forment le complexe de répliation. La protéine NS5 possède une activité ARN-polymérase ARN-dépendante.⁷⁶

Le DENV provoque la dengue, qui se caractérise par une infection asymptomatique, subclinique ou symptomatique qui, dans la plupart des cas, devient autolimitante (*i.e.* se résout d'elle-même en une quinzaine de jours). Les principaux symptômes sont : fièvre élevée, maux de tête, douleurs rétroorbitaires, myalgie, douleurs articulaires et, dans certains cas, des rougeurs de la peau. Ces symptômes peuvent être causés par n'importe lequel des quatre sérotypes du DENV au moment de l'infection initiale. Cependant, dans les régions où plusieurs sérotypes circulent en même temps, il est possible de contracter une infection secondaire causée par une souche appartenant à un sérotype différent, ce qui peut entraîner des affections plus graves comme la fièvre hémorragique de la dengue et le syndrome de choc de la dengue.⁸⁰

Bien que le mécanisme exact de réplication et de pathogenèse du ZIKV ne soit pas encore bien compris, il a la capacité de se répliquer dans les cellules intestinales et les glandes salivaires d'*Aedes* spp. et dans les cellules de mammifères comme les neurones et les cellules gliales des singes et les cellules cutanées et dendritiques des humains *in vitro*. Le ZIKV a la capacité d'infecter différents hôtes, ce qui l'aide à maintenir un cycle urbain entre les humains et les vecteurs et un cycle enzootique entre les primates et les moustiques. ZIKV a été isolé sur *A. africanus*, *A. aegypti* et *A. furcifer*^{81, 82} ce qui suggère que les trois espèces peuvent agir comme vecteurs. Chez l'Homme, la plupart des infections à ZIKV sont asymptomatiques. Lorsque des manifestations cliniques surviennent, les symptômes comprennent de la fièvre, des éruptions cutanées, des douleurs articulaires et une conjonctivite. Des rapports en provenance du Brésil ont également indiqué une association entre ZIKV et le syndrome de Guillain-Barré et avec la microcéphalie congénitale foetale lorsque le virus a été acquis pendant la grossesse.^{83, 84} D'autres manifestations telles que les neuropathies périphériques idiopathiques, la rétinopathie et d'autres anomalies neurologiques congénitales ont également été suggérées.⁸⁵ Bien que les lésions cognitives, sensorielles et motrices ne soient pas exclusives à cette infection, des caractéristiques uniques au **syndrome associé à l'infection congénitale à virus Zika** ont été spécifiquement déterminées.⁸⁶

La transmission du CHIKV chez l'Homme se fait par le moustique, qui peut être impliqué dans les cycles épizootiques, où les animaux vertébrés agissent comme réservoirs viraux. En revanche, pendant les épidémies actives, les humains sont les réservoirs.⁸⁷ CHIKV a une période d'incubation de 3 à 12 jours et provoque des symptômes tels que fièvre soudaine, arthralgie, myalgies et éruptions cutanées. Chez la femme, des études ont montré une relation entre l'infection à CHIKV et l'avortement pendant le premier et le dernier trimestre de la grossesse.⁸⁸ Dans certains cas,

80. REIF, J. S. *Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section B* 171-181 (CRC Press, 2017).

81. DIALLO, D. *et al. PLoS One* **9** (éd. ATTOUI, H.) e109442 (2014).

82. MARCHETTE, N. J. *et al. Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**, 411-5 (1969).

83. HEUKELBACH, J. *et al. J. Infect. Dev. Ctries.* **10**, 116-120 (2016).

84. AWADH, A. *et al. PLoS Curr.* **1**, 1 (2017).

85. MUSSO, D. & GUBLER, D. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 487-524 (2016).

86. MOORE, C. A. *et al. JAMA Pediatr.* **171**, 288-295 (2017).

87. MOHAN, A. *et al. Indian J. Dermatol.* **55**, 54-63 (2010).

88. SIMON, F. *et al. Med. Clin. North Am.* **92**, 1323-1343 (2008).

une infection peut déclencher des symptômes d'inflammation articulaire, d'arthrite paralytique et d'arthrite chronique qui peuvent durer jusqu'à 4 mois chez 33% des patients infectés.⁸⁹ Le Chikungunya a toutefois reçu peu d'attention de la part de la communauté médicale⁸⁸ jusqu'à sa résurgence en 2006 à La Réunion, où l'apparition généralisée du virus a entraîné une morbidité accrue.

3.2 Epidémiologie

3.2.1 DENV

La question de savoir si le DENV est originaire d'Asie ou d'Afrique fait toujours débat. Dans les Amériques, des épidémies de maladies présentant des symptômes similaires à ceux de la dengue ont été signalées pour la première fois en 1635 et 1699.⁹⁰ Les preuves de l'association entre le DENV et les formes plus graves de la maladie, la dengue hémorragique et le syndrome de choc de la dengue, n'ont été obtenues que beaucoup plus tard, de sorte que ce n'est que dans les années 1950 que ces maladies ont été liées au DENV.⁹¹ L'augmentation des échanges commerciaux, résultant notamment de l'accroissement des activités touristiques entre les Caraïbes et l'Amérique du Nord et du Sud a entraîné une augmentation du nombre de foyers dans ces régions.⁹² Les initiatives régionales de lutte contre les vecteurs ont commencé bien avant que l'agent viral ne soit identifié. Malgré cela, l'apparition de foyers dans des pays comme la Jamaïque, Porto Rico, les Antilles et le Venezuela, ainsi que l'amélioration des mesures de lutte dans les années 1960, ont permis une réintroduction et une expansion géographique du vecteur, et donc de l'agent viral. C'est la principale cause des grandes épidémies de dengue survenues dans les Amériques depuis 2000, et les quatre sérotypes circulent maintenant dans cette région.⁹³ Le DENV a été signalé dans plus de 100 pays dans le monde, avec environ 100 millions de personnes infectées chaque année. Cependant, certains rapports ont estimé que le nombre annuel d'infections par le DENV est au moins trois fois plus élevé que celui estimé par l'OMS.⁹⁴

3.2.2 ZIKV

Le ZIKV a été découvert en 1947 en Ouganda. Au départ, seuls des cas sporadiques d'infection à ZIKV ont été signalés, la répartition étant centrée sur l'Afrique équatoriale et certaines parties de l'Asie. Ce n'est qu'en 2000, lors de sa résurgence sur l'île de Yap (Pacifique) en dehors des continents Africain et Asiatique, que le ZIKV a pris de l'importance.⁹⁵ En 2007, 73% de la population de Micronésie a été infectée par le ZIKV, qui a ensuite commencé à se propager dans

89. FOURIE, E. D. & MORRISON, J. G. *S. Afr. Med. J.* **56**, 130-2 (1979).

90. RAMOS-CASTAÑEDA, J. *et al. PLoS Negl. Trop. Dis.* **11** (2017).

91. HALSTEAD, S. B. *Bull World Heal. Organ* **58**, 375-397 (1980).

92. TITTARELLI, E. *et al. Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1684-1685 (2017).

93. DICK, O. B. *et al. Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**, 584-593 (2012).

94. BHATT, S. *et al. Nature* **496**, 504-507 (2013).

95. HAYES, E. B. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1347-1350 (2009).

les îles du Pacifique, où un deuxième foyer majeur impliquant 28 000 cas suspects s'est déclaré en 2013.⁹⁶ Cette épidémie a été suivie d'une augmentation de la proportion de cas du syndrome de Guillain-Barré.⁹⁷ Par la suite, le ZIKV a été détecté en Amérique centrale et en Amérique du Sud, principalement au Chili en 2014 et au Brésil en 2015⁷⁴ où entre 440 000 et 1 300 000 cas d'infection à ZIKV sont survenus⁹⁸ et ont été associés à une augmentation des cas de syndrome de Guillain-Barré et de microcéphalie chez les nouveau-nés.⁹⁹ En 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a annoncé que la ZIKV était une urgence internationale. À ce jour, des cas de ZIKV ont été signalés dans 48 pays et territoires dépendants américains dont des cas importés aux États-Unis, au Canada et en Europe.¹⁰⁰

3.2.3 CHIKV

CHIKV a été décrit pour la première fois en 1952 à la suite d'un foyer de maladie chez les Makondéens de la côte de Tanzanie.¹⁰¹ Le nom du virus se traduit par " la maladie qui déforme les articulations".¹⁰² Par la suite, le virus a été identifié chez des moustiques *A. africanus* de l'Ouganda à l'Afrique de l'Est, où des preuves du cycle de vie sauvage enzootique ont été observées.¹⁰³ Plus tard, CHIKV a été trouvé dans d'autres régions d'Afrique subsaharienne.¹⁰⁴ Le premier foyer hors d'Afrique a été signalé à Bangkok, avec d'autres foyers dans les années 1960 et 1970 en Inde.¹⁰⁵ Le virus s'est ensuite propagé sur tout le continent asiatique, provoquant plusieurs épidémies. En 2004, de nouveaux foyers de CHIKV ont été signalés en Inde, en Italie et en France, avec un total de 1,3 million de cas recensés.^{106, 107, 108} La vaste étendue géographique et plusieurs épidémies généralisées ont renforcé l'importance de CHIKV dans le domaine de la santé publique mondiale ces dernières années. CHIKV a été signalé dans 45 pays et territoires dépendants des Amériques, avec plus de 2,9 millions de cas suspects et 296 décès attribués au virus.¹⁰⁹ Toutefois, le nombre réel de cas d'infection à CHIKV serait sous-estimé en raison d'un diagnostic inexact et de l'absence de signalement.

96. BESNARD, M. *et al.* *Eurosurveillance* **19**, 20751 (2014).

97. CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* *Lancet* **387**, 1531-1539 (2016).

98. HENNESSEY, M. *et al.* *Am. J. Transplant.* **16**, 1031-1034 (2016).

99. CAUCHEMEZ, S. *et al.* *Lancet* **387**, 2125-2132 (2016).

100. METSKY, H. C. *et al.* *Nature* **546**, 411-415 (2017).

101. LUMSDEN, W. H. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **49**, 33-57 (1955).

102. ROSS, R. W. *J. Hyg. (Lond.)* **54**, 177-191 (1956).

103. MCCRAE, A. W. *et al.* *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**, 152-168 (1971).

104. COFFEY, L. L. *et al.* *Viruses* **6**, 4628-4663 (2014).

105. HAMMON, W. M. D. *et al.* *Science* **131**, 1102-1103 (1960).

106. LANCIOTTI, R. S. & VALADERE, A. M. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1400-1402 (2014).

107. GRANDADAM, M. *et al.* *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 910-913 (2011).

108. REZZA, G. *et al.* *Lancet* **370**, 1840-1846 (2007).

109. YACTAYO, S. *et al.* *J. Infect. Dis.* **214**, S441-S445 (2016).

3.3 Lutte contre les vecteurs

Aedes est parfaitement adapté aux villes situées en zone tropicales et subtropicales où il vit et se reproduit dans les habitations et les réservoirs d'eau stagnante. Les villes tropicales continuent à se développer, dépassant souvent la mise en place d'infrastructures adéquates pour gérer l'approvisionnement en eau ou l'élimination des déchets. Cette croissance urbaine rapide, conjuguée à la généralisation du transport aérien mondial, permet aux agents pathogènes de se déplacer aussi facilement que leurs hôtes. Elle crée les conditions idéales pour la propagation rapide des maladies humaines dans le monde entier.¹¹⁰ Ces moustiques, notamment *A. albopictus* se développe depuis maintenant plusieurs années en Europe et notamment en France comme le montre la FIGURE 3.3.

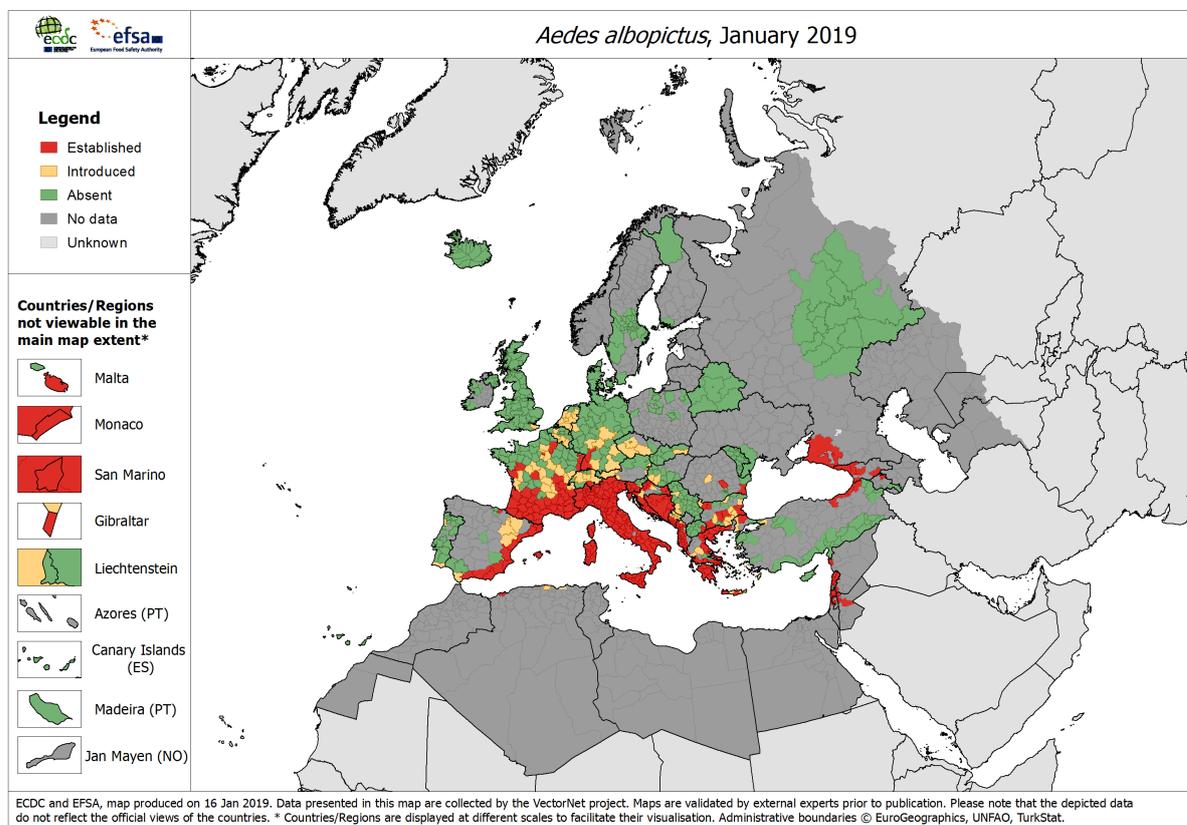


FIGURE 3.3 – Distribution d'*A. albopictus* en Europe selon l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)

Les méthodes existantes qui visent à réduire la maladie par l'élimination physique des sites de reproduction, ou par l'application d'insecticides ciblant les larves ou les adultes, ne sont pas adaptées à ce nouveau contexte mondial. De nouvelles approches de lutte antivectorielle qui impliquent la libération de moustiques modifiés se répartissent actuellement en deux grandes

110. FLORES, H. A. & O'NEILL, S. L. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 508-518 (2018).

catégories : soit ils visent à réduire la population de vecteurs, soit ils modifient le vecteur pour le rendre réfractaire à la transmission d'agents pathogènes.

3.3.1 Les approches de réduction de la population de moustique

Elles impliquent d'élever et de relâcher un grand nombre de moustiques mâles qui ne peuvent pas produire une progéniture viable¹¹⁰ lorsqu'ils s'accouplent avec des femelles sauvages. Au cours de plusieurs générations de lâcher continu de ces mâles, la taille de la population de vecteurs est réduite, ce qui limite la transmission de la maladie. Ces méthodes comprennent la technique des insectes stériles (SIT), la technique des insectes incompatibles (IIT) et diverses stratégies de modification génétique.¹¹¹

3.3.2 Les approches de modification de la population de moustique

Elles impliquent la libération de moustiques mâles et femelles porteurs d'un facteur héréditaire qui réduit ou bloque leur capacité à transmettre des virus, comme la dengue ou le Zika. Lors de l'accouplement des moustiques modifiés avec des moustiques sauvages, le facteur se répand dans la population, les moustiques deviennent incapables de transmettre l'agent pathogène sans qu'il soit nécessaire de supprimer la population. Ces approches comprennent le déploiement de bactéries endosymbiotiques bloquant les agents pathogènes *Wolbachia pipientis* (FIGURE 3.4) et de mécanismes d'entraînement des gènes, comme le système CriSPr-Cas9, associés à des gènes bloquant la transmission.

Wolbachia pipientis est une bactérie qui infecte essentiellement les arthropodes et a un mode de vie intracellulaire au niveau du cytoplasme de leurs hôtes. Un des principaux effets de l'infection par *Wolbachia* est l'incompatibilité cytoplasmique (IC) qui se caractérise par une réduction totale ou partielle du nombre de descendants viables lors du croisement entre un mâle infecté et une femelle non infectée. La bactérie modifie le sperme des mâles infectés pendant la spermatogenèse de sorte que les chromosomes paternels se condensent au moment de la fécondation, ce qui tue généralement l'embryon en développement. Si l'ovule est infecté par la bactérie, la modification chromosomique est reconnue et le développement se déroule normalement. *Wolbachia* a également la capacité de rendre son hôte résistant à de nombreux virus comme le DENV et le ZIKV. Les mécanismes exacts de ces deux effets phénotypiques restent pour le moment inconnus.¹¹¹

111. JIGGINS, F. M. *BMC Biol.* **14**, 92 (2016).

Modification de la population de moustique utilisant les bactéries du genre *Wolbachia*

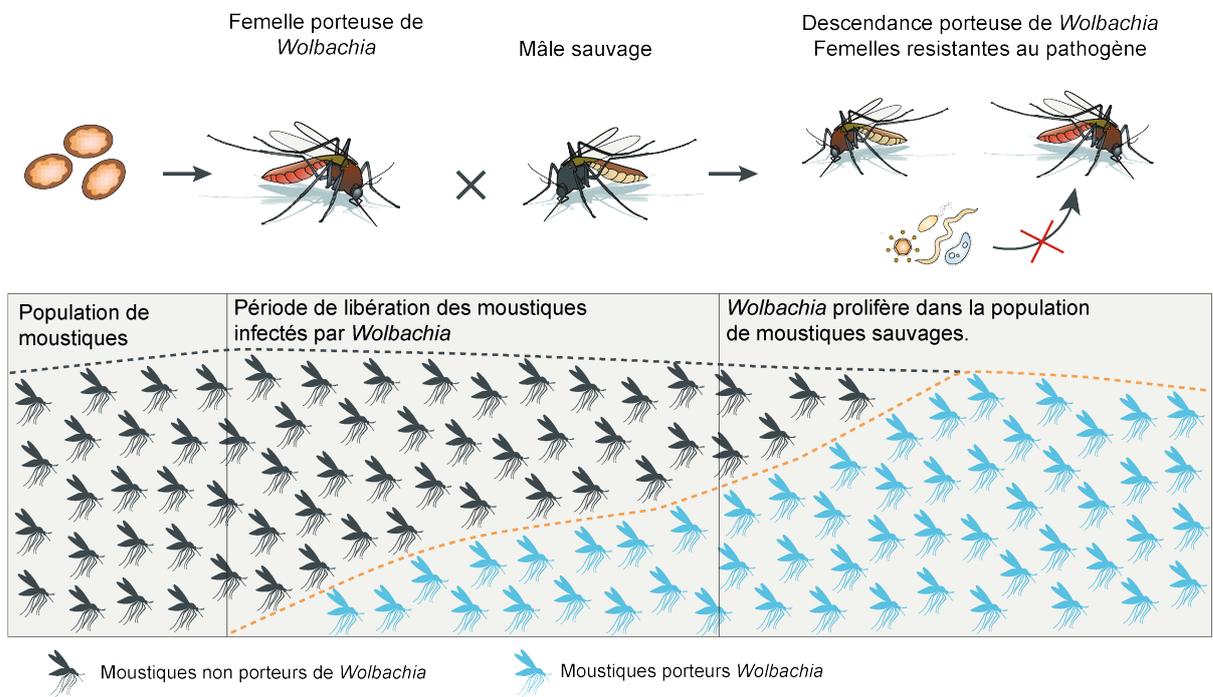


FIGURE 3.4 – Modification de la population de moustique *via* une bactérie endosymbiotique, d'après Flores *et al.*¹¹⁰

3.4 Développement de vaccins : progrès et challenges

3.4.1 Développement de vaccins anti-CHIKV

Diverses approches ont été utilisées pour mettre au point un vaccin qui produirait des niveaux élevés d'anticorps, fournirait une immunité durable et nécessiterait des besoins de production minimales et simples. Diverses options telles que les particules de type viral (VLP), les vaccins à sous-unités, les vaccins vectorisés/chimiques, les vaccins à acide nucléique et les vaccins vivants atténués ont été explorées.¹¹² Le plus avancé de ces vaccins recombinants pour CHIKV est un vaccin à vecteur vivant atténué contre la rougeole (MV-CHIK). Il contient à la fois les gènes de la protéine de capsid et de la glycoprotéine d'enveloppe. Il en résulte une présentation quasi native des protéines structurales avec une réponse immunitaire imitant celle d'une infection par un virus sauvage. Lors des essais cliniques de phase II, le vaccin a montré d'excellentes innocuité et tolérabilité, ainsi qu'une bonne immunogénicité, indépendamment de l'immunité préexistante contre le vecteur. MV-CHIK est un vaccin candidat prometteur pour la prévention du CHIKV.¹¹³ Bien que la communauté scientifique se soit principalement concentrée sur la mise au point de vaccins, un nombre croissant d'études, dont la plupart ont été publiées au cours des deux ou trois dernières années seulement, ont porté sur les options thérapeutiques possibles.

3.4.2 Développement de vaccins anti-DENV

Après plus de 25 ans de recherche et de nombreux essais cliniques, en 2015, la société Sanofi-Pasteur a enregistré un vaccin (Dengvaxia®) contre les quatre sérotypes du DENV. Son utilisation est toutefois limitée en raison de preuves suggérant qu'il augmente le risque de dengue grave dans certaines circonstances.¹¹⁴ Depuis juillet 2019, le vaccin figure sur la liste des médicaments essentiels de l'OMS reconnue par environ 150 pays.¹¹⁵ Cependant, il ne doit pas être administré aux enfants de moins de 9 ans et aux personnes séro-négatives¹¹⁶ car les anticorps générés par le vaccin intensifieraient l'infection virale dans ces populations.¹¹⁷ Ce vaccin est basé sur un vecteur vivant chimérique recombinant. Les gènes codant pour la pré-membrane (prM) et l'enveloppe (E) de la souche atténuée du vaccin YFV 17D ont été substitués aux gènes prM et E des quatre DENV.

En raison de l'absence de protéines non structurales du DENV, le Dengvaxia provoque une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique très limitée.¹¹⁸ Au cours des dernières années, de nombreuses études ont démontré le rôle protecteur de la réponse immunitaire à médiation

112. POWERS, A. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, 1-29 (2018).

113. REISINGER, E. C. *et al. Lancet* **392**, 2718-2727 (2018).

114. SRIDHAR, S. *et al. N. Engl. J. Med.* **379**, 327-340 (2018).

115. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO model list of essential medicines application, 21th list 2019*. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/> (visité le 01/08/2019).

116. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO recommendations for routine immunization 2019*. https://www.who.int/immunization/policy/immunization{_}tables/en/ (visité le 01/08/2019).

117. WILDER-SMITH, A. *et al. Lancet Infect. Dis.* **19**, e31-e38 (2019).

118. HALSTEAD, S. B. & ZOMPI, S. *Front. Immunol.* **6** (2015).

cellulaire contre le DENV. Plusieurs expériences chez la souris ont démontré que les lymphocytes T CD8⁺ et même CD4⁺ contribuent à la protection, au contrôle de la maladie virale ou à la réduction de la charge virale dans le sang et différents organes.^{119, 120} Des vaccins candidats (le vaccin de TAKEDA et le vaccin du NIH) sont en cours d'essais cliniques ; ils se sont révélés sûrs et immunogènes, mais leur profil d'efficacité n'a pas été démontré.^{121, 122} Ces deux vaccins candidats comprennent des régions virales pour développer une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Le développement d'autres vaccins contre le DENV implique de surmonter un grand nombre de problèmes.¹²³

- Les anticorps anti-prM ont une forte réactivité croisée entre les sérotypes du DENV et favorisent fortement la facilitation de l'infection par des anticorps (Antibody-Dependant Enhancement - ADE).¹²⁴
- La protection à vie contre le sérotype infectieux suite à une primo-infection par DENV a été remise en cause car de nombreux cas de réinfections ont été constatés chez l'Homme et l'animal.^{125, 126}
- La présence d'anticorps réactifs au DENV en quantité non neutralisante provenant d'une infection antérieure (ou d'une mère immunisée) et pouvant engendrer une ADE et un facteur de risque majeur pour le développement d'une dengue sévère.¹²⁷
- À l'heure actuelle, l'antigène induisant une réponse immunitaire protectrice est inconnu et les anticorps neutralisant dirigés contre les quatre sérotypes peuvent induire l'ADE.¹²⁸

Des vaccins candidats n'induisant pas d'anticorps neutralisants, qui reposent exclusivement sur la médiation cellulaire, pourraient donc être une solution potentielle pour se protéger contre le DENV. Ce type de vaccin n'éliminerait pas complètement le virus pendant l'infection mais pourrait suffire à réduire la charge virale, afin d'améliorer le pronostic clinique.

3.4.3 Développement de vaccins anti-ZIKV

Les vaccins candidats utilisant des technologies distinctes en sont à différents stades de développement. Certains ont déjà atteint les phases I/II d'essais cliniques. Les vaccins candidats appartiennent à trois catégories : (1) vaccin inactivé, (2) vaccin sous-unité et (3) vaccin vivant atténué.¹²⁹ Récemment, trois études cliniques de phase I ont été publiées pour démontrer l'inno-

119. YAUCH, L. E. *et al.* *J. Immunol.* **182**, 4865-4873 (2009).

120. ZELLWEGER, R. M. *et al.* *PLoS Pathog.* **9** (éd. FOUCHIER, R. A. M.) e1003723 (2013).

121. OSORIO, J. E. *et al.* *Expert Rev. Vaccines* **15**, 497-508 (2016).

122. WHITEHEAD, S. S. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 509-517 (2016).

123. GIL, L. & LAZO, L. *Viral Immunol.* **32**, 236-238 (2019).

124. DEJNIRATTISAI, W. *et al.* *Science* **328**, 745-748 (2010).

125. BERNARDO, L. *et al.* *Arch. Virol.* **153**, 849-854 (2008).

126. VALDÉS, I. *et al.* *Arch. Virol.* **161**, 465-470 (2016).

127. ZELLWEGER, R. M. *et al.* *J. Immunol.* **193**, 4117-4124 (2014).

128. ROUVINSKI, A. *et al.* *Nature* **520**, 109-113 (2015).

129. SHAN, C. *et al.* *Cell Host Microbe* **24**, 12-17 (2018).

cuité et l'immunogénicité des vaccins inactivés¹³⁰ et des sous-unités d'ADN.^{131, 132} Malgré des progrès prometteurs, des lacunes demeurent dans la connaissance du ZIKV pour le développement d'un vaccin sûr et efficace.

L'infection par ZIKV cause le syndrome de Guillain-Barré (SGB) avec un taux d'incidence d'environ 1 adulte infecté sur 4 000 à 5 000.¹³³ Si les antigènes viraux sont responsables du SGB, le ou les antigènes qui déclenchent l'attaque des nerfs périphériques doivent être identifiés. Une fois ces antigènes viraux définis, les vaccins candidats doivent être repensés pour exclure les épitopes provoquant des réactions croisées. Malheureusement, les modèles animaux de SGB ne sont pas disponibles actuellement pour étudier les aspects moléculaires de la maladie.

Les anticorps induits par le vaccin ZIKV pourraient favoriser l'infection par le DENV. Étant donné que ZIKV, le DENV et d'autres flavivirus circulent conjointement dans de nombreuses régions géographiques, les réactions croisées représentent un défi majeur pour le développement du vaccin contre ZIKV. Jusqu'à présent, de nombreuses études insistent sur la complexité des interactions entre les infections à ZIKV et à DENV. En outre, les réactions croisées des lymphocytes T provenant d'une infection antérieure par le DENV pourraient également influencer sur l'issue de l'infection à ZIKV, ce qui laisse entendre que l'immunité antérieure du DENV joue un rôle dans la formation de la réponse des lymphocytes T à une infection ultérieure par ZIKV.^{134, 135} La réponse immunitaire à la vaccination par ZIKV et son impact potentiel sur l'infection ultérieure par le DENV seront donc différents selon que l'on a ou non une immunité antérieure aux flavivirus. Un vaccin ZIKV optimal devrait être conçu pour induire des anticorps protecteurs de longue durée, spécifiques du type viral, avec une réactivité croisée minimale qui peut renforcer d'autres infections aux flavivirus. Pour atteindre cet objectif, des études devraient être poursuivies afin de définir les épitopes spécifiques responsables de la neutralisation du virus.

Le nombre de cas humains de ZIKV est en déclin. La mise au point d'un modèle d'infection humaine contrôlée pour le ZIKV accélérera de nombreux aspects de la recherche et de la mise au point de contre-mesures du ZIKV. Un tel modèle d'infection humaine contrôlée a été mis au point avec succès et utilisé pour la mise au point du vaccin TV003 (TetraVax-DV) actuellement en essais cliniques de phase II.¹³⁶ L'approbation réglementaire exige une évaluation éthique minutieuse des risques pour les volontaires humains.

Environ 80% des personnes infectées par le ZIKV sont asymptomatiques. De plus, les personnes qui présentent des symptômes cliniques présentent souvent une maladie bénigne.

130. MODJARRAD, K. *et al. Lancet* **391**, 563-571 (2018).

131. TEBAS, P. *et al. N. Engl. J. Med.* (2017).

132. GAUDINSKI, M. R. *et al. Lancet* **391**, 552-562 (2018).

133. DOS SANTOS, T. *et al. N. Engl. J. Med.* **375**, 1598-1601 (2016).

134. GRIFONI, A. *et al. J. Virol.* **91**, e01469-17 (2017).

135. WEN, J. *et al. Nat. Microbiol.* **2**, 17036 (2017).

136. KIRKPATRICK, B. D. *et al. Sci. Transl. Med.* **8** (2016).

Il est par conséquent nécessaire d'établir une corrélation bien définie entre la protection et les mécanismes de l'infection *in utero* pour évaluer rapidement et précisément l'efficacité du vaccin.

Un test diagnostique fiable de l'infection à ZIKV est nécessaire pour appuyer les essais cliniques.¹³⁷ Pendant la période infectieuse, les ARN viraux peuvent être quantifiés de façon fiable à l'aide des tests RT-PCR bien établis. Après la période infectieuse, un test sérologique est nécessaire pour la détection de l'infection à ZIKV.

La transmission de ZIKV de la mère au fœtus chez la souris est prévenue lorsque les vaccins sont administrés avant la grossesse.^{138, 139} Il reste à démontrer si les vaccins administrés pendant la grossesse (*i.e.* la vaccination maternelle) peuvent prévenir la transmission *in utero* du ZIKV .

3.5 Inhibiteurs des flavivirus : DENV et ZIKV

Une protéine virale cible doit idéalement combiner deux caractéristiques : elle doit être essentielle au cycle cellulaire viral⁷⁶ et présenter un faible taux de mutations.¹⁴⁰ Ce dernier point est particulièrement important pour les virus à ARN tels que les flavivirus, dont les ARN polymérases n'ont pas de fonction de relecture. Le taux élevé de mutation entraîne une proportion relativement importante de virions non fonctionnels, mais ce problème est contrebalancé par d'autres facteurs, tels que l'évasion immunitaire et le développement de la résistance aux médicaments. Le degré de conservation évolutive des propriétés structurales ou fonctionnelles, observés en comparant les génomes viraux, permet d'évaluer la probabilité d'apparition de mutations induisant une résistance. Un degré élevé de conservation révèle également les structures cibles qui ont le plus de chance d'être pertinentes dans un large spectre. Les cibles semblant plus prometteuses sont la protéase NS3 et la polymérase NS5.

3.5.1 Inhibiteurs de la protéase NS3

La NS3 est une grosse protéine (≈ 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/NS5.¹⁴¹ 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.¹⁴² L'hydrolyse des nucléosides triphosphatés (NTP) catalysée par la NTPase

137. BALMASEDA, A. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 8384-8389 (2017).

138. RICHNER, J. M. *et al. Cell* **170**, 273-283.e12 (2017).

139. SHAN, C. *et al. Nat. Commun.* **8**, 676 (2017).

140. BOLDESCU, V. *et al. Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 565-586 (2017).

141. LESCAR, J. *et al. Antiviral Res.* **80**, 94-101 (2008).

142. LI, H *et al. J. Virol.* **73**, 3108-16 (1999).

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.^{143, 144}

La NS3 s'est avérée efficace dans le traitement du VHC (virus de l'hépatite C) et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine, pour lesquels de nombreux inhibiteurs peptidiques et pseudo-peptidiques sont actuellement utilisés en clinique.¹⁴⁵ De nombreuses études se sont concentrées sur le développement d'inhibiteurs de protéases dérivés de peptides imitant le substrat. Les stratégies comprenaient l'incorporation d'un électrophile en C-terminal,^{146, 147, 148} l'optimisation de la partie N-terminale,^{149, 150, 151} et la modulation de certains acides aminés basiques par des analogues non naturels.^{152, 153} Étant donné l'importance des inhibiteurs de protéases pour le traitement d'autres infections virales, le dosage enzymatique simple et robuste et la disponibilité de données structurales, de nombreux résultats de criblages virtuels et à haut débit sont disponibles pour cette cible.^{154, 155, 156} La protéase a d'ailleurs été la première cible de ZIKV dont la structure a été résolue en complexe avec un inhibiteur de haute affinité.¹⁵⁷ Toutefois, les activités présentées sont souvent faibles, et le développement "hit-to-lead" est souvent inexistant.

3.5.2 Inhibiteurs de l'ARN polymérase NS5

Comme la NS3, la NS5 est une protéine multifonctionnelle : elle a une fonction d'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et une fonction méthyltransférase.¹⁵⁸ La structure de la NS5-RdRp montre une structure de type main droite avec trois sous-domaines : doigts, paume et pouce.¹⁵⁹ Le site catalytique est situé à l'intersection de deux canaux ; l'un donne accès au site actif pour le brin matrice d'ARN monocaténaire et le second canal permet l'entrée des nucléotides. Récemment, les structures cristallines de la protéine NS5 du ZIKV^{160, 161} ont été rapportées. La NS5-RdRp est essentielle pour le cycle de réplication virale, est hautement conservée et n'a pas d'homologue eucaryote, ce qui en fait une cible intéressante pour le développement de médicaments. Ceci est souligné par le succès clinique des inhibiteurs de polymérase pour le VHC et le VIH.¹⁴⁵ Les inhibiteurs nucléosidiques sont des analogues du substrat. Lors de la

143. XU, T. *et al. J. Virol.* **79**, 10278-10288 (2005).

144. WU, J. *et al. J. Virol.* **79**, 10268-10277 (2005).

145. DE CLERCQ, E. & LI, G. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 695-747 (2016).

146. NITSCHKE, C. *et al. J. Med. Chem.* **60**, 511-516 (2017).

147. YIN, Z. *et al. Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 36-39 (2006).

148. YIN, Z. *et al. Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 40-43 (2006).

149. BASTOS LIMA, A. *et al. Bioorganic Med. Chem.* **23**, 5748-5755 (2015).

150. BEHNAM, M. A. M. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 1037-1042 (2014).

151. NITSCHKE, C. *et al. J. Med. Chem.* **56**, 8389-8403 (2013).

152. BEHNAM, M. A. *et al. J. Med. Chem.* **58**, 9354-9370 (2015).

153. WEIGEL, L. F. *et al. J. Med. Chem.* **58**, 7719-7733 (2015).

154. ERBEL, P. *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 372-373 (2006).

155. NOBLE, C. G. *et al. J. Virol.* **86**, 438-446 (2012).

156. NITSCHKE, C. *et al. Chem. Rev.* **114**, 11348-11381 (2014).

157. LEI, J. *et al. Science* **353**, 503-505 (2016).

158. RAWLINSON, S. M. *et al. Curr. Drug Targets* **7**, 1623-1638 (2006).

159. YAP, T. L. *et al. J. Virol.* **81**, 4753-4765 (2007).

160. GODOY, A. S. *et al. Nat. Commun.* **8**, 14764 (2017).

161. ZHAO, B. *et al. Nat. Commun.* **8**, 14762 (2017).

phosphorylation, ces agents inhibent l'activité de la RdRp en concurrence avec les nucléotides endogènes ; leur incorporation dans l'ARN naissant entraîne soit une terminaison de la chaîne, soit une accumulation létale de mutations.

De nombreux inhibiteurs nucléosidiques des flavivirus basés sur la structure des nucléotides naturels comme 7-Deaza-2'-C-méthyl adénosine (7DMA),¹⁶² le 2'CMA-C-méthyladénosine, ou le le NITD008^{163, 164} sont décrits dans la littérature. L'analogue de l'adénosine, BCX4430, initialement développé contre les filovirus, a démontré une activité à large spectre contre de nombreux virus, dont DENV-2.¹⁶⁵ Le BCX4430 possède notamment un profil pharmacocinétique et une efficacité favorables contre le virus Ebola (EBOV) démontrés lors d'un essai clinique de phase I (ClinicalTrials.gov identifier : NCT02319772) complété en 2016.¹⁶⁶ Malgré des résultats encourageants, les recherches visant à mettre au point des inhibiteurs nucléosidiques contre le RdRp flaviviral restent compliquées pour deux raisons principales :

1. **La conversion des inhibiteurs nucléosidiques en triphosphate** biologiquement actif par les kinases hôtes. La capacité d'optimisation de la structure nucléosidique est souvent limitée par la spécificité restreinte du substrat des kinases cellulaires.¹⁶⁷ Des prodrogues ont été élaborées pour surmonter ces obstacles¹⁶⁸ et l'approche des promédicaments phosphoramidiques tels que le sofosbuvir a été efficace pour l'inhibiteur nucléosidique du VHC.¹⁶⁹
2. **La toxicité résultant d'une sélectivité insuffisante** contre les polymérases non ciblées. Une synergie antivirale a été observée pour une combinaison d'INX-08189 et de ribavirine dans des essais cellulaires du DENV.¹⁷⁰ Ceci montre l'intérêt des stratégies de combinaison visant à réduire au minimum la toxicité.

Récemment, des inhibiteurs allostériques de la NS5 RdRp du DENV ont été rapportés comme étant actifs contre les quatre sérotypes au cours de tests enzymatique et cellulaires.¹⁷¹ Les inhibiteurs ciblent une poche près du site actif, interférant ainsi avec les changements de conformation de la RdRp requis pour passer de l'initiation à l'élongation. Les résidus qui tapissent la poche sont conservés dans d'autres flavivirus ;¹⁷¹ toutefois, l'activité de ces résidus n'a été évaluée que dans le DENV. Un problème potentiel de cette stratégie allostérique est la faible conservation des domaines concernés qui expose au phénomène de résistance, comme observé pour les inhibiteurs allostériques de la polymérase du VHC.¹⁷²

162. ZMURKO, J. *et al. PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1-16 (2016).

163. YIN, Z. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 20435-20439 (2009).

164. LATOUR, D. R. *et al. Antiviral Res.* **87**, 213-222 (2010).

165. WARREN, T. K. *et al. Nature* **508**, 402-405 (2014).

166. TAYLOR, R. *et al. J. Infect. Public Health* **9**, 220-226 (2016).

167. GOLITSINA, N. L. *et al. Antiviral Res.* **85**, 470-481 (2010).

168. SOFIA, M. J. in *Adv. Pharmacol.* 39-73 (2013).

169. SOFIA, M. J. *et al. J. Med. Chem.* **53**, 7202-7218 (2010).

170. YEO, K. L. *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2086-2093 (2015).

171. LIM, S. P. *et al. PLoS Pathog.* **12** (éd. FREMONT, D. H.) e1005737 (2016).

172. ELTAHLA, A. A. *et al. Viruses* **7**, 5206-5224 (2015).

3.6 Inhibiteurs du CHIKV

Plusieurs approches ont été examinées pour le développement de produits thérapeutiques : l'utilisation de composés antiviraux traditionnels, de composés issues de la synthèse, le criblage *in silico* à haut débit de composés existants et l'utilisation de dérivés d'acide nucléique, d'anticorps monoclonaux et de molécules ciblant les protéines des cellules hôtes¹¹² (*i.e.* les PKC). Cependant, à l'heure actuelle, aucun composé n'a atteint la phase clinique et le traitement vise principalement à soulager les symptômes, notamment les douleurs articulaires à l'aide d'antipyrétiques, d'analgésiques optimaux et de liquides. Le chapitre suivant est consacré aux puissants effets inhibiteurs de la mort cellulaire induite par le CHIKV des phorboides.

Chapitre 4

Les phorboïdes anti-CHIKV : implication des Protéines Kinases C

Sommaire

4.1 Les tiglianes et ingénanes	49
4.1.1 Relations structure-activité	51
4.1.2 Inhibition de la réplication du VIH	51
4.2 Les daphnanes	54
4.3 Les PKC, des cibles potentielles des esters de phorbol anti-CHIKV	56

Parmi les diterpènes macrocycliques, les phorboïdes (*i.e.* les tiglianes, les ingénanes et les daphnanes) présentent de puissantes activités inhibitrices du CHIKV. Entre 2011 et 2019, les activités de 54 phorboïdes (naturels ou commerciaux) anti-CHIKV ont été décrites dans la littérature.¹⁷³ Ce chapitre dresse des relations structure-activité de ces composés et discute de l'implication probable des PKC dans le mécanisme d'inhibition de l'effet cytopathique du CHIKV.

Dans un premier temps, la cytotoxicité de tous les composés a été évaluée (cellules Vero) afin de pouvoir ultérieurement calculer un indice de sélectivité (SI), défini comme le rapport : $CC_{50} \text{ Vero} / CE_{50}$ où CC_{50} et CE_{50} sont la concentration en composé qui inhibe 50% du métabolisme cellulaire, et la concentration en composé qui inhibe 50% de la mort cellulaire induite par le virus, respectivement. La méthodologie utilisée pour le test d'inhibition du CHIKV est celle décrite par Bourjot *et al.*³³

4.1 Les tiglianes et ingénanes

Les tiglianes forment le plus grand groupe de phorboïdes. Ils sont constitués d'un système tétracyclique 5/7/6/3 dans lequel les cycles A et B, et B et C sont joints par une liaison *trans* alors

173. REMY, S. & LITAUDON, M. *Molecules* **24**, 2336 (2019).

que la liaison des cycles C et D est *cis*. Un carbonyle est situé en position 3, une double liaison en C-1, et la plupart des tiglianes sont hydroxylés aux positions 4, 9, 12, 13, 13, et 20.⁴ Également appelés esters de phorbol (PE), la plupart des tiglianes existent sous la forme de 12,13 ou 13,20-diesters et certains existent sous la forme de 12- ou 13- monoesters et de 12,13,20-triesters. Ils peuvent être classés en :

- phorbol esters, regroupant les mono- di- ou tri-esters
- 4-deoxyphorbol esters,
- 12-deoxyphorbol esters
- 4,12- dideoxyphorbol esters
- 4,20-dideoxyphorbol esters¹⁷⁴

Les ingénanes, groupe de phorboïdes biogénétiquement plus évolué,⁵⁰ possèdent un squelette tétracyclique 5/7/7/3 incluant un pont cétonique entre les carbones C-8 et C-10 et une position 4 β -hydroxylée. La jonction entre les cycles A et B est *trans* et des doubles liaisons relient les carbones C-1 et C-2 sur le cycle A et les carbones C-6 et C-7 sur le cycle B. Les positions 3, 5, 13, 17 et 20 peuvent être oxygénées et/ou estérifiées.⁴

Au total, 51 tiglianes (**1-51**) et 3 ingénanes (**52-54**) ont été évalués dans un test cellulaire contre le CHIKV. Ces composés étaient soit commerciaux (**1-20**, **25**, **26**, **41-43**, **52-54**)¹⁷⁵ soit isolés de différentes espèces d'Euphorbiaceae *i.e.*, *Trigonostemon howii*³³ (**21**), *Croton mauritanus*¹⁷⁶ (**23**, **24**), *Euphorbia semiperfoliata*¹⁷⁷ (**33-35**, **40**), *Stillingia lineata*¹⁷⁸ (**22**, **31**, **32**, **44**, **45**), *Bocquillonia nervosa*¹⁷⁹ (**46-49**), *Euphorbia pithyusa*¹⁸⁰ (**42**, **43**, **50**, **51**), *Euphorbia dendroides*¹⁸¹ (**36-39**), *Euphorbia cupanii*¹⁸² (**27-30**) (Tableau 4.1, FIGURE 4.1). La plupart de ces diterpènes possèdent de puissantes activités inhibitrices du CHIKV. Cependant, le niveau d'activité semble dépendant du type structural concerné et de ses substituants. Le phorbol-12,13-didecanoate (**11**), le 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acétate (TPA, **15**) et dans une moindre mesure le 12-deoxyphorbol-13-hexadecanoate (**46**) ont démontré les activités les plus élevées rapportées à ce jour (CE_{50} = 6.0, 2.9 and 20 nM, and SI = 686, 1965 and 1500, respectivement). Le TPA n'a pas montré d'activité significative contre le virus Sindbis et le virus de la Forêt de Semliki, deux autres membres des *Alphavirus*.³³ Trente-deux autres tiglianes ou ingénanes ont montré des activités anti-CHIKV significatives avec des valeurs de CE_{50} comprises entre 20 nM et 5 μ M. Ils sont répartis dans toutes les classes décrites ci-dessus. Parmi eux, les phorbols esters **22**, et **27-29**, les 4-deoxyphorbol esters **33**, **35**, **37**, **38**, les 12-deoxyphorbol esters **41** (prostratine), **44**, and **47-49** ont montré des SI > 20.

174. WANG, H.-B. *et al. Chem. Rev.* **115**, 2975-3011 (2015).

175. NOTHIAS-SCAGLIA, L. F. *et al. J. Nat. Prod.* **78**, 1277-1283 (2015).

176. CORLAY, N. *et al. Fitoterapia* **97**, 87-91 (2014).

177. NOTHIAS, L.-F. *et al. J. Nat. Prod.* **80**, 2620-2629 (2017).

178. OLIVON, F. *et al. J. Nat. Prod.* **78**, 1119-1128 (2015).

179. OLIVON, F. *et al. ACS Chem. Biol.* **12**, 2644-2651 (2017).

180. ESPOSITO, M. *et al. J. Nat. Prod.* **80**, 2051-2059 (2017).

181. NOTHIAS, L. F. *et al. J. Nat. Prod.* **81**, 758-767 (2018).

182. NOTHIAS-ESPOSITO, M. *et al. J. Nat. Prod.* **82**, 1459-1470 (2019).

4.1.1 Relations structure-activité

Même s'il est difficile de formuler des règles claires de relations structure-activité au sein des tiglianes, des règles générales peuvent être élaborées. Comme précédemment rapporté,^{175,177} l'activité anti-CHIKV de certains phorbols peut être modulée par la longueur et la position en C-12 et/ou C-13 des chaînes acyles sur le squelette phorbol, la configuration relative de C-4 et la présence de carbonyles additionnels en positions 7 et 20. Généralement, une forte activité anti-CHIKV est rapportée pour les phorbols monoesters (**3**, **6**, **7**) et les phorbol di- et triesters (**9**, **11**, **15**, **17**, **19**, et **26-30**) possédant de longues chaînes aliphatiques en C-12 et/ou C-13. Au contraire, ceux possédant une chaîne courte sont moins actifs et moins sélectifs à l'exception du composé **22** possédant un groupement acétyle et un groupement méthyle-butyryle en C-12 et C-13 respectivement ($CE_{50} = 3.3 \mu\text{M}$, et $SI = 41$). La comparaison des composés **11** et **12**, et **15** (TPA) et **16** indique que les dérivés du 4β -phorbol sont de plus puissants inhibiteurs que leur équivalent 4α . Une observation similaire peut être notée en comparant les activités antivirales des 4 -déoxyphorbols possédant des chaînes courtes en C-12 et C-13 : les 4α -déoxyphorbols **31** et **34** ont démontré des activités plus faibles que celles des 4β -déoxyphorbols **35** et **33**. En revanche, le 4α -déoxyphorbol **32**, qui possède une chaîne nona-2-enoyl, présente une activité anti-CHIKV significative ($CE_{50} = 1.5 \mu\text{M}$, et $SI = 5.1$). Tous les 4β -déoxyphorbols à l'exception de **39**, présentent également une puissante activité anti-CHIKV, dont le 4β -déoxyphorbol 12-acétate-13-isobutyrate (**35**) qui a l'indice sélectivité le plus élevé ($CE_{50} = 0.44 \mu\text{M}$, et $SI = 390$). Enfin, la plupart des 12 -déoxyphorbols ont montré une forte activité anti-CHIKV. En particulier, les composés **46-48**, qui ont tous une chaîne latérale hexadécanoyle en C-13, présentent les meilleurs SI. Parmi ces derniers, la présence d'une fonction 6,7-époxy au lieu d'un groupement 6,7-dihydroxy a un effet favorable sur l'activité anti-CHIKV (**48 vs 49**)¹⁷⁹ En général, l'oxydation des esters de phorbol¹⁸³ menant à une cétone α,β -insaturée en position 20 ou 7 semble responsable d'une diminution significative de l'activité antivirale (**25 vs 9**, **26 vs 15**, **40**, **21**). Enfin, il convient de noter que l'ingénol-3,20-dibenzoate **54** a été le premier diterpénoïde de type ingénane présentant une activité anti-CHIKV significative.¹⁷⁵

4.1.2 Inhibition de la réplication du VIH

Les propriétés inhibitrices de la réplication du VIH-1 et du VIH-2, de la plupart des dérivés de tigliane et de l'ingénane mentionnés dans le Tableau 4.1, ont également été évalués.^{175,178} De manière générale, les relations structure-activité établies pour les activités anti-CHIKV des composés testés sont applicables pour les activités anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Notamment, le rôle de la longueur et de la position des chaînes acyles en C-12 et C-13, la nécessité d'une configuration C- 4β pour un effet antiviral élevé, et l'effet délétère d'une oxydation en C-20. De plus, le calcul des coefficients de corrélation de Pearson, entre les valeurs de CE_{50} pour chaque paire de virus, ont montré que les CE_{50} étaient positivement corrélés (CHIKV/HIV-1, $r = 0,81$

183. SCHMIDT, R. & HECKER, E. *Cancer Res.* **35**, 1375-1377 (1975).

$\pm 0,09$; CHIKV/HIV-2, $r = 0,84 \pm 0,07$).¹⁷⁵ Par conséquent, à l'instar du mécanisme d'action proposé pour les inhibiteurs du VIH,²⁹ les dérivés d'esters de phorbol pourraient fonctionner selon un mécanisme propre au CHIKV, éventuellement associé à l'activation des PKC.¹⁸⁴

Tableau 4.1 – Activité Anti-CHIKV des tiglianes et des ingénanes (μM)

Composé	CE ₅₀	SI	R1	R2	R3
1 phorbol	> 343	> 1	HO-	HO-	HO-
2 phorbol-12-acétate	> 245	0.8	AcO-	HO-	HO-
3 phorbol-12-decanoate	4.9 \pm 1.7	1.5	DecO-	HO-	HO-
4 phorbol-13-acétate	> 174	n.d.	HO-	AcO-	HO-
5 phorbol-13-butyrate	20 \pm 10	12.3	HO-	BuO-	HO-
6 phorbol-13-decanoate	2.2 \pm 0.1	9.7	HO-	DecO-	HO-
7 phorbol-13-tetradecanoate	0.99 \pm 0.03	9.0	HO-	TetradecO-	HO-
8 phorbol-12,13-diacétate	9.4 \pm 1.0	4.2	AcO-	AcO-	HO-
9 phorbol-12,13-dibutyrate	1.8 \pm 0.2	2.1	BuO-	BuO-	HO-
10 phorbol-12,13-dihexanoate	3.2 \pm 0.2	1.8	HexO-	HexO-	HO-
11 phorbol-12,13-didecanoate	6.0 \pm 0.9 nM	686	DecO-	DecO-	HO-
12 4 α -phorbol-12,13-didecanoate	1.5 \pm 0.1	2.2	DecO-	DecO-	HO-
13 phorbol-13,20-diacétate	24.6 \pm 7.1	1.7	HO-	AcO-	AcO-
14 phorbol-12,13,20-triacétate	32.6 \pm 4.0	2.2	AcO-	AcO-	AcO-
15 12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acétate (TPA)	2.9 \pm 0.3 nM	1965	TetradecO-	AcO-	HO-
16 12- <i>O</i> -tetradecanoyl-4 α -phorbol-13-acétate	2.8 \pm 0.5	1.9	TetradecO-	AcO-	HO-
17 12- <i>O</i> -tiglylphorbol-13-decanoate	1.1 \pm 0.3	3.3	Tiglo-	DecO-	HO-
18 12- <i>O</i> -(<i>N</i> -methylantranilate)phorbol-13-acétate	15 \pm 4	1.1	MA-	AcO-	HO-
19 12,13- <i>O</i> , <i>O'</i> -dinonanoylphorbol-20-homovanillate	0.6 \pm 0.1	3.7	NonO-	NonO-	HVA-
20 12- <i>O</i> -phenylacetyl-13- <i>O</i> -acetylphorbol-20-homovanillate	1.7 \pm 0.3	14.2	PhAcO-	AcO-	HVA-
21 trigowiin A	> 100	> 2.3	DodecO-	AcO-	-
22 12- <i>O</i> -acetylphorbol-13(2 ^{yl} -methyl)-butyrate 12	3.3 \pm 0.3	41	AcO-	mBuO-	HO-
23 12- <i>O</i> -decanoylphorbol-13-acétate	2.4 \pm 0.3	2.0	DecO-	AcO-	HO-
24 12- <i>O</i> -decanoyl-7-hydroperoxy-5-en E -13-acétate phorbol	4.0 \pm 0.8	1.9	-	-	-
25 20-oxo-phorbol-12,13-dibutyrate	13.1 \pm 0.5	2.7	BuO-	BuO-	O=
26 20-oxo-TPA	0.7 \pm 0.1	5.9	TetradecO-	AcO-	O=

184. MÁRQUEZ, N. *et al.* *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1370-1380 (2008).

Composé	CE ₅₀	SI	R1	R2	R3
27 12 β - <i>O</i> -[Deca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dienoyl]-13 α -isobutyl-4 β -phorbol	< 0.7	>77	<i>E</i> -DecadiO-	iBuO-	HO-
28 12 β - <i>O</i> -[Deca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dienoyl]-13 α -(2-methylbutyl)-4 β -phorbol	< 0.7	>12	<i>E</i> -DecadiO-	mBuO-	HO-
29 12 β - <i>O</i> -[Deca-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -phorbol	< 0.8	>58	DecadiO-	iBuO-	HO-
30 12 β - <i>O</i> -[Deca-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dienoyl]-13 α -isobutyryl-5-en <i>E</i> -7-oxo-4 β -phorbol	4.5 \pm 0.6	6	DecadiO-	iBuO-	-
4-deoxyphorbol esters					
31 12 β - <i>O</i> -acetyl-4 α -deoxyphorbol-13(2''-methyl)-butyrate	77	1.4	AcO-	mBuO-	-
32 12 β - <i>O</i> -[nona-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -trienoyl]-4 α -deoxy-phorbol-13-butyrate	1.4 \pm 0.2	5.1	NontriO-	BuO-	-
33 4 β -Deoxyphorbol 12-tiglate-13-isobutyrate	1.0 \pm 0.4	25	TigIO-	iBuO-	-
34 4 α -Deoxyphorbol 12-tiglate-13-isobutyrate	17.0 \pm 1.0	7	TigIO-	iBuO-	-
35 4 β -Deoxyphorbol 12-acétate-13-isobutyrate	0.44 \pm 0.03	390	AcO-	iBuO-	-
36 12 β - <i>O</i> -[Deca-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol	0.9 \pm 0.1	6	DecadiO-	iBuO-	-
37 12 β - <i>O</i> -[Deca-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -trienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol	0.6 \pm 0.6	41	DecatriO-	iBuO-	-
38 12 β - <i>O</i> -[Octa-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol	0.4 \pm 0.02	34	OctaDiO-	iBuO-	-
39 12 β - <i>O</i> -[Deca-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> -trienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol	12.6 \pm 46.2	4	7-DecatriO-	iBuO-	-
4,20-dideoxyphorbol ester					
40 4 α ,20-Dideoxyphorbol 12-tiglate-13-isobutyrate	51.1 \pm 4.1	3	-	-	-
12-deoxyphorbol esters					
41 12-deoxyphorbol-13-acétate	2.7 \pm 1.2	22.8	H-	AcO-	HO-
42 13- <i>O</i> -isobutyryl-12-deoxyphorbol-20-acétate	0.7 \pm 0.1	5.0	H-	BuO-	AcO-
43 13- <i>O</i> -phenylacetyl-12-deoxyphorbol-20-acétate	50.8 \pm 2.1	1.9	H-	PhAcO-	AcO-
44 12-deoxyphorbol-13(2''-methyl)butyrate	1.2 \pm 0.2	> 240	H-	mBuO-	HO-
45 12-deoxyphorbol-13-[8'-oxo-hexadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -trienoate]	2.2 \pm 1.5	5.9	H-	OxoHDTO-	HO-
46 12-deoxyphorbol-13-hexadecanoate	0.02 \pm 0.001	1500	H-	HexadecO-	HO-

	Composé	CE ₅₀	SI	R1	R2	R3
47	12-deoxy-5β-hydroxy-phorbol-13-hexadecanoate	0.13 ± 0.03	98	H-	HexadecO-	HO-
48	12-deoxy-6,7-epoxy-5β-hydroxy-phorbol-13-hexadecanoate	0.09 ± 0.05	54	-	-	-
49	12-deoxy-5β,6β,7α-trihydroxy-phorbol-13-hexadecanoate	2.14 ± 0.3	26	-	-	-
4,12-dideoxyphorbol esters						
50	4α-12-dideoxyphorbol-13(2,3-dimethyl)butyrate-20-acétate	> 11	n.d	-	dBuO-	OAc-
51	4β-12-dideoxyphorbol-13(2,3-dimethyl)butyrate-20-acétate	4.0 ± 0.3	10.6	-	dBuO-	OAc-
Ingenanes						
52	ingenol	30.1 ± 19.2	4.8	HO-	HO-	-
53	ingenol-3-mebutate	22.9 ± 5.2	2.3	MbO-	HO-	-
54	ingenol-3,20-dibenzoate	1.2 ± 0.1	6.4	BzO-	BzO-	-
	chloroquine	10 ± 5	8.9	-	-	-

4.2 Les daphnanes

Les daphnanes, dérivés d'un précurseur de type tigliane¹⁸⁵ sont basés sur un squelette tricyclique 5/7/6 dont les jonctions de cycles A/B et B/C sont *trans*. Une double liaison ou un groupe époxy peut être présent entre les carbones C-6 et C-7. Un grand nombre de daphnanes possèdent un fragment orthoester (Daphnane Diterpenoid Orthoesters - DDO), qui peut être fixé sur l'anneau C à différentes positions *i.e.* C-9, C-11, C-12, C-13 et C-14.^{185, 186} Dans plusieurs études récentes, les activités anti-CHIKV de la résinifératoxine (**55**) disponible sur le marché¹⁷⁵, ainsi que des DDO isolés de *Trigonostemon cherrieri*^{187, 188, 189} (**56-63**), *Neoguillauminia Cleopatra*¹⁷⁹ (**64**), et *Codiaeum peltatum*¹⁸⁶ (**65, 66**), ont été rapportées (Tableau 4.2, FIGURE 4.2). La plupart d'entre eux ont montré des activités anti-CHIKV significatives avec des valeurs CE₅₀ de 0,6-18 μM (Tableau 4.2). De cette série chimique, la trigocherrierine A (**56**) possédant une chaîne latérale 2-méthyl-décanoyle en C-12 et un fragment 9,13,14-orthoester présentait la plus forte activité antivirale avec le plus fort indice sélectif (CE₅₀ = 0,6 μM, et SI = 72). Enfin, il a été démontré que les activités anti-VIH des trigocherriolides sont 100 à 1000 fois plus élevées que celles des trigocherrines, ce qui suggère un mécanisme d'action différent.¹⁹⁰

185. HE, W. *et al. Mini-Reviews Med. Chem.* **2**, 185-200 (2005).

186. OLIVON, F. *et al. J. Nat. Prod.* **82**, 330-340 (2019).

187. BOURJOT, M. *et al. Molecules* **19**, 3617-3627 (2014).

188. ALLARD, P. M. *et al. Phytochemistry* **84**, 160-168 (2012).

189. ALLARD, P. M. *et al. Org. Lett.* **14**, 342-345 (2012).

190. LITAUDON, M *et al. Planta Med.* **79** (2013).

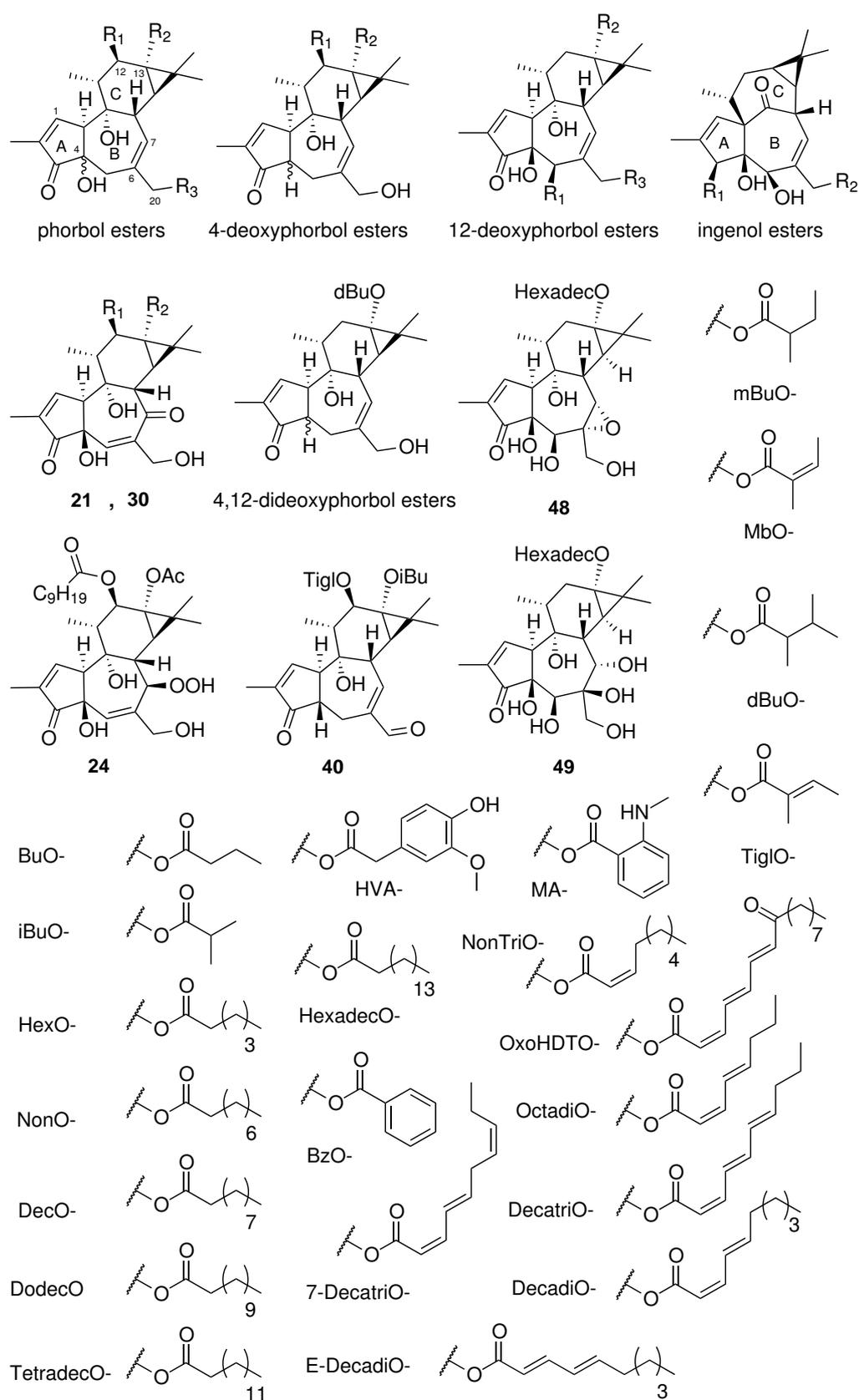


FIGURE 4.1 – Structure des tiglianes et des ingénanes

Tableau 4.2 – Activité Anti-CHIKV des daphnanes (μM)

	Composé	EC ₅₀	SI
55	resiniferatoxin	1,8 \pm 0,2	2,3
56	trigocherrierin A	0,6 \pm 0,1	71,7
57	trigocherrin A	1,5 \pm 0,6	23
58	trigocherrin B	2,6 \pm 0,7	36
59	trigocherrin F	3,0 \pm 1,2	7,7
60	trigocherriolide A	1,9 \pm 0,6	2,4
61	trigocherriolide B	2,5 \pm 0,3	2,1
62	trigocherriolide C	3,9 \pm 1,0	2,7
63	trigocherriolide E	0,7 \pm 0,1	9,4
64	neoguillauminin A	17,7 \pm 0,8	2
65	codiapeltine A	10,0 \pm 2,3	5
66	codiapeltine B	4,4 \pm 0,5	11
	chloroquine	10 \pm 5	8,9

4.3 Les PKC, des cibles potentielles des esters de phorbol anti-CHIKV

Récemment, il a été démontré que les effets inhibiteurs des esters de phorbols (PE) sur le VIH-1 et le VIH-2 sont fortement corrélés à ceux observés sur CHIKV.¹⁷⁵ Ces résultats sont assez surprenants étant donné que le CHIKV et le VIH appartiennent à deux genres de virus différents, *Alphavirus* et *Lentivirus*, respectivement, mais peuvent très probablement s'expliquer par un mécanisme d'action commun basé sur les PKCs. Bien que le mécanisme reste mal défini, cela indique que l'inhibition de la mort cellulaire par les esters de phorbol induite par le CHIKV pourrait résulter d'une activation des PKCs,¹⁹¹ et qu'elles constituent une cible importante pour l'inhibition de la réplication du CHIKV.

Les PKC sont une famille de sérine/thréonine kinases qui régulent de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Elles sont classées en plusieurs sous-familles en fonction de leur mode d'activation. Les isoformes classiques (α , βI , βII , et γ) nécessitent du calcium et du diacylglycérol (DAG); les nouvelles isoformes (PKC- δ , $-\epsilon$, $-\eta$, et $-\theta$) nécessitent le DAG mais pas le calcium pour leur activation, tandis que l'activation des isoformes atypiques (M ζ - ι/λ) est indépendante du calcium et de DAG. Après activation, les PKCs subissent une translocation du cytoplasme vers la membrane plasmique et agissent par

191. ABDELNABI, R. *et al. Antiviral Res.* **139**, 79-87 (2017).

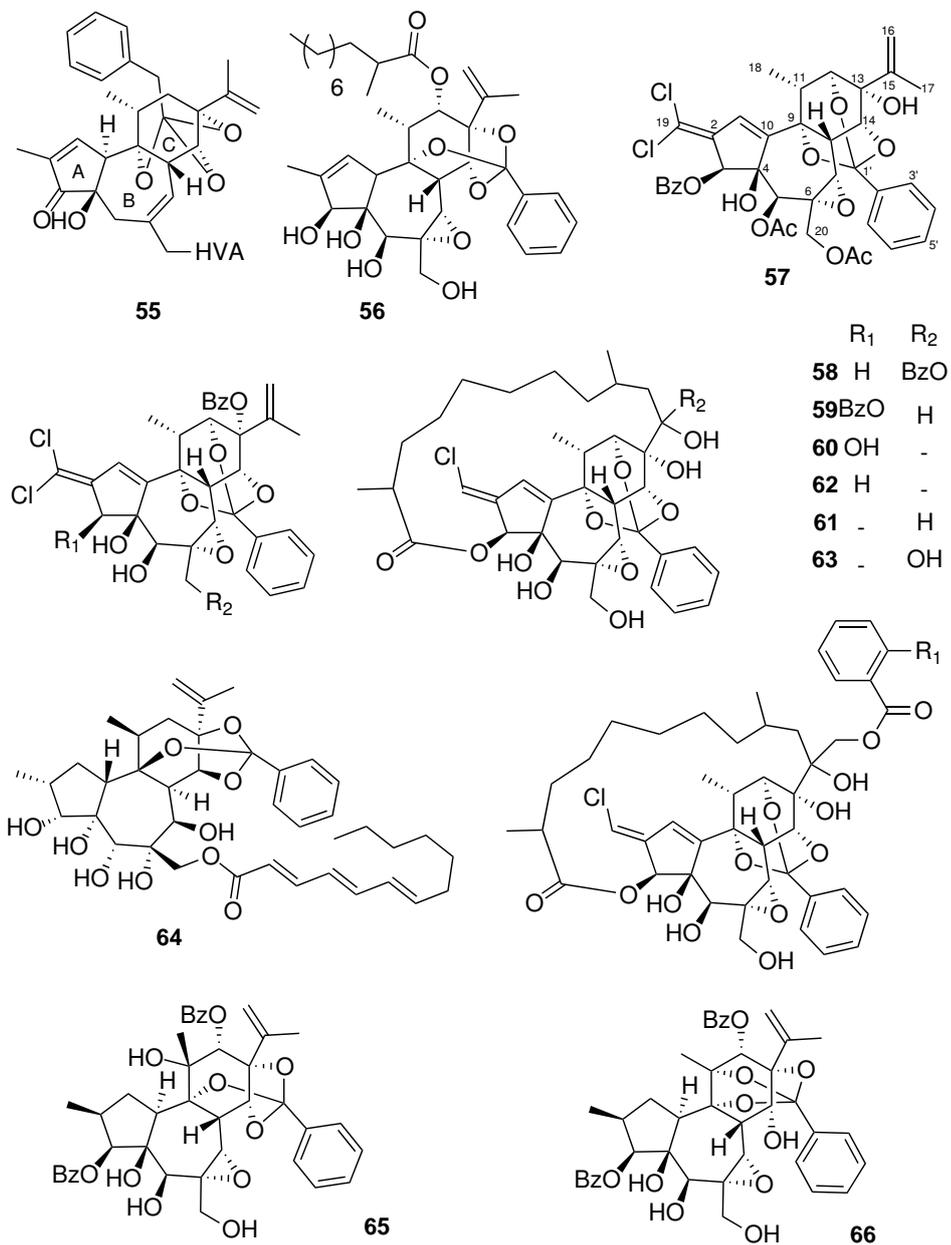


FIGURE 4.2 – Structure des daphnanes

phosphorylation des facteurs de signalisation.^{192, 193, 194} En raison de leur similarité structurale avec le DAG, les PE sont des ligands puissants du domaine régulateur de toutes les isoformes des PKC classiques et nouvelles.

L'interaction des phorbols avec la PKC dépend de leurs substituants et nécessite une combinaison optimale de liaisons hydrogène et de contacts hydrophobes. Les phorbols se lient à un site riche en cystéine remplaçant une molécule d'eau en établissant des liaisons hydrogène *via* les atomes d'oxygène liés aux carbones C-3, C-4, et C-20.^{195, 196, 197} Les chaînes acyles hydrophobes des esters de phorbol permettent la formation d'un complexe avec les PKCs et leur ancrage à la membrane.¹⁹⁷ Il a été constaté que des changements au niveau de l'atome d'oxygène C-3¹⁹⁸ pouvaient entraîner une diminution de l'activation de la PKC en raison de la perte des effets inductifs et stériques exercés sur le groupe hydroxy C-4.¹⁹⁶ Étant donné que la configuration *cis* de la jonction des cycles A/B pourrait créer un arrangement spatial incompatible avec la liaison PKC, les plus puissants PE modulateurs de l'activité des PKCs appartiennent à la série β (jonction A/B *trans*).¹⁹⁹ Le modèle pharmacophorique pour les PE nécessite une région lipophile, trois groupes capables de former des liaisons hydrogène, et une distance et une orientation adéquates entre la région lipophile des chaînes ester et les systèmes cycliques du squelette phorbol.¹⁹⁸

Les tiglianes, qui sont l'une des classes les plus importantes des diterpènes d'Euphorbiaceae,^{4,174} possèdent un squelette chimique comprenant un gem-diméthylcyclopropane qui pourrait être associée à une activation PKC.²⁰⁰ Parmi les tiglianes, la prostratine est un ester de 12-déoxyphorbol qui s'est révélé être un puissant activateur des PKC.¹⁹⁴ Ce composé, qui n'a pas d'effet protumoral,²⁰¹ inhibe l'entrée du VIH et compromet les réservoirs viraux latents du VIH par des mécanismes dépendant de la PKC.^{202, 203} Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études^{26-29,184} ont montré que les dérivés du phorbol stimulent la réplication du VIH tout en inhibant la formation de virions, supprimant ainsi les réservoirs latents du virus par la stratégie de "kick and kill".²⁰⁴

Il a récemment été constaté que la prostratine était également un inhibiteur puissant et sélectif du CHIKV.³³ Elle inhibe principalement la réplication du CHIKV après l'entrée du virus dans la cellule et conserve donc une activité antivirale lorsqu'il est ajouté aux cellules plusieurs heures après l'infection.¹⁹¹ Elle a été testée en association avec des inhibiteurs de la PKC de spectre

192. BREITKREUTZ, D. *et al.* *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **133**, 793-808 (2007).

193. CORBALÁN-GARCÍA, S. & GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 633-654 (2006).

194. MCKERNAN, L. N. *et al.* *Adv. Virol.* **2012**, 1-8 (2012).

195. MATIAS, D. *et al.* in *Stud. Nat. Prod. Chem.* (éd. ur RAHMAN, A.) 1^{re} éd., 45-79 (Elsevier, 2016).

196. XU, R. X. *et al.* *Biochemistry* **36**, 10709-10717 (1997).

197. KRAFT, A. S. & ANDERSON, W. B. *Nature* **301**, 621-623 (1983).

198. WENDER, P. A. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4214-8 (1986).

199. SILINSKY, E. M. & SEARL, T. J. *Br. J. Pharmacol.* **138**, 1191-1201 (2003).

200. DURÁN-PEÑA, M. J. *et al.* *Nat. Prod. Rep.* **31**, 940-952 (2014).

201. GUSTAFSON, K. R. *et al.* *J. Med. Chem.* **35**, 1978-1986 (1992).

202. LÓPEZ-HUERTAS, M. R. *et al.* *J. Biol. Chem.* **286**, 27363-27377 (2011).

203. TRUSHIN, S. A. *et al.* *J. Virol.* **79**, 9821-9830 (2005).

204. THORLUND, K. *et al.* *BMC Infect. Dis.* **17**, 1-12 (2017).

connu, et les résultats ont montré que l'effet de la prostratine semblait être principalement médié par l'activation des isoformes classiques de la PKC.¹⁹¹

Compte tenu de l'activité anti-CHIKV des PE rapportée ci-dessus, des relations structure-activité ont pu être proposées. Elles suggèrent l'importance de la configuration du carbone C-4, l'influence des carbonyles en C-20 et/ou C-7 et la fonction 6,7-époxy (qui est spatialement proche de C-20) et le rôle clé des chaînes aliphatique des esters. Ces hypothèses sont en accord avec le modèle pharmacophorique élaboré pour les interactions phorbol-PKC.¹⁹¹⁻¹⁹⁵ L'une des principales préoccupations au sujet des phorbols est leur effet pro-tumoral. Elle a été attribuée à des chaînes acyles hydrophobes qui sont exposées à l'extérieur du complexe PKC/phorbol et le retiennent probablement au niveau de la membrane plasmique. Il en résulte une activation soutenue de la PKC qui entraîne sa dérégulation et ultimement, la perte de son activité. Parmi les PE, une longue chaîne latérale en position 13 associée à l'absence d'hydroxyle en position 12 (esters de déoxyphorbol-12) semble être responsable d'une forte activité tumorale. Par conséquent, les PE à chaîne(s) acyle(s) courte(s) ou moyenne(s) peuvent activer les PKC classiques et devraient être dépourvus d'activité pro-tumorale.

Les esters de phorbol, les esters de 4-déoxy et de 12-déoxyphorbol se sont parmi les agents anti-CHIKV les plus prometteurs. Étant donné que les PKC sont des cibles potentielles pour l'inhibition de la réplication du CHIKV et que les PE agissent très probablement par une voie dépendante de la PKC, ces composés et leurs analogues offrent des possibilités intéressantes de développement comme agents thérapeutiques pour le traitement du chikungunya.^{184, 205, 206, 207}

205. BOCKLANDT, S. *et al.* *Antiviral Res.* **59**, 89-98 (2003).

206. ZHANG, G. *et al.* *Cell* **81**, 917-924 (1995).

207. NEWTON, A. C. & BROGNARD, J. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 438-447. arXiv : 15334406 (2017).

Chapitre 5

Les réseaux moléculaires

Sommaire

5.1	Acquisition des données LC-MS/MS	61
5.2	Traitement des données de LC-MS/MS	62
5.3	Annotation des données MS/MS	64
5.3.1	Comparaison aux bases de données spectrales	64
5.3.2	Comparaison aux bases de données structurales	66
5.3.3	Annotation des motifs structuraux : "MS2LDA"	68
5.3.4	Annotation de la classe chimique : "ClassyFire"	69
5.4	Les réseaux moléculaires	69
5.4.1	GNPS	71
5.4.2	MetGem	72
5.4.3	Cartographie de métadonnées : priorisation des extraits de plantes	72
5.5	Annotation du réseau moléculaire	73
5.5.1	Network Annotation Propagation	73
5.5.2	MolNetEnhancer	74
5.5.3	Anticipation des structures chimiques : "MetWork" et "C-NAP"	74

5.1 Acquisition des données LC-MS/MS

Dans le cadre de ces travaux, les données ont été acquises grâce à un spectromètre de masse tandem quadripôle-temps de vol (Q-ToF). Dans ce système, les ions produits par la source d'ionisation pénètrent dans un premier quadripôle permettant de sélectionner les ions d'intérêt pour leur fragmentation en MS/MS. Le champ électrique de ce quadripôle stabilise la trajectoire des ions possédant un rapport m/z déterminé. Ces ions pénètrent ensuite dans un second quadripôle, jouant le rôle de cellule de collision, où ils sont décomposés en fragments suite à leur collision (collision-induced dissociation - CID) avec un gaz inerte (*i.e.* azote ou argon). Les ions fragments, sont enfin dirigés vers la dernière partie du spectromètre de masse, le ToF. Dans cette partie,

avant d'atteindre le détecteur, ils parcourent une distance en un temps proportionnel à la racine carrée de leur rapport m/z qui peut ainsi être calculé. Les modes d'acquisition automatique permettent d'optimiser la quantité d'information lors de l'analyse.²⁰⁸ Deux grands modes d'acquisition sont principalement utilisés : l'analyse data-indépendante (data independent analysis - DIA) et l'analyse data-dépendante (data dependent analysis - DDA).

La **DIA** est une méthode analytique dans laquelle tous les ions d'une gamme de m/z sont fragmentés et analysés. Les spectres sont acquis soit à un moment donné soit en fragmentant des gammes de m/z prédéterminées de manière séquentielle.²⁰⁹ La DIA assure un bon recouvrement des analytes présents dans le mélange mais souffre de la perte du lien entre l'ion parent et les fragments, nécessitant un traitement des données plus complexe, si bien qu'elle est peu utilisée en métabolomique en comparaison à la DDA. Lors d'une **DDA**, le spectromètre passe automatiquement du mode MS au mode MS/MS lorsque les ions précurseurs dépassent un seuil d'intensité prédéfini (ou tout autre critère prédéfini). Ainsi, seuls les N ions les plus intenses du spectre MS sont fragmentés. Une fenêtre d'exclusion dynamique assure que le même ion précurseur ne puisse être sélectionné à nouveau pour l'analyse MS/MS qu'après un certain intervalle de temps. Le lien entre l'ion précurseur et les fragments est conservé, cependant la sélection du nombre d'ions à fragmenter est limitée par le temps de cycle nécessaire à l'instrument pour l'acquisition des spectres MS/MS.²⁰⁹

Chaque analyse génère de grandes quantités de données (plusieurs milliers de spectres MS/MS par expérience), c'est pourquoi les données brutes doivent être retraitées afin d'en extraire les informations chimiques pertinentes. Le traitement des données comporte plusieurs étapes : le pré-traitement, l'annotation des spectres et l'analyse statistique et/ou la construction de graphiques représentant les relations entre les données (réseaux).²¹⁰

5.2 Traitement des données de LC-MS/MS

La majorité des programmes disponibles gratuitement pour le prétraitement exigent que les données MS soient dans un **format libre**, par exemple mzML, mzXML et netCDF. La première étape avant le prétraitement est donc souvent la conversion vers un format libre de données. Cette conversion peut être effectuée à l'aide du logiciel MSConvert²¹¹ prenant en charge la plupart des formats propriétaires (.d pour Agilent, .raw pour Waters). Les étapes initiales du prétraitement des données consistent généralement en la détection des pics (peak picking), la déconvolution, l'appariement des pics (peak matching) et l'alignement des pics entre les échantillons.²¹² La première étape de détection des pics peut également inclure la correction de la ligne de base, la réduction du bruit et le lissage, selon l'algorithme utilisé. La déconvolution est nécessaire pour traiter les pics chevauchants et les fragments provenant du même métabolite. Avant l'alignement,

208. ALLWOOD, J. W. & GOODACRE, R. *Phytochem. Anal.* **21**, 33-47 (2010).

209. FENAILLE, F. *et al. J. Chromatogr. A* **1526**, 1-12 (2017).

210. AKSENOV, A. A. *et al. Nat. Rev. Chem.* **1**, 0054 (2017).

211. CHAMBERS, M. C. *et al. Nat. Biotechnol.* **30**, 918-920 (2012).

212. WANT, E. & MASSON, P. in *Methods Mol. Biol.* 277-298 (2011).

les pics sont appariés/groupés par m/z et temps de rétention. L'alignement des pics est généralement effectué en utilisant les temps de rétention issus des données chromatographiques.²¹³ Bon nombre d'outils de prétraitement reconnus pour les données LC-MS sont disponibles en langage R, notamment XCMS,²¹⁴ le logiciel le plus utilisé pour les analyses LC-MS,²¹⁵ ou inclus dans des workflows. Ces workflows, regroupent l'ensemble des outils nécessaires au traitement des données de LC-MS et ont l'avantage de posséder une interface graphique sous la forme de plateformes web (MetaboAnalyst 3.0, XCMS Online, W4M) ou d'applications de bureau (MZmine 2).²¹⁶

La détection des pics est une étape critique du prétraitement des données de MS. La méthode doit être suffisamment souple pour tenir compte des variations dans les données obtenues avec différents instruments, comme la résolution (chromatographique et masse), la forme des pics, ou le bruit de fond. En utilisant MZmine 2, la détection des pics s'effectue en plusieurs étapes²¹⁷ qui doivent être optimisées par l'opérateur :

1. Le module "**mass detection**" génère une liste de masses (ions) pour chaque scan dans le fichier brut de données. Plusieurs algorithmes sont fournis pour cette étape. Le choix de l'algorithme optimal dépend des caractéristiques des données brutes (résolution de masse, précision de masse, forme du pic, bruit). Si les données brutes sont déjà centroidées, un seul algorithme (centroid mass detector) peut être utilisé. II détecte tous les signaux au-dessus d'un niveau de bruit donné comme étant des pics. D'autres algorithmes ne fonctionnent qu'avec des données de type continu.
2. Le module "ADAP (Automated Data Analysis Pipeline) **chromatogram builder**"²¹⁸ relie les m/z , de même valeurs, détectés sur plusieurs scans consécutifs. Afin de construire les EIC (Extracted Ion Chromatograms) l'algorithme connecte les pics les plus intenses en premier car ils ont tendance à être plus précis. À l'issue de cette étape un chromatogramme couvrant un intervalle de temps minimal est construit pour chaque m/z .
3. Chaque chromatogramme est ensuite **déconvolué** en pics chromatographiques individuels. Cette étape permet notamment de séparer les isomères (de même m/z) en fonction de leurs temps de rétention. L'algorithme "local minimum search" tente d'identifier les minima locaux dans le chromatogramme en tant que points de délimitation entre des pics individuels. L'algorithme de déconvolution ADAP, en plus des minima locaux, utilise l'approche de transformée en ondelettes continues (Continuous Wavelet Transform - CWT) qui diminue le nombre de faux positifs en considérant la forme du pic chromatographique.²¹⁹
4. À l'issue de la déconvolution, le module "isotopic peak grouper" tente de trouver les pics qui forment un modèle isotopique. Lorsqu'une configuration isotopique est trouvée, l'in-

213. ZHOU, B. *et al. Mol. BioSyst.* **8**, 470-481 (2012).

214. SMITH, C. A. *et al. Anal. Chem.* **78**, 779-787 (2006).

215. WEBER, R. J. *et al. Metabolomics* **13**, 12 (2017).

216. SPICER, R. *et al. Metabolomics* **13**, 106 (2017).

217. PLUSKAL, T. *et al. BMC Bioinformatics* **11** (2010).

218. MYERS, O. D. *et al. Anal. Chem.* **89**, 8696-8703 (2017).

219. DU, P. *et al. Bioinformatics* **22**, 2059-2065 (2006).

formation sur la charge et les rapports isotopiques est sauvegardée, et les pics isotopiques supplémentaires sont retirés de la liste des pics. Seul l'isotope le plus intense est conservé. Le module CAMERA (Collection of Algorithms for MEtabolite pRofile Annotation)²²⁰ associe, la détection des isotopes à l'identification de l'ion moléculaire, des différents adduits et des fragments en source, ce qui permet de réduire le nombre d'ions à prendre en compte pour la suite des analyses.

5. Lorsque plusieurs échantillons sont considérés, une **étape d'alignement**, dont le but est de faire correspondre les pics communs aux différentes listes de pics, est nécessaire. L'algorithme "joint aligner" aligne les pics détectés dans les différents échantillons à l'aide d'un score de correspondance. Ce score est calculé en fonction de la masse et du temps de rétention de chaque pic. L'un des inconvénients de cet algorithme est son incapacité à faire face à des déviations non linéaires des temps de rétention entre les échantillons. L'algorithme "random sample consensus" (RANSAC) corrige les déviations de RT²¹⁷ en créant un modèle mathématique de ces déviations à partir d'un sous-ensemble des échantillons.
6. La liste de pics résultante de l'alignement peut contenir des pics manquants en raison d'une détection incomplète des pics ou d'une erreur dans l'alignement des différentes listes de pics. Le module "gap-filling" comble les lacunes de la liste des pics lorsque cela est possible en fonction des paramètres définis par l'utilisateur. Les paramètres les plus importants sont "tolérance m/z " et "tolérance RT" qui définissent la fenêtre dans laquelle l'algorithme doit trouver le nouveau pic.
7. Enfin, l'identification des pics peut être effectuée en comparant les données de MS1 à des bases de données personnalisées de m/z et de RT, ou en se connectant à des ressources en ligne directement depuis l'interface de MZmine 2.

5.3 Annotation des données MS/MS

5.3.1 Comparaison aux bases de données spectrales

L'approche la plus couramment utilisée pour annoter les molécules qui ont été détectées par MS consiste à comparer leur spectre à des banques de spectres de composés connus. Concernant la LC-MS, les bases de données spectrales comprennent principalement des données ESI-CID-MS/MS.²¹⁰ Bien que certaines bases de données comme NIST restent payantes, ces dernières années, de nouvelles bases de données telles que MassBank, MoNA ou GNPS se sont spécialisées dans le partage des données MS/MS. On dénombre ainsi environ 150 000 spectres MS/MS de référence téléchargeables librement.²²¹ Le processus de recherche dans les bases de données comporte deux étapes :

1. Comparaison de l'ion précurseur. Cette étape permet d'éliminer plus de 99% des propositions.

220. KUHLE, C. *et al. Anal. Chem.* **84**, 283-289 (2012).

221. KIND, T. *et al. Mass Spectrom. Rev.* **37**, 513-532 (2017).

2. Comparaison des spectres MS/MS parmi les candidats issus de la première étape.

La similarité des spectres MS/MS est établie grâce à un score généralement basé sur les m/z des ions fragments et leurs intensités respectives. L'algorithme le plus utilisé pour la recherche dans les bases de données MS/MS est le "dot-product" qui utilise le cosinus de l'angle entre les représentations vectorielles des deux spectres.²²² Un spectre de masse peut être représenté comme un point dans un espace multidimensionnel défini par les valeurs de m/z . La longueur et la direction dans l'espace du vecteur sont déterminées par la valeur du m/z et l'intensité relative de l'ion (FIGURE 5.1).²²³ Les longueurs (r) des vecteurs A et B sont déterminées par les équations 5.1 et 5.2, respectivement, et l'angle θ est défini par l'équation 5.3 où a_i et b_i sont les intensités relatives des ions de masse i pour les spectres A et B. Un angle de 0° (cosine score de 1) signifie qu'il n'y a aucune différence spectrale perceptible. Les spectres qui se ressemblent ont des vecteurs qui pointent dans la même direction dans l'espace. Un angle de 90° indique une différenciation spectrale maximale et donc un cosine score de 0.

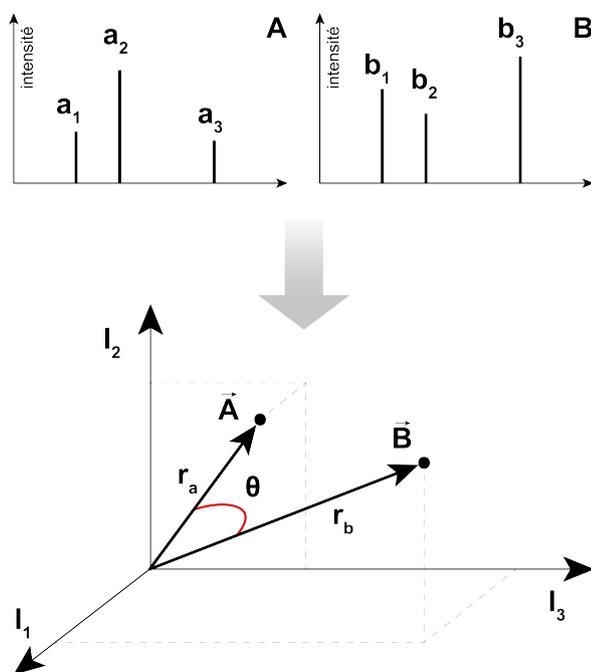


FIGURE 5.1 – Représentation vectorielle de deux spectres hypothétiques (A et B) dans un espace tri-dimensionnel (chaque spectre comporte trois m/z , 1, 2, et 3) adapté d'après Wan *et al.*²²³

$$r_a = \sqrt{\sum_i a_i^2} \quad (5.1)$$

$$r_b = \sqrt{\sum_i b_i^2} \quad (5.2)$$

222. STEIN, S. E. & SCOTT, D. R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 859-866 (1994).

223. WAN, K. X. *et al. J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 85-88 (2002).

$$\cos \theta = \frac{\sum_i a_i b_i}{\sqrt{\sum_i a_i^2 \sum_i b_i^2}} \quad (5.3)$$

5.3.2 Comparaison aux bases de données structurales

Les approches de fragmentation *in silico* pour l'annotation de molécules inconnues sont utilisées dans les cas où aucun spectre de masse de référence ne correspond au spectre expérimental dans les bases de données spectrales.²²⁴ Cette approche consiste généralement à comparer les spectres expérimentaux à une sélection de fragments générés *in silico*, calculés à partir de candidats extraits de bases de données de composés connus.²²⁵ Au lieu de chercher dans des bases de données spectrales qui ne couvrent qu'un million de composés, les algorithmes de fragmentation *in silico* ont accès à des bases de données de structures moléculaires, comme ChemSpider et PubChem, qui couvrent près de 100 millions de composés.²²⁶ Il existe quatre approches de calcul principales pour exploiter les bases de données de structure sur la base des données de MS/MS²²⁷ :

Rule-based fragmentation spectrum prediction (e.g. MS-FINDER, MAGMa) : les spectres d'un ensemble de structures moléculaires candidates, sont prédits en leur appliquant des règles de fragmentation, puis ils sont comparés aux spectres de fragmentation mesurés (FIGURE 5.2 (a)).

Combinatorial fragmentation (e.g. MetFrag) : contrairement aux fragmenteurs fondés sur des règles, la fragmentation combinatoire ne vise pas à prédire un spectre de fragmentation, mais plutôt à expliquer les pics du spectre observé. Pour ce faire, tous les fragments possibles d'une structure candidate sont générés par la rupture systématique de toutes les liaisons et sont comparés au spectre expérimental (FIGURE 5.2 (b)).²²⁸ Pour simuler la fragmentation MetFrag utilise un algorithme de recherche par arbre. La racine de l'arbre correspond à la molécule intacte, les branches représentent la rupture d'une liaison particulière et les nœuds sont les fragments qui en résultent. L'énumération exhaustive de toutes les cassures de liaisons possibles est très lente.²²⁹ C'est pourquoi, la plupart des approches utilisent des méthodes heuristiques qui limitent le nombre de cassures permis.²³⁰ Cela permet non seulement d'accélérer les calculs, mais aussi d'éviter que le fragmenteur ne prévoit un trop grand nombre de fragments improbables. MetFrag utilise trois règles : le nombre de niveaux de l'arbre de recherche est déterminé (*i.e.* le nombre de cassures est limité), les fragments redondants sont éliminés et seuls les fragments de masse

224. BÖCKER, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **36**, 1-6 (2017).

225. BLAŽENVIĆ, I. *et al. Metabolites* **8**, 31 (2018).

226. KIM, S. *et al. Nucleic Acids Res.* **44**, D1202-D1213 (2016).

227. HUFKY, F. & BÖCKER, S. *Mass Spectrom. Rev.* **36**, 624-633. arXiv : NIHMS150003 (2017).

228. RUTKIES, C. *et al. J. Cheminform.* **8**, 3 (2016).

229. HEINONEN, M. *et al. Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 3043-3052 (2008).

230. WOLF, S. *et al. BMC Bioinformatics* **11** (2010).

supérieure à la plus faible masse de tous les fragments sont considérés. MetFrag considère les énergies de dissociation des liaisons de manière à classer les fragments selon leur probabilité. Ainsi, plus l'énergie est élevée plus le score du fragment est faible. MetFusion est le successeur de MetFrag et associe la fragmentation combinatoire à la recherche dans les BD spectrales. MetFusion a pour but d'améliorer le classement de la structure moléculaire correcte dans une liste de structures candidates.

1. MetFrag génère une liste de structures candidates et leur score de probabilité à partir des BD structurales (MetFrag score)
2. La similarité spectrale entre le spectre inconnu et une BD de spectre de références est calculée (cosine score)
3. Les deux scores précédents sont associés à la similarité structurale entre les structures candidates et les composés de références pour donner le MetFusion score.

Competitive fragmentation modeling (e.g. CFM-ID) : cette approche basée sur le machine learning prédit les spectres de masse à l'aide d'un modèle probabiliste du processus de fragmentation qui est appris, au préalable, à partir de données expérimentales (FIGURE 5.2 (c)). Ce modèle estime la probabilité de survenue d'un événement de fragmentation donné, et prédit les pics les plus susceptibles d'être observés, améliorant ainsi la précision. Contrairement aux spectres habituellement générés par l'approche "rule-based", cette approche permet également de prédire les intensités de pics.²³¹

Molecular fingerprint prediction (e.g. CSI:FingerID, Sirius4) : plutôt que de prédire la fragmentation d'une structure moléculaire, cette approche utilise le machine learning dans le "sens opposé" pour prédire les propriétés structurales du composé inconnu à partir de son spectre de masse (FIGURE 5.2 (d)). L'empreinte moléculaire (*i.e.* la structure) est prédite et utilisée pour rechercher le composé inconnu dans les bases de données de structures moléculaires.^{232, 233}

Il n'existe pas de solution parfaite, et chacune des approches possède ses avantages et ses inconvénients. De manière générale, les algorithmes de fragmentation doivent être considérablement améliorés. Le CASMI (Critical Assessment of Small Molecule Identification) est une compétition au cours de laquelle les participants doivent déterminer la structure moléculaire d'un composé sur la base de données de MS par différentes approches d'annotation *in silico*.²³⁴ Une comparaison de quatre algorithmes de fragmentation *in silico* utilisant les composés du CASMI a montré que les algorithmes *in silico* "purs" ne pouvaient identifier correctement que 17 à 25% des composés. En combinant d'une part la comparaison à des bases de données spectrales et d'autre part le résultat de plusieurs algorithmes, l'identification pouvait atteindre 93%. La combinaison de plusieurs

231. DJOUMBOU-FEUNANG, Y. *et al. Metabolites* **9**, 72 (2019).

232. HUFISKY, F. *et al. Nat. Prod. Rep.* **31**, 807-817 (2014).

233. DÜHRKOP, K. *et al. Nat. Methods* **16**, 299-302 (2019).

234. BLAŽENVIĆ, I. *et al. J. Cheminform.* **9**, 1-12 (2017).

programmes de fragmentation *in silico* avec des informations expérimentales est actuellement la meilleure option pour l'annotation précise des structures chimiques.²²⁵

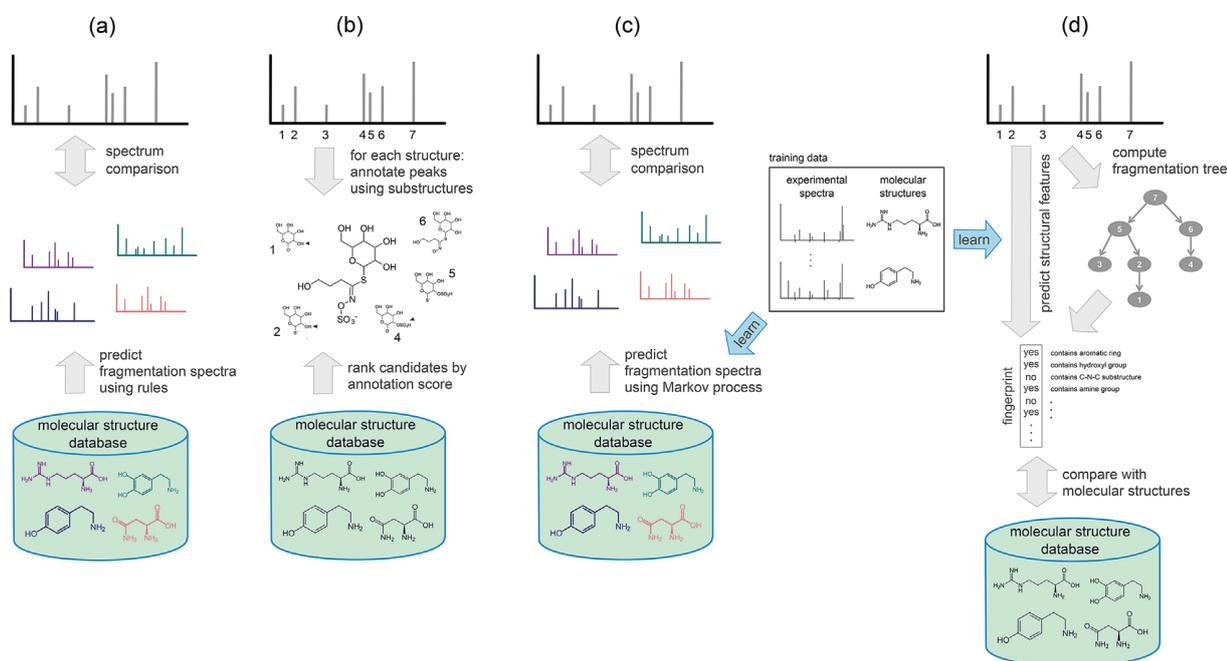


FIGURE 5.2 – Quatre principales approches de calcul pour exploiter les bases de données de structure sur la base des données de MS/MS Hufsky *et al.*²²⁷

5.3.3 Annotation des motifs structuraux : "MS2LDA"

L'allocation de Dirichlet latente (Latent Dirichlet Allocation - LDA) est un modèle permettant d'expliquer des ensembles d'observations à partir de similarités entre des données. Appliqué à un texte, il décompose le document en sujets basés sur des mots récurrents. Appliqué à des données de MS/MS, MS2LDA décompose les spectres de fragmentation en blocs de fragments et de pertes de neutres récurrents, appelés "Mass2Motifs".^{235, 236} Ces "Mass2Motif" correspondent à des sous-structures chimiques communes (*e.g.* une unité hexose ou une perte de groupe carboxyle). En ne comparant que de petites portions du spectre, MS2LDA permet d'annoter des molécules non présentes dans les bases de données. De plus, MS2LDA peut annoter et grouper les spectres en fonction de pertes neutres (*e.g.* la perte de CHOOH), ce qui n'est pas possible avec les bases de données spectrales. Cette nouvelle approche peut contribuer à l'annotation *de novo* ou à la classification fonctionnelle de molécules non identifiables par ailleurs. Elle vient judicieusement s'ajouter à l'annotation par comparaison avec des spectres de référence en augmentant le nombre de molécules identifiables.²³⁵ MS2LDA est disponible *via* une application web qui permet aux utilisateurs de télécharger des données MS/MS, d'extraire les Mass2Motifs, d'annoter et stocker

235. Van der Hooft, J. J. J. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 13738-13743 (2016).

236. Van der Hooft, J. J. J. *et al. Anal. Chem.* **89**, 7569-7577 (2017).

des annotations pour les Mass2Motifs extraits (soit par inspection manuelle ou par comparaison avec d'autres expériences) et d'explorer interactivement les résultats de décomposition (en reliant les changements d'intensité MS1 aux Mass2Motifs).²³⁷

5.3.4 Annotation de la classe chimique : "ClassyFire"

Les taxonomies et les ontologies organisent des concepts complexes et leurs relations. Jusqu'à récemment, contrairement à de nombreuses disciplines scientifiques comme la biologie ou la géologie, le monde de la chimie ne disposait pas d'une taxonomie normalisée. En 2016, Djoumbou Feunang *et al.*²³⁸ ont introduit ClassyFire, une application Web pour la classification structurale automatisée des entités chimiques. Cette application utilise une approche de classification basée sur un ensemble de règles taxonomiques appelé ChemOnt. Chaque nom de catégorie dans ChemOnt, a été créé en extrayant des termes de classification chimique issus de la littérature scientifique. Ces catégories sont organisées en arborescence. Inspirés par la taxonomie biologique linnéenne, les quatre premiers niveaux de la taxonomie chimique ont été nommés Royaume, SuperClasse, Classe et Sous-Classe. La classification s'effectue en plusieurs étapes (FIGURE 5.3) :

Dans un premier temps, ClassyFire calcule les caractéristiques physico-chimique et structurales des structures candidates soumises sous la forme de descripteurs moléculaires (*e.g.* SMILES, InchiKeys). Chaque caractéristique est ensuite affectée à sa catégorie selon des règles définies au préalable dans un dictionnaire qui répertorie les catégories de chaque caractéristique. Par exemple, la catégorie "leucotriènes" décrit les dérivés de l'acide arachidonique, contenant trois groupes hydroxyles ainsi que quatre doubles liaisons, dont exactement trois sont conjuguées.

Une fois l'affectation des catégories terminée, la classification est établie en sélectionnant le parent direct. Le parent direct est la catégorie qui permet de définir le plus grand nombre de caractéristiques du composé. Il est sélectionné en considérant des paramètres, encodés dans des clés de détermination, comme le nombre cycles, d'hétérocycles ou le nombre total d'hétéroatomes.

5.4 Les réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires²³⁹ sont des représentations visuelles de l'espace chimique présent dans les analyses de MS. L'approche des réseaux moléculaires (MN) est considérée comme un outil puissant pour traiter les données de MS/MS. Le concept de MN est basé sur l'organisation et la visualisation des données MS/MS sous la forme de cartes des similarités spectrales, qui révèlent la présence de fragments MS/MS homologues.

237. WANDY, J. *et al.* *Bioinformatics* **34** (éd. STEGLE, O.) 317-318 (2018).

238. DJOUMBOU FEUNANG, Y. *et al.* *J. Cheminform.* **8**, 1-20 (2016).

239. WATROUS, J. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E1743-E1752 (2012).

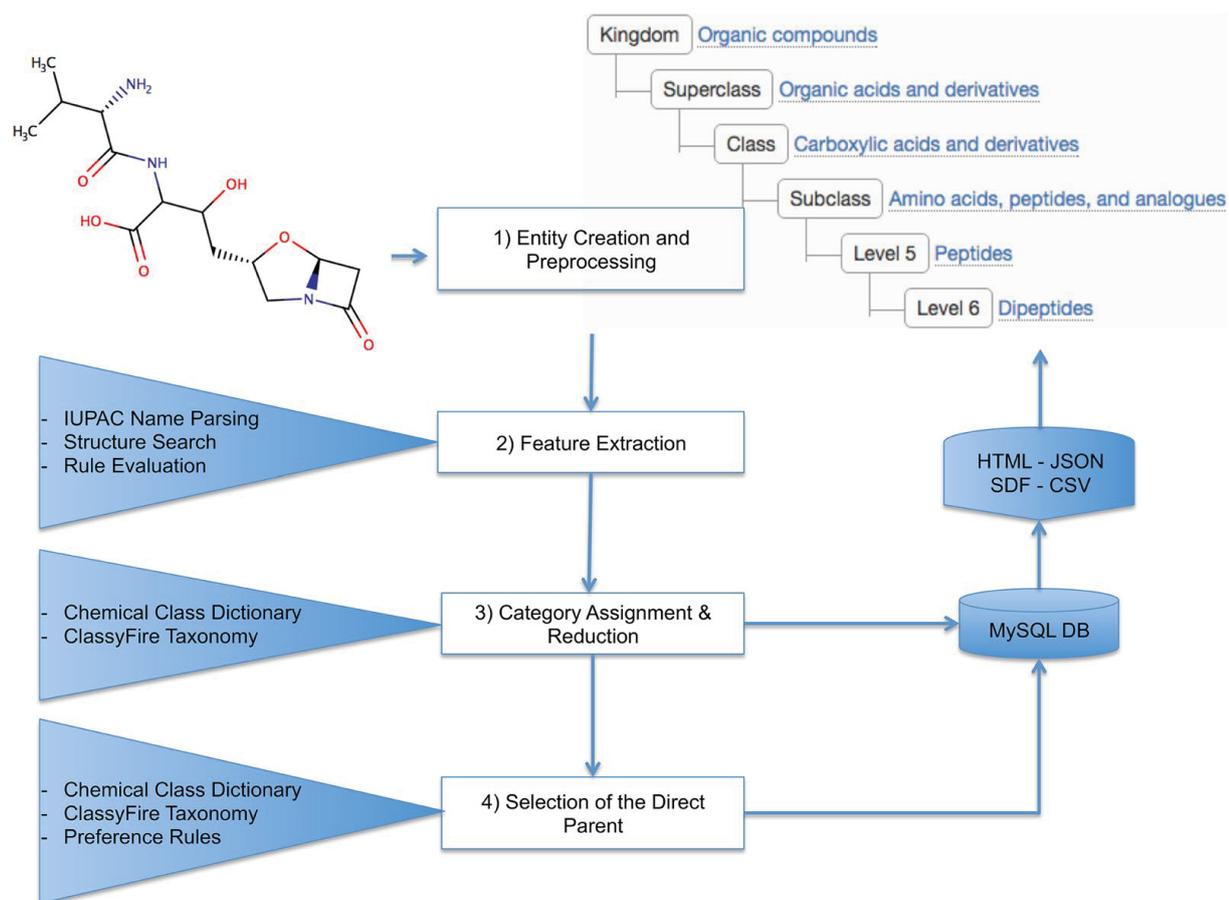


FIGURE 5.3 – Processus de classification chimique par ClassyFire.²³⁸

5.4.1 GNPS

Une fois les données de LC-MS/MS pré-traitées, elles sont téléchargées sur la plateforme GNPS. Dans un premier temps, les données MS/MS sont simplifiées pour réduire la charge de calcul et améliorer l'efficacité de l'algorithme de comparaison spectrale. Ainsi, les ions fragments de faible intensité sont éliminés en appliquant un seuil d'intensité minimal ("Minimum Fragment Ion Intensity") et les pics qui ne font pas parti des 6 pics les plus intenses dans une fenêtre de ± 50 Da autour de leur valeur de m/z sont supprimés (*Filter peaks in 50Da Window*). De la même manière les ions précurseurs résiduels, (fréquemment observés dans les spectres MS/MS acquis sur les qTOFs), sont éliminés en supprimant tous les ions dans une fenêtre de ± 17 Da autour des valeurs de m/z de chaque précurseur (*Filter Precursor Ion Window*).²⁴⁰

De plus, les spectres ayant le même rapport masse/charge d'ions précurseurs (m/z) et ayant des spectres MS/MS similaires sont fusionnés en un seul **spectre consensus** (spectre moyen) grâce au programme MS-Clustering²⁴¹ inclus dans la plateforme GNPS. Les paramètres **Precursor Ion Mass Tolerance (PIMT)** et **Fragment Ion Mass Tolerance (FIMT)** définissent l'intervalle dans lequel les valeurs de m/z du précurseur et des fragments peuvent varier pour être fusionnés en spectre consensus. Pour les données acquises sur un spectromètre de masse haute résolution comme le q-ToF la valeurs recommandée est $\pm 0,02$ Da.

Les spectres consensus sont ensuite simplifiés en vecteurs dans un espace multidimensionnels (voir section 5.3.1). Ces vecteurs sont utilisés pour calculer le cosin score (dot product normalisé) de chaque paire de spectres MS/MS et ainsi estimer leur degré de similarité spectrale (de 0 à 1, 1 correspondant à des spectres identiques).

Les résultats des comparaisons vectorielles peuvent ensuite être visualisés sous forme de graphiques de similarité spectrale appelés réseaux moléculaires, où chaque **nœud (ou node)** est un spectre consensus MS/MS et les **liens (ou edges)** entre les nœuds indiquent le degré de similarité entre les spectres consensus. Comme les composés structurellement apparentés partagent des spectres de fragmentation similaires, leurs représentation graphique ont tendance à se regrouper et à créer des sous-ensembles de nodes interconnectées appelés **familles moléculaires**.

Plusieurs paramètres peuvent être modifiés afin d'adapter l'analyse et changer la visualisation des données : **Min Pairs Cos** : cosin score minimal requis entre deux spectres MS/MS consensus pour qu'un lien se forme dans le réseau moléculaire. **Min Matched Peaks** : nombre minimal d'ions fragments communs à deux spectres MS/MS consensus afin d'être considérés pour le calcul du cosin score. **Maximum shift between precursors** : Différence de masse maximale entre deux nœuds connectés dans un réseau moléculaire. **Network TopK** : Nombre maximum de nœuds voisins pour un nœud unique. Le lien entre deux nœuds n'est conservé que si les deux nœuds sont à l'intérieur des "TopK" nœuds les plus similaires. Par exemple, si cette valeur est

240. QUINN, R. A. *et al. Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 143-154 (2017).

241. FRANK, A. M. *et al. J. Proteome Res.* **7**, 113-122 (2008).

fixée à 20, un seul nœud peut être connecté à un maximum de 20 autres nœuds. Le maintien de cette valeur à un bas niveau rend les très grands réseaux (nombreux nœuds) beaucoup plus faciles à visualiser.

5.4.2 MetGem

L'un des principaux inconvénients de la visualisation des réseaux est qu'en considérant un grand nombre de scores pour créer des liens entre les nœuds, le réseau devient illisible. Pour permettre une visualisation optimale des familles moléculaires, seuls les scores de similarité les plus pertinents sont sélectionnés à l'aide d'étapes de filtrage (*i.e.* seuil de cosine score et topK). Cependant, selon les valeurs de filtrage sélectionnées, certains nœuds et liens sont arbitrairement effacés et une partie de l'information est ignorée. En d'autres termes, des sous-ensembles de composés partageant des squelettes apparentés et des spectres MS/MS comparables peuvent être compartimentés dans le réseau final. Les paramètres de filtrage peuvent être optimisés mais cette procédure nécessite la réalisation d'expériences successives ou parallèles sur GNPS nécessitant du temps de traitement par la plateforme. La création d'une représentation fiable des ensembles de spectres MS/MS peut être réalisé à l'aide d'algorithmes de réduction de dimensions tels que t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding).^{242, 243}

MetGem est un logiciel de bureau, libre de droit et téléchargeable en ligne, qui permet d'étudier en parallèle deux représentations complémentaires de l'ensemble des données MS/MS, l'une basée sur une architecture classique de type GNPS et l'autre sur l'algorithme t-SNE.²⁴² L'algorithme de réduction de dimension, t-SNE, modélise chaque spectre MS/MS (*i.e.* un objet de haute dimension) par un point bidimensionnel ou tridimensionnel de telle sorte que des spectres similaires sont modélisés par des points proches et des spectres différents sont modélisés par des points éloignés. Il préserve les interactions entre les groupes de spectres apparentés. Les deux interfaces offrent des fonctionnalités complémentaires permettant une comparaison spectrale plus détaillée et améliorent ainsi la robustesse de l'information chimique extraite de l'ensemble de données original. Enfin, tous les paramètres peuvent être optimisés en temps réel et de nouveaux réseaux peuvent être générés en quelques secondes pour de petits ensembles de données.

5.4.3 Cartographie de métadonnées : priorisation des extraits de plantes

Plusieurs stratégies ont été développées afin de combiner de grands ensembles de données biologiques et chimiques afin de détecter plus efficacement de nouveaux composés présentant un intérêt thérapeutique.²⁴⁴ Récemment notre équipe a proposé une approche de priorisation des produits naturels bioactifs basée sur la fusion de données taxonomiques et d'essais biologiques dans un réseau moléculaire de grande taille.¹⁷⁹ Dans cette approche, des extraits de plantes sont classés en plusieurs groupes en fonction de leurs résultats d'activité biologique. Une couleur est

242. OLIVON, F. *et al. Anal. Chem.* **90**, 13900-13908 (2018).

243. LAURENS VAN DER MAATEN & GEOFFREY E., H. *J. Mach. Learn. Res.* **164**, 10 (2008).

244. BRITO, Á. *et al. Algal Res.* **9**, 218-226 (2015).

assignée à chaque niveau d'activité biologique et en parallèle, ces extraits sont classés en fonction de leur origine taxonomique et une couleur est assignée à chaque genre de plante. Ces couleurs sont reportées sur le réseau moléculaire de manière à représenter l'intensité relative de chaque ion dans chaque groupe d'extraits. Ainsi grâce à la cartographie des activités biologiques, il est possible de détecter les espèces chimiques préférentiellement retrouvées dans les extraits les plus actifs. Et grâce à la cartographie de l'origine taxonomique, il devient possible d'estimer la rareté (*i.e.* composés retrouvés dans un seul genre) des composés détectés. Les composés les plus rares et/ou présents majoritairement, dans les extraits les plus actifs peuvent ainsi être isolés de manière spécifique.

5.5 Annotation du réseau moléculaire

GNPS et MetGem proposent un accès à différentes bases de données (GNPS Collections, Pesticides, NIH, MassBank, Respect...).

La première étape d'annotation du réseau moléculaire est la comparaison des spectres consensus aux bases de données spectrales. La similarité spectrale est évaluée de la même manière que décrit en sections 5.3.1 et 5.4.1. Le spectre expérimental est annoté sur la base du spectre de référence avec lequel il partage la plus haute valeur de cosine score.

Si la fonction "Search Analogs" est activée GNPS ou MetGem permettent également la recherche des analogues dans une gamme de valeur de m/z autour de celle de l'ion précurseur du spectre expérimental.

5.5.1 Network Annotation Propagation

Les bibliothèques de référence pour annoter les données MS/MS ne couvrent qu'une petite partie de l'espace chimique connu. L'utilisation d'outils de fragmentation *in silico* pour la prédiction de spectres MS/MS à partir de bibliothèques de structures (SMILES, InChIKey...) offre une alternative prometteuse. Une des faiblesses de l'annotation moléculaire utilisant de telles approches *in silico* est qu'elles annotent actuellement les molécules individuellement. Cependant, les relations moléculaires, basées sur la similarité spectrale, peuvent être utilisées pour améliorer l'hypothèse structurelle déduite de l'annotation des molécules détectées par spectrométrie de masse. Un outil en ligne appelé "Network Annotation Propagation" (NAP) associe la fragmentation *in silico* et la similarité spectrale mise en évidence par les réseaux moléculaires afin de déduire la similarité moléculaire et de renforcer les annotations.

NAP commence par utiliser le concept MetFusion pour reclasser une liste de structures candidates proposées par MetFrag pour chaque nœud du réseau moléculaire. Ensuite, NAP reclassifie les candidats en utilisant la topologie du réseau moléculaire basée sur la similarité structurelle, en propageant les annotations de la bibliothèque spectrale (score Fusion), et/ou les structures candidates pour les nœuds connectés (score Consensus).

Il y a deux approches pour re-classer des candidats.

- Quand il y a une correspondance avec les BD spectrales au sein d'une famille moléculaire, NAP utilise la prédiction *in silico* de MetFrag avec MetFusion pour re-classer les structures candidates de la famille moléculaire (Fusion scoring). L'outil de fragmentation *in silico* MetFusion combine les résultats de la recherche dans la bibliothèque spectrale et les prédictions de fragmentation *in silico* de MetFrag. Le classement des structures candidates est amélioré en tenant compte de la similarité structurelle entre les propositions *in silico* et les propositions issues des bibliothèques spectrales. Avec NAP, les candidats issus des bases de données spectrales de MetFusion sont remplacés par les annotations de tous les voisins directs dans le réseau moléculaire. En d'autres termes, avec NAP, le classement des structures candidates est amélioré en tenant compte de la similarité structurelle entre les propositions *in silico* et les annotations des voisins dans le réseau moléculaire.
- Quand il y a peu ou pas de candidats dans les BD spectrales, un score de similarité est obtenu à partir des candidats des BD structurales obtenus par MetFrag *in silico* (Consensus scoring). Cela signifie qu'il est possible de propager des annotations même lorsqu'il n'y a pas de correspondance spectrale avec les bases de données de spectres de référence.

5.5.2 MolNetEnhancer

MolNetEnhancer est un programme permettant l'intégration aux réseaux moléculaires, des informations de sous-structures, d'annotation structurelle *in silico* et de classification chimique.²⁴⁵ Ce programme permet de cartographier sur le réseau moléculaire :

- les Mass2Motifs, soit sous forme de diagramme circulaire sur le nœud (node) lorsqu'il contient plusieurs Mass2Motif, soit sous la forme de ligne (edge) reliant les nœuds partageant le même Mass2Motif.
- les classes chimiques les plus abondantes par famille moléculaire. Elles sont obtenues en utilisant ClassyFire et les structures candidates issues de la comparaison aux bases de données spectrales et structurales (*in silico*).

5.5.3 Anticipation des structures chimiques : "MetWork" et "C-NAP"

Metwork est une plateforme en ligne récemment développée par Beauxis *et al.*²⁴⁶ permettant d'annoter des réseaux moléculaires par anticipation des nouvelles structures chimiques. Il s'appuie sur des données MS/MS organisées en réseau moléculaire, une bibliothèque collaborative de transformations (bio)chimiques (plus de 80 réactions disponibles) et un module de prédiction des spectres MS/MS basé sur l'algorithme de fragmentation *in silico* CFM-ID (voir 5.3.2). L'utilisateur sélectionne les réactions chimiques (hydroxylation, estérification...) permettant la métabolisation *in silico* des composés annotés au sein du réseau. Lorsque la masse exacte d'une structure prédite est détectée dans le réseau, le spectre MS/MS de cette structure est prédit et

245. ERNST, M. *et al.* *Metabolites* **9**, 144 (2019).

246. BEAUXIS, Y. & GENTA-JOUVE, G. *Bioinformatics* **35**, 1795-1796 (2019).

comparé au spectre issu du réseau (expérimental) afin d'annoter le nœud si les spectres sont similaires.

C-NAP (Combinatorial-Network Annotation Propagation). Parfois, le faible nombre d'annotations obtenues avec NAP est dû au faible nombre de candidats dans les bases de données (*i.e.* analogues structuraux) structurales utilisées (*e.g.* les prémyrsinanes). Pour surmonter cette limitation Nothias-Esposito *et al.*¹⁸² ont récemment proposé d'utiliser une base de données structurales combinatoires (Combinatorial Structures DataBase - CSDB) de molécules théoriques dans le protocole NAP. Cette CSDB a été créée grâce au programme SmlLib,²⁴⁷ à partir de squelettes chimiques connus et de blocs de construction de type acyle souvent retrouvés au sein des échantillons étudiés. Cette base de données structurales a été ensuite utilisée conjointement avec les bases de données spectrales dans le protocole NAP afin d'augmenter le nombre de nœuds annotés dans les réseaux moléculaires.¹⁸²

Une bibliothèque combinatoire est un ensemble de molécules créées par des combinaisons virtuelles entre des "blocs de construction" (*e.g.* chaînes acyles) moléculaires et des squelettes chimiques (*e.g.* myrsinanes). **SmlLib** est un logiciel conçu pour créer rapidement des bibliothèques combinatoires au format SMILES. SmlLib n'effectue pas de réactions chimiques proprement dites. Il se contente de concaténer les squelettes chimique et les blocs de construction avec des liaisons simples. SmlLib traite trois classes de molécules : les squelettes, les linkers et les blocs de construction. Les linkers fonctionnent comme des jonctions entre les squelettes et les blocs de construction (FIGURE 5.4).²⁴⁷

247. SCHÜLLER, A. *et al.* *QSAR Comb. Sci.* **22**, 719-721 (2003).

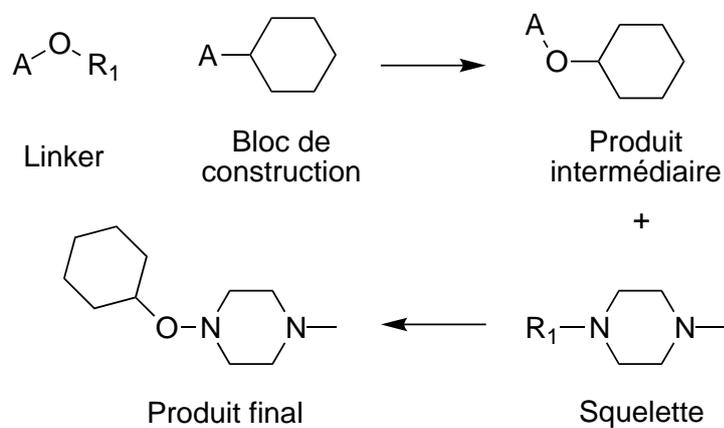


FIGURE 5.4 – Une réaction virtuelle : Le bloc de construction est connecté au linker *via* le groupement R1 formant un produit intermédiaire et un sous-produit virtuel A-R1 (négligé). Le groupement A du produit intermédiaire subit ensuite une réaction avec le groupement R1 du squelette chimique donnant le produit de réaction final et un second sous-produit A-R1 (également négligé).²⁴⁷

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 6

Études phytochimiques de *Sandwithia guyanensis* et *Sagotia racemosa*

Sommaire

6.1	Description des plantes	79
6.2	Activités biologiques des extraits	80
6.3	Extraction et purification	81
6.4	Caractérisation structurale des diterpènes de <i>S.guyanensis</i> . . .	81
6.4.1	Les phénanthrènes	83
6.4.2	Les dérivés de l'euphoractine B	84
6.4.3	Les dérivés de l'euphoractine A	87
6.4.4	Le sikkimenoïde E et l'euphactine G	89
6.4.5	Les lathyranes	90
6.5	Caractérisation structurale des phénanthrènes de <i>S.racemosa</i> .	96
6.6	Identification de phorboïdes antiviraux	98
6.6.1	Fragmentations caractéristiques des esters de phorbol	98
6.6.2	Annotation du réseau moléculaire de <i>S.guyanensis</i>	98
6.6.3	Annotation du réseau moléculaire de <i>S.racemosa</i>	99
6.7	Discussion	102
6.8	Conclusion	103

6.1 Description des plantes

S. guyanensis Lanj. et *S. racemosa* Baill. sont des Crotonoideae appartenant à la tribu des Aleuritideae.²⁴⁸ *Sagotia* est un genre néotropical regroupant deux espèces actuellement recon-

248. SECCO, R. D. S. *et al.* *Phytotaxa* **394**, 225-229 (2019).

nues, *S. racemosa* Baill.²⁴⁹ et *S. brachysepala* (Müll.Arg) Secco,²⁵⁰ présentes principalement dans les régions amazoniennes du Brésil, Colombie, Equateur, Guyana, Guyane française, Pérou, Suriname et Venezuela, mais aussi au Panama et Costa Rica.²⁵¹ Les principaux caractères morphologiques retrouvés chez *Sagotia* sont : le port arboricole, la monoïcité, l'absence de latex laiteux, les feuilles alternes et entières, les inflorescences terminales, racèmes et peu fleuries, avec des fleurs, sans nectar, pistillées en dessous et staminées au-dessus, les fleurs staminées comportant cinq sépales et cinq pétales, et les fleurs pistillées comportant cinq ou six sépales unies seulement à la base et accrescentes dans le fruit.²⁵² *S. racemosa* n'a été étudiée qu'une seule fois en 1976 sur le plan chimique. L'étude a permis d'identifier deux phénanthrènes à partir d'un extrait de bois de tronc, les micrandrols E et F.²⁵³

Le genre *Sandwithia*, dont les caractéristiques morphologiques sont très proches de celles du genre *Sagotia*, est représenté par deux espèces, *S. heterocalyx* et *S. guyanensis*.²⁵⁴ À la différence de *S. racemosa*, *S. guyanensis* est un arbre dioïque, avec des fleurs à nectars, des fleurs staminées à filaments visibles et des fleurs pistillées à calice fusionné à quatre lobes. *S. guyanensis* n'a fait l'objet que d'une seule étude phytochimique en 1987, qui a conduit à l'isolement de deux sesquiterpénoïdes, le cyprénol et l'acide cyprénoïque, du bois racinaire et de l'écorce.²⁵⁵

Dès la première description de *Sandwithia*, un lien de parenté très proche a été établi entre les deux espèces.²⁵⁶ Récemment, les données moléculaires ont confirmé que les deux espèces étaient soeurs au sein des Crotonoideae (bootstrap = 92%).²⁵⁷

6.2 Activités biologiques des extraits

En 2012, 577 extraits d'EtOAc préalablement filtrés sur cartouche polyamide et 17 extraits d'alcaloïdes obtenus à partir de différentes parties de 324 espèces végétales collectées en Guyane française ont été évalués pour leur pouvoir inhibiteur du virus CHIKV.³³ Les extraits ont été préparés à partir d'écorce ou de rameaux (46%), de feuilles (38%), de fruits ou de fleurs (9%), de plantes entières (6%) et de racines (1%). Sur les 594 extraits organiques testés, environ 10% ont présenté des activités anti-CHIKV puissantes, avec des valeurs EC₅₀ < 10 µg/mL, dont l'extrait d'écorce EtOAc de *S. racemosa* présentant l'activité la plus puissante (*i.e.* 0.8 µg/mL) et l'extrait d'écorce de *S. guyanensis* (*i.e.* 7.9 µg/mL).

249. BAILLON, H. *Adansonia* **1**, 139-173 (1860).

250. WFO. *World Flora Online. Sagotia - Accepted name* 2019. <http://www.worldfloraonline.org/> (visité le 01/08/2019).

251. GBIF. *GBIF.org* 2019. www.gbif.org (visité le 01/08/2019).

252. WEBSTER, G. L. in *Flower. Plants. Eudicots Malpighiales* 51-216 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014).

253. DE ALVARENGA, M. A. *et al. Phytochemistry* **15**, 844-845 (1976).

254. WFO. *World Flora Online. Sandwithia - Accepted name* 2019. <http://www.worldfloraonline.org/> (visité le 01/08/2019).

255. JACOBS, H. *et al. J. Nat. Prod.* **50**, 835-842 (1987).

256. LANJOUW, J. *Bull. Misc. Inf. (Royal Bot. Gard. Kew)* **1932**, 183-187 (1932).

257. WURDACK, K. J. *et al. Am. J. Bot.* **92**, 1397-1420 (2005).

6.3 Extraction et purification

Les fractionnements bio-guidés des extraits AcOEt des écorces de *S. guyanensis* et *S. racemosa* ont permis d'isoler 19 (**67** - **85**) diterpénoïdes de six types structuraux différents à partir de *S. guyanensis* et 3 phénanthrènes (**86** - **88**), l'acide stictique, l'acide hyperhomosékikaïque, la trigoxyphine K et cinq flavonoïdes connus à partir de *S. racemosa*.

Les extraits acétate d'éthyle (AcOEt) de l'écorce broyée de *S. guyanensis* et *S. racemosa* ont été solubilisés dans l'acétonitrile (ACN) puis partitionné avec du *n*-heptane afin d'obtenir des extraits ACN délipidés.

Le fractionnement de l'extrait de *S. guyanensis* par chromatographie flash sur silice a donné 19 fractions. Les fractions F3 à F5, F10, F11 et F13 à F15, ayant montré les activités anti-CHIKV les plus fortes ($0,6 < EC_{50} < 8 \mu\text{g}/\text{mL}$) et la fraction inactive F6, ont été séquentiellement purifiées par HPLC semi-préparative et/ou analytique, afin d'obtenir 17 nouveaux composés **67** - **83** dont trois diterpénoïdes dégradés **67** - **69**, les euphoractines P-W (**70** - **77**), le sikkiménoïde E (**78**), l'euphactine G (**79**), et les jatrontelones J-M (**80** - **83**) ; ainsi que les jatrontelones A (**84**) et C (**85**) déjà connues.

Le fractionnement de l'extrait de *S. racemosa* par chromatographie flash sur silice a donné 12 fractions. En raison de sa forte activité anti-CHIKV ($2,7 \mu\text{g}/\text{mL}$), la fraction F5 a été purifiée par CLHP semipréparative en phase inverse pour donner les composés **86** et **87**. Le composé **88** a été isolé à partir de F6 et les autres composés à partir des fractions restantes. Les structures des composés **86** - **88** ont été déterminées par l'analyse des données de RMN et de spectrométrie de masse (MS), et celles des flavonoïdes (la 3,5,7-triméthoxyflavone,²⁵⁸ 4',5,7-triméthoxykaempferol,²⁵⁹ la 5,7-diméthoxychrysin, la 4',3,5,7-tetraméthoxyflavone, la tectochrysin²⁶⁰), de l'acide stictique,²⁶¹ de l'acide hyperhomosékikaïque²⁶² et de la trigoxyphine K²⁶³ ont été déterminées en comparaison avec des données de la littérature. Les données de RMN 1D des composés **86** - **88** sont présentées en Tableau 6.7 et les données spectroscopiques de tous les composés isolés de *S. racemosa* sont disponibles dans les informations complémentaires de Remy *et al.*²⁶⁴ Une origine endophytique ou lichénique de l'acide stictique et de l'acide hyperhomosékikaïque ne peut être exclue.²⁶⁵

6.4 Caractérisation structurale des diterpènes de *S. guyanensis*

Les élucidations structurales de ces composés ont été effectuées au moyen de l'analyse des données de RMN et de MS. La configuration relative du composé **82** et les configurations absolues

258. ARAI, Y. *et al. Fitoterapia* **101**, 51-56 (2015).

259. DONG, H. *et al. Phytochemistry* **50**, 899-902 (1999).

260. LU, K. *et al. Tetrahedron Lett.* **54**, 6345-6348 (2013).

261. OLIVON, F. *et al. J. Nat. Prod.* **81**, 1610-1618 (2018).

262. DAVID, F. *et al. Aust. J. Chem.* **46**, 301-313 (1993).

263. YANG, D. S. *et al. J. Nat. Prod.* **76**, 265-269 (2013).

264. REMY, S. *et al. Phytochemistry* **167**, 112101 (2019).

265. LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F. *et al. J. Nat. Prod.* **70**, 1218-1220 (2007).

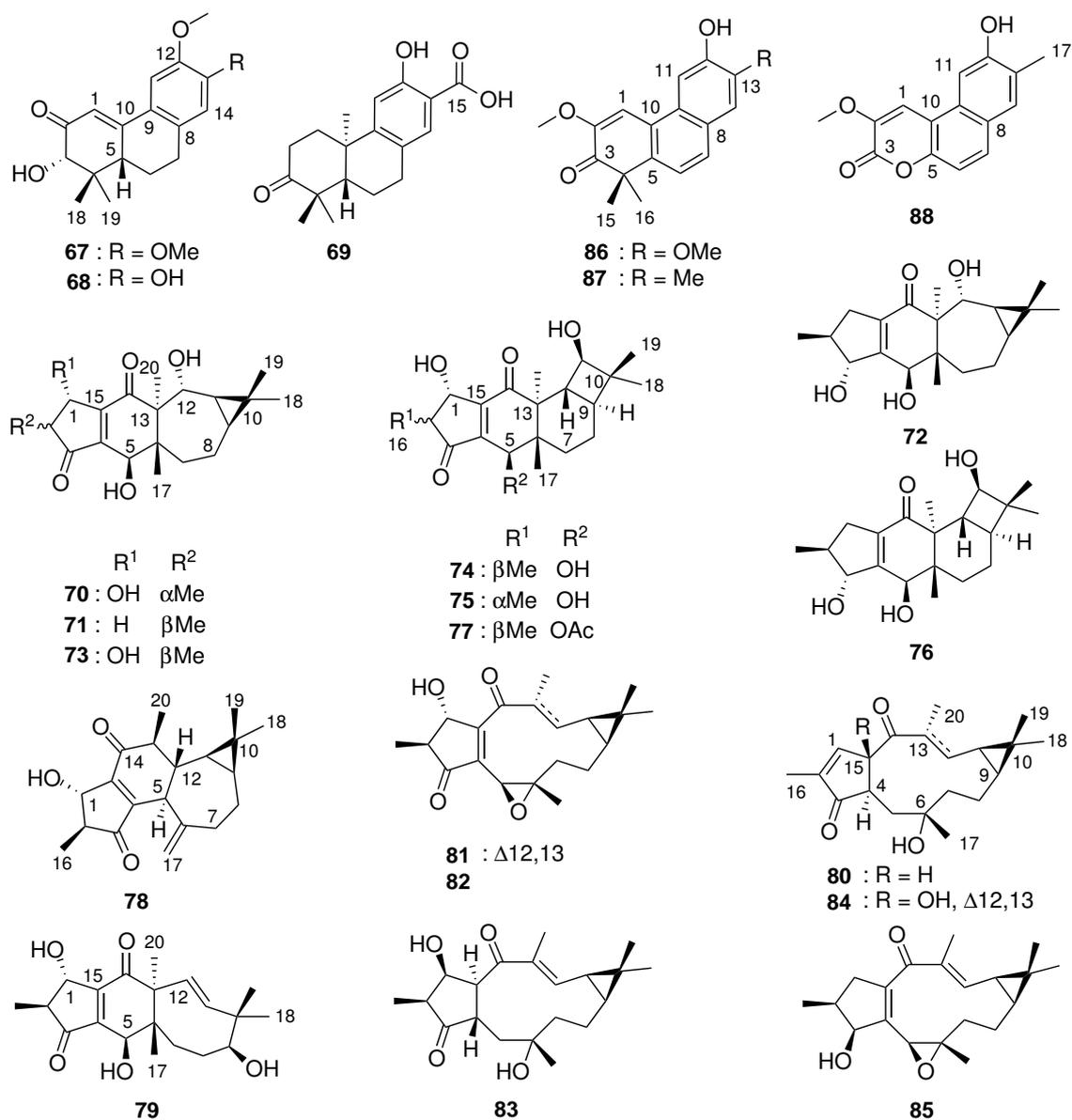


FIGURE 6.1 – Structures des diterpènes macrocycliques et phénanthrènes isolés de *S.guyanensis* et *S.racemosa*

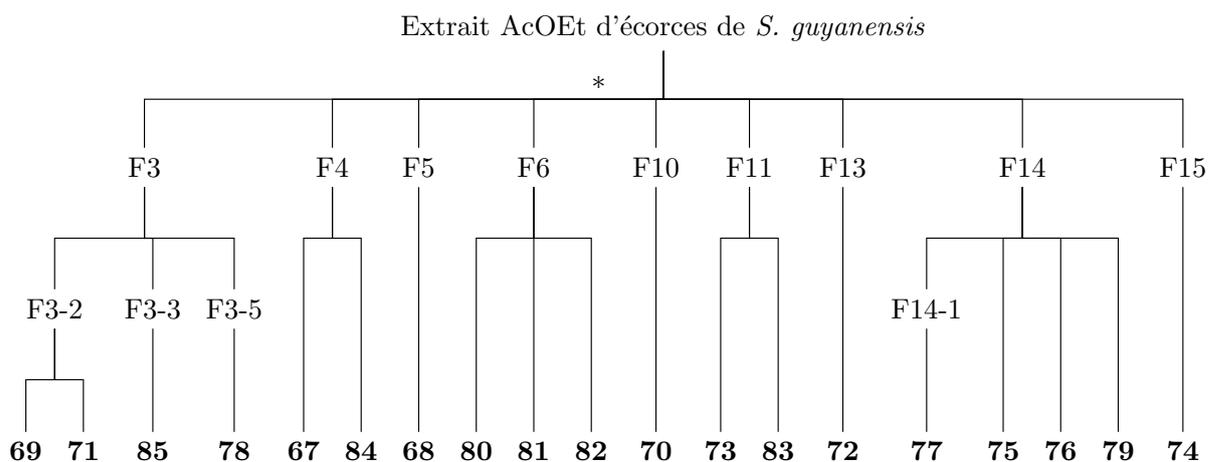


FIGURE 6.2 – Schéma de fragmentation de l'extrait brut de *S. guyanensis*, purification par HPLC préparative ou analytique en phase inverse (sauf *, par chromatographie flash en phase normale)

des composés **69** - **72** et **80** ont été confirmées par analyse par diffraction des rayons X. Les structures des jatrontelones A (**84**) et C (**85**) ont été élucidées par comparaison avec les données de la littérature.²⁶⁶ Les données de RMN ^1H et ^{13}C des composés **67** - **83** sont présentées dans les tableaux 6.1 à 6.6 et les spectres sont disponibles dans les informations supplémentaires de la publication Remy *et al.*²⁶⁷

6.4.1 Les phénanthrènes

Le spectre de masse HRESIMS(+) du composé **67** a montré un adduit sodium à m/z 325,1422 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculé pour 325,1410) conforme à une formule moléculaire, $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4$, indiquant huit équivalents d'insaturation. L'analyse des données de RMN a indiqué que **67** était un diterpénoïde de type phénanthrène structurellement proche de la domohinone isolé de *Domohinea perrieri*.²⁶⁸ En effet, son spectre de RMN ^{13}C présentait 18 résonances, comprenant un groupe carbonyle, huit carbones aromatiques/oléfiniques, deux méthyles et deux méthoxyes, un CH aliphatique et deux CH_2 aliphatiques, une oxyméthine et un carbone quaternaire (Tableau 6.6). Cependant, comparativement à la domohinone, aucune cétone en C-7 n'a été détectée et le composé **67** présentait un groupe méthoxy en C-13 (δ_{C} 56,1; δ_{H} 3,89) plutôt qu'un groupe méthyle chez la domohinone. L'attribution complète des signaux spectres RMN ^1H et ^{13}C de **67** a été effectuée grâce aux expériences de COSY, HSQC et HMBC et les positions relatives des substituants sur le noyau phénanthrène ont été déterminées par l'étude des corrélations NOESY (FIGURE 6.3).

Les données HRESIMS du composé **68** ont révélé une molécule protonée à m/z 289,1440 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculé pour 289,1434) correspondant à la formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_4$. L'analyse des données spectroscopiques, comparables à celles du composé **67** ont permis d'affirmer que le composé

266. ZHU, J. Y. *et al.* *RSC Adv.* **5**, 47235-47243 (2015).

267. REMY, S. *et al.* *J. Nat. Prod.* **81**, 901-912 (2018).

268. LONG, L. *et al.* *Tetrahedron* **53**, 15663-15670 (1997).

68 avait une structure similaire à celle du composé **67** mais avec un hydroxyle fixé en C-13 au lieu d'un groupe méthoxy pour **67**.

La formule brute $C_{18}H_{22}O_4$ du composé **69** a été établie par ESI(+)-HRMS à partir de la molécule protonée $[M+H]^+$ à m/z 303,1601 (calculé pour 303,1591). Les données de RMN 1H et ^{13}C du composé **69** (Tableau 6.1 et Tableau 6.6) étaient comparables à celles des composés **67** et **68**, mais ont révélé la présence d'une fonction acide carboxylique (δ_C 173.1), un singulet supplémentaire, résonnant à δ_H 1,31 correspondant à un troisième méthyle et un carbonyle non conjugué (δ_C 216,8) au lieu d'une cétone conjuguée dans les composés **67** et **68**. Les corrélations HMBC, d'une part entre le carbone du carbonyle C-15 et les protons H-11 (δ_H 6,90) et H-14 (δ_H 7,62) et d'autre part entre un proton déblindé à δ_H 10,10 et les carbones C-11, C-12 et C-13, ont permis de déduire que l'acide carboxylique et le groupe hydroxyle étaient liés aux carbones C-13 et C-12, respectivement. D'autres corrélations HMBC ont permis de localiser les groupes Me-20 et carbonyle en position 10 et 3, respectivement. La structure et la configuration absolue (5*S*,10*R*) du composé **69** ont été confirmées par une analyse par diffraction des rayons X.

Tableau 6.1 – Données RMN 1H des composés **67** - **69** (500 MHz, $CDCl_3$).

no.	67	68	69
1 α	6.64, d (2.6)	6.62, d (2.6)	2.46, ddd (13.5, 7.5, 4.3)
1 β	-	-	1.97, ddd (13.5, 10.0, 7.5)
2 α	-	-	2.60, ddd (16.0, 7.5, 4.3)
2 β	-	-	2.72, ddd (16.0, 10.0, 7.5)
3	4.04, s	4.04, s	-
5	2.59, m	2.58, ddd (13.0, 3.5, 3.5)	1.90, dd (12.0, 2.5)
6 α	2.13, m	2.10, dt d (13.0, 3.5, 3.5)	1.84, m
6 β	1.63, m	1.60, dt d (13.0, 12.5, 5.2)	1.80, ddd (12.0, 12.0, 6.0)
7 α	2.88, m	2.84, m	2.82, ddd (16.5, 12.0, 7.0)
7 β	-	-	2.97, ddd (16.5, 5.4, 1.5)
11	7.22, s	7.22, s	7.62, s
14	6.65, s	6.73, s	6.90, s
15	-	-	-
18	1.31, s	1.29, s	1.18, s
19	0.79, s	0.78, s	1.15, s
20	-	-	1.31, s
12-OMe	3.92, s	3.91, s	-
13-OMe	3.89, s	-	-
3-OH	3.84, sl	3.85, sl	-
13-OH	-	5.96, sl	-
15-OH	-	-	10.10, s

6.4.2 Les dérivés de l'euphoractine B

Le spectre de masse ESI(+)-HRMS de l'euphoractine P (**70**) présente un adduit sodium à m/z 371,1840 $[M+Na]^+$ (calculé pour 349,1829) correspondant à la formule moléculaire $C_{20}H_{28}O_5$,

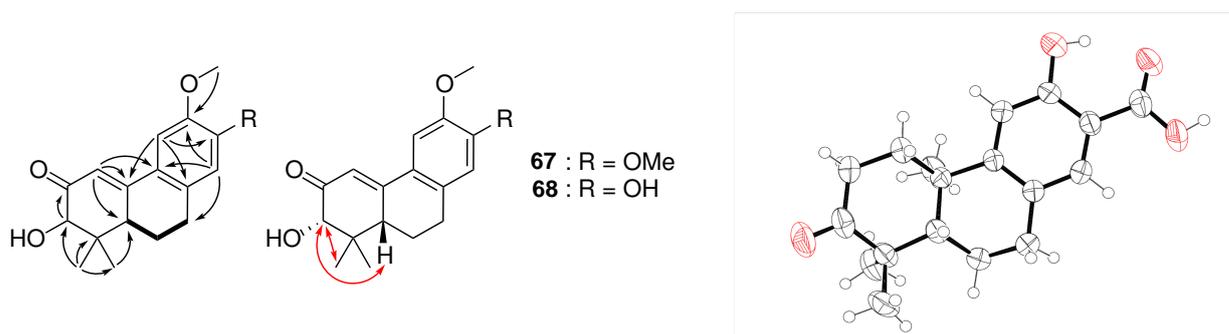


FIGURE 6.3 – Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) des composés **67** et **68**. Vue ORTEP du composé **69**

indiquant sept équivalents d'insaturation. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont révélé la présence de 20 atomes de carbone correspondant à cinq méthyles, deux carbonyles conjugués, cinq carbones quaternaires (deux oléfiniques), six méthines (trois oxygénées), et deux méthylènes. Ces données de RMN ont confirmé une structure tétracyclique similaire à celle de l'euphoractine B,²⁶⁹ mais avec la présence de deux carbonyles (δ_{C} 210,1 et 210,9), et l'absence d'un groupement cinnamoylé. Deux systèmes de spin impliquant les protons H-1 et H-2, et de H-7 à H-12 ont été identifiés par analyse des corrélations ^1H - ^1H observées dans le spectre COSY. La structure 2D du composé **70** a été déduite des corrélations HMBC et sa configuration relative des corrélations NOESY. La structure et la configuration absolue de **70** a été confirmée par l'analyse par diffraction des rayons X (FIGURE 6.4). Il convient de noter que, contrairement à l'euphoractine B, la jonction des cycles à six et sept chaînons de l'euphoractine P (4) est *trans*.

Le spectre de masse ESI(+)-HRMS de l'euphoractine Q (**71**) a montré un adduit sodium m/z 355,1886 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculé pour 355,1880), correspondant à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ et indiquant la perte d'un atome d'oxygène comparé à **70**. Les données spectroscopiques de RMN 1D et 2D étaient similaires à celles du composé **70**, mais ont révélé un groupe méthylène (δ_{C} 31,8, δ_{H} 2,44, 2,80, 1- CH_2) au lieu d'une oxyméthine en position 2 pour le composé **70**. La configuration relative de C-2 a été établie sur la base de fortes corrélations NOESY entre H-1 β à δ_{H} 2,44 et les groupes Me-16 et Me-17, tous orientés au-dessus du plan moyen de la molécule. La structure et la configuration absolue de **71** a été confirmée par l'analyse par diffraction des rayons X (FIGURE 6.4).

Le spectre de masse ESI(+)-HRMS de l'euphoractine R (**72**) a montré un adduit sodium m/z 357,2045 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculé pour 357,2036) correspondant à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$, indiquant deux protons de plus que **71**. En comparaison avec **71**, la perte d'un degré d'insaturation combinée à la présence d'une oxyméthine supplémentaire (δ_{C} 83,1, δ_{H} 4,55) observée dans les spectres RMN ^{13}C et HSQC de **72**, suggère qu'un carbonyle est remplacé par un groupe hydroxyle. La corrélation HMBC de H₃-16 à l'oxyméthine sur δ_{C} 83,1 a confirmé la substitution du cycle pentacyclique par un groupe hydroxyle en C-3. La structure et la configuration absolue

269. SHI, J.-G. & JIA, Z.-J. *Phytochemistry* **38**, 1445-1447 (1995).

de **72** a été confirmée par l'analyse par diffraction des rayons X (FIGURE 6.4).

La formule moléculaire $C_{20}H_{28}O_5$ a été attribuée à l'euphoractine S (**73**) sur la base des données HRESIMS de l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 371,1837 (calculé pour pour $C_{20}H_{28}O_5Na$, 371,1829), identique à celle du composé **70**. Les données RMN 1H et ^{13}C du composé **73** ont révélé que sa structure était identique à celle du composé **70** à l'exception de la constante $^3J_{1/2}$ de 6,0 Hz chez **70** au lieu de 2,5 Hz pour **73**. Ces valeurs, semblables à celles rapportées pour la lagaspholone A ($^3J_{1a/2} = 6,5$ Hz, $^3J_{1b/2} = 2,0$ Hz) et la curcusone A ($^3J_{1a/2} = 6,8$ Hz, $^3J_{1b/2} = 2,3$ Hz), suggèrent une configuration *trans* de la liaison C-(1)H/C-(2)H.^{270, 271} Une forte corrélation NOESY entre H-1 et H₃-16 indique également que ces protons sont cofaciaux. Le composé **73**, de configuration absolue (2*S*) est donc le 2-épimère de l'euphoractine P (**70**). Les principales corrélations COSY, NOESY et HMBC de **73** sont illustrées en FIGURE 6.4.

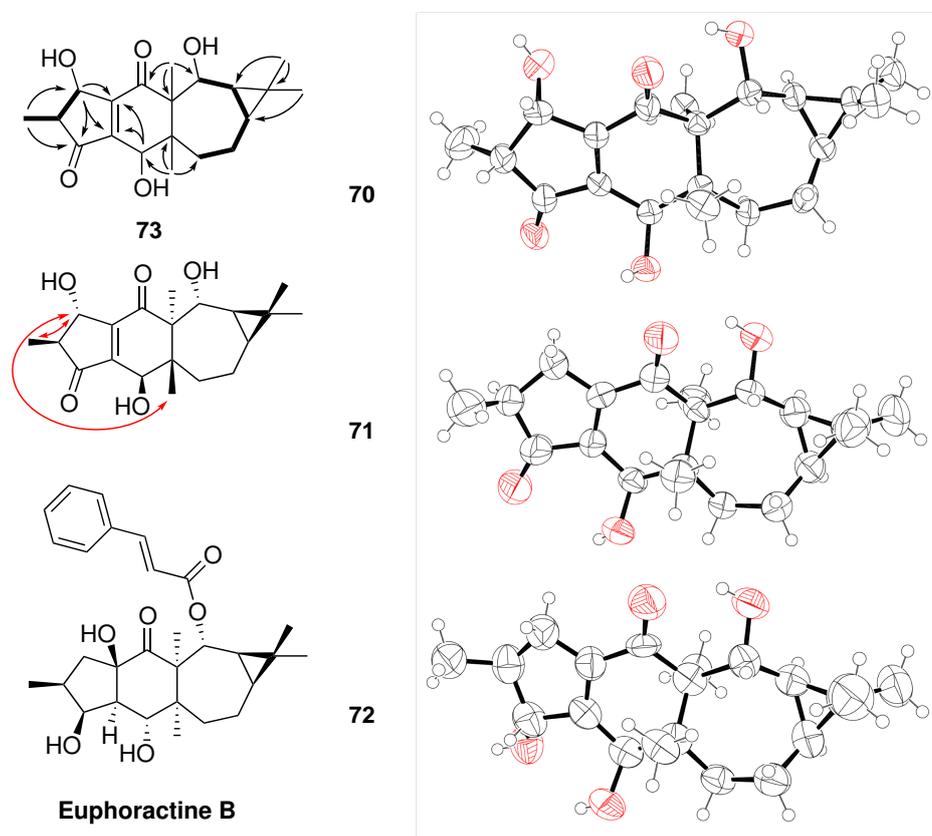


FIGURE 6.4 – Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé **73** et structure de l'euphoractine B. Vue ORTEP des composés **70** - **72**.

270. DUARTE, N. & FERREIRA, M. J. U. *Org. Lett.* **9**, 489-492 (2007).

271. NAENGCHOMNONG, W. *et al. Tetrahedron Lett.* **27**, 2439-2442 (1986).

Tableau 6.2 – Données RMN ¹H des composés **70** à **73** (500 MHz, MeOD (**70**), CDCl₃ (**71** à **73**)).

no.	70	71	72	73
1 α	5,14, d (6,0)	2,80, ddd (19,0, 6,4, 3,1)	2,10, m	4,82, sl
1 β		2,44, ddd (19,0, 2,7, 2,2)	2,59, m	
2 α	2,59, dq (6,0, 7,4)	2,60, qdd (7,5, 6,4, 2,2)	2,15, m	2,52, qd (7,5, 2,4)
3			4,55, m	
5	4,53, s	4,66, dd (3,1, 3,1)	4,53, s	4,70, sl
7 α	1,77, m	1,73, dd (13,5, 12,5)	1,71, dd (14,2, 12,5)	1,71, dd (13,5, 12,5)
7 β	2,04, dd (14,4, 7,0)	2,10, dd (13,5, 7,0)	1,95, dd (14,2, 7,0)	2,10, dd (13,5, 7,0)
8 α	1,79, m	1,80, ddd (14,6, 7,4, 7,0)	1,79, ddd (14,6, 7,5, 7,0)	1,81, dd (14,7, 7,5, 7,0)
8 β	1,04, m	0,99, ddd (14,6, 12,5, 11,0)	0,99, ddd (14,6, 12,5, 11,0)	0,97, m
9	0,82, m	0,77, ddd (11,0, 9,5, 7,4)	0,74, ddd (11,0, 9,6, 7,5)	0,76, m
11	0,56, dd (9,4, 9,4)	0,57, dd (9,5, 9,5)	0,55, dd (9,6, 9,0)	0,53, dd (9,4, 9,0)
12	4,05, d (9,4)	4,01, d (9,0)	3,94, d (9,0)	4,02, d (9,0)
16	1,14, d (7,0)	1,26, d (7,5)	1,20, d (7,0)	1,30, d (7,5)
17	0,87, s	0,88, s	0,84, s	0,87, s
18	1,10, s	1,12, s	1,10, s	1,10, s
19	1,13, s	1,13, s	1,10, s	1,12, s
20	1,37, s	1,38, s	1,40, s	1,37, s

6.4.3 Les dérivés de l'euphoractine A

Les données ESI(+)-HRMS de l'euphoractine T (**74**) ont permis d'établir, la même formule moléculaire, C₂₀H₂₈O₅, que celle du composé **73** (m/z 371,1841 [M+Na]⁺ (calculé pour 371,1829)). La comparaison des données de RMN du composé **74** avec celles du composé **73** (Tableau 6.2 et Tableau 6.3) a révélé que les composés ne différaient qu'au niveau de la partie "Est" de leurs structures. Sur le spectre COSY de **74**, deux systèmes de spin impliquent les protons, H-1 à H₃-16, et H₂-7 à H-12 comme le montre la FIGURE 6.5. Ces caractéristiques, associées aux corrélations HMBC entre les protons H₃-18 et H₃-19 et les carbones C-9, C-10 et C-11 ont permis d'attribuer au composé **74** une structure de type 5/6/6/4 semblable à celle de l'euphoractine A, un diterpénoïde connu isolé d'*Euphorbia micractina*.²⁷² La configuration relative du composé **74** a été établie par l'analyse des données du spectre de NOESY. Les corrélations croisées H₃-16/H-1, H-1/H₃-17, H₃-17/H-12, H-12/H₃-19, ont indiqué l'orientation β de ces protons, et l'orientation α de HO-1. Les corrélations H₃-18/H-9/H-11/ H-20/H-5 ont permis d'orienter HO-5 et HO-11 en β et H-9 et H₃-20 en α .

La formule moléculaire, C₂₀H₂₈O₅, de l'euphoractine U (**75**) a été déduite à partir de l'adduit sodium [M+Na]⁺ (m/z 371,1854 (calculé pour 371,1829)) observé sur le spectre ESI(+)-HRMS. Les données spectroscopiques ont montré que **75** était le 2-épimère de **74**, avec un groupe 16-Me orienté en α . La configuration *cis* de la liaison C-(1)H/C-(2)H a été établie sur la base d'une

272. SHI, J.-G. & JIA, Z.-J. *Phytochemistry* **38**, 1445-1447 (1995).

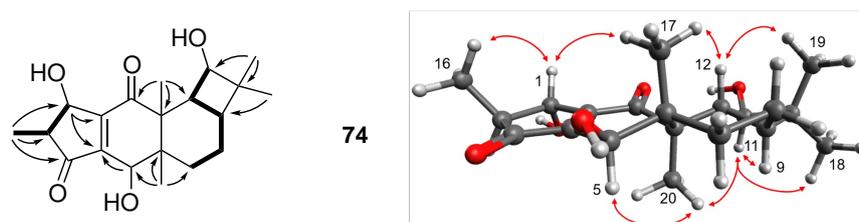


FIGURE 6.5 – Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé **74**.

correlation NOESY H-1/H-2 et d'une constante de couplage vicinal plus grande ($^3J_{1/2} = 6,0$ Hz) que celle observée pour le composé **74**. En outre, comme pour les composés **70** - **72**, la corrélation NOESY entre H-1 et H₃-17 suggère leur orientation β , permettant de proposer la configuration relative de l'euphoractine U (**75**) (FIGURE 6.1).

Tableau 6.3 – Données RMN ^1H des composés **74** à **77** (500MHz CDCl_3)

no.	74	75	76	77
1 α	4,76, d (2,0)	5,20, d (6,0)	2,66, ddt (15,9, 7,4, 2,0)	4,75, dd (2,5, 2,5)
1 β			2,03, ddt (15,9, 7,4, 2,6)	
2	2,54, qd (7,5, 2,0)	2,74, qd (7,5, 6,0)	2,17, sept (7,4)	2,48, qd (7,5, 2,5)
3			4,61, m	
5	4,78, sl	4,75, sl	4,64, sl	6,05, sl
7 α	1,57, m	1,58, m	1,55, m	1,49, m
7 β	1,88, m	1,88, m	1,72, dl (13,5)	1,59, m
8 α	1,42, m	1,42, m	1,43, qd (13,0, 4,0)	1,52, m
8 β	1,54, m	1,54, m	1,51, m	1,39, m
9	1,13, m	1,13, m	1,10, m	1,14, m
11	3,52, d (8,5)	3,52, d (8,5)	3,48, d (8,0)	3,54, d (8,3)
12	2,09, dd (13,0, 8,5)	2,09, dd (13,0, 8,5)	1,97, dd (13,0, 8,5)	2,06, dd (13,0, 8,3)
16	1,31, d (7,5)	1,23, d (7,5)	1,22, d (7,0)	1,28, d (7,0)
17	0,99, s	1,00, s	0,95, s	1,03, s
18	1,11, s	1,12, s	1,10, s	1,11, s
19	1,08, s	1,08, s	1,06, s	1,07, s
20	1,22, s	1,19, s	1,20, s	1,31, s
5-OAc				1,03, s
				2,1, s

Les données HRESIMS de l'euphoractine V (**76**) ont montré un adduit sodium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 357,2061 (calculé pour 357,2036), correspondant à la formule moléculaire $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$. L'analyse des données de RMN a révélé une structure comparable à celle des composés **74** et **75**, mais avec un groupe hydroxyle en C-3 au lieu d'un groupe carbonyle. La configuration *trans* de la liaison C-(2)H/C-(3)H a été établie par l'analyse des constantes de couplage des protons du système de spin H-1/H-2, H-2/H₃-16/H-3 (Tableau 6.3) et une forte corrélation NOESY entre H-3 et H₃-16.

La formule moléculaire $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$ de l'euphoractine W (**77**) a été établie à partir de l'adduit

sodium $[M+Na]^+$ à m/z 413,1944 (calculé pour 413,1935) observé sur le spectre ESI(+)-HRMS. Les données de RMN du composé **77**, comparables à celles du composé **74**, indiquent qu'il s'agit d'un analogue acétylé (δ_C 20,8 et 17,9, δ_H 2,17) de **74**. La localisation du groupement acétyle en position 5 a été déduite grâce à la corrélation HMBC entre le proton H-5 et le carbone de l'ester carboxylique. La configuration relative du composé **77** (FIGURE 6.1), semblable au composé **74**, a été déduite des corrélations NOESY.

6.4.4 Le sikkiménoïde E et l'euphactine G

Les données HRESIMS du sikkiménoïde E (**78**) ont montré une molécule protonée $[M+H]^+$ à m/z 337,1777, correspondant à la formule moléculaire $C_{20}H_{26}O_3$, indiquant huit équivalents d'insaturation. Les données RMN étaient étroitement comparables à celles du sikkiménoïde A isolé d'*Euphorbia sikkimensis*²⁶³, et possédant un squelette de type jatrophanolane. L'analyse des données spectroscopiques RMN 1D et 2D a confirmé que le sikkiménoïde E (**78**) était l'analogue 1-hydroxylé du sikkiménoïde A.²⁶³ Les corrélations clés COSY, NOESY et HMBC sont présentées en FIGURE 6.6. Sa configuration relative a été déduite de l'analyse des corrélations NOESY, la comparaison des déplacements chimiques et des valeurs de constantes de couplage avec celles du sikkiménoïde A. Les corrélations croisées entre H-1 et H₃-16 et entre H-2 et H-5 observées en NOESY, ont permis d'orienter les groupes 2-Me et 1-OH en β et α respectivement .

Tableau 6.4 – Données RMN ¹H des composés **78** et **79** (500MHz, CDCl₃)

no,	78	79
1	4,86, d (2,5)	4,85, d (2,5)
2	2,45, m	2,57, qd (7,5, 2,5)
5	3,24 dl (9,0)	4,58, sl
7 α	2,54, dd (12,5, 5,5)	2,08, dd (15,8, 11,3)
7 β	2,26, dd (13,0, 12,5)	1,19, dd (15,8, 7,0)
8 α	2,21, m	1,49, m
8 β	0,93, m	1,43, m
9	0,88, m	3,34, dd (10,5, 2,5)
11	0,56, dd (9,8, 9,2)	5,48, d (17,0)
12 α	1,41, dd (19,2, 12,5)	5,83, d (17,0)
13	2,44 m	-
16	1,28, d (7,8)	1,33, d (7,5)
17	4,71, d (9,0), 4,04, d (14,4)	0,93, s
18	1,11, s	1,26, s
19	0,92, s	1,05, s
20	1,15, d (6,7)	1,30, s

Le spectre HRESIMS du **79** a permis d'établir la même formule brute que les composés **70**, **74** et **75** ($C_{20}H_{28}O_5$). Les données de RMN ont révélé des signaux comparables à ceux des euphactines A-D isolées d'*E. micractina*²⁷², possédant un squelette tricyclique 5/6/8. Toutefois, contrairement à la structure des euphactines, ni le groupement benzoyle ni le groupement cinna-

moyle n'ont été identifiés. De plus, trois groupes hydroxyles en positions 1, 5 et 9 ont été détectés sur le composé **79**, comme l'indiquent les déplacements chimiques des trois méthines CH-1, CH-5 et CH-9 (δ_C/δ_H 73,7/4,85, 70,5/4,58 et 84,6/3,34 respectivement). Par ailleurs, les spectres RMN ^1H et ^{13}C de **79** ont révélé la présence de deux carbonyles conjugués (δ_C 207,8 et 202,8, C-3 et C-14, respectivement) et d'une double liaison disubstituée de configuration *trans* (δ_H 5,48 et 5,83, d, $J = 17,0$ Hz, C-11-C-12). Les principales corrélations COSY, NOESY et HMBC sont illustrées à la FIGURE 6.6. Les corrélations croisées NOESY H₃-16/H-1/H₂-17/H-12/H₃-19, ont permis d'indiquer la coplanarité de ces protons qui ont été arbitrairement orientés en β , tandis que les corrélations H₃-20/H-11 et H-9/H₃-18 indiquaient leur orientation α (FIGURE 6.6). Il est à noter que contrairement aux euphactines A-F,²⁷³ la jonction des cycles à six et huit membres de **79** est *trans*.

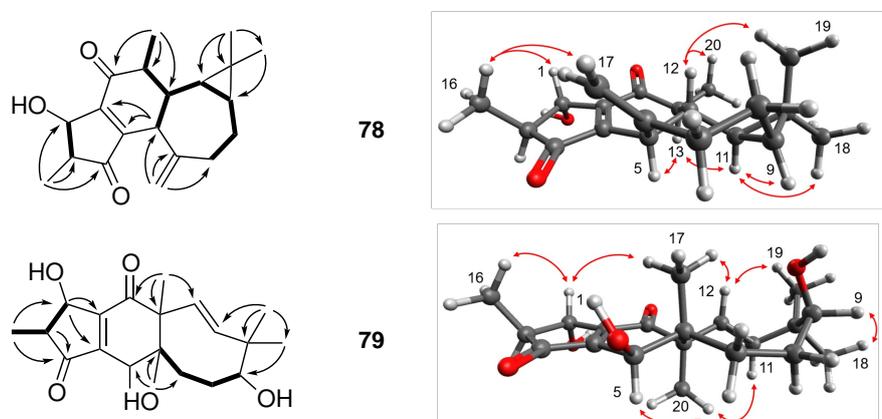


FIGURE 6.6 – Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) des composés **78** et **79**.

6.4.5 Les lathyranes

L'adduit sodium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 341,2096 (calculé pour 341,2087), observé sur le spectre ESI(+)-HRMS du composé **80** (jatroitelone J) a permis de lui attribuer la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$. Les données RMN du composé **80**, similaires à celles du curculathyrane A et de la jatroitelone A (**84**) isolées de *Jatropha curcus*²⁷⁴ et de *J. integerrima*,²⁶⁶ respectivement, ont révélé que **80** possédait un squelette de type lathyrane. Toutefois, en comparaison à la curculathyrane A, aucune double liaison $\Delta^{4(5)}$ ni groupe hydroxyle en position 15 n'ont été observés lors de l'analyse des spectres RMN du composé **80**. La structure 2D du composé **80** a été établie, grâce à l'observation de deux systèmes de spin observés sur le spectre COSY, impliquant les protons H-1 à H-5 et H-7 à H₃-20 d'une part, et grâce aux corrélations HMBC entre H₂-5, H₃-17, H₂-7 et le carbone tertiaire oxygéné C-6 (δ_C 71,9), entre H₃-17 et C-5 et C-7, entre H₃-20 et C-12, entre C-13 et le carbonyle C-14, et H-15 (δ_H 3,83) et C-1, C-2, et C-14, d'autre part. Les

273. TIAN, Y. *et al.* *J.Nat.Prod.* **76**, 1039-46 (2013).

274. NAENGCHOMNONG, W. *et al.* *Tetrahedron Lett.* **27**, 5675-5678 (1986).

corrélations croisées NOESY entre H-15 (δ_{H} 3,83) et H-5b, H-7, H-8b, H-12b et H-13, ont permis l'orientation en β de ces protons, tandis que les corrélations croisées entre H-4 (δ_{H} 3,10) et H-7a ont permis leur orientation en α . La structure et la configuration absolue du composé **80** ont été confirmées par une analyse par diffraction des rayons X (FIGURE 6.7). La Jatroitelone J (**80**) est le premier exemple de diterpénoïde de type lathyrane non oxydé en C-15 d'origine naturelle.

Tableau 6.5 – Données RMN ^1H des composés **80** à **83** (500MHz CDCl_3)

no.	80	81	82	83
1	7,07, m	4,69, d (1,5)	4,58, d (2,0)	4,06, dd (9,4, 9,4)
2		2,46, qd (7,5, 1,5)	2,46, ddd (14,8, 7,5, 2,0)	2,34, m
4	3,10, ddd (7,5, 2,5, 2,0)			2,32, d (13,0)
5a	2,09, dd (15,0, 2,0)	3,64, s	3,77, s	2,08, dd (10,0, 1,9)
5b	1,52, dd (15,0, 7,5)			1,62, dd (15,6, 5,5)
7a	1,42, m 2H	1,14, m	1,31, dd (13,5, 13,5)	1,43, m
7b		2,35, dd (13,0, 12,0)	2,36, ddd (13,5, 6,0, 1,0)	1,43, m
8a	1,42, m	1,14, m	1,82, ddd (15,0, 6,0, 1,0)	1,58, m
8b	0,49, d (11,0)	1,30, m	0,98, m	0,61, ddd (13,0, 12,5, 11,0)
9	0,28, dd (9,5, 9,5)	1,43, m	0,15, dd (9,0, 9,0)	0,99, ddd (12,5, 8,6, 3,4)
11	0,59, dd (11,0, 9,5)	1,65, dd (11,0, 8,0)	0,53, ddd (10,0, 9,0, 4,8)	1,35, dd (9,7, 9,3)
12a	1,99, ddd (15,1, 5,6, 1,6)	6,04, d (11,0)	2,08, ddd (15,0, 10,0, 4,5)	5,54 dl (9,7)
12b	1,71, ddd (15,1, 12,0, 3,0)		1,16, m	
13	3,14, m		3,18, m	
15	3,83 td (7,5, 2,5, 2,5)			3,59, dd (13,0, 9,4)
16	1,78, sl	1,21, d (7,5)	1,24, d (7,5)	1,20, d (7,0)
17	1,21, s	1,26, s	1,27, s	1,16, s
18	0,99, s	1,22, s	0,99, s	1,11, s
19	0,83, s	1,11, s	0,87, s	1,16, s
20	1,22, d (7,0)	2,02, s	1,13, d (7,0)	2,07, s
1-OH		4,61, sl		

Les données HRESIMS de la jatroitelone K (**81**) ont montré une molécule protonée $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 331,1933 (calculé pour $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_3$, 331,1904) correspondant à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$, indiquant huit équivalents d'insaturation. Les données de RMN 1D et 2D étaient comparables à celles de la jatroitelone C (**85**), isolée de *J. integerrima*,²⁶⁶ mais avec la présence d'un carbonyle à δ_{C} 205,8 (C-3) à la place d'un groupement hydroxyle chez la jatroitelone C (**85**). Ces données de RMN, ont montré des signaux similaires à ceux de **73**, **74**, **78**, **79**, impliquant la présence d'une cyclopenténone hydroxylé en C-1 chez **81**. Ces observations ont été confirmées par les corrélations HMBC entre H₃-16 et l'oxyméthine à δ_{C} 75,9, (C-1) et C-3, et entre H-1 et C-4, C-14 et C-15. La configuration relative du composé **81** a été établie à partir de la comparaison des données de RMN avec celles de la jatroitelone C et de l'analyse par NOESY (FIGURE 6.7).

La formule brute de la jatroitelone L (**82**), $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$, a été établie à partir de la molécule

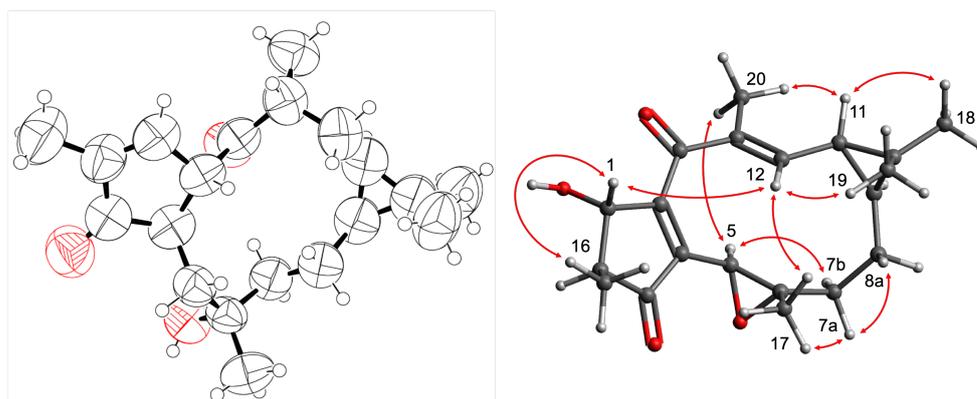


FIGURE 6.7 – Vue ORTEP du composé **80** (gauche) et corrélations NOESY du composé **81** (droite).

protonée $[M+H]^+$ observé sur le spectre ESI(+)-HRMS (m/z 333,2069 calculé pour 331,2060), indiquant sept équivalents d'insaturation, un de moins que la jatrontelone K (**81**). Les données spectroscopiques RMN étaient comparables à celles de la curculathyrane B7, ce qui a permis de déduire un squelette carboné tricyclique époxydé en position 5,6 avec une liaison C-12/C-13 saturée. Cette observation a été confirmée par les corrélations HMBC entre H₃-20 et deux carbones sp³ résonnant à δ_C 26,7 et 44,2 (C-12 et C-13, respectivement). La configuration relative du composé **82** a été établie à partir des corrélations NOESY et confirmée par une analyse aux rayons X (??).

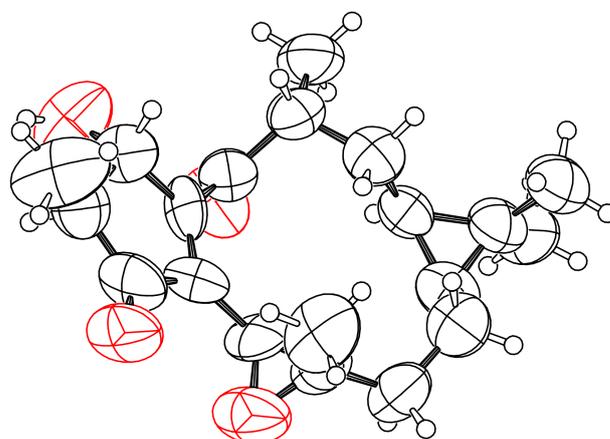


FIGURE 6.8 – Vue ORTEP du composé **82**

Les données HRESIMS de la jatrontelone M (**83**) ont montré un adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 357,2040 (calculé pour 357,2036) correspondant à la formule brute C₂₀H₃₀O₄. L'analyse des données de RMN de **83** (Tableau 6.5 et Tableau 6.6) a révélé la présence d'un squelette lathyrane similaire à celui des composés **80** et **84** caractérisé par l'absence d'une double liaison $\Delta^{4(15)}$. Le système de spin H₃-16 à H₂-5 (FIGURE 6.9) identifié à partir du spectre COSY, combiné à la constante de couplage $^3J_{4/15}$ de 13 Hz a permis d'affirmer que le cycle A du composé

83 était une cyclopentanone saturée. La configuration relative de **83** a été déterminée par une expérience NOESY. Cependant, les résonances de H-2 et H-4 (δ_{H} 2,34 et 2,32, respectivement) se chevauchent sur le spectre de RMN ^1H enregistré dans CDCl_3 . Afin de lever toute ambiguïté sur la configuration relative du composé **83**, des spectres RMN supplémentaires ont été enregistrés dans le benzène- d_6 à 600 MHz (voir informations supplémentaires S88 et S89 de Remy *et al.*²⁶⁷). Sur le spectre NOESY, les corrélations croisées H₃-16/H-1, H-1/H-4, H-4/H-4, H-4/H-5a et H-5a/H₃-17 ont indiqué que ces protons étaient cofaciaux, arbitrairement orientés β , tandis que les corrélations H-2/H-15, H-15/H₃-20, H₃-20/H-11, H-11/H-9 et H-9/H₃-18 ont permis de déterminer leur orientation en α . Il est à noter que la configuration *trans* de la jonction de cycle C4/C15 du composé **83** est opposée à celle du composé **80**. La jatointelone M (**83**) est le deuxième exemple d'un diterpénoïde de type lathyrane non oxydé en C-15 d'origine naturelle.

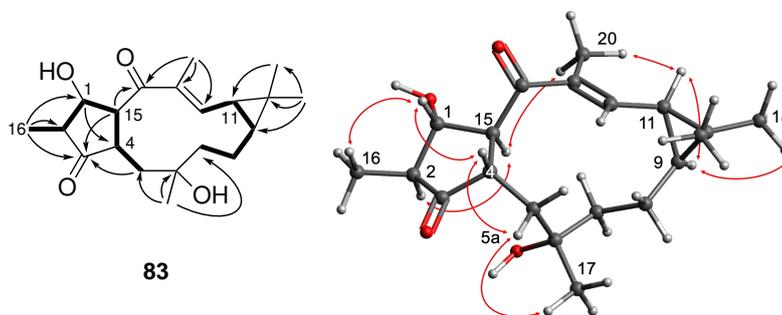


FIGURE 6.9 – Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) du composé **83**.

D'un point de vue biosynthétique, les euphoractanes (**70-77**) pourraient provenir de la cyclisation annulaire de dérivés de type lathyrane précédemment décrite par Appendino *et al.*⁶⁹ (FIGURE 6.10). La conversion du lathyrane **81** en euphoractine T (**74**) en présence d'un acide de Lewis a permis d'appuyer cette hypothèse. L'activation du carbonyle en position 14 par le $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ induit le déplacement de la double liaison $\Delta^{12(13)}$ et le réarrangement du cyclopropane en cyclobutane. L'addition de l'énolate sur l'époxyde en milieux aqueux a permis d'obtenir le composé **74** avec un rendement estimé à 80% (d'après l'intégration du pic de RMN ^1H , figure S77 des informations supplémentaires de Remy *et al.*²⁶⁷).

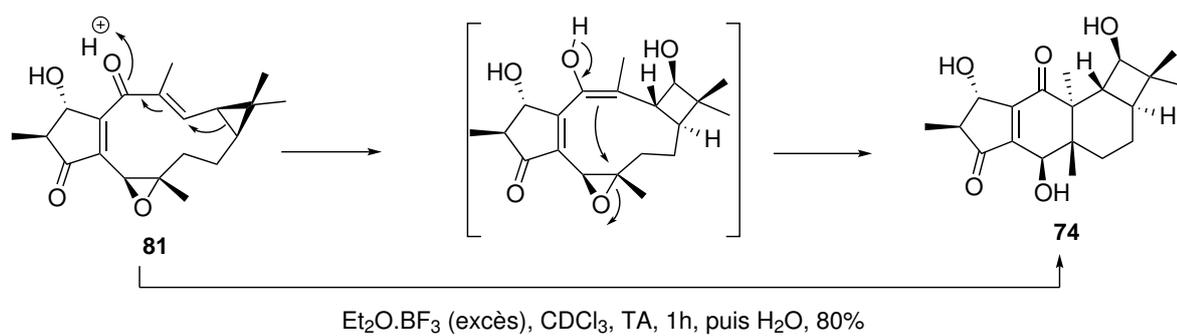


FIGURE 6.10 – Hypothèse biosynthétique de la formation de l'euphoractane **74** à partir du lathyrane **81**

Tableau 6.6 – Données RMN ^{13}C des composés **67**, **71**, **75**, **77** - **80**, **83** (125 MHz, MeOD), **68**, **69**, **72** - **74**, **76**, **81**, **82** (75 MHz CDCl_3)
 δC en ppm

no.	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
1	115,4	115,1	37,3	67,4	31,8	34,6	72,8	73,4	66,9	34,4	73,2	74,2	73,7	152,1	75,9	77,9	78,3
2	199,4	199,4	34,6	48,2	41,7	41,9	51,1	51,3	46,5	42,3	45,1	50,4	51,4	141,3	48,9	50,7	51,1
3	80,6	80,6	216,8	210,9	214,1	83,1	209,5	210,4	212,2	83,7	204,8	207,5	207,8	210,6	205,8	204,8	216,7
4	43,0	43,0	47,6	158,2	158	159,4	156,3	155,7	156,6	160,8	156,7	153,7	156,3	41,6	159,2	162,1	54,1
5	47,9	48,0	50,2	70,8	70,9	71,8	70,6	71,0	70,8	72,3	70,8	45,8	70,5	41,7	60,1	50,2	31,1
6	23,2	23,1	20,2	51,9	50,7	51,2	50,9	48,5	48,2	48,8	47,8	153,6	59,4	71,9	62,8	61,1	73,0
7	30,4	30,1	29,8	34,0	32,9	33,3	32,7	30,5	30,7	30,8	30,6	40,2	28,0	39,8	36,3	40,6	38,5
8	135,0	135,8	126,6	20,3	19,6	19,7	19,4	28,4	21,3	21,6	21,3	27,2	29,9	18,7	18,3	19,6	21,4
9	123,7	123,4	157,5	28,2	27,1	26,9	26,9	37,2	37,3	37,1	37,1	26,7	84,6	26,7	36,6	28,5	30,9
10	148,1	148,8	38,2	21,0	20,2	20,1	20,1	44,1	44,2	44,1	44,2	19,7	44,7	16,1	26,8	18,3	22,3
11	107,7	107,1	114,2	31,1	30,2	30,3	29,7	73,6	73,8	73,7	73,7	35,5	141,6	19,2	28,7	23,4	25,1
12	152,0	145,7	160,1	71,0	69,6	70,2	69,6	45,2	45,4	45,4	45,1	47,3	125	27,5	146,7	26,7	131,5
13	157,2	157,6	109,6	61,0	59,9	58,2	59,9	54,5	54,6	53,3	54,9	49,4	53,3	44,2	137,3	44,2	144
14	111,4	114,8	131,2	210,1	209,3	209,1	209,5	205,8	205,4	204,5	205,2	202,3	202,8	209,1	195,2	210,9	208,0
15			173,1	149,8	146	135,4	146,0	147,8	148,4	134,7	145,1	157,7	147,5	60,5	139,1	137,6	54,6
16				9,1	16,2	17,9	13,0	12,9	10,0	17,9	12,2	14,3	12,9	10,4	14,2	14,4	12,1
17				14,7	14,4	14,2	14,2	14,4	14,4	14,4	15,6	110,5	0,93	28,5	16,3	18,6	32,2
18	24,9	24,9	26,9	29,1	28,9	28,9	28,7	28,4	28,4	28,5	28,4	28,6	1,26	28,8	28,3	28,9	28,6
19	13,4	13,4	21,4	15,4	15,4	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3	17,0	1,05	15,0	15,7	15,2	15,3
20			24,5	12,0	12,2	13,0	12,0	14,1	14,1	14,8	14,3	11,2	1,3	13,4	11,8	17,8	13,0
5-OAc											170,9						
											20,8						
12-OMe	56,1	56,1															
13-OMe	56,1																

6.5 Caractérisation structurale des phénanthrènes de *S.racemosa*

Le spectre ESI(+)-HRMS du trigohowilol C (**86**) a montré un ion protoné à m/z 299,1295 $[M+H]^+$ correspondant à la formule moléculaire $C_{18}H_{19}O_4$ (calculé pour 299,1278) indiquant dix équivalents d'insaturation. L'analyse des données RMN a indiqué que **86** était un diterpénoïde de type phénanthrène de structure proche du trigohowilol B isolé de *Trigonostemon howii*.²⁷⁵ Son spectre RMN ^{13}C présentait 18 signaux, dont un carbonyle, cinq carbones aromatiques/oléfiniques, deux groupements méthyles, deux groupements méthoxy et huit carbones aromatiques quaternaires (Tableau 6.6). Toutefois, en comparaison au trigohowilol B, le composé **86** présentait un méthoxyle (δ_C 55,6, δ_H 3,93) au lieu d'un hydroxyle, chez le trigohowilol B, en position 2. L'analyse des spectres COSY, HSQC, HMBC et ROESY ont permis de confirmer la structure en FIGURE 6.11 et FIGURE 6.1.

La formule moléculaire $C_{18}H_{19}O_3$ a été attribuée au trigohowilol D (**87**) sur la base des données ESI(+)-HRMS de l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 305,1151 (calculé pour 305,1148). Les données de RMN 1H et ^{13}C du composé **87** étaient similaires à celles du composé **86**, mais avec la présence d'un groupement méthyle au lieu d'un groupement méthoxy retrouvé chez **86**. Les corrélations HMBC entre les protons H₃₋₁₇ (δ_H 2,45) et les carbones C-12, C-13 et C-14 (δ_C 153,8, 126,0 et 130,4, respectivement), ont permis de localiser le groupement méthyle en position 13 (FIGURE 6.11). D'autres corrélations ont confirmé la structure du composé **87** présentée en FIGURE 6.1.

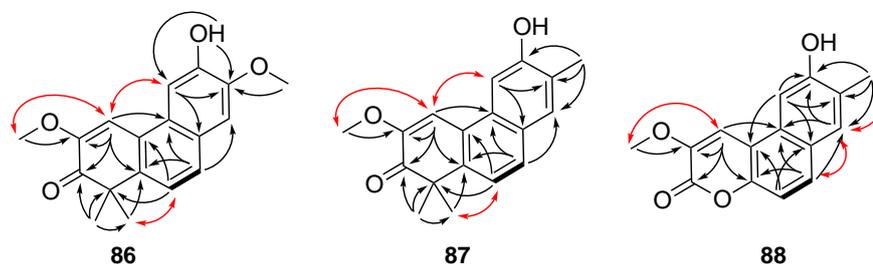


FIGURE 6.11 – Corrélations clé COSY (gras), HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) des composés **86** à **88**

La formule moléculaire $C_{15}H_{13}O_4$ a été établie pour le trigoflavidol D (**88**) par ESI-HRMS à partir de la molécule protonée $[M+H]^+$ à m/z 257,0807 (calculé pour 257,0808) avec dix équivalents d'insaturation. Son spectre de RMN ^{13}C indique la présence de 15 résonances carbonées, dont une pour un carbonyle, 13 carbones aromatiques/oléfiniques, un groupe méthyle et un groupe méthoxy. Les données spectroscopiques de RMN 1D et 2D ont suggéré une structure de benzo[f]coumarine proche du trigoflavidol C (Tang et al., 2012a), la seule différence étant l'absence du groupe méthoxy en position 7 (δ_C 129,0; δ_H 7,84 d) chez **88**. La structure 2D du composé **88** est déduite des corrélations HMBC et sa configuration relative des corrélations

275. TANG, G. H. *et al.* *J. Nat. Prod.* **75**, 1962-1966 (2012).

Tableau 6.7 – Données RMN ^1H et ^{13}C (150 MHz) des composés **86** (600 MHz, CDCl_3), **87** (500 MHz, CDCl_3) et **88** (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$), J en Hz)

no.	86		87		88	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	110,8	7,30 s	110,7	7,29 s	110,5	7,79 s
2	149,4		149,4		144,3	
3	199,3		199,4		157,3	
4	49,1		49,3			
5	140,9		141,6		148,3	
6	122,2	7,37 d (8,4)	121,8	7,35 d (8,6)	112,9	7,26 d (8,8)
7	126,8	7,64 d (8,4)	127,4	7,66 d (8,6)	129,0	7,84 d (8,8)
8	122,3		121,8		125,5	
9	126,2		130,2		129,7	
10	128,2		128,3		112,8	
11	104,9	7,65 s	104,6	7,49 s	104,7	7,89 s
12	146,6		153,8		157,4	
13	147,2		126,0		127,4	
14	106,7	7,13 s	130,4	7,60 s	130,2	7,76 s
15	28,2	1,55 s	28,2	1,55 s		
16	28,2	1,55 s	28,2	1,55 s		
17			16,3	2,45 s	16,4	2,39 s
13-OMe	56,1	4,05 s				
2-OMe	55,6	3,93 s	55,7	3,94 s	56,4	4,07 s
12-OH		6,03 br s		5,16 br s		

ROESY, comme représenté en FIGURE 6.11.

6.6 Identification de phorboïdes antiviraux

S. guyanensis et *S. racemosa* ont été sélectionnées pour les puissantes activités anti-CHIKV des extraits de leurs écorces. Cependant, seul le composé **81** a montré une faible activité antivirale contre CHIKV ($EC_{50} = 14 \mu M$, $SI = 1,92$). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette contradiction, l'activité biologique de l'extrait est due :

- à des composés qui se sont dégradés au cours du processus de purification,
- à des composés qui agissent en synergie dans l'extrait.
- ou à de puissants inhibiteurs du CHIKV, présents à l'état de trace dans les extraits.

Il est maintenant connu que les phorbols et désoxyphorbols présents chez de nombreuses Euphorbiaceae et possédant des esters à longue(s) chaîne(s) situées en C-12 et/ou C-13 sont de puissants inhibiteurs de la réplication du virus CHIKV.¹⁷³ Le TPA inhibe le virus à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. A cette concentration, il est impossible d'isoler un tel composé à partir d'un extrait de plante. Il peut cependant être détecté grâce à la spectrométrie de masse. Afin d'identifier les composés pouvant être responsables des fortes activités anti-CHIKV initialement présentes dans les extraits et les fractions des deux plantes, deux réseaux moléculaires (MN) ont été construits à partir des données LC-MS/MS issus des extraits des deux espèces.

6.6.1 Fragmentations caractéristiques des esters de phorbol

Les travaux de Nothias-Scaglia *et al.*²⁷⁶ décrivent en détail la fragmentation des phorboïdes ; notamment, en electrospray en mode positif, les spectres MS/MS des esters de phorbol (PE) possèdent des fragments caractéristiques à m/z 311, 293 et 265 et les esters de 4-déoxyphorbols (dPE) à m/z 335, 313 et 295 (FIGURE 6.12). De plus, les pertes des chaînes acyles sont facilement détectables (*e.g.* acide acétique, 60 amu, acide isobutyric, 88 amu, acide tiglique/angélique, 100 amu, acide benzoïque 122 amu).

6.6.2 Annotation du réseau moléculaire de *S.guyanensis*

Chez *S. guyanensis*, les fractions F14 et F15 présentaient des $EC_{50} < 0,6 \mu g/mL$. Le réseau moléculaire (MN) de *S.guyanensis* a été construit à partir des données LC-MS/MS des fractions chromatographiques F3-F16 (FIGURE 6.13). Les données ont été pré-traitées grâce au logiciel MZMine 2 puis téléchargées sur la plateforme GNPS pour la comparaison des spectres MS/MS. Le fichier de sortie a ensuite été visualisé grâce au logiciel Cytoscape. La quantification relative des ions détectés, basées sur les aires des pics chromatographiques (XIC) dans chaque fraction, a été représentée par un diagramme circulaire (FIGURE 6.13 B) selon la procédure publiée par Olivon *et al.*¹⁷⁹

276. NOTHIAS-SCAGLIA, L. F. *et al.* *J. Chromatogr. A* **1422**, 128-139 (2015).

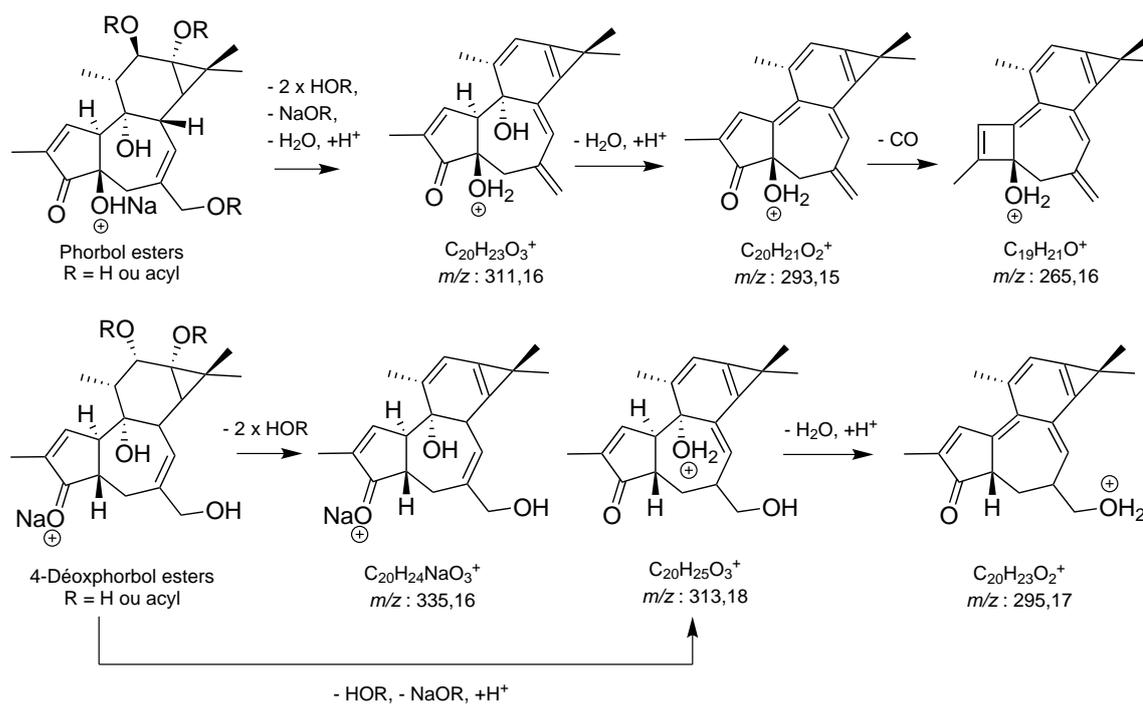


FIGURE 6.12 – Fragmentation des PE et dPE en ESI(+)

L'observation d'une famille moléculaire dont les spectres MS/MS possèdent des fragments caractéristiques à m/z 311, 293 et 265, a indiqué que ces ions étaient des dérivés du phorbol.²⁷⁶ L'examen des spectres MS/MS des nœuds C, D, E et F a montré que ces composés partageaient le même mode de fragmentation MS/MS que des esters de phorbol ayant une ou deux longues chaînes carbonées, notamment par l'observation de pertes neutres de chaînes acyles de longueurs variées (FIGURE 6.13 C-F). De plus, lors de la recherche dans les bases de données spectrales du GNPS, le spectre MS/MS de l'ion à m/z 595,436 (FIGURE 6.13 C) correspondait à un analogue du 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), un des plus puissants composés anti-CHIKV décrit à ce jour ($EC_{50} \approx 2,9$ nM, SI = 1965).³³

Comme les ions C-F sont retrouvés principalement dans les fractions F14 et F15 (FIGURE 6.13 B), il est très probable que les phorbols à longue(s) chaîne(s) soient responsables des activités anti-CHIKV initiales de l'extrait et des fractions. Malgré les efforts déployés, aucun analogue du phorbol n'a pu être isolé en raison de concentrations inférieures à la limite de détection (0,1 mg) du détecteur ELS.

6.6.3 Annotation du réseau moléculaire de *S.racemosa*

De la même manière que pour *S.guyanensis* les données LC-MS/MS des fractions F1-F12 de l'extrait de *S.racemosa* ont permis de construire un réseau moléculaire *via* la plateforme GNPS. L'étude de *S.racemosa* postérieure à celle de *S.guyanensis* a bénéficié du protocole NAP

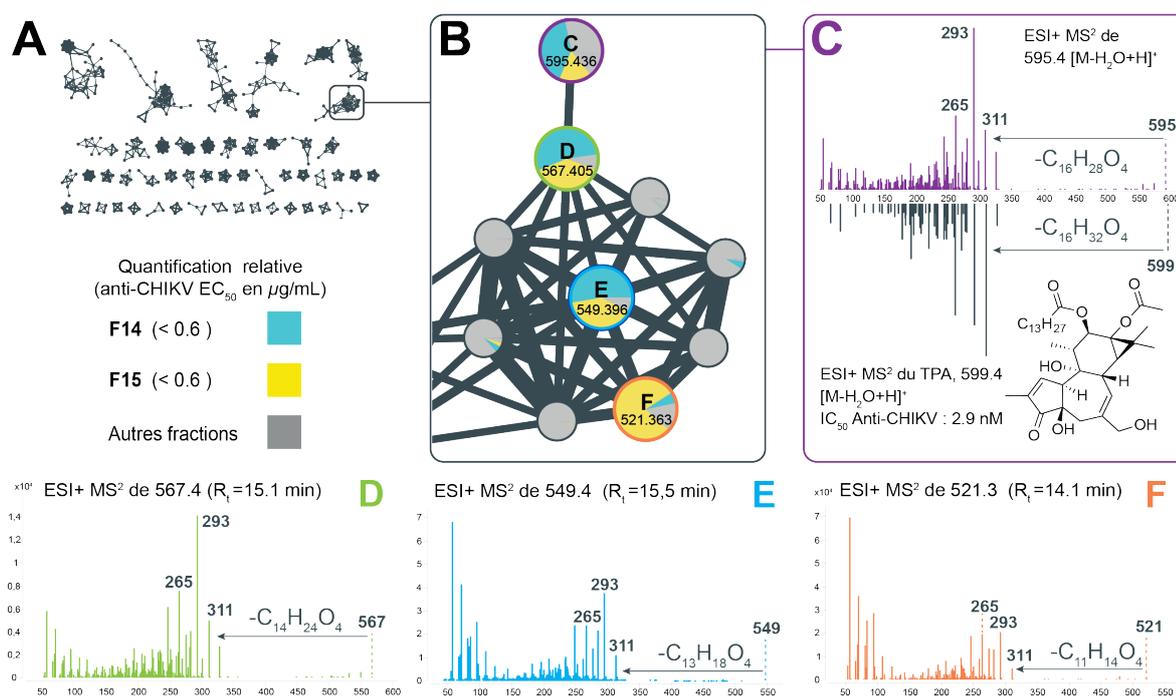


FIGURE 6.13 – (A) Réseau moléculaire des fractions F3-F6 de l'extrait de *S.guyanensis*. (B) Famille moléculaire correspondant à des analogues du phorbol. La quantification relative de chaque ion dans les fractions est représentée par des diagrammes circulaires dépendants de l'aire des pics HPLC. (C) Le spectre du nœud C correspondant à un analogue du TPA issu des bases de données spectrales de GNPS. (D, E, et F) spectres des nœuds D, E, et F montrant les fragments et les pertes de chaînes acyles caractéristiques des phorboides.

récemment développé sur la plateforme GNPS. La comparaison aux bases de données spectrales de GNPS a permis d'annoter deux nœuds comme analogues de PE (FIGURE 6.14, C et D) et le protocole NAP a permis de consolider et de propager l'annotation aux voisins de C et D. Ceci a rendu possible l'annotation de quatre nœuds supplémentaires (FIGURE 6.14, A, B1, B2 et E). Le candidat le mieux classé pour chaque nœud n'était pas toujours un PE. Toutefois, des PE candidats pour les nœuds A, B1, B2 et E ont été classés parmi les 12 premiers candidats (3e, 12e, 12e et 3e, respectivement). Une inspection manuelle des spectres MS/MS a révélé des pertes d'acyles et des fragments caractéristiques à m/z 335, 1615 et 295, 1690, permettant de supposer que ces ions étaient des esters de 4-déoxyphorbol (dPE).²⁷⁶

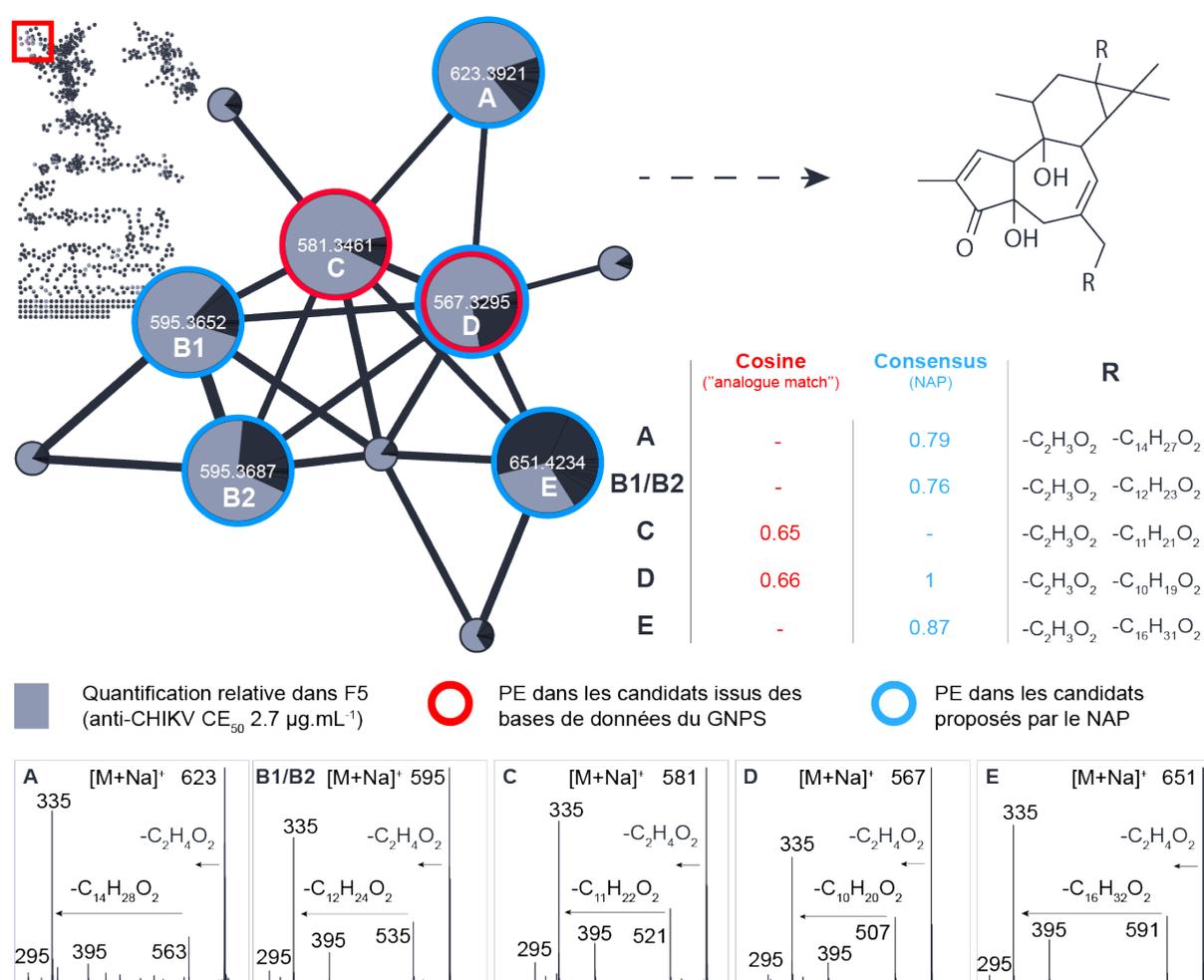


FIGURE 6.14 – Annotation du réseau moléculaire des fraction F1-F12 de l'extrait de *S. racemosa*. La table indique les cosines scores entre les spectres expérimentaux et des spectres d'analogues d'esters de phorbol (EP) provenant des bases de données de GNPS et les scores consensus issus du NAP incluant la comparaison aux spectres issus de la fragmentation *in silico* de bases de données structurales. La quantification relative de chaque ion dans F5 est représentée par des diagrammes circulaires dépendants de l'aire des pics HPLC. Les spectres MS/MS des nœuds A-E montrent des fragments et des pertes de neutres caractéristiques des phorboïdes.

Les ions A-D se trouvaient principalement dans la fractions F5 (EC₅₀ 2.7 µg/mL), des analogues de dPE pourraient donc être responsables des activités anti-CHIKV initialement présentes dans l'extrait et F5.

6.7 Discussion

S. guyanensis et *S. racemosa* sont deux espèces d'Euphorbiaceae endémiques d'Amérique du sud (voir 6.1). Considérées comme des espèces sœurs, elles appartiennent à deux genres qui ne comptent que deux espèces chacune. Ces espèces biosynthétisent un ensemble de métabolites spécialisés originaux, parmi lesquels des diterpénoïdes macrocycliques et polycycliques possédant des squelettes carbonés rares. De manière générale, les terpènes jouent divers rôles dans la médiation des interactions entre les organismes, qu'elles soient antagonistes ou bénéfiques. Ils défendent de nombreuses espèces de plantes contre les prédateurs, les pathogènes et les espèces concurrentes,²⁷⁷ mais très peu ont été étudiées d'un point de vue fonctionnel. Un certain nombre de terpènes se sont avérés être des toxines, des répulsifs ou des attractifs pour d'autres organismes, ce qui a permis de postuler qu'ils ont un rôle écologique dans des interactions antagonistes ou mutualistes entre organismes.²⁷⁸ Il est par ailleurs étonnant de constater que, malgré la diversité des terpénoïdes connus, des espèces végétales éloignées sur le plan phylogénétique ont développé la capacité de produire des structures chimiques similaires à des fins communes. Enfin, les concentrations de ces métabolites varient d'une espèce, d'un organe, ou encore d'une saison à l'autre^{279, 280} et leur rôle dans la Nature reste à découvrir. Le financement d'un projet annuel du Labex CEBA a été l'opportunité de débiter une étude de la variation de composition de *S.guyanensis* au cours des saisons qui permettrait d'apporter les premiers éléments expliquant les conditions de leur production. Des collectes des écorces et des feuilles de *S. guyanensis* à quatre périodes de l'année ont été entreprises (3 arbres par période). En août 2017 (fin de saison des pluies), novembre 2017 (saison sèche), avril 2018 (fin de saison des pluies) et octobre 2018 (saison sèche). Des extraits AcOEt ont été préparés pour chaque collecte. Les premières analyses par l'approche des réseaux moléculaires des extraits d'écorces et de feuilles n'ont pour l'instant pas permis de détecter les diterpènes isolés précédemment. Cependant, le réseau des extraits d'écorces a d'ores et déjà permis de confirmer la présence des esters de phorbol précédemment identifiés. La famille moléculaire présentée en FIGURE 6.15 montre des ions dont certains ont été annotés comme PE. D'autre part l'analyse des données de MS/MS via la plateforme MS2LDA a permis de confirmer l'annotation par la détection de trois motifs, motif_390, euphorbia_motifs_78 et euphorbia_motif_199 communs comportant des fragments caractéristiques des PE (la description des motifs est disponible aux url suivantes : http://ms2lda.org/basicviz/view_parents/193105/, .../192610/ et .../193008/ respecti-

277. GERSHENZON, J. & DUDAREVA, N. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 408-414 (2007).

278. LANGENHEIM, J. H. *J. Chem. Ecol.* **20**, 58 (1994).

279. OBST, J. R. *For. Prod. Biotechnol.* **10**, 151-165 (1998).

280. VALARES MASA, C. *et al. Molecules* **21**, 275 (2016).

vement). Ces composés sont présents dans tous les extraits d'écorces. Leur production ne semble donc pas spécifique à une période donnée. Des études métabolomiques plus poussées pourraient permettre de préciser les variations quantitatives de production au cours des saisons. La suite de l'étude consistera à optimiser les paramètres d'acquisition et de traitement des données de MS/MS afin de tenter de détecter des diterpènes rares tels que les euphoractines dans les extraits d'écorces et de feuilles de *S. guyanensis* et ainsi d'apporter des informations sur leurs conditions de production (partie de plante, période...).

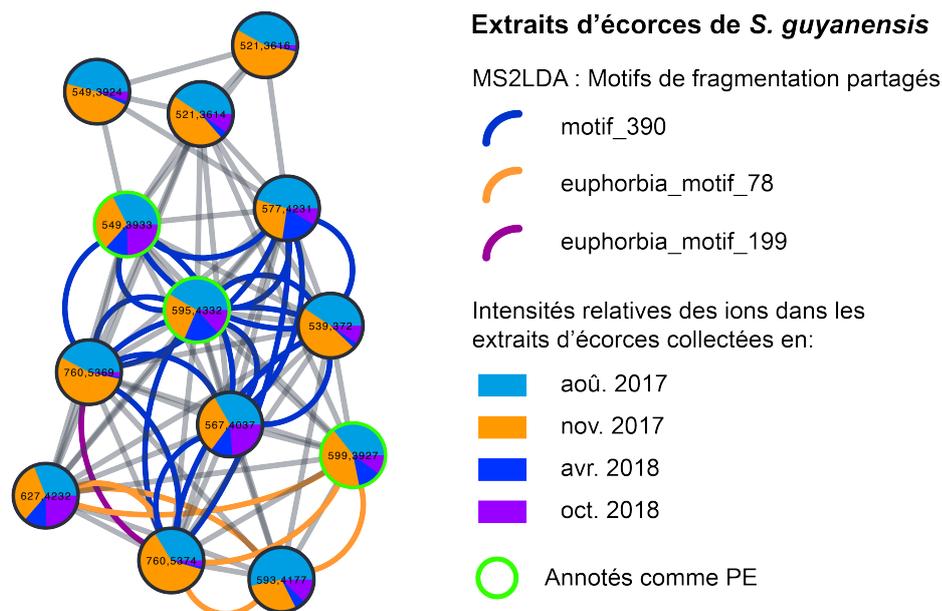


FIGURE 6.15 – Famille moléculaire d'esters de phorbol retrouvée au sein d'extraits d'écorces de *S. guyanensis* récoltés à plusieurs périodes de l'année

6.8 Conclusion

19 diterpénoïdes de six types structuraux différents ont été isolés à partir de l'extrait d'écorce du tronc de *S. guyanensis*. Parmi les composés décrits pour la première fois, (**97**), les euphoractines P-W **98** et l'euphactine G (**99**) possèdent les rares squelettes cycliques condensés 5/6/7/3 (**70-73**), 5/6/6/4 (**74 - 77**) et 5/6/8 (**79**) et le sikkiménoïde E (**78**) est seulement le cinquième analogue du jatropholane décrit dans la nature. Des diterpénoïdes macrocycliques possédant de tels squelettes de carbone n'ont été rapportés que chez quatre espèces d'*Euphorbia*^{281, 282, 283, 284} tandis que les jatropholanes, également caractérisés par un système cyclique fusionné 5/6/7/3, ont été isolés seulement chez quelques espèces d'*Euphorbia* et de *Jatropha*.^{263,266,270,281,282 285} Les

281. GAO, J. & AISA, H. A. *J. Nat. Prod.* **80**, 1767-1775 (2017).

282. GAO, J. *et al. Phytochemistry* **122**, 246-253 (2016).

283. SHI, J.-G. *et al. Phytochemistry* **32**, 208-210 (1992).

284. VASAS, A. *et al. Tetrahedron* **60**, 5025-5030 (2004).

285. XU, J. J. *et al. Helv. Chim. Acta* **94**, 842-846 (2011).

diterpénoïdes de type lathyrane²⁸⁶ à 5/11/3 membres sont plus courants.⁴ Toutefois, il convient de noter que tous les diterpénoïdes de type lathyrane décrit dans la littérature sont oxydés en C-15, ce qui n'est pas le cas de la jatointelone J (**80**) et de la jatointelone M (**83**). Ces composés sont les premiers exemples de diterpénoïdes de type lathyrane non oxydés C-15 d'origine naturelle.

Les phénanthrènes **86** et **87** isolés de *S. racemosa* sont structurellement apparentés aux micrandroles E et F, deux phénanthrènes caractérisés en 1976 dans une étude réalisée sur le bois de cœur de la même espèce.²⁵³ Ces types de composés sont appelés diterpènes dégradés car ils possèdent des squelettes polycycliques de 16 à 19 carbones avec un ou plusieurs groupes méthyles et/ou un groupe gem-diméthyle dans différentes positions. Plus de 30 diterpènes dégradés ont été caractérisés à ce jour (voir Annexes). Cette sous-classe de diterpènes se trouve exclusivement chez les Crotonoideae au sein des Euphorbiaceae²⁵⁷. Enfin, il est à noter que malgré le fait que *S. racemosa* soit phylogénétiquement et morphologiquement très proche de *S. guyanensis* et que les deux espèces cohabitent dans les mêmes biotopes, les types structuraux identifiés chez les deux espèces et leurs proportions relatives dans l'écorce semblent très différents. Seuls des diterpénoïdes de type phénanthrène et phorbol ont été identifiés chez les deux espèces.

Parmi tous les composés isolés, seule la jatointelone K (**81**) a présenté une faible activité anti-CHIKV ($EC_{50} = 14 \mu\text{M}$, $SI = 1,92$). La forte activité anti-CHIKV des extraits pourrait s'expliquer par la présence de dérivés de phorbols à longue(s) chaîne(s) bioactifs à l'état de traces. Cette étude illustre comment l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem combinée à l'analyse des données par les réseaux moléculaires peuvent être mis en œuvre dans les études phytochimiques pour comprendre les problèmes et améliorer le processus de découverte de composés bioactifs.

286. SHI, Q.-W. *et al.* *Chem. Rev.* **108**, 4295-4327 (2008).

Chapitre 7

Inhibiteurs de DENV-2 et ZIKV : 1. Criblage d'extraits d'Euphorbiaceae

Sommaire

7.1	Test de l'activité polymérase de la NS5	106
7.1.1	Principe	106
7.1.2	Mise en œuvre	106
7.2	Production de la protéine non-structurale 5	108
7.2.1	Transformation	108
7.2.2	Cultures des bactéries	108
7.2.3	Purification par affinité métallique	109
7.2.4	Purification par exclusion stérique	112
7.2.5	Contrôles et Bilan	112
7.3	Criblage des extraits d'Euphorbiaceae	115
7.3.1	Description des extraits	115
7.3.2	Analyse des résultats	115

Chez les flavivirus, une fois la cellule infectée, l'ARN génomique est immédiatement traduit en une polyprotéine qui est clivée en deux groupes de protéines : les protéines structurales et les protéines non-structurales. Parmi les protéines non-structurales, la NS5 possède deux activités essentielles à la réplication virale : une activité ARN polymérase qui permet la réplication de l'ARN génomique et une activité méthyl-transférase (NS5 MTase) qui permet de coiffer cet ARN pour éviter sa dégradation (FIGURE 7.1). Dans cette étude, l'inhibition de l'activité ARN polymérase de la protéine NS5 de ZIKV et de DENV-2 par une collection d'extraits de plantes a été évaluée dans le but d'isoler de nouvelles molécules inhibitrices des deux virus.

7.1 Test de l'activité polymérase de la NS5

7.1.1 Principe

Le test d'inhibition de la NS5 polymérase est basé sur la fluorescence d'un intercalant des acides nucléiques double brin : le PicoGreen[®]. En présence d'ARN monopolymérique Poly uracile (Poly(U)) d'ATP et d'ions K^+ , Mg^{2+} et Mn^{2+} l'enzyme synthétise le brin complémentaire pour donner un ARN double brin. La quantité d'ARN db produite peut être évaluée par l'ajout de PicoGreen[®]. Ce composé se lie de manière spécifique aux ARN db et peut être visualisé par fluorimétrie. La quantité de fluorescence reflète donc l'activité polymérase de la NS5. Ainsi, en présence d'un inhibiteur, la fluorescence diminue indiquant une baisse de la production d'ARN db.

7.1.2 Mise en œuvre

Le test a été optimisé pour être réalisé en plaque 96 puits de manière semi-automatique grâce à deux robots : un robot Biomek 4000[®] permettant les opérations de transfert puits par puits ou colonne par colonne et un robot Biomek I5[®] pour les transferts de la plaque entière. Afin d'éviter la dégradation de la protéine, toutes les opérations manuelles (préparations des réactifs, des tampons, de la plaque "réactifs"...) ont été réalisées dans la glace. Pour chaque test trois plaques sont nécessaires (FIGURE 7.2) :

1. la **plaque "réactifs"** contient :
 - les éléments nécessaires aux contrôles : le DMSO (colonne 1), le mélange pour le contrôle du bruit de fond (Bdf), l'EDTA (contrôle) et l'inhibiteur de référence (3'dATP),
 - les éléments nécessaires à la réaction : l'ATP (mix nucléotide), l'enzyme et les ions (mix enzyme).
2. la **plaque d'expérience** est la plaque dans laquelle a lieu la réaction enzymatique. Elle contient les substances à tester à l'exception des colonnes 1 et 12 qui sont réservées aux contrôles.
3. la **plaque de lecture** est une plaque noire Greiner qui est utilisée pour la lecture des résultats au fluorimètre.

Dans un premier temps, le contrôle positif (DMSO) et les contrôles négatifs (Bdf, 3'dATP, EDTA et tampon TE (Tris-EDTA, tampon de dilution du PicoGreen[®])) sont transférés dans la plaque d'expérience (colonnes 1 et 12). Puis, les substances à tester sont réparties dans les autres puits. Dans un second temps, l'enzyme est distribué et la réaction est démarrée grâce à l'ajout des nucléotides. La plaque est alors scellée et incubée à 30 °C. Après 30 minutes pour DENV-2 et 20 minutes pour ZIKV, la réaction est stoppée par l'ajout d'EDTA. Enfin, le contenu de la plaque d'expérience est transféré dans la plaque de lecture à laquelle est ajouté le PicoGreen[®]. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante la plaque de lecture est lue à l'aide d'un fluorimètre.

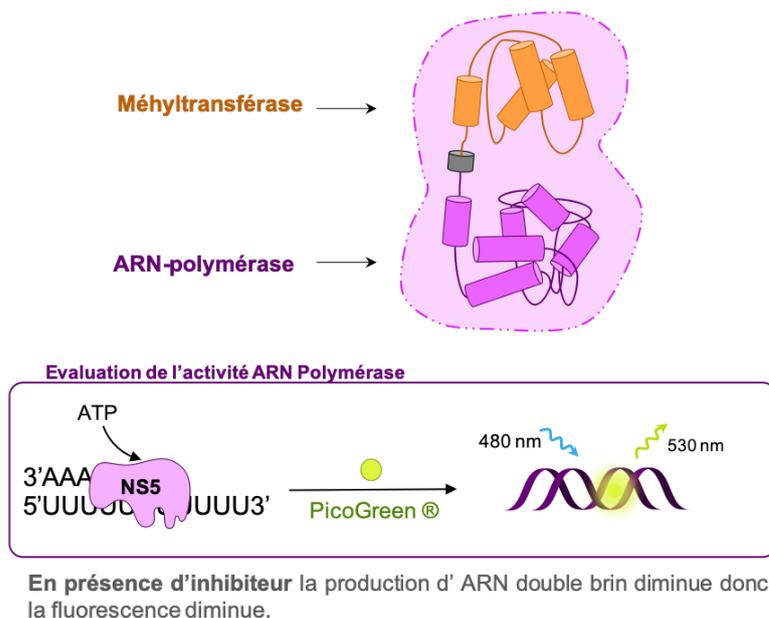


FIGURE 7.1 – Schéma de la structure de la protéine NS5 des flavivirus (haut) et principe du test d'évaluation de l'activité ARN polymérase (bas)

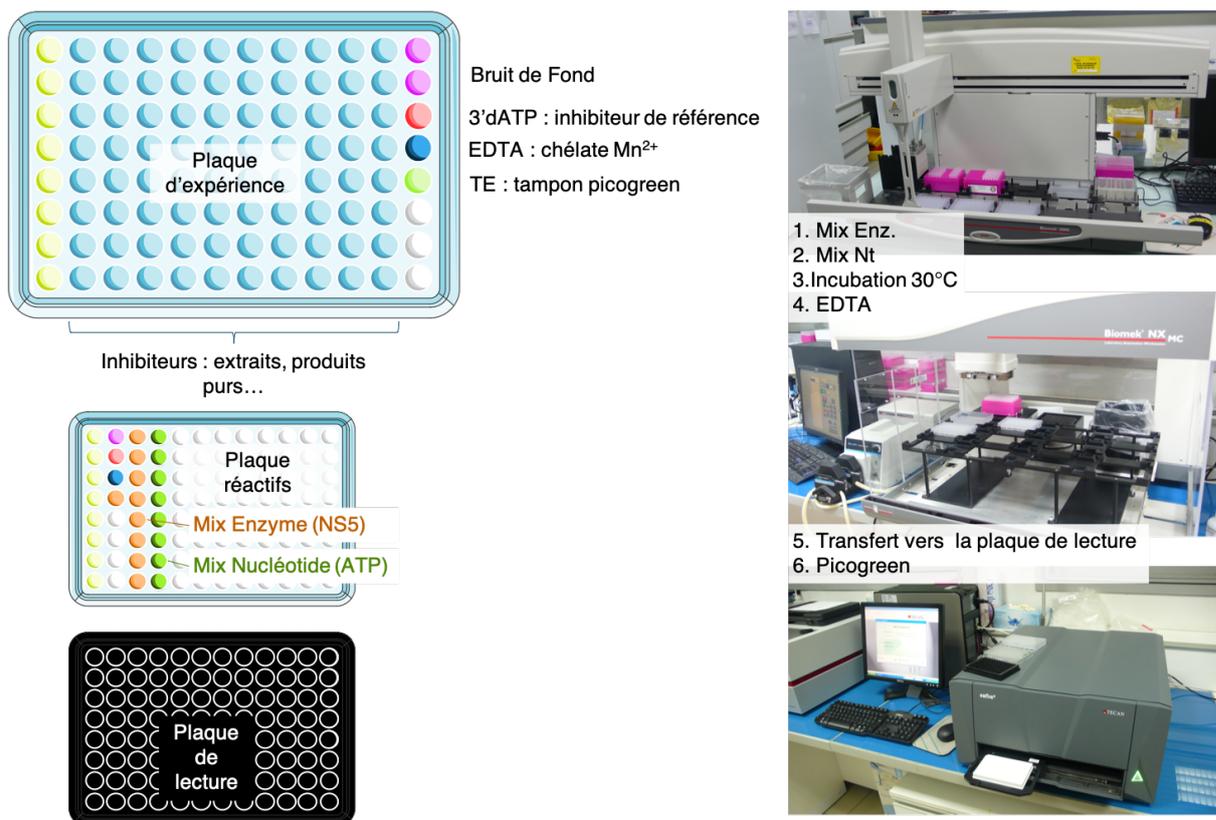


FIGURE 7.2 – Mise en œuvre du test d'inhibition de la NS5 polymérase. Mix Enz. : solution contenant l'enzyme et la chaîne Poly(U) ; Mix Nt : solution contenant l'ATP

7.2 Production de la protéine non-structurale 5

7.2.1 Transformation

La première étape de la production de la NS5 est la transformation. Le gène codant pour la séquence de la NS5 est d'abord inséré dans un plasmide (vecteur) à l'aide d'une enzyme de restriction. Le gène est ensuite inséré dans une cellule hôte compétente (*E.coli*) via le plasmide (Tableau 7.1). Un choc thermique permet l'incorporation des plasmides en augmentant la perméabilité des membranes des bactéries. Celle-ci sont ensuite incubées dans un milieu riche permettant de maintenir les cellules en vie lors du choc thermique (SOC).²⁸⁷ Afin de sélectionner les cellules transformées, les bactéries sont transférées sur un milieu solide (LB-Agar) contenant deux antibiotiques, le chloramphénicol (CAF) et l'ampicilline (Ampi), pour lesquels la cellule hôte et le vecteur sont respectivement résistants.

7.2.2 Cultures des bactéries

Après une nuit à 37°C des pré-cultures de 5 mL en milieu liquide (LB + Ampicilline + CAF) sont réalisées en prélevant un clone bactérien par culture. Après une nuit à 37°C, les pré-cultures ayant les meilleures densités optiques ($DO \approx 1$) sont stockées à -80°C dans 100% de glycérol, un milieu permettant une stabilité optimale des bactéries lors des décongelations répétitives. La culture à grande échelle des bactéries transformées débute par la réalisation d'une pré-culture de 500 mL permettant de remettre les bactéries en condition de multiplication après leur stockage. Cette pré-culture est composée d'un milieu liquide (TB - terrific broth - pour DENV-2, LB - lysogeny broth - pour ZIKV) d'antibiotiques (CAF et Ampicilline) et de 5 à 8 µL du stock glycérol de bactéries transformées. La pré-culture est incubée à 37°C une nuit, puis elle est utilisée pour ensemercer des cultures de 1L (+CAF+Ampicilline) de manière à obtenir une DO initiale de 0,2 dans chaque flasque. Les cultures sont incubées à 37°C. Lorsque leur DO atteint une valeur entre 0,5 et 0,6, l'induction de l'expression du gène est déclenchée par l'ajout d'IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside, concentration finale : 250 µM). Après une nuit d'incubation à 17°C les cultures sont centrifugées et les culots stockés à -20°C.

Tableau 7.1 – Protéines, types de bactéries et de plasmides utilisés

Protéines	PM (kDa)	ϵ_{280}	pI	Bactéries	Plasmides
ZIKV	106,4	2,1	8,9	<i>E. coli</i>	pQE-30
DENV-2					pDest-17

PM : poids moléculaire, ϵ_{280} : coefficient d'extinction molaire, pI : point isoélectrique

287. HANAHAN, D. J. *Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1983).

Induction de l'expression du gène : L'IPTG est un analogue non-hydrolysable du lactose, très répandu en biologie moléculaire, qui permet l'induction des protéines recombinantes. En l'absence de lactose ou d'IPTG l'opéron lac est sous sa forme réprimée empêchant la liaison de l'ARN-polymerase. En présence d'IPTG, l'opéron lac se dissocie de son répresseur (FIGURE 7.3).

- Sur le génome d'*E.coli*, l'ARN-polymerase constitutive peut alors se lier au promoteur du T7 (ou T5) et permettre l'expression du gène de l'ARN-pol T7.
- Sur le vecteur, l'ARN-pol T7 peut se lier au promoteur T7 et permettre l'expression du gène cible.

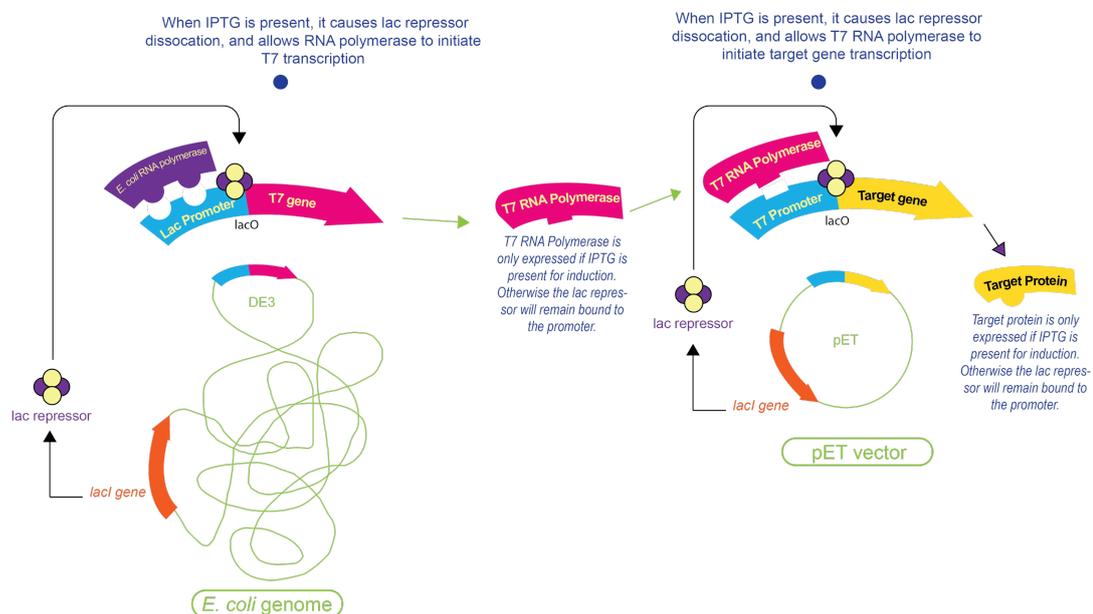


FIGURE 7.3 – Mécanisme de l'induction de l'expression d'un gène par l'IPTG dans une bactérie

7.2.3 Purification par affinité métallique

Cette étape débute par la lyse des bactéries. Afin de limiter la dégradation de la protéine, notamment par les différents agents libérés lors de la lyse bactérienne, les opérations de purification sont effectuées à 4 °C. Les culots bactériens sont suspendus dans le tampon de lyse (Tableau 7.2). Puis, afin d'accentuer le choc osmotique, du NaCl solide (concentration finale 1M) est ajouté à la suspension qui est ensuite agitée durant 30 minutes. La suspension est soniquée, 20 µL sont prélevés (F_{tot}) pour les contrôles ultérieurs, puis le lysat est centrifugé pour donner une fraction soluble (FS) et un culot bactérien (F_{pel}) dont 20 µL sont également prélevés.

Une protéine de fusion est une protéine artificielle obtenue par la combinaison de plusieurs protéines. Un des principaux intérêts des protéines de fusion réside dans la possibilité d'y incorporer un tag (étiquette) permettant de faciliter leur purification. Ainsi, les séquences codant pour les protéines NS5 de ZIKV et DENV-2 ont été clonées en fusion avec un tag hexa histidine. Les six histidines en N-terminal du domaine méthyltransférase possèdent des groupements imidazoles qui peuvent se lier aux métaux tels que le nickel ou le cobalt par coordination (FIGURE 7.4).

La résine cobalt est équilibrée avec du tampon d'équilibrage (Tableau 7.2) puis la FS est ajoutée à la résine. Le mélange est incubé sous agitation pendant une heure durant laquelle la protéine se fixe sur la résine *via* son tag hexa-histidine (FIGURE 7.4). Les protéines non fixées à la résine (FNR) sont éliminées par plusieurs cycles de lavage avec du tampon de lavage. La résine est chargée sur une colonne puis, est éluée par fractions de 1 mL avec du tampon d'éluion. Un suivi au bleu de Bradford et des DO permet de détecter la présence de protéines dans les fractions. Les fractions contenant les protéines sont regroupées (Pool Co) et concentrées sur un centricon dans le tampon d'éluion.

Tableau 7.2 – Description des tampons pour la purification de la NS5 de ZIKV (en noir) et de DENV-2 (en gris)

mM	Lyse	Equilibrage	Lavage	Elution	GF	Dialyse	Rôle
Hepes	-	-	-	-	20	20	contrôle le pH
NaP	5	5	5	5	-	-	contrôle le pH
Tris	20	20	20	20	20	20	contrôle le pH
Glycérol (%)	20	20	20	20	10	40	stabilise la protéine
	-	-	-	-	-	40	
NaCl	200	500	1500	500	750	750	choc osmotique (lyse), limite les interactions non spécifiques avec la résine, maintient la force ionique
	1000	500	1000	300	300	300	
Glycine	-	-	-	250	-	-	évite la précipitation de la protéine
	-	-	-	250	250	-	
Igepal (%)	1,6	1,6	0,8	0,8	-	-	détergent non-ionique, perméabilise les membranes
Triton X (%)	0,1	-	-	-	-	-	détergent, perméabilise les membranes
Imidazole	10	5	10	250	-	-	à faible concentration : limite les fixations non-spécifiques, à forte concentration, décroche la protéine de la résine
	10	5	10	250	-	-	
BME	5	5	5	5	-	-	agent réducteur, limite l'oxydation des protéines
	-	-	-	-	-	-	
DTT	-	-	-	-	10	10	agent réducteur, limite l'oxydation des cystéines
	-	-	-	-	5	5	

Tableau 7.3 – Description et concentration des additifs au tampon de lyse

Additif	Concentration	Rôle
Lysozyme	1 mg mL ⁻¹	dégrade le peptidoglycane, lyse bactérienne
DNase	22 µg mL ⁻¹	dégrade les acides nucléiques de la bactérie
Benzamidine	0,2 mM	inhibiteur des protéases à sérine, limite la dégradation des protéines lors de la lyse

7.2.4 Purification par exclusion stérique

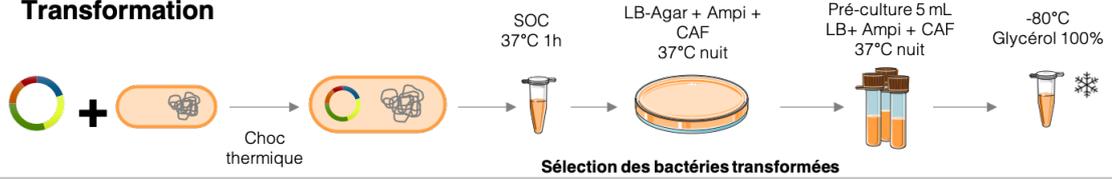
Malgré l'attention particulière portée à la prévention de la dégradation de la protéine, la rupture du "linker" entre les deux domaines, qui constitue probablement un site d'autolyse, semble inévitable.²⁸⁸ Le tag histidine est localisé au niveau du domaine NS5 MTase. Ainsi, la NS5 Full a été retrouvée en mélange avec la NS5 MTase dans l'éluat de la purification par affinité métallique (FIGURE 7.4). Par conséquent, une étape supplémentaire de purification a été nécessaire. Cette étape s'effectue sur une chaîne chromatographique de type Äkta[®] munie d'une colonne d'exclusion stérique et d'un détecteur UV. La colonne est équilibrée avec le tampon GF puis la solution de protéine est injectée et éluée avec le même tampon. Les deux pics correspondant à la NS5 Full (pic 1) et à la NS5 MTase (pic 2) ont été récoltés, concentrés sur un centricon et dialysés dans le tampon de dialyse (une nuit sous agitation) pour être stockés à -20°C .

7.2.5 Contrôles et Bilan

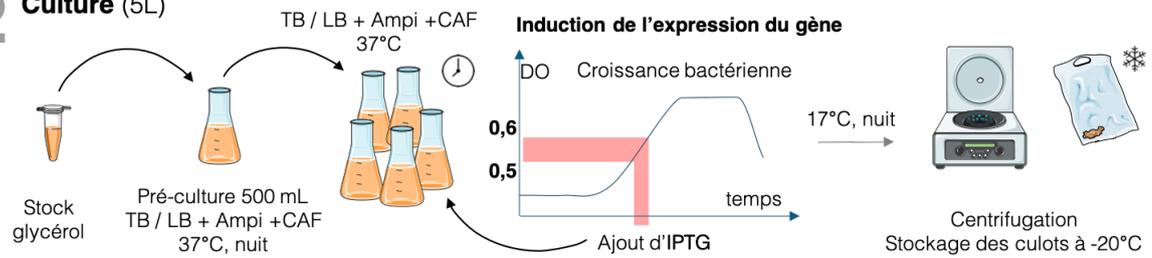
Qualité L'analyse des prélèvements effectués au cours du processus de purification, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de vérifier la présence de la protéine d'intérêt révélée par une bande à environ 100 kDa. Sur la (FIGURE 7.5), le dépôt Ftot indique la présence de la NS5 dans le lysat bactérien et confirme ainsi la bonne expression de la protéine par les bactéries. Même si une partie est restée dans le culot du lysat bactérien (Fpel), la protéine a été récupérée dans le surnageant (FS). FS est plus dilué que Fpel d'où une intensité moindre de la tâche. La portion de protéine retrouvée dans le culot pourrait correspondre à des protéines mal repliées ayant précipité. La quantité de NS5 non fixée sur la résine cobalt (FNR) était faible, et les lavages n'ont pas décroché (Lav.1 et 2) la protéine, ce qui indique que la fixation sur la résine est efficace. L'éluution de la résine par une forte concentration d'imidazole (Pool Co.), a permis de récupérer la totalité de la protéine fixée à la résine qui ne contient plus de protéine après éluution (Résine). La seconde étape de purification a permis d'isoler les deux pics dont les PM correspondent à ceux de la NS5 Full (106 kDa) et de la NS5 MTase (33 kDa); aucune impureté n'est détectée dans ces deux fractions (Pic 1 et Pic 2). Les mêmes contrôles ont été effectués lors de la production de la NS5 de DENV-2.

288. BERA, A. K. *et al. J. Biol. Chem.* **282**, 12883-12892 (2007).

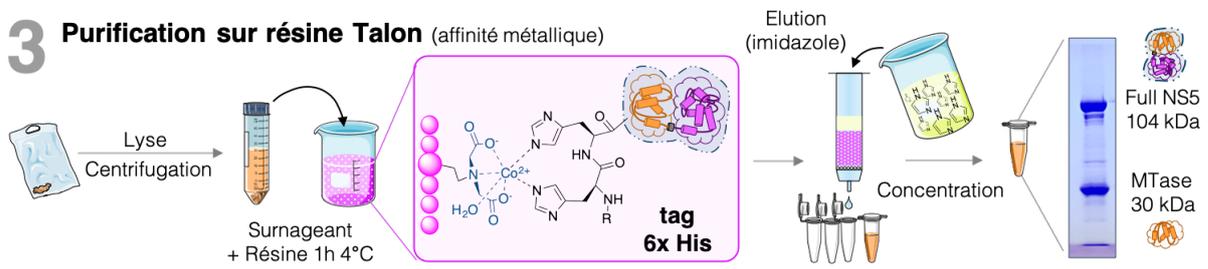
1 Transformation



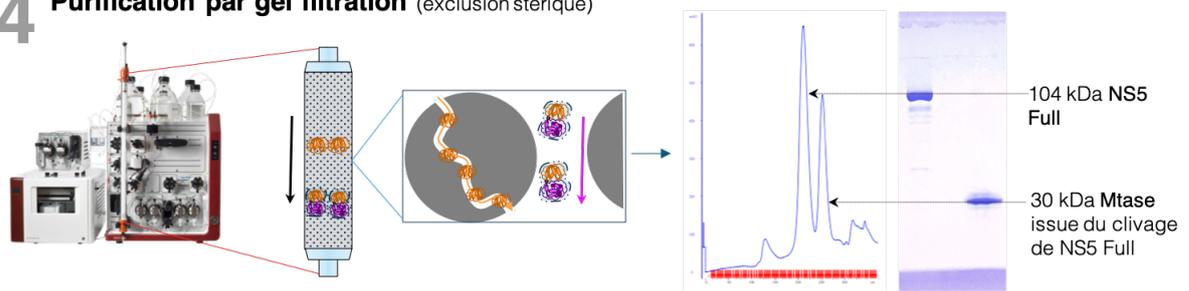
2 Culture (5L)



3 Purification sur résine Talon (affinité métallique)



4 Purification par gel filtration (exclusion stérique)



5 Evaluation de l'activité polymérase



FIGURE 7.4 – Production, purification et test d'activité de la protéine NS5 de ZIKV et DENV-2

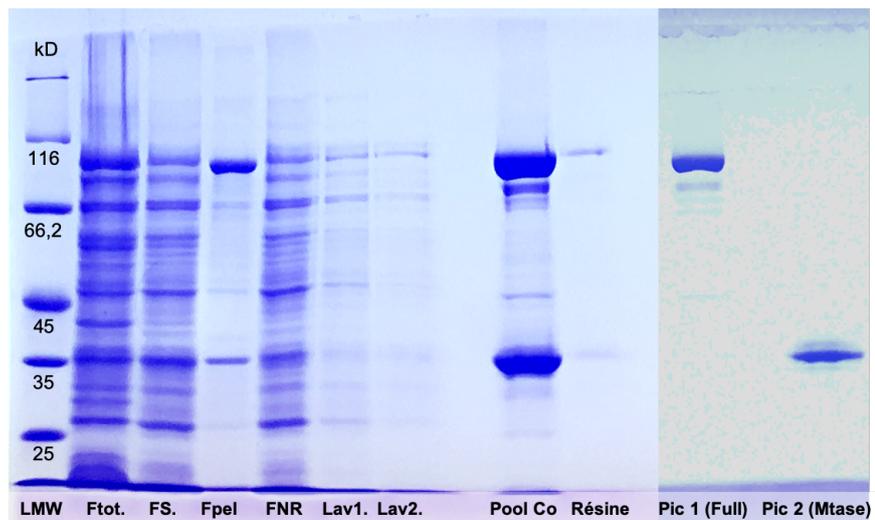


FIGURE 7.5 – Contrôle des différentes étapes de purification de la Full NS5 de ZIKV par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Quantité La mesure des DO_{280} au cours des différentes étapes de la purification a été réalisée dans le but de détecter d'éventuelles dégradations de la protéine ou une défaillance technique notamment lors des étapes de concentration. Elle a également permis de faire le bilan (Tableau 7.4) des quantités de protéines produites en fonction du volume de culture de bactérie (Rdt).

Tableau 7.4 – Bilan de la production et de la purification

	Purification				Production	
	Vf. (μ L)	DO	Prot. (mg)	Cf. (μ M)	Vol. Cult. (L)	Rdt (mg/L)
ZIKV	460	19,6	4,3	90,1	5	0,86
DENV-2	300	18,4	2,6	82,2	5	0,52

Fonction Le contrôle de l'activité des enzymes produites est une étape essentielle pour garantir la fiabilité du test d'inhibition. Pour cela, un mélange contenant l'enzyme, l'ATP et la matrice Poly(U) dans le tampon contenant des ions K^+ , Mg^{2+} et Mn^{2+} est incubé à $30^\circ C$ (FIGURE 7.4). Des prélèvements à différents intervalles de temps permettent de suivre la cinétique de la réaction enzymatique. Ces prélèvements sont immédiatement déposés dans une plaque dont les puits contiennent de l'EDTA qui arrête la réaction. Le PicoGreen[®] est ajouté et la plaque incubée dans l'obscurité. Enfin, la plaque est lue sur un fluorimètre et les résultats sont analysés en utilisant le logiciel Graphpad Prism. Les activités des deux polymérase produites (ZIKV et DENV-2) ont été comparées à :

- une enzyme dont la forte processivité (capacité à produire le brin d'ARN complémentaire) est connue (DENV-2 pol)

— une enzyme ne possédant pas d'activité ARN-polymérase (ZIKV MTase)

Les résultats (FIGURE 7.6) montrent que les NS5 produites possèdent une activité conforme et qu'elles peuvent être utilisées dans le cadre des tests d'inhibition (criblage et IC_{50}).

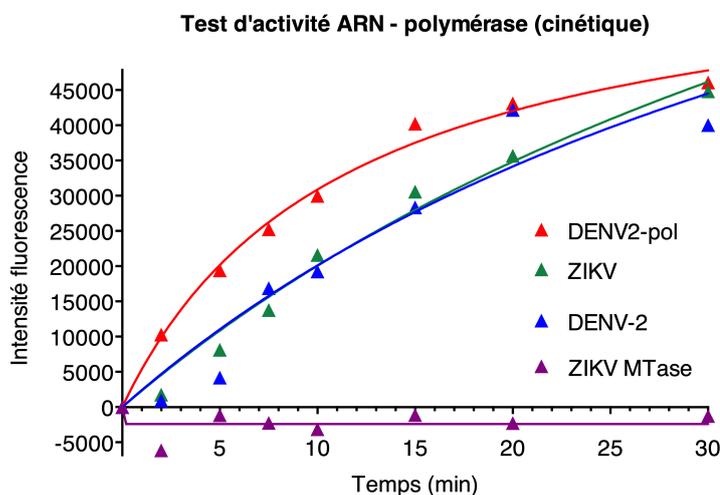


FIGURE 7.6 – Résultat des tests d'activité ARN-polymérase

7.3 Criblage des extraits d'Euphorbiaceae

7.3.1 Description des extraits

Une collection de 339 extraits AcOEt d'Euphorbiaceae tropicales ont été filtrés sur polyamide pour réduire la quantité de composés trop polaires susceptibles d'induire des faux-positifs lors du criblage biologique. Cet ensemble d'extraits a été préparé à partir de 134 espèces de plantes réparties en 34 genres dont les plus représentés sont *Phyllanthus*, *Bocquillonia*, *Autrobusus* et *Baloghia*. Plus de 90% d'entre elles sont endémiques. Les extraits proviennent de feuilles (46%), d'écorces et/ou de tiges (45%), de plantes entières (4%) ou encore de fruits (5%). Les plantes utilisées proviennent majoritairement de Nouvelle-Calédonie (86%) mais également du Vietnam (9%), de Malaisie (3%), Guyane (2%) et d'Ouganda (0.3%) (FIGURE 7.7).

7.3.2 Analyse des résultats

Les pourcentages d'inhibition des NS5 ont été répartis en 5 groupes 0 à 40, 40 à 50, 50 à 60, 60 à 80 et > 80% pour DENV et 0 à 60, 60 à 70, 70 à 80, 80 à 90 et > 90% pour ZIKV. La valeur des seuils d'activité a été fixée à la moyenne plus un écart-type soit 54% pour DENV et 76% pour ZIKV. Ainsi 52 et 48 extraits ont démontré une activité inhibitrice de la NS5 de DENV et de ZIKV, respectivement. Les résultats ont été examinés en utilisant une régression résiduelle afin de réduire l'impact des genres botaniques faiblement représentés et de corrélérer la proportion

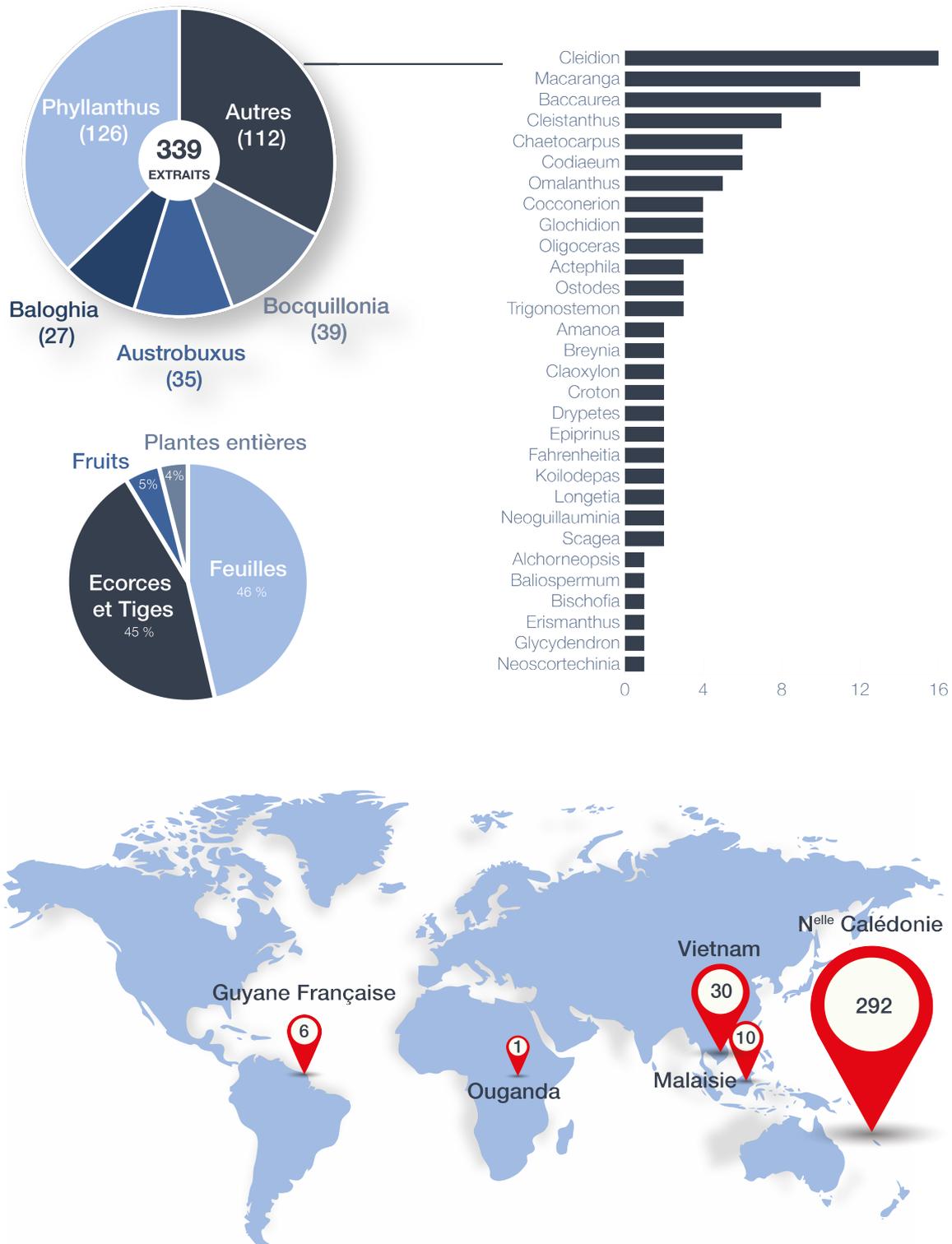


FIGURE 7.7 – Description de la banque d'extraits d'Euphorbiaceae : nombre d'extraits par genre (en haut), pourcentage des parties de plantes, nombre d'extraits par pays de récolte (en bas)

d'extraits actifs à la population de chaque genre.²⁸⁹ La proportion relative d'extraits actifs sur DENV et sur ZIKV est respectivement de 11,6% et de 13,1%. Pour chaque famille la valeur du résidu a été calculée en mesurant l'écart de la moyenne à partir de l'analyse de régression. Cette analyse a montré que les genres *Bocquillonia*, *Codiaeum* et *Trigonostemon* sont retrouvés parmi les quatre plus hautes valeurs de résidus pour les deux virus. Une seconde analyse a été réalisée en prenant en compte les parties de plantes. Elle montre que, concernant ZIKV, les extraits de feuilles ont la valeur de résidus la plus haute tandis que pour DENV ce sont les extraits d'écorces et tiges. Ces résultats n'ont pas permis de conclure concernant les parties de plantes à privilégier, mais ont suggéré que les extraits de plantes des genres *Bocquillonia*, *Codiaeum* et *Trigonostemon* avaient les meilleures chances de contenir des inhibiteurs doubles des NS5 de ZIKV et de DENV.

289. PEYRAT, L. A. *et al.* *Fitoterapia* **112**, 9-15 (2016).

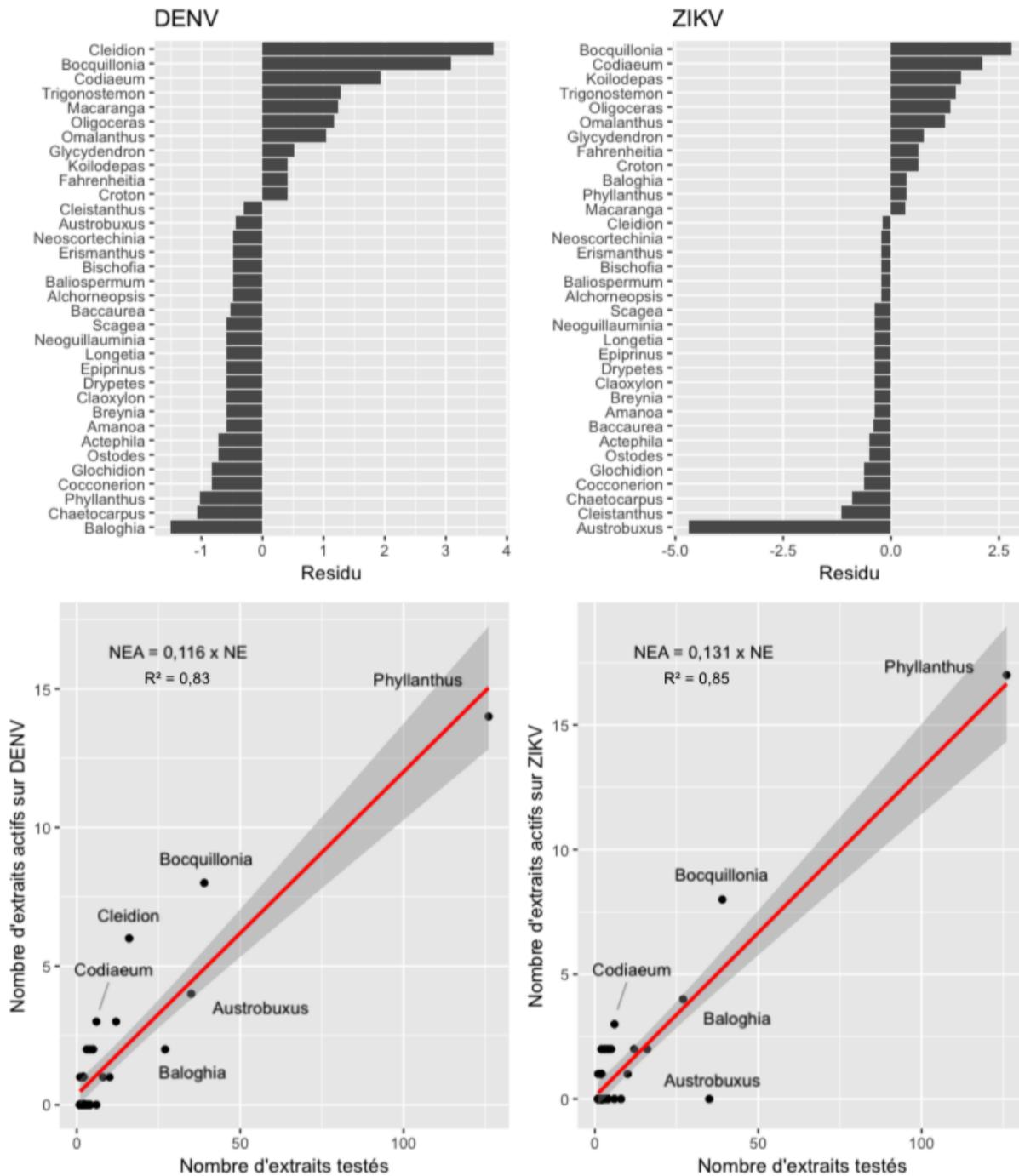


FIGURE 7.8 – Régression résiduelle montrant la proportion relative des extraits actifs par genre botanique.

Chapitre 8

Inhibiteurs de DENV-2 et ZIKV : 2. Isolements ciblés de composés d'intérêt

Sommaire

8.1	Création d'un réseau moléculaire multi-informatif	119
8.1.1	Cartographie des résultats du criblage	120
8.1.2	Cartographie de la taxonomie	120
8.1.3	Interprétation	120
8.2	Composés d'intérêt de <i>Codiaeum peltatum</i>	121
8.2.1	Description de la plante	121
8.2.2	Isolement ciblé	121
8.2.3	Caractérisation structurale	121
8.2.4	Activités biologiques	124
8.3	Composés d'intérêt de <i>Koilodepas longifolium</i>	126
8.3.1	Description de la plante	126
8.3.2	Isolement ciblé et caractérisation	126
8.4	Discussion	128
8.5	Conclusion	130

8.1 Création d'un réseau moléculaire multi-informatif

Récemment, une stratégie visant à prioriser l'isolement des produits naturels en associant les réseaux spectraux et les activités biologiques a été développée dans l'équipe.^{179, 290} Le concept de cette approche est basée sur la cartographie de différentes variables au sein d'un réseau moléculaire pour mettre en évidence des squelettes chimiques bioactifs. En supposant que des différences spectrales dans un ensemble taxonomiquement homogène d'échantillons suggère de l'originalité

290. OLIVON, F. *et al. Org. Chem. Front.* **5**, 2171-2178 (2018).

structurale, la construction de ce réseau multi-informatif permet d'associer les données structurales aux données taxonomiques et aux résultats de bioactivité. Dans cette étude, les données provenant de l'analyse LC-MS/MS des extraits de 339 euphorbiacées ont été pré-traitées via MZMine 2 puis soumises à la plateforme GNPS afin de construire le MN global.

8.1.1 Cartographie des résultats du criblage

Dans cette première étape, il s'agit d'explorer le réseau et de comparer la composition chimique des extraits actifs par rapport aux extraits inactifs. Une couleur a été attribuée à chaque niveau d'inhibition de la de l'activité ARN-polymérase (voir 7.3.2) et ces couleurs ont été appliquées à tous les nœuds du MN de manière à visualiser l'intensité relative de chaque ion dans les extraits d'un niveau d'activité donné. Différentes familles moléculaires ont alors pu être observées. Certaines sont d'une couleur unique et correspondent à des familles de métabolites présentes dans des extraits appartenant à un niveau d'activité unique. D'autres présentent des couleurs variées et correspondent donc à des familles de métabolites que l'on retrouve dans des extraits appartenant à différents niveaux d'activité. La cartographie des niveaux d'inhibition des NS5 du ZIKV et du DENV a permis de mettre en évidence des familles moléculaires d'ions retrouvés spécifiquement dans les extraits inhibant les deux virus, laissant supposer un squelette chimique commun à des inhibiteurs doubles (FIGURE 8.1 B et C).

8.1.2 Cartographie de la taxonomie

Dans un second temps, les extraits ont été regroupés soit par genre ou par espèce, soit en fonction de leurs parties végétales. Chaque groupe s'est vu attribuer une couleur spécifique. Et de la même manière que pour la cartographie de la bioactivité, les intensités relatives de chaque ion provenant des différents groupes d'extraits ont pu être visualisées sur le MN. Cette représentation supplémentaire a permis de vérifier si la présence d'ion spécifiques était limitée à certain genres, espèces, ou parties de plantes.

8.1.3 Interprétation

Lorsque des familles moléculaires sont partagées par des extraits aux activités biologiques élevées, il est supposé que leur co-occurrence en font des candidats bioactifs potentiels. Ainsi, plus le nombre d'extraits actifs contenant une famille moléculaire donnée est élevé, plus la probabilité que ces composés soient actifs est grande ; cependant, leur originalité structurale n'est pas garantie. D'un autre côté, si une famille moléculaire est exclusive d'un extrait bioactif unique, on peut supposer que ces composés sont peut-être responsables de la bioactivité observée puisqu'ils peuvent être différenciés des composés ubiquitaires présents dans l'extrait. Par conséquent, si le but est d'isoler des composés originaux et bioactifs, le deuxième cas doit être considéré.

8.2 Composés d'intérêt de *Codiaeum peltatum*

8.2.1 Description de la plante

Le genre *Codiaeum* compte 17 espèces et fait partie des Crotonoideae de la tribu des codiaeeae. *C. peltatum* (Labill.) P.S. Green est un arbrisseau de 2 à 12 mètres endémique de Nouvelle-Calédonie très similaire à *C. variegatum* cultivée comme plante d'intérieur (FIGURE 8.2). Il possède un latex clair et des rameaux glabres. Les feuilles possèdent un pétiole de 0,8 à 8 cm, renflé aux 2 extrémités, glabre ; les jeunes feuilles possèdent un limbe linéaire étroit (25 x 1 cm env.) avec une nervure marron foncé et sont panachées de jaune et blanc, les feuilles adultes sont plus larges aux extrémités (5 cm env.) et possèdent une nervure verte et une couleur moins soutenue que les jeunes feuilles. Les fleurs femelles sont très petites et sont organisées en longues inflorescences de 10 à 30 cm comportant jusqu'à 50 fleurs. Les fleurs mâles sont plus grandes (2 cm), comportent des pétales de petite taille et des étamines à filets (11 à 20) de 2 à 4 mm.²⁹¹

8.2.2 Isolement ciblé

L'approche précédemment décrite a permis de mettre en évidence la composition chimique originale de l'extrait d'écorces de *C. peltatum*, une espèce endémique de Nouvelle-Calédonie. En effet, une famille moléculaire (FIGURE 8.1 D) retrouvés uniquement dans les extraits du genre *Codiaeum* (i.e. *C. oligogynum* et *C. peltatum*) inhibant les ARN-polymérase de DENV et le ZIKV (FIGURE 8.1 B et C) ont été identifiés. Les composés possédant des ions protonés de m/z 581,1824 (**89**), 595,237 (**90**), 581,219 (**91** et **92**), 609,255 (**93** et **94**) ont été isolés à partir de l'extrait des tiges et écorces de *C. peltatum*.

8.2.3 Caractérisation structurale

L'analyse des données de RMN 1D des composés **91** - **94** et leur comparaison à celles de la littérature a permis de déterminer leur structure comme étant celle de l'actéphilol A (**91**), l'épi-actéphilol A (**92**), le fimbriicalyx C (**93**) et le fimbriicalyx D (**94**) connus, qui partagent un squelette de type phénanthrène dimérique possédant un pont dioxane.

Le composé **89** a été isolé sous la forme d'une résine rouge brunâtre. L'analyse des données HRESIMS (+) a permis de lui attribuer la formule brute $C_{34}H_{28}O_9$ (m/z 581,1796 $[M+H]^+$, calculé pour $C_{34}H_{29}O_9$, 581,1806). Les données de RMN de **89** étaient semblables à celles de l'actéphilol A (**91**), mais ont révélé la présence d'un seul groupe méthoxy et de deux autres groupes carbonyles à δ_C 178,6 et 182,4. La structure du composé **89** peut être divisée en deux monomères, A et B (FIGURE 8.3). Alors que les déplacements chimiques des RMN 1H et ^{13}C de la sous-unité A étaient proches de ceux du composé **91**, ceux de la sous-unité B présentaient des différences marquées. Le motif ortho-quinone a été déduit par l'observation des principales corrélations HMBC de H-8' (δ_H 7.71, s) à C-6' et au carbonyle à δ_C 178.6 d'une part et de

²⁹¹. MC PHERSON, G. & TIREL, C. *Flore de la Nouvelle-Calédonie et dépendances Vol. 14 Euphorbiaceae 1* (éd. MORAT, P. & MACKEE, H.) (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, 1987).

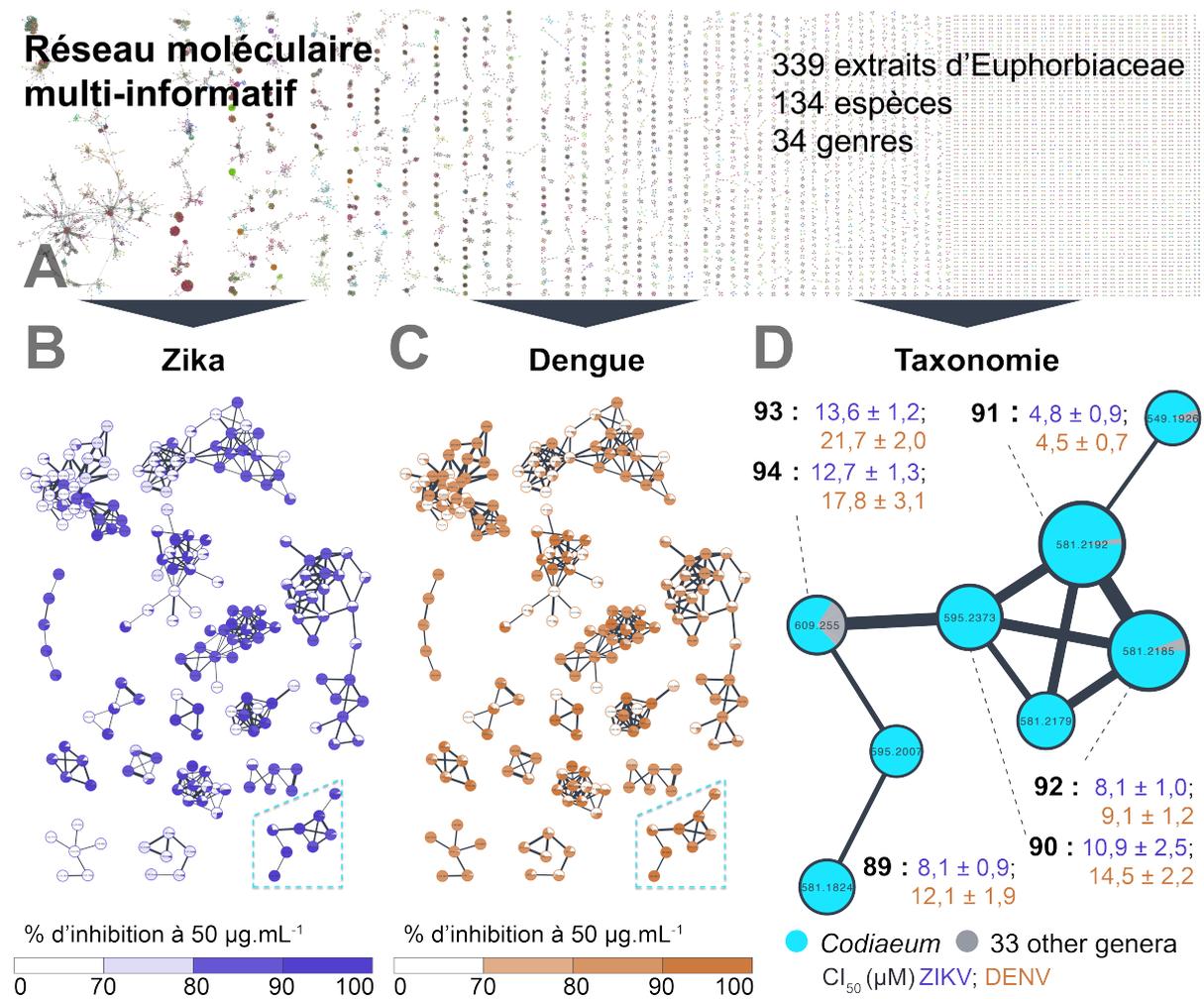


FIGURE 8.1 – A. Réseaux moléculaire multi-informatif global; B et C. Cartographie des Pourcentages d'inhibition de la NS5 polymérase de ZIKV (A) et de DENV-2 (B), sous-réseaux de familles moléculaires présentes dans des extraits inhibant les deux polymérases. D. Cartographie de la taxonomie, famille moléculaire retrouvée uniquement chez *Codiaeum*

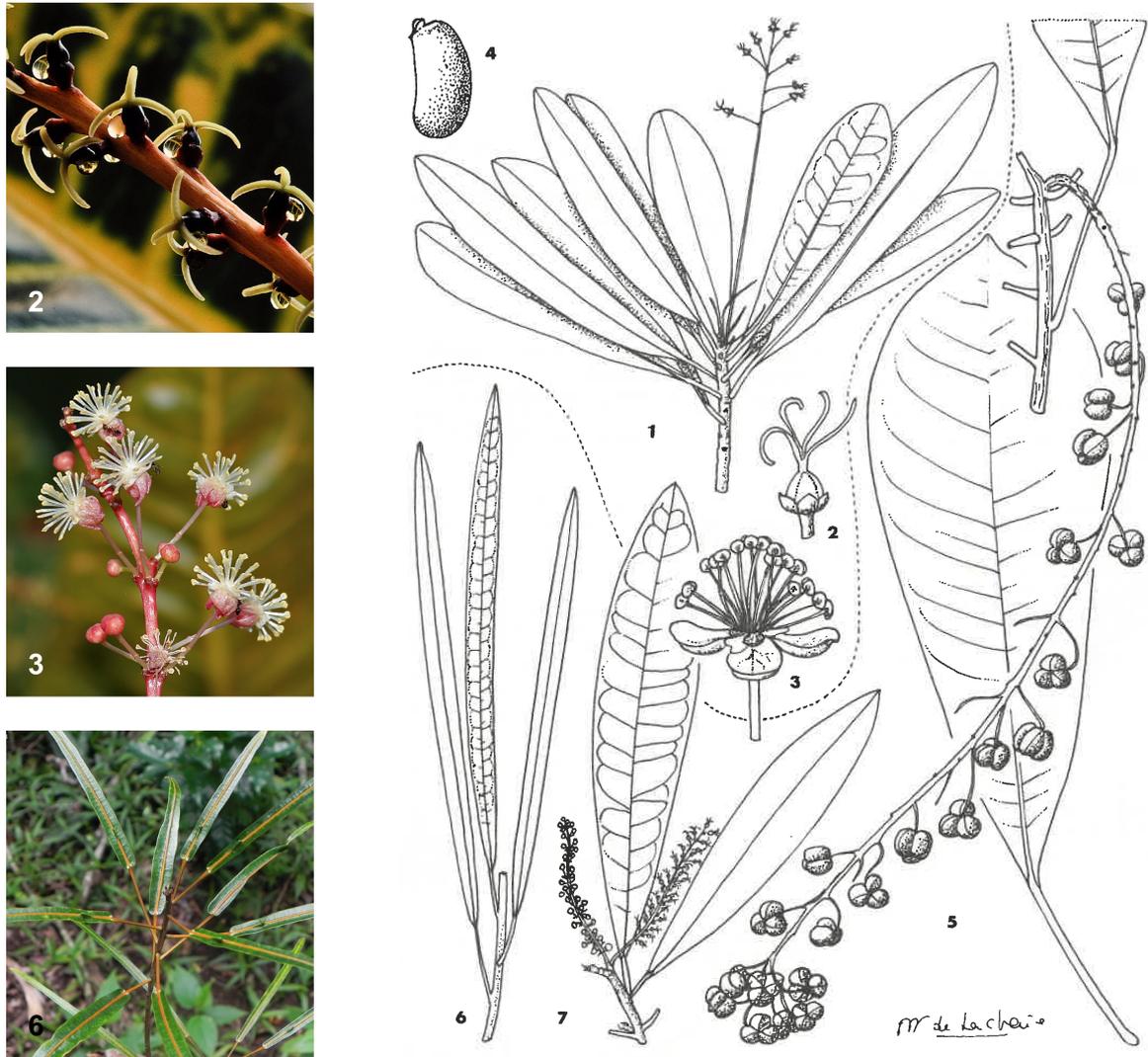


FIGURE 8.2 – Schéma²⁹¹ et photo de *Codiaeum* spp. 1. extrémité florifère mâle 2. fleur femelle 3. fleur mâle 4. graine 5. infructescence 6. feuilles jeunes 7. extrémité d'un rameau portant une inflorescence mâle et une inflorescence femelle

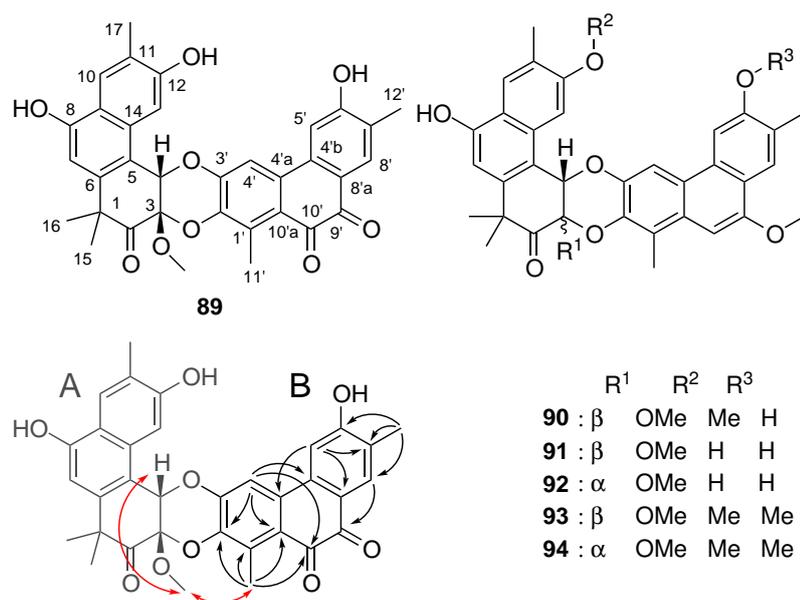


FIGURE 8.3 – Structure des composés **89** - **94** et corrélations HMBC (flèches noires) et NOESY (flèches rouges) clés du composé **89**

H₃-11' (δ_H 2.65, s) à C-1', C-2', C-10a' et un carbonyle à δ_C 182.4, qui établit la fonction 9', 10'-dione. D'autres corrélations HMBC ont confirmées la structure de la sous-unité B proposée en (FIGURE 8.3). La configuration relative du composé **89** a été établie à partir de la comparaison des données de RMN avec celles du composé **91** et de l'analyse de son spectre ROESY (FIGURE 8.3). La configuration *cis* de la jonction trans-annulaire C-3-C-4 a été confirmée par une forte corrélation ROESY entre 3-OMe (δ_H 3.42, s) et H-4 (δ_H 5.71, s). L'actéphilol B (**89**) est le septième membre décrit de la famille des dimères de phénanthrène à pont 1,4-dioxane.²⁹²

Le composé **90** a été isolé sous la forme d'une résine brun-rouge, et ses données HRESIMS ont montré un ion protoné à m/z 595,2316 correspondant à la formule brute C₃₆H₃₅O₈ (calculé pour 595,2326). Les données spectroscopiques du composé **90** étaient proches de celles de l'actéphilol A (**91**) et de l'épi-acéphilol A (**92**). Cependant, une forte corrélation HMBC entre trois protons à δ_H 3,84, et le carbone C-12 (δ_C 159,9) a indiqué la présence d'un méthoxyle supplémentaire en position 12. La configuration relative de l'actéphilol C (**90**) a été déduite à partir des fortes corrélations ROESY entre le 3-OMe (δ_H 3.49, s) et H-4 (δ_H 5.80, s).

8.2.4 Activités biologiques

Les composés **89** à **94** ont démontré une forte activité inhibitrice, bien que \approx 100 fois moins puissante que le composé de référence, le 3'-dATP, sur les deux enzymes avec des valeurs de CI₅₀ (Concentration inhibitrice médiane) de l'ordre du μ M. Pour confirmer ces résultats, deux séries d'expériences ont été menées. Premièrement, les valeurs CI₅₀ des composés **89-94** ont été

292. OVENDEN, S. P. *et al. Tetrahedron Lett.* **42**, 7695-7697 (2001).

Tableau 8.1 – Données RMN ^1H et ^{13}C des composés **89** et **90** (600 MHz et 150 MHz, MeOD)

A		89		90		B		89		90	
no.	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	no.	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H		
1	47,2		48,8		1'	132,1		120,3			
2	204,2		207		2'	140,6		141,6			
3	96,7		98,5		3'	146,3		141,4			
3-OMe	52,1	3,42 s	53	3,49 s	4'	110,1	7,23 s	108,2	7,74 s		
4	72,5	5,71 s	74,5	5,80 s	4'a	121,7		120,7			
5	112,1		116,2		4'b	135,9		132,6			
6	142,8		144,6		5'	109,7	7,20 s	107,2	7,64 s		
7	103,3	6,74 s	105,8	6,79 s	6'	164,1		156,8			
8	155,2		156,3		7'	126,3		126,5			
9	118,1		120,5		8'	132,1	7,71 s	125,7	7,93 s		
10	123,8	7,93 s	125,5	8,01 s	8'a	131,2		122,2			
11	126		128,2		9'	178,6		154,3			
12	156,4		159,9		9'-OMe			56,2	4,02 s		
12-OMe			56,5	3,84 s	10'	182,4		96,8	6,83 s		
13	104	7,38 s	101,4	7,35 s	10'a	124,8		129,5			
14	133,6		135,4		11'	13,4	2,65 s	11,8	2,61 s		
15	28,7	1,35 s	30	1,46 s	12'	15,5	2,13 s	16,9	2,34 s		
16	27,9	1,58 s	28,9	1,65 s							
17	16,7	2,32 s	17,1	2,34 s							

déterminées en présence d'un détergent (Triton X-100), à une concentration finale de 0,01%. L'utilisation d'un détergent dans le dosage sous la concentration micellaire critique indique si un composé génère des agrégats pouvant interférer avec le dosage de l'activité biologique (voir 8.4). Dans ces conditions, les composés **90** à **94** ont perdu leur potentiel inhibiteur ($\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{M}$) des deux protéines NS5, tandis que le composé **89** a présenté des valeurs de CI_{50} de $36,0 \pm 4,7$ et $67,2 \pm 20,0 \mu\text{M}$ sur ZIKV-NS5 et DENV-NS5, respectivement. Dans un second temps, les valeurs des constantes de dissociation apparentes (Kd_{app}) de ces composés sur ZIKV-NS5 et DENV-NS5 ont été déterminées en utilisant un test orthogonal basé sur la polarisation de fluorescence. Cet essai montre si un composé peut avoir une interaction spécifique avec l'enzyme en mesurant son potentiel à modifier l'interaction entre la bodipy-GTP (bore-dipyrrrométhène) et la protéine. Les composés **90-94** n'ont montré aucune fixation sur l'enzyme ($\text{Kd}_{\text{app}} > 100 \mu\text{M}$). Ces résultats, corrélés à la perte d'inhibition dans les tests en présence de détergent, ont confirmé que ces composés agissent comme agrégants et non comme inhibiteurs spécifiques. Toutefois, le composé **89** a montré un Kd_{app} de $32,1 \pm 4,5$ et $9,3 \pm 3,6 \mu\text{M}$ sur ZIKV-NS5 et DENV-NS5, respectivement. En accord avec les analyses en présence de détergents ces résultats ont indiqué une interaction spécifique de **89** avec les NS5 des deux virus menant à leur inhibition. L'actephilol B (**89**) est le premier inhibiteur double naturel du ZIKV et du DENV NS5 décrit à ce jour.

8.3 Composés d'intérêt de *Koilodepas longifolium*

8.3.1 Description de la plante

Le genre *Koilodepas* compte 12 espèces et fait partie des Acalyphoideae de la tribu des Epiprineae. Il est exclusivement retrouvé en Asie, plus particulièrement en Inde, en Chine, en Malaisie et au Vietnam. *K. longifolium* Hook.F. est un petit arbre jusqu'à 12 m de haut, aux branches fleuries de 1,5 à 2,3 mm de diamètre dont l'écorce extérieure est blanche à brun clair, lisse et dont le bois est jaune (FIGURE 8.4). Les feuilles dont le limbe est elliptique, possèdent un pétiole de 3-20 mm de long, rond ; la face supérieure vert moyen à vert très foncé, brillant ; face inférieure vert clair. Inflorescences jusqu'à 12 cm de long, jaune foncé, poils brun foncé, ramifiés, fleurs constituées de coupes de calice, Fleurs de couleur vert pâle avec une teinte argentée à crème à jaune. Fleurs staminées de 0,8-1,3 mm de diamètre ; bractées largement ovoïdes, parfois fendues, calice à 3 ou 4 lobes, lobes entiers ou bilobés, 3 ou 4 sépales, 0.9-1,2 mm de hauteur, dents triangulaires, toutes aiguës ; étamines en filaments de 0,5-0,6 mm de longueur. Fleurs pistillées de 1,7-3 mm de diamètre ; bractées triangulaires, parfois glandulaires ; calice à mi-ovaire, lobes (6-12) triangulaires, nectaires extrafloraux sur l'extérieur du tube ; ovaire (2)3-loculaire, profondément bilobé ; stigmates individuellement visibles. Les fruits sont des capsules lobés (12-14), jaune foncé à brunâtre.

8.3.2 Isolement ciblé et caractérisation

Malgré une activité élevée de son extrait de fruit (90.3 % et 74.5 % d'inhibition de la NS5 de ZIKV et DENV-2, respectivement, à 50 µg/mL), aucune famille moléculaire spécifique de *Koilodepas longifolium* n'a été détectée au sein du réseau moléculaire (MN) global. Afin de tenter d'expliquer son activité, un MN a été constitué à partir de l'extrait de fruit de *Koilodepas longifolium*. L'extrait était majoritairement constitué de deux composés (FIGURE 8.5, B). Au sein du MN, ces deux composés majoritaires ont été identifiés au sein d'une famille moléculaire spécifique et annotés *via* le protocole NAP d'annotation *in silico* comme étant des flavonoïdes glycosylés (B). Par ailleurs, l'analyse des données de spectrométrie de masse en tandem par MS2LDA a permis de mettre en évidence un motif structural (acide hydroxy-cinnamique) partagé par tous les nœuds de cette famille moléculaire. Les deux composés (**95** et **96**) ont été isolés sélectivement et l'analyse de leurs spectres de RMN 1D et 2D a permis de confirmer l'annotation des composés comme étant la naringénine 7-*O*-(3,6-di-*p*-coumaroyl)glucoside (**95**) précédemment décrit et son isomère (**96**). Les faibles quantités isolées n'ont cependant pas permis d'attribuer formellement le point d'isomérisation entre les deux composés.

L'activité des deux composés a été évaluée sur les protéines NS5 des deux virus ; les **95** et **96** ont montré des activités inhibitrices de l'ordre du micromolaire (Tableau 8.2). Cependant en présence de détergent les CI₅₀ de **95** et **96** sont supérieures, laissant supposer un pouvoir agrégant fort de ces composés.

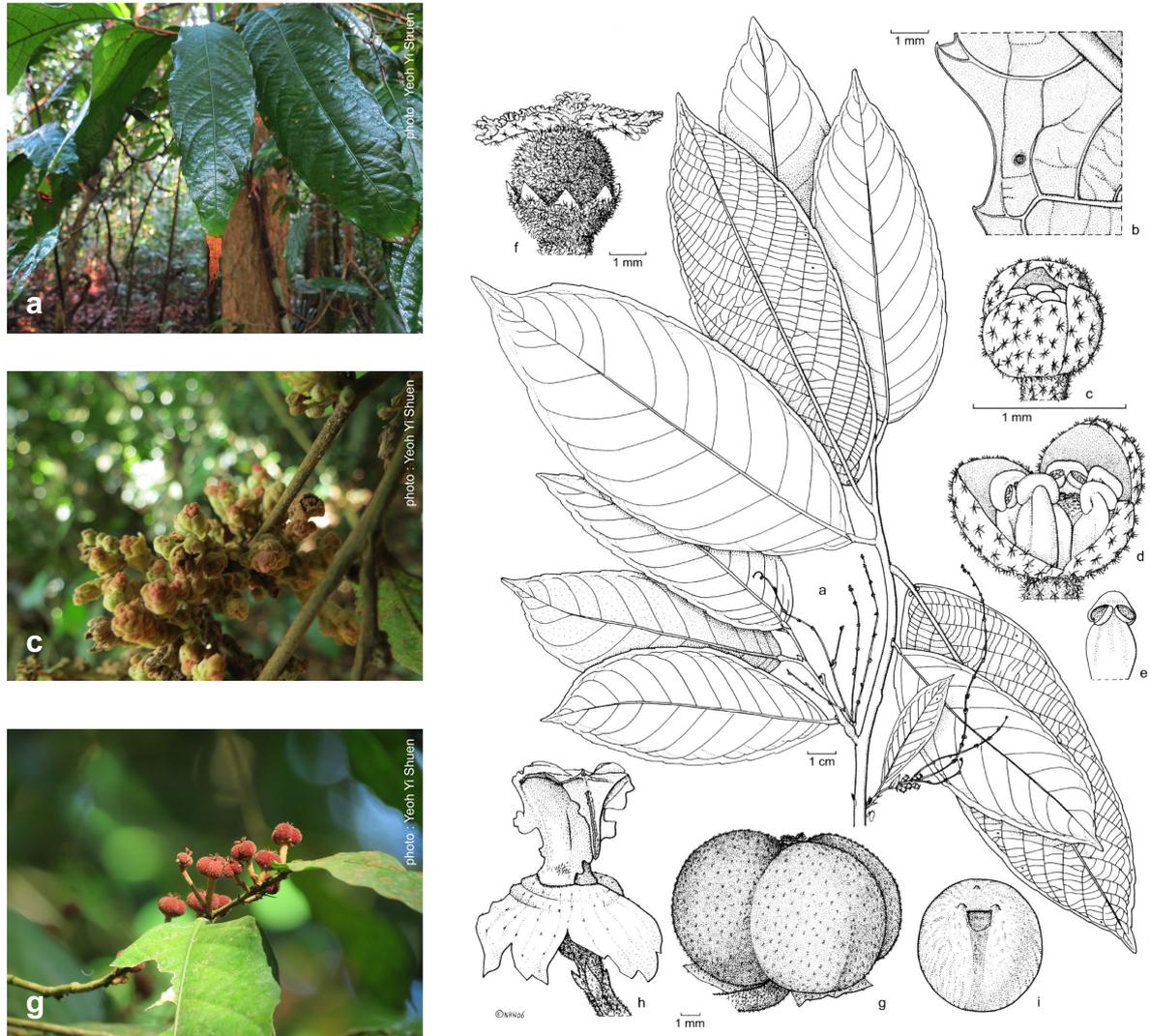


FIGURE 8.4 – Schéma²⁹¹ et photo de *Koilodepas longifolium* a. extrémité florifère b. bord du limbe montrant un nectaire extrafloral c. fleur mâle (bourgeon staminé) d. bourgeon staminé, avec un sépal en moins montrant les étamines e. une étamine f. fleur femelle (pistillée) g. Fruit h. columelle après déhiscence i. graine

Tableau 8.2 – Activité Anti-DENV et Anti-ZIKV des composés **95** et **96** (μM)

Composé	CI ₅₀ ZIKV sans détergent	CI ₅₀ ZIKV avec détergent	CI ₅₀ DENV-2 sans détergent	CI ₅₀ DENV-2 avec détergent
95	16,4 ± 1,5	40,6 ± 3,4	23,0 ± 2,0	42,5 ± 10,5
96	6,7 ± 0,7	31,7 ± 6,6	15,2 ± 1,2	94,2 ± 25,7

8.4 Discussion

Les composés isolés dans le cadre de cette étude semblent, pour la plupart, inhiber la NS5 par un phénomène d'agrégation. L'agrégation de ligands organiques pose des défis majeurs dans la découverte et le développement de médicaments.²⁹³ Les inhibiteurs sujets à l'agrégation sont une source notoire de faux positifs dans le dépistage des substances médicamenteuses en raison de leur propension à inhiber de manière non spécifique l'activité enzymatique par adsorption des agrégats sur les protéines.^{294, 295, 296, 297, 298, 299} Ces interactions^{295, 296} modulent l'activité enzymatique par de multiples mécanismes, notamment la dénaturation, la modification de la dynamique et/ou la séparation physique des enzymes de leur substrat respectif.³⁰⁰ Les agrégats peuvent également nuire directement au dosage de l'activité soit en liant des réactifs de dosage ou en interférant directement avec la détection instrumentale.^{301, 302}

Actuellement, la détection des inhibiteurs sujets à l'agrégation repose sur des stratégies directes et indirectes. Les premières sont basées sur des méthodes telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la microscopie électronique à transmission (TEM) pour observer directement les particules agrégées, tandis que les secondes se concentrent sur les caractéristiques classiques de l'inhibition par agrégation, telles que la promiscuité envers de multiples cibles, une puissance accrue malgré une durée d'incubation prolongée et une puissance réduite en présence de détergent non-ionique, tel que le Triton X-100 (TX).^{294, 296, 298, 300} Le TX est largement utilisé dans le criblage à haut débit, comme outils pour détecter et atténuer les interactions non spécifiques.^{294, 300, 303} Ces atténuateurs empêchent les composés de s'agréger ou interfèrent avec les interactions non spécifiques entre agrégats et protéines.³⁰⁴ Cependant, il est encore difficile de comprendre comment ces détergents non-ioniques agissent sur les agrégats pour diminuer les

293. BOULTON, S. *et al.* *J. Med. Chem.* **62**, 5063-5079 (2019).

294. FENG, B. Y. *et al.* *J. Med. Chem.* **50**, 2385-2390 (2007).

295. MCGOVERN, S. L. *et al.* *J. Med. Chem.* (2002).

296. MCGOVERN, S. L. *et al.* *J. Med. Chem.* **46**, 4265-4272 (2003).

297. OWEN, S. C. *et al.* *ACS Chem. Biol.* **7**, 1429-1435 (2012).

298. SEIDLER, J. *et al.* *J. Med. Chem.* **46**, 4477-4486 (2003).

299. RISHTON, G. M. *Drug Discov. Today* **8**, 86-96 (2003).

300. COAN, K. E. *et al.* *J. Med. Chem.* **52**, 2067-2075 (2009).

301. JADHAV, A. *et al.* *J. Med. Chem.* **53**, 37-51 (2010).

302. WALTERS, W. P. *et al.* *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 384-387 (1999).

303. ACKER, M. G. & AULD, D. S. *Perspect. Sci.* **1**, 56-73 (2014).

304. COAN, K. E. D. & SHOICHET, B. K. *Mol. Biosyst.* **3**, 208-213 (2007).

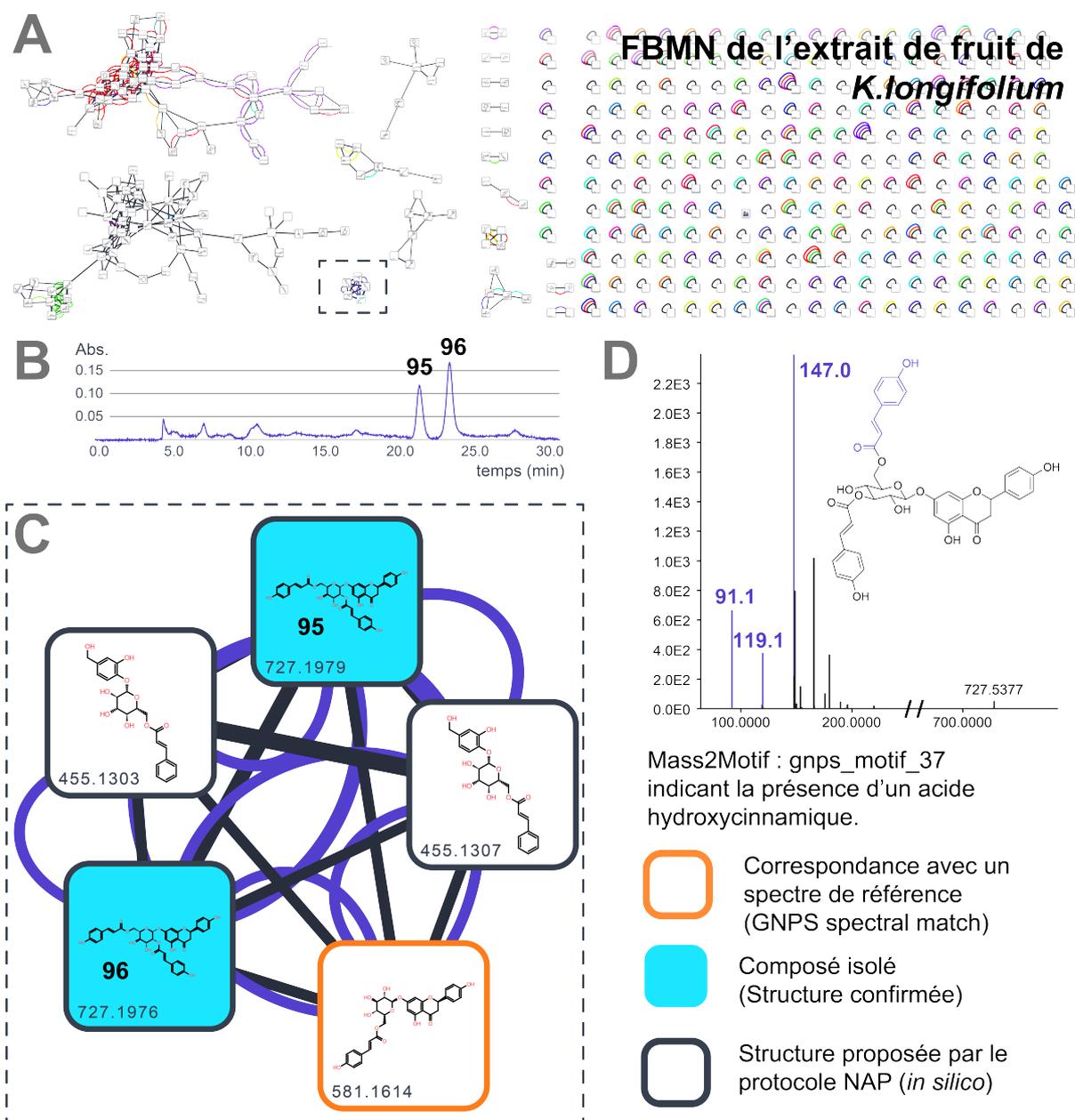


FIGURE 8.5 – A. Réseaux moléculaire de l'extrait de fruit de *Koiloceras longifolium* ; B. Chromatogramme UV de l'extrait montrant les deux pics majoritaires ; C. Famille moléculaire annotée. Les liens en violet indiquent un motif partagé par les spectres. D. Spectre MS/MS du composé 96 montrant les fragments (violet) composant le motif commun à la famille moléculaire (acide hydroxycinnamique).

interactions non spécifiques, et la manière avec laquelle les détergents affectent l'inhibiteur libre et ses interactions spécifiques. De tels effets constituent une préoccupation majeure pour le criblage, car ils pourraient concurrencer la liaison spécifique des médicaments aux cibles visées, ce qui entraînerait de faux négatifs. Ce bilan faux positif *vs* faux négatif doit être pris en compte lors de l'utilisation d'atténuateurs d'inhibition par agrégation et c'est la raison pour laquelle le criblage des extraits a été réalisé en l'absence de détergent.

8.5 Conclusion

Dans cette étude les NS5 de ZIKV et de la DENV-2 ont été produites, puis, les niveaux d'inhibition de l'activité ARN-polymérase des deux protéines par 339 extraits d'Euphorbiaceae ont été évalués en utilisant un test basé sur la fluorescence des ARN double brins. L'utilisation des réseaux moléculaires et leur annotation a permis d'isoler sélectivement des composés bioactifs à partir d'extraits d'Euphorbiaceae. Le réseaux moléculaires multi-informatifs combinant les informations de bioactivité et les données taxonomiques des 339 extraits de plantes ont mis en évidence la composition chimique originale de *C. peltatum* et ont notamment permis l'isolement MS-guidé et la caractérisation de l'actéphilol B (**89**). Ce membre de la famille rare des dimères de phénanthrène à pont 1,4-dioxane est le premier inhibiteur double naturel des ARN-polymérases de DENV-2 et du ZIKV. D'autre part, l'annotation du réseau moléculaire de l'extrait de fruits de *K. longifolium*, sélectionné pour son niveau d'inhibition élevée des deux protéines, a permis d'identifier la structure des deux composés majoritaires de l'extrait. Les deux composés ont été sélectivement isolés, leur structure confirmée par RMN et leur niveau d'activité ont montré qu'ils étaient très probablement responsables de l'activité de l'extrait. La combinaison des résultats du profilage biologique et chimique dans un réseau moléculaire et l'annotation de ce dernier grâce à des outils de comparaison de spectres expérimentaux ou simulés permet d'avoir une vue d'ensemble de l'espace chimique au sein de collections d'extraits taxonomiquement homogènes. Ces travaux montrent que l'étude de la distribution des familles moléculaires dans les extraits est susceptible d'augmenter significativement les chances de découvrir de nouveaux composés bioactifs.

Troisième partie

Matériels et méthodes

Chapitre 9

Biological assays

Sommaire

9.1 Zika and Dengue RNA-polymerase inhibition assessment	133
9.1.1 Products and Reagents	133
9.1.2 Expression and Purification of Zika and Dengue 2 NS5 Recombinant Proteins	133
9.1.3 Principle of the Assay	134
9.1.4 Screening Assay Determination Based on the Fluorescent Picogreen Assay	134
9.1.5 IC ₅₀ Determination Based on Fluorescent Picogreen Assay	135
9.1.6 Apparent Kd Determination of Compounds by a Fluorescence Po- larization Assay	135
9.2 Virus-Cell-Based Anti-Chikungunya Assay	136

9.1 Zika and Dengue RNA-polymerase inhibition assessment

9.1.1 Products and Reagents

Homopolymeric uridine (Poly U) RNA template was obtained from GE Healthcare. Natural extracts or pure compounds were resuspended at 10 or 1 mg/mL in 100% DMSO and stored at -20 °C. The Quant-it Picogreen dsDNA assay kit (ref P11496) was obtained from Molecular Probes-Invitrogen.

9.1.2 Expression and Purification of Zika and Dengue 2 NS5 Recombinant Proteins

The viral NS5 proteins of Zika and Dengue serotype 2 (DENV-2) virus coding sequences were cloned in fusion with a N-terminus hexahistidine tag in gateway plasmids (pQE30). The proteins

were expressed in *E. coli* cells and purified following a previously described protocol.³⁰⁵

9.1.3 Principle of the Assay

A picogreen kinetic assay was based on polymerase activity of NS5 protein, which catalyzes de novo reaction of a poly(U) template and adenosine triphosphate (ATP). The reaction was carried out at 30 °C with 50 mM Hepes pH 8, 10 mM DTT, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, and the selected concentrations in substrate (Poly U and ATP) and enzyme. Each reaction assay was robotized on a Biomek 4000 in 40 μL final volume for screening assay and IC50. Control plates, using only DMSO at 5% final concentration instead of compounds, were used to determine the Z' factor, the background, and the gain value of the assay. Quality of measurements was assessed by calculating the Z' factor for each plate : $Z' \text{ factor} = 1 - ([3SD(neg) + 3SD(pos)]/[av(neg) - av(pos)])$, 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. Assay plates contained positive and negative controls distributed in the first and the last columns, respectively. Positive and negative controls consisted of the reaction mixture supplemented by ATP and 5% DMSO or 20 mM EDTA, respectively. In the case of the screening assay, 3'dATP was also used as an internal control in the last column at 10 μM final concentration. Time incubation (from 10 to 30 min), substrate concentrations (poly U and ATP), and enzyme concentration were optimized, based on the previous experimental results to obtain the best reproducibility ($Z' > 0.6$; background <10%, gain value <120).

9.1.4 Screening Assay Determination Based on the Fluorescent Picogreen Assay

The assay was organized in 96-well Nunc plates, each containing 80 samples that are natural extracts or pure compounds. Each of 80 samples was added to the assay using a BioMek I5 workstation (Beckman) to a final concentration of 50, 10, or 1 μg/mL and/or 50, 10, and 1 μM in 5% DMSO. Reactions were conducted in 40 μL final volume. For each assay, 20 μL of the enzyme mix was first distributed in plate wells using a Biomek 4000 (Beckman), containing 2 μL of the samples. Reactions were initiated by addition of 18 μL of the nucleotide mix (100 and 80 μM ATP for Zika NS5 and DENV-2 NS5, respectively) and incubated at 30 °C for 20 and 30 min for Zika NS5 and DENV-2 NS5, respectively. Assays were stopped by the addition of 20 μL of EDTA (100 mM). Reaction mixes were transferred to a Greiner plate using a Biomek I5 Automate (Beckman). Picogreen fluorescent reagent was diluted to 1/800 in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, with no NaCl added) according to manufacturer's data, and 60 μL of reagent was distributed into each well of the Greiner plate. The plate was incubated for 5 min in the dark at room temperature, and the fluorescence signal was read at 480 nm (excitation) and 530 nm (emission) using a TecanSafire2. For each compound, the percentage of inhibition was

305. POTISOPON, S. *et al. Antiviral Res.* **140**, 25-36 (2017).

calculated as follows : $\text{Inhibition\%} = 100(\text{rawdataofcompound} - \text{av(pos)})/(\text{av(neg)} - \text{av(pos)})$. Compounds leading to a 70% inhibition or more at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and presenting a dose/response effect were qualified as hits. Selected hits were then confirmed in triplicate, and IC_{50} values determined only on pure compounds.

9.1.5 IC_{50} Determination Based on Fluorescent Picogreen Assay

The concentrations of the compounds leading to 50% inhibition of NS5-mediated RNA synthesis were determined in IC_{50} buffer (50 mM HEPES pH 8.0, 10 mM KCl, 2 mM MnCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM DTT) containing 100 or 40 nM homopolymeric uridine RNA template for Zika NS5 and DENV-2 NS5, respectively, seven various concentrations of compound, and 40 nM of enzyme. For the IC_{50} determination in the presence of detergent, Triton X100 was added at 0.01% final concentration in the assay. Five ranges of inhibitor were available (0.01 to 5 μM ; 0.1 to 50 μM ; 0.5 to 50 μM ; 1 to 100 μM ; 5 to 400 μM). According to the inhibitory potency of the compound tested, a range was selected to obtain a more accurate IC_{50} based on the best repartition of the points surrounding the range. Reactions were conducted in 40 μL volume on a 96-well Nunc plate. All experiments were robotized by using a BioMek 4000 Automate (Beckman). A 2 μL amount of each diluted compound in 100% DMSO was added to the wells to the chosen concentration (5% DMSO final concentration). For each assay, the enzyme mix was distributed in wells. Reactions were started by the addition of the nucleotide mix (100 and 80 μM ATP for Zika NS5 and DENV-2 NS5, respectively) and were incubated at 30 °C for 10 min. Reaction assays were stopped by the addition of 20 μL of EDTA (100 mM). Positive and negative controls consisted respectively of a reaction mix with 5% DMSO final concentration or EDTA (100 mM) instead of compounds. Reaction mixes were then transferred to a Greiner plate using a Biomek I5 Automate (Beckman). Picogreen fluorescent reagent was diluted to 1/800 in TE buffer according to the manufacturer's data, and 60 μL of reagent was distributed into each well of the Greiner plate. The plate was incubated for 5 min in the dark at room temperature, and the fluorescence signal was read at 480 nm (excitation) and 530 nm (emission) using a TecanSafire2. The IC_{50} value was determined using the following equation : % of active enzyme = $100/(1 + I^2/\text{IC}_{50}^2)$, where I is the concentration of inhibitor and 100% activity is the fluorescence intensity without inhibitor. IC_{50} was determined from curve-fitting using Prism software. For each value, results were obtained using triplicates in a single experiment.

9.1.6 Apparent Kd Determination of Compounds by a Fluorescence Polarization Assay

The concentration of compounds leading to a shifting of the fixation of GTP bodipy to the D2 or Zika NS5 protein was determined in the binding buffer (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.01% NP40, 1 mM DTT) containing 50 nM GTP bodipy, 300 nM D2 NS5, or 150 nM Zika NS5 and seven various concentrations of compound. Reactions were conducted in 50 μL volume on a black 96-half-well Greiner plate. Each diluted compound (2.5 μL) in 100% DMSO was added

in plate wells to the chosen concentration (5% DMSO final concentration). For each assay, 10 μL of a $5\times$ concentration of the enzyme was distributed in plate wells. Reactions were started by the addition of the GTP bodipy (10 μL of a $5\times$ concentration) and were incubated at room temperature for 15 min. Total fluorescence and fluorescence polarization were measured using a microplate reader (Pherastar) with a fluorescence polarization module (485 nm excitation and 520 emission wavelengths). Instrument settings were fixed as follows : 100 mP target mP, 200 flashes per well, 0.5 s settling time. Focus and gain values were adjusted prior to measurement. The positive control consisted of a reaction mix with 5% DMSO final concentration in place of the compound. GTP bodipy alone ($n = 8$) was used to determine the minimal fluorescence polarization intensity, and the average of this background value was subtracted from each value of the assay. The fluorescence polarization of the positive control is 100% fixation, and the residual fluorescence polarization signal (mP %) is determined for each concentration of the compound. The apparent K_d ($K_{d_{app}}$) of the compound was determined from curve-fitting using Prism software. For each value, results were obtained using triplicates in a single experiment.

9.2 Virus-Cell-Based Anti-Chikungunya Assay

The antiviral activity of the extracts and pure compounds against Chikungunya virus was determined using an MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]-based cytopathic effect reduction assay. Chikungunya virus (Indian Ocean strain 899), kindly provided by Prof. C. Drosten (Institute of Virology, University of Bonn, Germany), was grown on Vero (African green monkey kidney) cells. Antiviral assays were performed in DMEM medium [MEM Rega3 (cat. no. 19993013 ; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL of 200 mM L-glutamine, and 5 mL of 7.5% NaHCO_3]. Cells were seeded in a 96-well plate (Falcon, BD Biosciences) and allowed to adhere overnight. Serial dilutions of the test compounds were made in 100 μL of assay medium in a 96-well microtiter. Subsequently, 50 μL of a $4\times$ virus dilution in assay medium was added (MOI 0.01), followed by 50 μL of a cell suspension. This suspension, with a cell density of 25 000 cells/50 μL , was prepared from a Vero A cell line subcultured in cell growth medium (MEM Rega3, supplemented with 10% FCS, 5 mL of L-glutamine, and 5 mL of NaHCO_3) in a 1 : 4 ratio. The assay plates were returned to the incubator (37°C, 5% CO_2 , 95-99% relative humidity) for 5 days, a time at which maximal virus-induced cell death or CPE is observed in untreated, infected controls. Subsequently, the assay medium was aspirated, replaced with 75 μL of a 5% MTS (Promega) solution (MTS-phenazinemethosulfate (MTS/PMS) stock solution [(2 g/L MTS (Promega, Leiden, The Netherlands) and 46 mg/mL PMS (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) in PBS at pH 6-6.5)], diluted 1/20 in MEM (Life Technologies, Gent, Belgium) in phenol-red-free medium, and incubated for 1.5 h. Absorbance was measured at a wavelength of 498 nm (Safire2, Tecan), with the optical densities (OD values) reaching 0.6-0.8 for the untreated, uninfected controls. The optical density values were converted to control percentages, and logarithmic interpolation was used to calculate the EC_{50} and CC_{50} . The EC_{50} was defined

as the compound concentration that protected 50% of cells from virus-induced CPE. Adverse effects of the drug on the host cell were also assessed by means of the MTS method, by exposing uninfected cells to the same concentrations of the compounds. The CC_{50} was defined as the compound concentration that reduced the number of viable cells by 50%. All assay conditions producing an antiviral effect that exceeded 50% were checked microscopically for signs of a cytopathic effect or adverse effects on the host cell (*i.e.*, altered cell or monolayer morphology). A sample was considered to elicit a selective antiviral effect on virus replication only when, following microscopic quality control, at least at one concentration no CPE or any adverse effect was observed (image resembling untreated, uninfected cells). The antiviral experiments have been performed in a biosafety screening facility that has been validated for handling of Chikungunya virus as well as the manipulation of molecules of unknown chemical safety risk. All studies have been performed by trained staff.

Chapitre 10

Phytochemical studies

Sommaire

10.1 General Experimental Procedures	139
10.2 Plant Material	140
10.2.1 <i>S.guyanensis</i>	140
10.2.2 <i>C. peltatum</i>	140
10.2.3 <i>S. racemosa</i>	140
10.2.4 <i>K.longifolium</i>	140
10.3 Extraction and isolation	141
10.3.1 <i>S.guyanensis</i>	141
10.3.2 <i>C. peltatum</i>	142
10.3.3 <i>S. racemosa</i>	142
10.3.4 <i>K.longifolium</i>	142

10.1 General Experimental Procedures

Optical rotations were measured at 25 °C on an MCP 300 Anton Paar polarimeter at 24 °C, with MeOH used as solvent. UV spectra were recorded on a Varian Cary 100 UV-vis spectrophotometer and measured in a 1 cm quartz cell. NMR spectra were recorded in methanol-d₄, CDCl₃ or benzene-d₆ on Bruker 500 and 600 MHz instruments (Avance 500 and Avance 600). Chemical shifts (relative to TMS) are in ppm, and coupling constants are in Hz. Kromasil analytical and semi preparative C₁₈ columns (250 × 4.6 mm and 250 × 10 mm i.d; 5 μm Thermo Electron), Kinetex analytical and semipreparative C₁₈ columns (250 × 4.6 mm and 250 × 10 mm; 5 μm Phenomenex) and a Nucleodur PFP analytical column (250 × 4.6 mm i.d; 5 μm Macherey Nagel) were used for HPLC separations using a Waters autopurification system equipped with a binary pump (Waters 2525), a UV-vis diode array detector (190-600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. HPLC separations were also undertaken using a Waters Alliance system equipped with a binary pump (Waters 2525), a UV-vis diode

array detector (190-600 nm, Waters 2996), and an ELS detector (Waters 2424). Disconnected from ELSD, this system was also used in preparative mode to purify small amounts of products. Prepacked GraceResolv silica cartridges were used for flash chromatography using a Teledyne Isco Combiflash Rf 200i. All solvents were purchased from Carlo Erba (France), and analytical plates (Si gel 60 F254) were from Merck (France). Methanol (HPLC grade) was purchased from J. T. Baker and 2-propanol (HPLC grade) from Fisher Scientific (Illkirch, France). Formic acid (purity 98%) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland)

10.2 Plant Material

10.2.1 *S.guyanensis*

Bark of *Sandwithia guyanensis* was collected by V. Eparvier in June 2010 in Saint Elie (French Guyana) and authenticated by Dr. Marie-Françoise Prévost (IRD of French Guyana). A voucher specimen (CAY-3589) has been deposited at IRD Herbarium of French Guyana. For the study about seasonal variation of the composition, leaves and bark of 3 trees at each period (september 2017, november 2017, april 2018, october 2018) were collected by P. Siland, S. Remy, F. Olivon and M. Litaudon, and authenticated by P. Siland.

10.2.2 *C. peltatum*

Stem and bark of *Codiaeum peltatum* were collected at "Mont Aoupinié" (New Caledonia) at an altitude of 487 m in November 2001 and authenticated by V. Dumontet. A voucher specimen (DUM-0109) has been deposited at the Herbarium IRD de Nouméa, New Caledonia

10.2.3 *S. racemosa*

Barks of *Sagotia racemosa* were collected and authenticated by P. Siland in October 2017 in Saint Elie (French Guyana). A voucher specimen (SIL-450) has been deposited at IRD Herbarium of French Guyana. This study has been authorized by the Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire through an Access and Benefit Sharing (ABS) declaration (NOR : TRELI734890A/5).

10.2.4 *K.longifolium*

The fruit of *K.longifolium* were collected at Tuyen Hoa, Quang Binh Province, Vietnam, and authenticated by N. T. Cuong and D. D. Cuong. A voucher specimen (VN-2221) has been deposited at the Herbarium of the Institute of Ecology and Biological Resources of the Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam.

10.3 Extraction and isolation

10.3.1 *S.guyanensis*

The dried bark (704.2 g) of *S.guyanensis* were extracted with EtOAc (3×500 mL) to give a crude extract (2.2 g) after concentration in vacuo at 40 °C. This extract was dissolved in MeCN (250 mL) and subjected to a liquid/liquid partition using n-heptane (3×250 mL) to afford 1.1 g of an MeCN soluble fraction. This residue was subjected to silica gel column chromatography using a gradient of n-heptane/EtOAc/MeOH of increasing polarity (1 :0 :0 to 0 :1 :0 to 0 :7 :3, 40 mL/min) to afford 19 fractions, F1 to F19, according to their TLC profiles. Purification of fraction F3 (55.2 mg) by semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O + 0.1% formic acid, 52 :48, in 30 min, 4.7 mL/min) afforded five fractions (F3-1 to F3-6). F3-2 was subjected to analytical HPLC (Nucleodur PFP, MeCN :H₂O (45 :55) + 0.1% formic acid at 1 mL/min), leading to **71** (1.5 mg) and **69** (1.8 mg) (tR = 9.01 and 12.07 min respectively). F3-3 was subjected to analytical HPLC (Nucleodur PFP, MeCN :H₂O (45 :55) + 0.1% formic acid at 1 mL/min), to afford **85** (3.2 mg) (tR = 12.94 min). F3-5 was subjected to analytical HPLC (Nucleodur PFP, MeCN :H₂O (70 :30) + 0.1% formic acid at 1 mL/min), leading to **78** (0.5 mg) (tR = 6.39 min). F4 (36.1 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O + 0.1% formic acid, 52 :48, in 30 min, 4.7 mL/min) to afford **67** (1.5 mg) (tR = 9.46 min) and **84** (1.7 mg) (tR = 11.52 min). F5 (54.2 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O + 0.1% formic acid, 40 :60, in 30 min, 4.7 mL/min) to afford **68** (23.7 mg) (tR = 11.51 min). F6 (36.1 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O+0.1% formic acid, 52 :48, in 30 min, 4.7 mL/min) to afford compounds **81** (9.6 mg), **82** (15.0 mg), and **80** (1.8 mg) (9.53, 12.76 and 17.13 min, respectively). F10 (30.9 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O + 0.1% formic acid, 35 :65, in 15 min, 4.7 mL/min) to afford **70** (2.7 mg) (tR = 11.06 min). F11 (40.6 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O + 0.1% formic acid, 35 :65, in 30 min, 4.7 mL/min) to afford compounds **73** (9.9 mg) and **83** (2.8 mg) (tR = 12.46 and 24.04 min, respectively). F13 (96.4 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O + 0.1% formic acid, 35 :65, in 30 min, 4.7 mL/min) to afford **72** (21.0 mg). F14 (69.9 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O+ 0.1% formic acid, 25 :75 to 45 :55, in 30 min, 4.7 mL/min) to afford compounds **75** (2.7 mg), **10** (7.0 mg), and **79** (1.5 mg) (tR = 12.18, 14.11, and 7.49 min, respectively) and F14-1. F14-1 was subjected to analytical HPLC (Kromasil C₁₈, (MeCN :MeOH, 1 :1)-H₂O + 0.1% formic acid, 55 :65, 1.0 mL/min) to afford **77** (2.5 mg, tR = 8.52 min). F15 (45.1 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN :H₂O + 0.1% formic acid, 25 :75, in 30 min, 4.7 mL/min) to afford **74** (6.5 mg, tR = 15.90 min). Concerning study of the seasonal variation of the composition, air dried plants from each collect were pulverized and transferred to 66 mL (bark) and 100 mL (leaves) stainless steel extraction cells and were successively extracted with n-heptane, EtOAc and MeOH using a Dionex ASE 300. Then each extracts were evaporated to dryness.

10.3.2 *C. peltatum*

The plant material (200 g, dry wt) was extracted with EtOAc (3 × 0.5 L each). The EtOAc extract was concentrated in vacuo at 40 °C to yield 1.5 g of residue. This extract was dissolved in MeCN (0.25 L) and subjected to a liquid/liquid partition with n-heptane (2 × 0.25 L) to afford 0.6 g of an MeCN soluble fraction. This fraction was subjected to a semipreparative HPLC (Kinetex C₁₈, H₂O-MeCN 35 :65 + 0.1% formic acid to 0 :100 in 45 min at 4.5 mL·min⁻¹) to afford 20 fractions of decreasing polarity, F1-F20. Fraction F7 (9.1 mg) was purified by semipreparative HPLC (Nucleodur PFP, H₂O- MeCN 50 :50 + 0.1% formic acid at 4.5 mL·min⁻¹) to afford **89** (1.1 mg) (tR : 18.0 min). Fraction F5 (17.4 mg) was purified by semipreparative HPLC (Nucleodur PFP, H₂O-MeCN 30 :70 + 0.1% formic acid at 4.5 mL·min⁻¹) to afford **90** (1.4 mg) (tR : 13.4 min). Fraction F9 (20.9 mg) was subjected to a semipreparative HPLC (Nucleodur PFP, H₂O-MeCN 45 :55 + 0.1% formic acid at 4.5 mL·min⁻¹) to afford **91** (2.9 mg) and **92** (4.1 mg) (tR : 18.5 and 20.5 min, respectively). Fraction F4 (27.8 mg) was purified by semipreparative HPLC (Nucleodur PFP, H₂O-MeCN 18 :82 + 0.1% formic acid at 4.5 mL·min⁻¹) to afford compounds **93** (0.62 mg) and **94** (0.47 mg) (tR : 11.3 and 12.0 min, respectively)

10.3.3 *S. racemosa*

The dried barks (300 g) of *S. racemosa* were extracted with EtOAc (3 × 500 mL) to give a crude extract (0.5 g) after concentration in vacuo at 40 °C. This extract was dissolved in MeCN (250 mL) and subjected to a liquid/liquid partition using n-heptane (3 × 250 mL) to afford 0.3 g of a MeCN soluble fraction. This residue was subjected to silica gel column chromatography using a gradient of n-heptane-EtOAc-MeOH of increasing polarity (1 :0 :0 to 0 :1 :0 to 0 :2 :8, 35 mL/min) to afford 12 fractions, F1 to F12, according to their TLC profiles. Purification of fraction F5 (17.7 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 55 :45, 4.7 mL/min) afforded compound **86** (1.0 mg) and compound **87** (2.6 mg). Purification of fraction F6 (14.4 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, MeCN-H₂O + 0.1% formic acid, 50 :50, 4.7 mL/min) afforded compound **88** (0.8 mg).

10.3.4 *K. longifolium*

1.8 g of dry EtOAc extract of *K. longifolium* was subjected to silica gel column chromatography using a gradient of n-heptane-EtOAc-MeOH of increasing polarity (1 :0 :0 to 0 :1 :0 to 0 :2 :8, 35 mL/min) to afford 14 fractions and compounds **95**(1.0 mg) and **96**(3.5 mg) according to their TLC profiles

Chapitre 11

LC-MS/MS analysis

Sommaire

11.1 Data Dependent LC ESI HRMS² Analysis	143
11.2 MZmine 2 Data Preprocessing Parameters.	144
11.2.1 <i>S. guyanensis</i>	144
11.2.2 <i>C. peltatum</i>	144
11.2.3 <i>S. racemosa</i>	145
11.2.4 <i>K. longifolium</i>	145
11.3 Molecular Network Analysis	146
11.3.1 <i>S. guyanensis</i>	146
11.3.2 <i>C. peltatum</i>	146
11.3.3 <i>S. racemosa</i>	146
11.3.4 <i>K. longifolium</i>	147

11.1 Data Dependent LC ESI HRMS² Analysis

LC analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 RSLC system equipped with an Accucore C18 column (2.1 × 100 mm ; 2.6 μm, ThermoScientific). The mobile phase consisted of H₂O-MeCN with 0.1% formic acid (20 :80) during 5 min, then a gradient from 20 :80 to 100 :0 in 20 min, at a flow rate of 350 μL/min. The temperature of the column oven was set at 30 °C and the injection volume at 5 μL. LC-ESI-HRMS² analyses were achieved by coupling the LC system to an Agilent 6540 hybrid quadrupole TOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with an ESI dual source, operating in positive-ion mode. Source parameters were set as follows : capillary temperature at 325 °C , source voltage at 3500 V, sheath gas flow rate at 7 L/min, nebulizer pressure at 30 psi, drying gas flow rate at 10 L/min, drying-gas temperature at 350 °C, stealth gas temperature at 350 °C, skimmer voltage at 45 V, fragmentor voltage at 150 V, and nozzle voltage at 500 V. MS scans were operated in full-scan mode from *m/z* 100 to 1000 (0.1 s scan time) with a mass resolution of 20 000 at *m/z* 922. An MS¹ scan was

followed by MS² scans of the five most intense ions above an absolute threshold of 3000 counts. Selected parent ions were fragmented with collision energy fixed at 35 eV and an isolation window of 1.3 amu. Calibration solution, containing two internal reference masses (purine, C₅H₄N₄, m/z 121.0509, and HP-921 [hexakis(1H,1H,3H- tetrafluoropentoxy)phosphazene], C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, m/z 922.0098), routinely led to mass accuracy below 2 ppm. LC-UV data were analyzed with Chromeleon software (Dionex), and MS data acquisition and processing were performed using MassHunter Workstation software (Agilent Technologies, Massy, France). All data files were converted from the .d (Agilent) standard data format to .mzXML format using the MSConvert software, part of the ProteoWizard package.

11.2 MZmine 2 Data Preprocessing Parameters.

11.2.1 *S. guyanensis*

Raw files were directly processed using the MZmine 2 v28. The mass detection was realized keeping the noise level at 0. The chromatogram building was achieved using a minimum time span of 0.1 min, minimum height of 5000 and m/z tolerance of 0.006 (or 20 ppm). The local minimum search deconvolution algorithm was used with the following settings : chromatographic threshold = 1%, minimum retention time range = 0.3 min, minimum relative height = 1%, minimum absolute height = 5000, minimum ratio of peak top/edge = 2, peak duration range = 0.1 - 2.0 min. Chromatograms were deisotoped using the isotopic peaks grouper algorithm with an m/z tolerance of 0.006 (or 20 ppm) and an RT tolerance of 0.5 min. Peak alignment was performed using the RANSAC aligner method (m/z tolerance at 0.006 (or 20 ppm), absolute tR tolerance 1.5 min, absolute RT tolerance after correction of 0.5 min, and a threshold value of 1). The peak list was gap filled with the peak finder module (intensity tolerance at 50%, m/z tolerance at 0.006 (or 20 ppm) and absolute RT tolerance of 0.5 min).

11.2.2 *C. peltatum*

The 339 MS² All .mzxml were processed using MZmine 2 v31. The mass detection was realized keeping the noise level at 0. The ADAP chromatogram builder was used using a minimum group size of scans of 4, a group intensity threshold of 3000, a minimum highest intensity of 4000, and m/z tolerance of 0.005 (or 20 ppm). The ADAP wavelets deconvolution algorithm was used with the following standard settings : S/N threshold = 8, minimum feature height = 4000, coefficient/area threshold = 20, peak duration range 0.05-1 min, tR wavelet range 0.01-0.07 min. However, these parameters needed to be reoptimized for a few specific samples in this data set. MS² scans were paired using an m/z tolerance range of 0.02 Da and tR tolerance range of 0.5 min. Isotopologues were grouped using the isotopic peak grouper algorithm with an m/z tolerance of 0.005 (or 20 ppm) and a tR tolerance of 0.2 min. Peak alignment was performed using the join aligner module [m/z tolerance = 0.004 (or 10 ppm), weight for m/z = 2, weight for tR = 1, absolute tR tolerance 0.5 min]. The peak list was gap-filled with the same tR and m/z

range gap filler module [m/z tolerance of 0.004 (or 10 ppm)]. Eventually, the .mgf preclustered spectral data file and its corresponding .csv metadata file (for tR,areas,and formulas integration) were exported using the dedicated “Export for GNPS” and “Export to CSV file” built-in options. See further documentation and tutorials at <https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking/>.

11.2.3 *S. racemosa*

All .mzxml were processed using MZmine 2v38. The mass detection was realized keeping the noise level at 20. The ADAP chromatogram builder was used using a minimum group size of scans of 4, a group intensity threshold of 3000, a minimum highest intensity of 8000, and m/z tolerance of 0.01 (or 20 ppm). The ADAP wavelets deconvolution algorithm was used with the following standard settings : S/N threshold = 8, minimum feature height = 5000, coefficient/area threshold = 20, peak duration range 0.01-0.6 min, RT wavelet range 0.01-0.1 min. However, these parameters needed to be reoptimized for a few specific samples in this data set. MS² scans were paired using an m/z tolerance range of 0.02 Da and RT tolerance range of 0.5 min. Isotopologues were grouped using the isotopic peak grouper algorithm with an m/z tolerance of 0.01 (or 20 ppm) and a RT tolerance of 0.2 min. Peak alignment was performed using the RANSAC aligner module [m/z tolerance = 0.01 (or 20 ppm), weight for m/z = 2, RT tolerance 0.5, RT tolerance after correction 0.5 min, RANSAC iterations 0, minimum number of points 30%, threshold value 0.2]. The peak list was gap-filled with the same RT and m/z range gap filler module [intensity tolerance 50%, m/z tolerance of 0.01 (or 20 ppm), retention time tolerance 0.3]. Eventually, the .mgf preclustered spectral data file and its corresponding peak area quantification table file were exported using the dedicated “Export for GNPS”. See further documentation and tutorials at <https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking/>.

11.2.4 *K. longifolium*

All .mzxml were processed using MZmine 2 v41. The mass detection was realized keeping the noise level at 0. The ADAP chromatogram builder was used using a minimum group size of scans of 4, a group intensity threshold of 3000, a minimum highest intensity of 4000, and m/z tolerance of 0.005 (or 20 ppm). The ADAP wavelets deconvolution algorithm was used with the following standard settings : S/N threshold = 8, minimum feature height = 4000, coefficient/area threshold = 20, peak duration range 0.05-0.5 min, RT wavelet range 0.01-0.07 min. MS² scans were paired using an m/z tolerance range of 0.02 Da and RT tolerance range of 0.5 min. Isotopologues were grouped using the isotopic peak grouper algorithm with an m/z tolerance of 0.005 (or 20 ppm), a RT tolerance of 0.2 min and a maximum charge of 2. Peak alignment was performed using the RANSAC aligner module [m/z tolerance = 0.001 (or 20 ppm), RT tolerance 1.5, RT tolerance after correction 0.5 min, RANSAC iterations 0, minimum number of points 50%, threshold value 1]. The peak list was gap-filled with the same RT and m/z range gap filler (multi-thread) module [intensity tolerance 50%, m/z tolerance of 0.001 (or

5 ppm), retention time tolerance 0.5]. Eventually, the .mgf preclustered spectral data file and its corresponding peak area quantification table file were exported using the dedicated “Export for GNPS”

11.3 Molecular Network Analysis

11.3.1 *S. guyanensis*

The molecular network was created using the online workflow at Global Natural Products Social molecular networking (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). The data was filtered by removing all MS/MS peaks within ± 17 Da of the precursor m/z . MS² spectra were window filtered by choosing only the top 6 peaks in the ± 50 Da window throughout the spectrum. A network was created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than six matched peaks. Further edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other’s respective top 10 most similar nodes. The spectra in the network were searched against GNPS’s spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.4 and at least four matched peaks. Analog search was enabled against the library with a maximum mass shift of 100 Da. Finally, MNs were visualized using Cytoscape 3.4.0 software. All data files used during this study were deposited in the GNPS MassIVE data repository and are publicly available (MassIVE ID : MSV000081542).

11.3.2 *C. peltatum*

The molecular networks were created using the online workflow at Global Natural Products Social molecular networking (<http://gnps.ucsd.edu>).⁴⁶ MS² spectra were window-filtered by choosing only the top six peaks in the ± 50 Da window throughout the spectrum. The data were not clustered with MS-Cluster. A network was created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and at least four matching peaks. Further edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other’s respective top 10 most similar nodes. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.7 and at least 4 matched peaks.

11.3.3 *S. racemosa*

A molecular network was created with the feature based molecular networking workflow (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking/>) on the GNPS website (<http://gnps.ucsd.edu>). The data was filtered by removing all MS² fragment ions within ± 17 Da of the precursor m/z . MS² spectra were window filtered by choosing only the top 6 fragment ions in the ± 50 Da window throughout the spectrum. The precursor ion

mass tolerance was set to 0.02 Da and a MS² fragment ion tolerance of 0.02 Da. A network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.65 and more than 4 matched peaks. Further, edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 15 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 1000, and the lowest scoring edges were removed from molecular families until the molecular family size was below this threshold. The spectra in the network were then searched against GNPS' spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.65 and at least 4 matched peaks. The molecular network was annotated following the Network Annotation Propagation workflow (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-theoretical.jsp>) on the GNPS website. The 20 first candidate structures of the neighbor nodes were used for Consensus re-ranking. The result from Fusion re-ranking was used to perform Consensus re-ranking. Candidates were searched within a 20 ppm window in GNPS and SUPNAT databases. [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ adducts were expected for the precursor ion mass. The NAP results were mapped on the feature-based molecular network and visualize in Cytoscape 3.7.1 via the Chem Viz2 plug-in.

11.3.4 *K.longifolium*

A molecular network was created with the feature based molecular networking workflow (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking/>) on the GNPS website (<http://gnps.ucsd.edu>). The data was filtered by removing all MS² fragment ions within ± 17 Da of the precursor m/z . MS² spectra were window filtered by choosing only the top 6 fragment ions in the ± 50 Da window throughout the spectrum. The precursor ion mass tolerance was set to 0.02 Da and a MS² fragment ion tolerance of 0.02 Da. A network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.65 and more than 4 matched peaks. Further, edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 15 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 1000, and the lowest scoring edges were removed from molecular families until the molecular family size was below this threshold. The spectra in the network were then searched against GNPS' spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.65 and at least 4 matched peaks. The molecular network was annotated following the Network Annotation Propagation workflow (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-theoretical.jsp>) on the GNPS website. The 15 first candidate structures of the neighbor nodes were used for Consensus re-ranking. The result from Fusion re-ranking was used to perform Consensus re-ranking. Candidates were searched within a 20 ppm window in GNPS, SUPNAT and NPAtlas databases. [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ adducts were expected for the precursor ion mass. The NAP results were mapped on the feature-based molecular network and visualize in Cytoscape 3.7.1 via the Chem Viz2 plug-in.

The molecular network was annotated following the MS2LDA Motif Database workflow on the GNPS website using the following parameters : Bin width = 0.01 ; Number of LDA Iterations = 1000, Minimum MS2 intensity = 20, LDA Free Motifs = 300 Overlap score threshold = 0.3, Probability value threshold = 0.1, TopX in mode = 5. Data were search to all substructures databases available.

Quatrième partie

Discussion et conclusion

Discussion

Can, or will, natural products ever recapture the preeminent position they once held as a foundation for drug discovery and development ? James D. McChesney³⁰⁶

Même si la Nature autorise un métabolisme exploratoire si le coût énergétique de production n'est pas supérieur au bénéfice,³⁰⁷ la pression évolutive pousse les organismes à produire majoritairement des composés qui leur procurent un avantage sélectif (*i.e.* un bénéfice). Ainsi, les substances naturelles sont inévitablement orientées vers l'interaction et peuvent agir en défendant l'organisme contre les prédateurs, en l'aidant à communiquer avec les autres membres de son espèce, en interférant avec des organismes concurrents ou en facilitant son adaptation à différents stress abiotiques.

Bien que la plupart des fonctions des produits naturels, dans leur organisme producteur, soient actuellement inconnues, le grand nombre de médicaments d'origine naturelle, atteste d'une bioactivité inhérente des métabolites spécialisés. Par la valorisation chimique et biologique de nombreuses espèces végétales, animales ou microbiennes, la Nature a fortement contribué à approvisionner un arsenal thérapeutique important permettant aujourd'hui, de traiter beaucoup de grandes pathologies. Cependant depuis les vingt dernières années, la recherche sur les substances naturelles est en fort déclin dans l'industrie pharmaceutique. De nouvelles méthodologies bouleversent aujourd'hui la manière de penser les substances naturelles et pourraient permettre de leur redonner une place importante dans les programmes de "drug discovery".

La biodiversité, une source de médicaments largement inexploitée

Outre les problèmes d'approvisionnement (accès physique, contexte légal, variabilité des lots...), la découverte et le développement de nouvelles molécules d'origine naturelle est perçu comme un processus lent et coûteux. Les campagnes actuelles de criblage à haut débit sont conçues pour identifier et classer par ordre de priorité les produits chimiques provenant des banques de composés en quelques semaines ou quelques mois. Le processus de bio-guidage, classiquement utilisé pour identifier les constituants actifs des extraits d'origine naturelle est un processus long. Il exige généralement que des essais biologiques soient effectués à chaque étape

306. McCHESNEY, J. D. *et al. Phytochemistry* **68**, 2015-2022 (2007).

307. FIRN, R. D. & JONES, C. G. *J. Exp. Bot.* **60**, 719-726 (2009).

de purification. Ainsi, le temps nécessaire à la réalisation de l'essai biologique et à la communication des résultats ainsi que le nombre de cycles de séparation déterminent le temps nécessaire à l'obtention d'un hit. D'autres facteurs, susceptibles d'influer sur la vitesse et l'efficacité de l'identification des composés sont : l'instabilité chimique, les séparations difficiles et les variations entre les analyses biologiques.

Les considérations précédentes sont accentuées par le sentiment que la plupart des composés médicamenteux d'origine naturelle ont déjà été découverts. Or, bien que le nombre d'espèces végétales et animales soit limité, seule une très petite fraction de l'ensemble des espèces a fait l'objet d'études chimiques, et une fraction de cette fraction l'objet d'études biologiques. Le nombre d'espèces végétales est estimé entre 300 000 et 400 000. À titre de comparaison, la plus grande bibliothèque d'extrait naturels, détenue par le National Cancer Institute (NCI),³⁰⁸ contient environ 125 000 extraits provenant de 30 000 espèces. De manière générale, seulement 5% de la biodiversité a été testé sur une cible biologique.³⁰⁹

La biodiversité reste donc largement inexploitée et les substances naturelles constituent toujours une source importante de molécules thérapeutiques. De nouvelles stratégies analytiques basées en particulier sur la spectrométrie de masse en tandem (MS) permettent aujourd'hui d'exploiter pleinement cette chimiodiversité naturelle dans des temps et coûts de plus en plus réduits.

La métabolomique non-ciblée appliquée aux substances naturelles

En pharmacognosie, l'isolement des substances naturelles est historiquement guidé par l'activité biologique détectée, une propriété physicochimique caractéristique, ou par la quantité d'un composé au sein d'un mélange. Ces méthodologies ont permis la découverte d'une grande diversité de molécules bioactives mais souffrent de la redécouverte systématique de certains principes actifs. Ces dernières années, la métabolomique non ciblée (analyse de l'ensemble des métabolites d'un échantillon) a pris une place de plus en plus importante dans la recherche relative aux substances naturelles en permettant une analyse exhaustive de la composition chimique des organismes étudiés. À l'heure actuelle, les approches basées sur la MS sont les plus performantes et les plus fréquemment utilisées. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution en tandem a développé la capacité du chimiste à détecter plus facilement des milliers de métabolites au cour d'une seule expérience.³¹⁰ Les spectres MS/MS peuvent ensuite être comparés à des bases de données pour détecter les composés connus. La quantité et la qualité de l'information chimique, qui peut être extraite des données de MS, dépendent principalement du pré-traitement de l'analyse et de l'interprétation minutieuses des données. Ces étapes ont connu une évolution rapide au cours des cinq dernières années, notamment avec l'introduction des réseaux moléculaires et des outils d'annotation des données de MS/MS, ceci dans

308. THORNBURG, C. C. *et al.* *ACS Chem. Biol.* **13**, 2484-2497 (2018).

309. MISHRA, B. B. & TIWARI, V. K. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4769-4807 (2011).

310. HAN, J. *et al.* *Metabolomics* **4**, 128-140 (2008).

le but d'améliorer les stratégies de déréplication de substances naturelles (*i.e.* l'identification de composés connus).

Le pré-traitement et l'homogénéité des échantillons Le prétraitement des données de MS est basé sur l'alignement de pics communs entre les chromatogrammes. Or, des espèces appartenant à un même taxon sont plus susceptibles de posséder des profils chimiques similaires. Par conséquent, l'homogénéité taxonomique des échantillons est gage d'un pré-traitement réussi. En d'autres termes, des échantillons trop différents, sans pic en commun rendent cette étape difficile. De plus, lors de l'utilisation des réseaux moléculaires, la visualisation de l'espace chimique (*i.e.* du métabolome) est plus simple lorsqu'un grand nombre de métabolites sont communs à tous les échantillons. De la même manière la détection des métabolites sortant de cette espace chimique est plus aisée. La détection de composés originaux est donc théoriquement plus fiable et plus facile lors de l'étude de grands ensembles d'organismes apparentés taxonomiquement.

Les réseaux multi-informatifs Les réseaux moléculaires (MN) permettent de visualiser et d'organiser un grand nombre de spectre MS/MS en fonction de leur similarité sous forme de familles moléculaires. Un des avantages principaux des MN est de pouvoir cartographier des informations relatives aux échantillons comme leur origine taxonomique ou leur bioactivité. La sélection de composés présents principalement dans des extraits bioactifs et appartenant à un seul genre taxonomique permet d'une part de réduire la probabilité d'isoler des composés déjà décrits, et d'autre part d'augmenter les chances que ces composés soient bioactifs. L'isolement MS-guidé des composés sélectionnés grâce aux réseaux multi-informatifs permettent notamment de s'affranchir de l'isolement bio-guidé coûteux et chronophage et de limiter les potentielles dégradations chimiques par la réduction du nombre d'étapes de purification (pour plus de détails, consulter la thèse de F. Olivon³¹¹). L'analyse des extraits basées sur la comparaison des données de MS/MS permet donc de répondre à des problèmes majeures associés à la découverte de nouvelles substances naturelles en "drug discovery". Cependant, de nombreuses limites persistent, notamment lors de l'annotation de ces données.

Annotation des données de MS/MS : limites et perspectives

Les méthodes d'annotation des données de MS/MS combinent généralement leur comparaison à des bases de données (BD) de spectres expérimentaux et de spectres prédits (*in silico*).

L'annotation par les bases de données. La première étape de l'annotation des données de MS/MS est la comparaison des spectres inconnus à des spectres de composés connus, référencés dans des BD. Afin de recueillir autant d'informations moléculaires que possible à partir d'expériences non ciblées, il est essentiel d'avoir un **accès rapide à des données de référence** et

³¹¹. OLIVON, F. *Nouvelle stratégie de priorisation pour l'étude des produits naturels par l'approche des réseaux moléculaires multi-informatifs* thèse de doct. (Paris-Saclay, 2018).

d'être en mesure d'effectuer des recherches au sein de la multitude de données collectées par des chercheurs du monde entier. Bien que l'augmentation du nombre de ressources disponibles soit très importante, la forte dispersion de l'information au sein de ces ressources crée une difficulté majeure pour les nombreux utilisateurs qui entreprennent une analyse exhaustive de leurs données. Les BD rassemblant des spectres provenant de bases de données de référence variées, comme la Massbank of North America et la BD du Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), constituent une avancée importante. En effet, elles facilitent l'accès à un ensemble de plus en plus complet de données, analytiques, chimiques et biologiques, et ont l'avantage de centraliser l'information en un seul et même endroit.³¹² Cependant, aujourd'hui l'inconvénient majeur des plateformes reste le manque de **standardisation du dépôt des métadonnées**. (*i.e.* les informations relatives à chaque analyse). Il s'agit pourtant d'un élément fondamental dans la réalisation d'études de MS permettant entre autres de garantir la compréhension et l'automatisation d'analyses ultérieures des données. Un grand défi pour la communauté scientifique est donc de créer et d'appliquer des normes de présentation des métadonnées et de créer des outils pour simplifier leur enregistrement.²¹⁰

Un autre inconvénient des BD est qu'elles ne couvrent qu'une petite partie de l'espace chimique connu. En métabolomique non ciblée, les expériences recueillent beaucoup plus de données qu'il n'est actuellement possible d'annoter de sorte que **seulement 2% en moyenne d'entre elles peuvent être annotées**.³¹³ Bien que ce nombre soit plus élevé pour les systèmes relativement bien étudiés, comme les lignées cellulaires humaines ou les organismes cultivés en laboratoire, il peut aussi être beaucoup plus faible pour des échantillons comme les extraits de plantes provenant souvent de milieux « non-contrôlés » tels que les forêts tropicales. Les BD sont majoritairement constituées de spectres de molécules "pures" et lorsqu'une nouvelle structure est résolue un seul spectre (*e.g.* $[M+H]^+$ en ESI(+)) est généralement mis à disposition de la communauté. Or, **les produits d'addition, les fragments de source et les multimères** constituent une source importante d'information qu'il est primordial d'inclure dans les BD afin d'augmenter le taux d'annotation.

L'annotation par les approches *in silico*. Pour étendre l'annotation aux spectres inconnus, l'association des bibliothèques de spectres simulés et des réseaux moléculaires peut aussi être utilisée. Ces dernières années, les algorithmes de prédictions spectrales ont beaucoup progressé. Cependant, la grande quantité de structures candidates diminue la lisibilité des résultats et beaucoup de propositions sont encore erronées. Ces outils, basés sur le « machine-learning » et sur des méthodes combinatoires devraient encore s'améliorer à mesure que le volume des données disponibles pour l'entraînement des algorithmes augmente. **L'utilisation des calculs *ab initio*** est une autre stratégie prometteuse qui peut être utilisée pour créer une bibliothèque de référence *in silico* prédite. En calculant l'énergie des liaisons d'une molécule, il est possible de

312. JOHNSON, S. R. & LANGE, B. M. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 22 (2015).

313. FENG, Q. *et al. Sci. Rep.* **6**, 22525 (2016).

prédire comment la molécule est susceptible de se fragmenter en phase gazeuse.³¹⁴ Cependant, ces méthodes nécessitent des ressources informatiques trop importantes pour les grands systèmes en nombre d'atomes et les méthodes *ab initio* actuelles ne permettent pas encore d'aborder la diversité chimique d'une expérience métabolomique type. Néanmoins, les méthodes de calcul *ab initio* continuent d'être développées et deviennent de plus en plus performantes.³¹⁵ De plus, la puissance des ordinateurs augmente également. Le développement d'ordinateurs quantiques pourrait apporter une solution au problème des ressources informatiques limitées, puisque des calculs qui prendraient normalement des milliers d'années sur un ordinateur classique seraient théoriquement effectués en une seconde sur un ordinateur quantique.^{316, 317} Il est possible que lorsque des méthodes de calcul plus efficaces voient le jour et que l'utilisation d'ordinateurs quantiques deviendra routinière, il ne sera plus nécessaire de disposer de BD de spectres de référence.

Apport de la chimiotaxonomie Toutes les plantes produisent des métabolites spécialisés, cependant les types structuraux sont souvent spécifiques et limités aux groupes de plantes taxonomiquement apparentés.³¹⁸ C'est pourquoi, lors de l'étude du métabolome d'organismes d'origine variée, il est primordial de considérer les informations taxonomiques des espèces étudiées. En spectrométrie de masse, l'annotation des données de MS/MS basée sur la taxonomie récemment proposé par Allard *et al.*,³¹⁹ pondère les scores des molécules candidates issus de l'annotation spectrale en fonction de la proximité taxonomique des organismes dont elles proviennent. Cette avancée majeure permet ainsi d'améliorer la fiabilité de l'annotation des spectres MS/MS en considérant la parenté des organismes envisagés.

Bilan

Cette thèse a permis d'explorer une infime partie des ressources de la biodiversité dans le but de découvrir de nouveaux composés bioactifs. L'utilisation d'outils informatiques très performants, mis récemment à la disposition de la communauté scientifique, s'est avéré un élément décisif dans ce contexte. Il est par exemple possible d'annoter bien plus rapidement les cartes spectrales, représentatives de métabolomes d'organismes vivants, et ainsi d'isoler de façon ciblée les substances naturelles d'intérêt selon des critères de rareté et/ou d'activité biologique. Au cours de nos travaux, nous avons aussi montré, qu'appliquées à un set taxonomiquement homogène de plantes, ces méthodologies constituent une stratégie innovante, rapide, efficace et prometteuse dans la perspective de trouver de nouvelles molécules utilisables en thérapeutique. Cependant, ces résultats montrent aussi qu'il reste beaucoup à faire tant la complexité du vivant

314. BARTLETT, R. J. & MUSIAL, M. *Rev. Mod. Phys.* **79**, 291-352 (2007).

315. SUN, J. *et al. Nat. Chem.* **8**, 831-836 (2016).

316. DENCHEV, V. S. *et al. Phys. Rev. X* **6**, 031015 (2016).

317. WANG, H. *et al. Nat. Photonics* **11**, 361-365 (2017).

318. Von LINNÉ, C. *Clavis medicinae* (éd. SALVIUS, L.) (Stockholm, 1766).

319. RUTZ, A. *et al. bioRxiv*, 702308 (2019).

est grande, que nos outils sont encore imparfaits et nos capacités de calcul limitées.

Conclusion générale

La première partie des travaux a concerné l'étude phytochimique des écorces de *S. guyanensis* et *S. racemosa* d'Euphorbiaceae provenant de Guyane dont les extraits possèdent de fortes propriétés inhibitrices du CHIKV in cellulo. Dans un premier temps, le fractionnement bioguidé des extraits d'écorces de ces deux plantes utilisant un test cellulaire d'inhibition du CHIKV a permis l'isolement de plus de 20 molécules aux squelettes chimiques parfois rares. Dans un second temps, des hypothèses biosynthétiques des familles chimiques les plus rares ont été proposées et l'activité biologique de ces composés a été évaluée. Seul un composé a démontré une activité modérée sur la réplication du CHIKV. Pour tenter d'expliquer les activités des extraits et de certaines fractions, des réseaux moléculaires (MN) ont été construits à partir des analyses LC-MS/MS des fractions des deux extraits *via* la plateforme GNPS. Ces réseaux permettent de lier les ions détectés en fonction de la similarité de leurs voies de fragmentation et donc de leur proximité structurale. L'annotation des MNs via le protocole NAP (Network Annotation Propagation) de GNPS a permis d'identifier de manière précise des analogues de phorbols connus pour inhiber le CHIKV à des concentrations nanomolaires. Ces composés présents à l'état de trace dans les fractions les plus actives ont fourni une explication plausible aux activités inhibitrices du CHIKV des extraits de *S.guyanensis* et *S.racemosa*. Le rôle des composés majoritaires isolés de ces deux plantes reste inconnu. Aussi un projet portant sur l'étude de la variation de la composition de *S.guyanensis* et *S.racemosa* au fil des saisons est en cours, et pourrait apporter les premiers éléments d'information concernant les conditions de production de ces composés.

La seconde partie des travaux s'est attachée à la découverte d'inhibiteurs doubles de la réplication du DENV et du ZIKV. Dans un premier temps, en collaboration avec l'équipe AFMB de l'université Aix-Marseille (Pr J-C Guillemot), un test d'inhibition de l'activité RdRp de la protéine NS5 du ZIKV et de DENV-2 basé sur une technique de fluorescence a été réalisé sur une banque de 339 extraits d'Euphorbiaceae de l'ICSN. En parallèle, une étude métabolomique a été conduite sur l'ensemble des extraits d'Euphorbiaceae de la collection de l'ICSN grâce aux MNs. Les données de spectrométrie de masse ont été pré-traitées grâce au logiciel MZmine2, puis soumises à la plateforme GNPS. Enfin, les informations taxonomiques et résultant des tests biologiques initiaux ont été croisées avec les données spectrales au sein d'un réseau moléculaire multi-informatif. L'extrait d'écorce de *C.peltatum* a été sélectionnée en fonction du niveau d'inhibition de l'activité RdRp de la protéine NS5 des deux virus et de l'originalité structurale des métabolites spécialisés observés par l'intermédiaire du réseau moléculaire et a permis l'isolement

ciblé et la caractérisation de plusieurs inhibiteurs doubles de ZIKV et DENV. De la même manière l'étude de l'extrait de fruit de *K. longifolium* a permis d'annoter avec précision la structure de composés majoritaires avant leur isolement et leur caractérisation structurale grâce à des méthodes d'annotation basées sur la reconnaissance de sous-structures chimiques (MS2LDA).

Bibliographie

1. TPL. *The Plant List. Euphorbiaceae* 2019. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/> (visité le 01/08/2019).
2. GRENAND, P., MORETTI, C., JACQUEMIN, H. & PREVOST, M.-F. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane* 1^{re} éd. (éd. IRD (INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT)) **3** (Paris, 2004).
3. 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 Res.* **5**, 652-662 (2011).
4. VASAS, A. & HOHMANN, J. *Euphorbia* Diterpenes : Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chem. Rev.* **114**, 8579-8612 (2014).
5. *About the genus Euphorbia* http://www.euphorbiaceae.org/pages/about{_}euphorbia.html (visité le 01/08/2019).
6. PRENNER, G. & RUDALL, P. J. Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and its allies : Exploring the organ-flower-inflorescence boundary. *Am. J. Bot.* **94**, 1612-1629 (2007).
7. WFO. *World Flora Online. Euphorbiaceae* 2019. <http://www.worldfloraonline.org/> (visité le 01/08/2019).
8. MAHLBERG, P., DAVIS, D. G., GALITZ, D. S. & MANNERS, G. D. Laticifers and the classification of *Euphorbia* : the chemotaxonomy of *Euphorbia esula* L. *Bot. J. Linn. Soc.* **94**, 165-180 (1987).
9. PINTUS, F., MEDDA, R., RINALDI, A. C., SPANÒ, D. & FLORIS, G. *Euphorbia* latex biochemistry : Complex interactions in a complex environment. *Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.* **144**, 381-391 (2010).
10. *Plant-derived Natural Products* (éd. OSBOURN, A. E. & LANZOTTI, V.) (Springer US, New York, NY, 2009).
11. KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems : Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* **72**, 1510-1530 (2011).
12. ERNST, M. *et al.* Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **176**, 90-101 (2015).
13. HECKER, E. Cocarcinogenic Principles from the Seed Oil of *Croton tiglium* and from Other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* **28**, 2338-2348 (1968).
14. ROSEN, R. H., GUPTA, A. K. & TYRING, S. K. Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses : Rapid lesion necrosis followed by lesion-specific immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* **66**, 486-493 (2012).

15. COLABUFO, N. A. *et al.* Perspectives of P-Glycoprotein Modulating Agents in Oncology and Neurodegenerative Diseases : Pharmaceutical, Biological, and Diagnostic Potentials. *J. Med. Chem.* **53**, 1883-1897 (2010).
16. WHITE, T. C., MARR, K. A. & BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 382-402 (1998).
17. LI, X.-Z. & NIKAIIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs* **69**, 1555-1623 (2009).
18. ECKFORD, P. D. W. & SHAROM, F. J. ChemInform Abstract : ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *ChemInform* **40**, 2989-3011 (2009).
19. ZHU, J. *et al.* Jatrophone Diterpenoids as Modulators of P-Glycoprotein-Dependent Multidrug Resistance (MDR) : Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of Promising MDR Reversal Agents. *J. Med. Chem.* **59**, 6353-6369 (2016).
20. DEWANJEE, S. *et al.* Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition. *Molecules* **22**, 871 (2017).
21. JIAO, W., DONG, W., LI, Z., DENG, M. & LU, R. Lathyrane diterpenes from *Euphorbia lathyris* as modulators of multidrug resistance and their crystal structures. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4786-4792 (2009).
22. DUARTE, N., JÁRDÁNHÁZY, A., MOLNÁR, J., HILGEROTH, A. & FERREIRA, M. J. U. Synergistic interaction between p-glycoprotein modulators and epirubicine on resistant cancer cells. *Bioorganic Med. Chem.* **16**, 9323-9330 (2008).
23. ESPOSITO, M. *et al.* Evaluation of Jatrophone Esters from *Euphorbia* spp. as Modulators of *Candida albicans* Multidrug Transporters. *J. Nat. Prod.* **80**, 479-487 (2017).
24. RAWAL, M. K. *et al.* Jatrophanes from *Euphorbia squamosa* as Potent Inhibitors of *Candida albicans* Multidrug Transporters. *J. Nat. Prod.* **77**, 2700-2706 (2014).
25. DAS, J. & RAHMAN, G. M. C1 Domains : Structure and Ligand-Binding Properties. *Chem. Rev.* **114**, 12108-12131 (2014).
26. HARADA, S., KOYANAGI, Y., NAKASHIMA, H., KOBAYASHI, N. & YAMAMOTO, N. Tumor promoter, TPA, enhances replication of HTLV-III/LAV. *Virology* **154**, 249-258 (1986).
27. HOSSAIN CHOWDHURY, M. I. *et al.* The phorbol ester TPA strongly inhibits HIV-1-induced syncytia formation but enhances virus production : Possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology* **176**, 126-132 (1990).
28. JIANG, G. & DANDEKAR, S. Targeting NF- κ B Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **31**, 4-12 (2014).
29. WARRILOW, D., GARDNER, J., DARNELL, G. A., SUHRBIER, A. & HARRICH, D. HIV Type 1 Inhibition by Protein Kinase C Modulatory Compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 854-864 (2006).
30. CASHMORE, A. *et al.* The structure of prostratin : a toxic tetracyclic diterpene ester from *Pimelea Prostrata*. *Tetrahedron Lett.* **17**, 1737-1738 (1976).
31. SANCHEZ-DUFFHUES, G. *et al.* Activation of Latent HIV-1 Expression by Protein Kinase C Agonists. A Novel Therapeutic Approach to Eradicate HIV-1 Reservoirs. *Curr. Drug Targets* **12**, 348-356 (2011).

32. WENDER, P. A., KEE, J.-M. & WARRINGTON, J. M. Practical Synthesis of Prostratin, DPP, and Their Analogs, Adjuvant Leads Against Latent HIV. *Science* **320**, 649-652 (2008).
33. BOURJOT, M. *et al.* Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. *J. Nat. Prod.* **75**, 2183-2187 (2012).
34. HOU, J. J. *et al.* Anti-proliferation activity of terpenoids isolated from *Euphorbia kansui* in human cancer cells and their structure-activity relationship. *Chin. J. Nat. Med.* **15**, 766-774 (2017).
35. CHALLACOMBE, J. M. *et al.* Neutrophils Are a Key Component of the Antitumor Efficacy of Topical Chemotherapy with Ingenol-3-Angelate. *J. Immunol.* **177**, 8123-8132 (2006).
36. MILLER, J. *et al.* Dose Characterization of the Investigational Anticancer Drug Tigilanol Tiglate (EBC-46) in the Local Treatment of Canine Mast Cell Tumors. *Front. Vet. Sci.* **6**, 106 (2019).
37. *QBiotics Group* <https://qbiotics.com> (visité le 27/05/2019).
38. KISSIN, I. & SZALLASI, A. Therapeutic Targeting of TRPV1 by Resiniferatoxin, from Preclinical Studies to Clinical Trials. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2159-2170 (2011).
39. TIAN, Y. *et al.* Lathyrane Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia micractina* and Their Biological Activities. *J. Nat. Prod.* **74**, 1221-1229 (2011).
40. XU, J., JIN, D.-q., SONG, H., GUO, Y. & HE, Y. Lathyrane diterpenes from *Euphorbia prolifera* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production. *Fitoterapia* **83**, 1205-1209 (2012).
41. DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach : Third Edition* 1-539 (2009).
42. ADOLF, W. *et al.* "Euphorbiasteroid" (Epoxy-lathyrol) A new tricyclic diterpene from *Euphorbia lathyris* L. *Tetrahedron Lett.* **11**, 2241-2244 (1970).
43. ZERBE, P. *et al.* Gene Discovery of Modular Diterpene Metabolism in Nonmodel Systems. *Plant Physiol.* **162**, 1073-1091 (2013).
44. ROHMER, M. in *Compr. Nat. Prod. II Chem. Biol.* (éd. MANDER, L. & LIU, H. W.) 2^e éd., 517-555 (Elsevier Ltd, 2010).
45. KUZUYAMA, T., HEMMI, H. & TAKAHASHI, S. in *Compr. Nat. Prod. II* 493-516 (2010).
46. FRANK, A. & GROLL, M. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chem. Rev.* **117**, 5675-5703 (2017).
47. ARENDT, P., POLLIER, J., CALLEWAERT, N. & GOOSSENS, A. Synthetic biology for production of natural and new-to-nature terpenoids in photosynthetic organisms. *Plant J.* **87**, 16-37 (2016).
48. CASTELBLANQUE, L. *et al.* Novel Insights into the Organization of Laticifer Cells : A Cell Comprising a Unified Whole System. *Plant Physiol.* **172**, 1032-1044 (2016).
49. WISE, R. R. in *Struct. Funct. Plast.* (éd. WISE, R. R. & HOOBER, J. K.) 3-26 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2006).
50. APPENDINO, G. in *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 2, 1-90 (2016).

51. WEINHEIMER, A. J., CHANG, C. W. J. & MATSON, J. A. in *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* (éd. HERZ, W., GRISEBACH, H. AND KIRBY, G. W.) 285-387 (Springer Vienna, Vienna, 1979).
52. ADOLF, W. & HECKER, E. Diterpenoid Irritants and Cocarcinogens in Euphorbiaceae and Thymelaeaceae : Structural Relationships in View of their Biogenesis. *Isr. J. Chem.* **16**, 75-83 (1977).
53. ROBINSON, D. R. & WEST, C. A. Biosynthesis of cyclic diterpenes in extracts from seedlings of *Ricinus communis*. I. Identification of diterpene hydrocarbons formed from mevalonate. *Biochemistry* **9**, 70-79 (1970).
54. DUEBER, M. T., ADOLF, W. & WEST, C. A. Biosynthesis of the Diterpene Phytoalexin Casbene : Partial Purification and Characterization of Casbene Synthetase from *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* **62**, 598-603 (2008).
55. NAKANO, Y. *et al.* Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha (Jatropha curcas L.)* *Plant Biotechnol.* **29**, 185-189 (2012).
56. KIRBY, J. *et al.* Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* **71**, 1466-1473 (2010).
57. KING, A. J. *et al.* A Cytochrome P450-Mediated Intramolecular Carbon-Carbon Ring Closure in the Biosynthesis of Multidrug-Resistance-Reversing Lathyrane Diterpenoids. *ChemBioChem* **17**, 1593-1597 (2016).
58. LUO, D. *et al.* Oxidation and cyclization of casbene in the biosynthesis of Euphorbia factors from mature seeds of *Euphorbia lathyris L.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5082-5089 (2016).
59. CHAN, W. R., PRINCE, E. C., MANCHAND, P. S., SPRINGER, J. P. & CLARDY, J. The Structure of Crotofolin A, a Diterpene with a New Skeleton. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4437-4439 (1975).
60. CHÁVEZ, K. *et al.* Crotofolane Diterpenoids from *Croton caracasanus*. *Nat. Prod. Commun.* **8**, 1934578X1300801 (2019).
61. KUPCHAN, S. M., SIGEL, C. W., MATZ, M. J., GILMORE, C. J. & BRYAN, R. F. Structure and Stereochemistry of Jatrophone, a Novel Macrocyclic Diterpenoid Tumor Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 2295-2300 (1976).
62. LANZOTTI, V. in *Nat. Prod.* (éd. RAMAWAT, K. G. & MERILLON, J.-M.) 3173-3191 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013).
63. ALBERTO MARCO, J., SANZ-CERVERA, J. F., YUSTE, A., JAKUPOVIC, J. & JESKE, F. Jatrophane derivatives and a rearranged jatrophane from *Euphorbia terracina*. *Phytochemistry* **47**, 1621-1630 (1998).
64. JAKUPOVIC, J. M. Diterpenes from *Euphorbia paralias*. *Phytochem.* **47**, 1611 -1620 (1998).
65. ZHOU, B., WU, Y., DALAL, S., CASSERA, M. B. & YUE, J. M. Euphorbesulins A-P, Structurally Diverse Diterpenoids from *Euphorbia esula*. *J. Nat. Prod.* **79**, 1952-1961 (2016).
66. BARILE, E. & LANZOTTI, V. Biogenetical related highly oxygenated macrocyclic diterpenes from sea spurge *Euphorbia paralias*. *Org. Lett.* **9**, 3603-3606 (2007).
67. JAKUPOVIC, J. *et al.* Diterpenes from *Euphorbia segetalis*. *Phytochemistry* **47**, 1583-1600 (1998).
68. HECKER, E. in *Pharmacogn. Phytochem.* (éd. H. WAGNER, L. H.) 147-165 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011).

69. APPENDINO, G., TRON, G. C., JAREVÅNG, T. & STERNER, O. Unnatural Natural Products from the Transannular Cyclization of Lathyrane Diterpenes. *Org. Lett.* **3**, 1609-1612 (2001).
70. GLEIZES, M., MARPEAU, A., PAULY, G. & BERNARD-DAGAN, C. Role of acyclic compounds in monoterpene biosynthesis in *Pinus pinaster*. *Phytochemistry* **21**, 2641-2644 (1982).
71. JORGENSEN, L. *et al.* 14-Step Synthesis of (+)-Ingenol from (+)-3-Carene. *Science* **341**, 878-882 (2013).
72. SCHMIDT, R. J. The biosynthesis of tiglliane and related diterpenoids; an intriguing problem. *Bot. J. Linn. Soc.* **94**, 221-230 (1987).
73. HUANG, Y. J. S., HIGGS, S., HORNE, K. M. E. & VANLANDINGHAM, D. L. Flavivirus-Mosquito interactions. *Viruses* **6**, 4703-4730 (2014).
74. YUN, S.-I. & LEE, Y.-M. Zika virus : An emerging flavivirus. *J. Microbiol.* **55**, 204-219 (2017).
75. LINDENBACH, B. D., THIEL, H.-J. & RICE, C. M. in *Fields Virol.* (éd. KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M.) 5^e éd., 1101-1113 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).
76. SHI, P.-Y. Unraveling a Flavivirus Enigma. *Science* **343**, 849-850 (2014).
77. PIETILÄ, M. K., HELLSTRÖM, K. & AHOLA, T. Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Res.* **234**, 44-57 (2017).
78. STRAUSS, J. H. & STRAUSS, E. G. The alphaviruses : gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* **58**, 491-562 (1994).
79. FIGUERA, A. & RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses : An update. *Acta Trop.* **190**, 99-111 (2019).
80. REIF, J. S. *Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section B* 171-181 (CRC Press, 2017).
81. DIALLO, D. *et al.* Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS One* **9** (éd. ATTOUI, H.) e109442 (2014).
82. MARCHETTE, N. J., GARCIA, R & RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**, 411-5 (1969).
83. HEUKELBACH, J., ALENCAR, C. H., KELVIN, A. A., DE OLIVEIRA, W. K. & PAMPLONA DE GÓES CAVALCANTI, L. Zika virus outbreak in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* **10**, 116-120 (2016).
84. AWADH, A. *et al.* Does Zika Virus Cause Microcephaly - Applying the Bradford Hill Viewpoints. *PLoS Curr.* **1**, 1 (2017).
85. MUSSO, D. & GUBLER, D. J. Zika Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 487-524 (2016).
86. MOORE, C. A. *et al.* Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr.* **171**, 288-295 (2017).
87. MOHAN, A., KIRAN, D. H., MANOHAR, I. & KUMAR, D. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of chikungunya fever : Lessons learned from the re-emerging epidemic. *Indian J. Dermatol.* **55**, 54-63 (2010).
88. SIMON, F., SAVINI, H. & PAROLA, P. Chikungunya : A Paradigm of Emergence and Globalization of Vector-Borne Diseases. *Med. Clin. North Am.* **92**, 1323-1343 (2008).

89. FOURIE, E. D. & MORRISON, J. G. Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. *S. Afr. Med. J.* **56**, 130-2 (1979).
90. RAMOS-CASTAÑEDA, J. *et al.* Dengue in Latin America : Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11** (2017).
91. HALSTEAD, S. B. Hemorrhagic dengue as a public health problem and a field of research. *Bull World Heal. Organ* **58**, 375-397 (1980).
92. TITTARELLI, E. *et al.* Dengue virus 1 outbreak in Buenos Aires, Argentina, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1684-1685 (2017).
93. DICK, O. B. *et al.* Review : The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**, 584-593 (2012).
94. BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504-507 (2013).
95. HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1347-1350 (2009).
96. BESNARD, M., LASTÈRE, S., TEISSIER, A., CAO-LORMEAU, V. M. & MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* **19**, 20751 (2014).
97. CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia : A case-control study. *Lancet* **387**, 1531-1539 (2016).
98. HENNESSEY, M., FISCHER, M. & STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *Am. J. Transplant.* **16**, 1031-1034 (2016).
99. CAUCHEMEZ, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15 : A retrospective study. *Lancet* **387**, 2125-2132 (2016).
100. METSKY, H. C. *et al.* Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* **546**, 411-415 (2017).
101. LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952-1953 II. General description and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **49**, 33-57 (1955).
102. ROSS, R. W. The newala epidemic : III. The virus : Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg. (Lond).* **54**, 177-191 (1956).
103. McCRAE, A. W., HENDERSON, B. E., KIRYA, B. G. & SEMPALA, S. D. Chikungunya virus in the entebbe area of Uganda : Isolations and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**, 152-168 (1971).
104. COFFEY, L. L., FAILLOUX, A. B. & WEAVER, S. C. Chikungunya virus-vector interactions. *Viruses* **6**, 4628-4663 (2014).
105. HAMMON, W. M. D., RUDNICK, A. & SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhage fevers of the Philippines and Thailand. *Science* **131**, 1102-1103 (1960).
106. LANCIOTTI, R. S. & VALADERE, A. M. Transcontinental Movement of Asian Genotype Chikungunya Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1400-1402 (2014).
107. GRANDADAM, M. *et al.* Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 910-913 (2011).
108. REZZA, G. *et al.* Infection with chikungunya virus in Italy : an outbreak in a temperate region. *Lancet* **370**, 1840-1846 (2007).

109. YACTAYO, S., STAPLES, J. E., MILLOT, V., CIBRELUS, L. & RAMON-PARDO, P. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *J. Infect. Dis.* **214**, S441-S445 (2016).
110. FLORES, H. A. & O'NEILL, S. L. Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 508-518 (2018).
111. JIGGINS, F. M. Open questions : How does *Wolbachia* do what it does? *BMC Biol.* **14**, 92 (2016).
112. POWERS, A. M. Vaccine and therapeutic options to control chikungunya virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, 1-29 (2018).
113. REISINGER, E. C. *et al.* Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK : a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. *Lancet* **392**, 2718-2727 (2018).
114. SRIDHAR, S. *et al.* Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N. Engl. J. Med.* **379**, 327-340 (2018).
115. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO model list of essential medicines application, 21th list 2019.* <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/> (visité le 01/08/2019).
116. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO recommendations for routine immunization 2019.* https://www.who.int/immunization/policy/immunization{_}tables/en/ (visité le 01/08/2019).
117. WILDER-SMITH, A. *et al.* Deliberations of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization on the use of CYD-TDV dengue vaccine. *Lancet Infect. Dis.* **19**, e31-e38 (2019).
118. HALSTEAD, S. B. & ZOMPI, S. Protective immune responses to dengue virus infection and vaccines : Perspectives from the field to the bench. *Front. Immunol.* **6** (2015).
119. YAUCH, L. E. *et al.* A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8+ T Cells. *J. Immunol.* **182**, 4865-4873 (2009).
120. ZELLWEGER, R. M. *et al.* Role of Humoral versus Cellular Responses Induced by a Protective Dengue Vaccine Candidate. *PLoS Pathog.* **9** (éd. FOUCHIER, R. A. M.) e1003723 (2013).
121. OSORIO, J. E., WALLACE, D. & STINCHCOMB, D. T. A recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate based on a dengue virus serotype 2 backbone. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 497-508 (2016).
122. WHITEHEAD, S. S. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine ; What makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine ? *Expert Rev. Vaccines* **15**, 509-517 (2016).
123. GIL, L. & LAZO, L. Effective Dengue Vaccines : A Pipe Dream ? *Viral Immunol.* **32**, 236-238 (2019).
124. DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* **328**, 745-748 (2010).
125. BERNARDO, L. *et al.* Anamnestic antibody response after viral challenge in monkeys immunized with dengue 2 recombinant fusion proteins. *Arch. Virol.* **153**, 849-854 (2008).

126. VALDÉS, I. *et al.* Could an experimental dengue virus infection fail to induce solid immunity against homologous viral challenge in non-human primates? *Arch. Virol.* **161**, 465-470 (2016).
127. ZELLWEGER, R. M., EDDY, W. E., TANG, W. W., MILLER, R. & SHRESTA, S. CD8 + T Cells Prevent Antigen-Induced Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Disease in Mice. *J. Immunol.* **193**, 4117-4124 (2014).
128. ROUVINSKI, A. *et al.* Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature* **520**, 109-113 (2015).
129. SHAN, C., XIE, X. & SHI, P. Y. Zika Virus Vaccine : Progress and Challenges. *Cell Host Microbe* **24**, 12-17 (2018).
130. MODJARRAD, K. *et al.* Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate : phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Lancet* **391**, 563-571 (2018).
131. TEBAS, P. *et al.* Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine — Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* (2017).
132. GAUDINSKI, M. R. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults : randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet* **391**, 552-562 (2018).
133. Dos SANTOS, T. *et al.* Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1598-1601 (2016).
134. GRIFONI, A. *et al.* Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. *J. Virol.* **91**, e01469-17 (2017).
135. WEN, J. *et al.* Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+ T cells. *Nat. Microbiol.* **2**, 17036 (2017).
136. KIRKPATRICK, B. D. *et al.* The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. *Sci. Transl. Med.* **8** (2016).
137. BALMASEDA, A. *et al.* Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 8384-8389 (2017).
138. RICHNER, J. M. *et al.* Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell* **170**, 273-283.e12 (2017).
139. SHAN, C. *et al.* A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nat. Commun.* **8**, 676 (2017).
140. BOLDESCU, V., BEHNAM, M. A., VASILAKIS, N. & KLEIN, C. D. Broad-spectrum agents for flaviviral infections : Dengue, Zika and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 565-586 (2017).
141. LESCAR, J. *et al.* Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses : The case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res.* **80**, 94-101 (2008).
142. 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.* **73**, 3108-16 (1999).
143. XU, T. *et al.* Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å. *J. Virol.* **79**, 10278-10288 (2005).

144. WU, J., BERA, A. K. & KUHN, R. J. Structure of the Flavivirus helicase : implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. *J. Virol.* **79**, 10268-10277 (2005).
145. DE CLERCQ, E. & LI, G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 695-747 (2016).
146. NITSCHKE, C. *et al.* Peptide–Boronic Acid Inhibitors of Flaviviral Proteases : Medicinal Chemistry and Structural Biology. *J. Med. Chem.* **60**, 511-516 (2017).
147. YIN, Z. *et al.* Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1 : Warhead. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 36-39 (2006).
148. YIN, Z. *et al.* Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2 : SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 40-43 (2006).
149. BASTOS LIMA, A. *et al.* Dual inhibitors of the dengue and West Nile virus NS2B-NS3 proteases : Synthesis, biological evaluation and docking studies of novel peptide-hybrids. *Bioorganic Med. Chem.* **23**, 5748-5755 (2015).
150. BEHNAM, M. A. M., NITSCHKE, C., VECHI, S. M. & KLEIN, C. D. C-terminal residue optimization and fragment merging : Discovery of a potent peptide-hybrid inhibitor of dengue protease. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 1037-1042 (2014).
151. NITSCHKE, C. *et al.* Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *J. Med. Chem.* **56**, 8389-8403 (2013).
152. BEHNAM, M. A., GRAF, D., BARTENSCHLAGER, R., ZLOTOS, D. P. & KLEIN, C. D. Discovery of Nanomolar Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors Containing a 4-Benzyloxyphenylglycine Residue. *J. Med. Chem.* **58**, 9354-9370 (2015).
153. WEIGEL, L. F., NITSCHKE, C., GRAF, D., BARTENSCHLAGER, R. & KLEIN, C. D. Phenylalanine and Phenylglycine Analogues as Arginine Mimetics in Dengue Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **58**, 7719-7733 (2015).
154. ERBEL, P. *et al.* Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 372-373 (2006).
155. NOBLE, C. G., SEH, C. C., CHAO, A. T. & SHI, P. Y. Ligand-Bound Structures of the Dengue Virus Protease Reveal the Active Conformation. *J. Virol.* **86**, 438-446 (2012).
156. NITSCHKE, C., HOLLOWAY, S., SCHIRMEISTER, T. & KLEIN, C. D. Biochemistry and Medicinal Chemistry of the Dengue Virus Protease. *Chem. Rev.* **114**, 11348-11381 (2014).
157. LEI, J. *et al.* Crystal structure of zika virus ns2b-ns3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science* **353**, 503-505 (2016).
158. RAWLINSON, S. M., PRYOR, M. J., WRIGHT, P. J. & JANS, D. A. Dengue virus RNA polymerase NS5 : a potential therapeutic target ? *Curr. Drug Targets* **7**, 1623-1638 (2006).
159. YAP, T. L. *et al.* Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. *J. Virol.* **81**, 4753-4765 (2007).
160. GODOY, A. S. *et al.* Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nat. Commun.* **8**, 14764 (2017).
161. ZHAO, B. *et al.* Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nat. Commun.* **8**, 14762 (2017).

162. ZMURKO, J. *et al.* The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1-16 (2016).
163. YIN, Z. *et al.* An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 20435-20439 (2009).
164. 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. *Antiviral Res.* **87**, 213-222 (2010).
165. WARREN, T. K. *et al.* Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature* **508**, 402-405 (2014).
166. TAYLOR, R. *et al.* BCX4430 - A broad-spectrum antiviral adenosine nucleoside analog under development for the treatment of Ebola virus disease. *J. Infect. Public Health* **9**, 220-226 (2016).
167. GOLITSINA, N. L., DANEHY, F. T., FELLOWS, R., CRETTON-SCOTT, E. & STANDRING, D. N. Evaluation of the role of three candidate human kinases in the conversion of the hepatitis C virus inhibitor 2'-C-methyl-cytidine to its 5'-monophosphate metabolite. *Antiviral Res.* **85**, 470-481 (2010).
168. SOFIA, M. J. in *Adv. Pharmacol.* 39-73 (2013).
169. SOFIA, M. J. *et al.* Discovery of a fluoro-2'- β -C -methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J. Med. Chem.* **53**, 7202-7218 (2010).
170. YEO, K. L. *et al.* Synergistic Suppression of Dengue Virus Replication Using a Combination of Nucleoside Analogs and Nucleoside Synthesis Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2086-2093 (2015).
171. LIM, S. P. *et al.* Potent Allosteric Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors : Mechanism of Action and Resistance Profiling. *PLoS Pathog.* **12** (éd. FREMONT, D. H.) e1005737 (2016).
172. ELTAHLA, A. A., LUCIANI, F., WHITE, P. A., LLOYD, A. R. & BULL, R. A. Inhibitors of the hepatitis C virus polymerase ; mode of action and resistance. *Viruses* **7**, 5206-5224 (2015).
173. REMY, S. & LITAUDON, M. Macrocyclic diterpenoids from Euphorbiaceae as a source of potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. *Molecules* **24**, 2336 (2019).
174. WANG, H.-B., WANG, X.-Y., LIU, L.-P., QIN, G.-W. & KANG, T.-G. Tiglane Diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae Families. *Chem. Rev.* **115**, 2975-3011 (2015).
175. NOTHIAS-SCAGLIA, L. F. *et al.* Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J. Nat. Prod.* **78**, 1277-1283 (2015).
176. CORLAY, N. *et al.* Tiglane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of chikungunya virus replication. *Fitoterapia* **97**, 87-91 (2014).
177. NOTHIAS, L.-F. *et al.* Environmentally Friendly Procedure Based on Supercritical Fluid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry Molecular Networking for the Discovery of Potent Antiviral Compounds from *Euphorbia semiperfoliata*. *J. Nat. Prod.* **80**, 2620-2629 (2017).
178. OLIVON, F. *et al.* Antiviral Activity of Flexibilane and Tiglane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J. Nat. Prod.* **78**, 1119-1128 (2015).

179. OLIVON, F. *et al.* Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-informational Molecular Networks. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2644-2651 (2017).
180. ESPOSITO, M. *et al.* Isolation of Premyrsinane, Myrsinane, and Tiglane Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* Using a Chikungunya Virus Cell-Based Assay and Analogue Annotation by Molecular Networking. *J. Nat. Prod.* **80**, 2051-2059 (2017).
181. NOTHIAS, L. F. *et al.* Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. *J. Nat. Prod.* **81**, 758-767 (2018).
182. NOTHIAS-ESPOSITO, M. *et al.* Investigation of Premyrsinane and Myrsinane Esters in *Euphorbia cupanii* and *Euphorbia pithyusa* with MS2LDA and Combinatorial Molecular Network Annotation Propagation. *J. Nat. Prod.* **82**, 1459-1470 (2019).
183. SCHMIDT, R. & HECKER, E. Autoxidation of Phorbol Esters under Normal Storage Conditions. *Cancer Res.* **35**, 1375-1377 (1975).
184. MÁRQUEZ, N. *et al.* Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1370-1380 (2008).
185. HE, W. *et al.* Daphnane-Type Diterpene Orthoesters and their Biological Activities. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2**, 185-200 (2005).
186. OLIVON, F. *et al.* Antiviral compounds from *Codiaeum peltatum* targeted by a multi-informative molecular networks approach. *J. Nat. Prod.* **82**, 330-340 (2019).
187. BOURJOT, M., LEYSSEN, P., NEYTS, J., DUMONTET, V. & LITAUDON, M. Trigocherrierin A, a potent inhibitor of chikungunya virus replication. *Molecules* **19**, 3617-3627 (2014).
188. ALLARD, P. M. *et al.* Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. *Phytochemistry* **84**, 160-168 (2012).
189. ALLARD, P. M. *et al.* Trigocherrin a, the first natural chlorinated daphnane diterpene orthoester from *Trigonostemon cherrieri*. *Org. Lett.* **14**, 342-345 (2012).
190. LITAUDON, M. *et al.* Diterpenoids from Euphorbiaceae with Potent Anti-CHIKV and Anti-HIV Activities : Are these Antiviral Properties Correlated? *Planta Med.* **79** (2013).
191. ABDELNABI, R. *et al.* Protein kinases C as potential host targets for the inhibition of chikungunya virus replication. *Antiviral Res.* **139**, 79-87 (2017).
192. BREITKREUTZ, D., BRAIMAN-WIKSMAN, L., DAUM, N., DENNING, M. F. & TENNENBAUM, T. Protein kinase C family : On the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **133**, 793-808 (2007).
193. CORBALÁN-GARCÍA, S. & GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. Protein kinase C regulatory domains : The art of decoding many different signals in membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 633-654 (2006).
194. MCKERNAN, L. N., MOMJIAN, D. & KULKOSKY, J. Protein kinase C : One pathway towards the eradication of latent HIV-1 Reservoirs. *Adv. Virol.* **2012**, 1-8 (2012).
195. MATIAS, D. *et al.* in *Stud. Nat. Prod. Chem.* (éd. ur RAHMAN, A.) 1^{re} éd., 45-79 (Elsevier, 2016).
196. XU, R. X., PAWELCZYK, T., XIA, T. H. & BROWN, S. C. NMR structure of a protein kinase C- γ phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* **36**, 10709-10717 (1997).

197. KRAFT, A. S. & ANDERSON, W. B. Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* **301**, 621-623 (1983).
198. WENDER, P. A., KOEHLER, K. F., SHARKEY, N. A., DELL'AQUILA, M. L. & BLUMBERG, P. M. Analysis of the phorbol ester pharmacophore on protein kinase C as a guide to the rational design of new classes of analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4214-8 (1986).
199. SILINSKY, E. M. & SEARL, T. J. Phorbol esters and neurotransmitter release : More than just protein kinase C? *Br. J. Pharmacol.* **138**, 1191-1201 (2003).
200. DURÁN-PEÑA, M. J., BOTUBOL ARES, J. M., COLLADO, I. G. & HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Biologically active diterpenes containing a gem-dimethylcyclopropane subunit : An intriguing source of PKC modulators. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 940-952 (2014).
201. GUSTAFSON, K. R. *et al.* A Nonpromoting Phorbol from the Samoan Medicinal Plant *Homalanthus nutans* Inhibits Cell Killing by HIV-1. *J. Med. Chem.* **35**, 1978-1986 (1992).
202. LÓPEZ-HUERTAS, M. R. *et al.* Protein kinase C θ is a specific target for inhibition of the HIV type 1 replication in CD4 + T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **286**, 27363-27377 (2011).
203. TRUSHIN, S. A. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Reactivation by Phorbol Esters or T-Cell Receptor Ligation Requires both PKC and PKC. *J. Virol.* **79**, 9821-9830 (2005).
204. THORLUND, K., HORWITZ, M. S., FIFE, B. T., LESTER, R. & CAMERON, D. W. Landscape review of current HIV 'kick and kill' cure research - some kicking, not enough killing. *BMC Infect. Dis.* **17**, 1-12 (2017).
205. BOCKLANDT, S., BLUMBERG, P. M. & HAMER, D. H. Activation of latent HIV-1 expression by the potent anti-tumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate. *Antiviral Res.* **59**, 89-98 (2003).
206. ZHANG, G., KAZANIETZ, M. G., BLUMBERG, P. M. & HURLEY, J. H. Crystal structure of the Cys2 activator-binding domain of protein kinase C δ in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917-924 (1995).
207. NEWTON, A. C. & BROGNARD, J. Reversing the Paradigm : Protein Kinase C as a Tumor Suppressor. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 438-447. arXiv : 15334406 (2017).
208. ALLWOOD, J. W. & GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Anal.* **21**, 33-47 (2010).
209. FENAILLE, F., BARBIER SAINT-HILAIRE, P., ROUSSEAU, K. & JUNOT, C. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics : Where do we stand? *J. Chromatogr. A* **1526**, 1-12 (2017).
210. AKSENOV, A. A., DA SILVA, R., KNIGHT, R., LOPES, N. P. & DORRESTEIN, P. C. Global chemical analysis of biology by mass spectrometry. *Nat. Rev. Chem.* **1**, 0054 (2017).
211. CHAMBERS, M. C. *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* **30**, 918-920 (2012).
212. WANT, E. & MASSON, P. in *Methods Mol. Biol.* 277-298 (2011).
213. ZHOU, B., XIAO, J. F., TULI, L. & RESSOM, H. W. LC-MS-based metabolomics. *Mol. Biosyst.* **8**, 470-481 (2012).
214. SMITH, C. A., WANT, E. J., O'MAILLE, G., ABAGYAN, R. & SIUZDAK, G. XCMS : Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* **78**, 779-787 (2006).

-
215. WEBER, R. J. *et al.* Computational tools and workflows in metabolomics : An international survey highlights the opportunity for harmonisation through Galaxy. *Metabolomics* **13**, 12 (2017).
216. SPICER, R., SALEK, R. M., MORENO, P., CAÑUETO, D. & STEINBECK, C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics* **13**, 106 (2017).
217. PLUSKAL, T., CASTILLO, S., VILLAR-BRIONES, A. & OREŠIČ, M. MZmine 2 : Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **11** (2010).
218. MYERS, O. D., SUMNER, S. J., LI, S., BARNES, S. & DU, X. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data : New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal. Chem.* **89**, 8696-8703 (2017).
219. DU, P., KIBBE, W. A. & LIN, S. M. Improved peak detection in mass spectrum by incorporating continuous wavelet transform-based pattern matching. *Bioinformatics* **22**, 2059-2065 (2006).
220. KUHL, C., TAUTENHAHN, R., BÖTTCHER, C., LARSON, T. R. & NEUMANN, S. CAMERA : An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal. Chem.* **84**, 283-289 (2012).
221. KIND, T. *et al.* Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. *Mass Spectrom. Rev.* **37**, 513-532 (2017).
222. STEIN, S. E. & SCOTT, D. R. Optimization and testing of mass spectral library search algorithms for compound identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 859-866 (1994).
223. WAN, K. X., VIDAUSKY, I. & GROSS, M. L. Comparing similar spectra : From similarity index to spectral contrast angle. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 85-88 (2002).
224. BÖCKER, S. Searching molecular structure databases using tandem MS data : are we there yet? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **36**, 1-6 (2017).
225. BLAŽENOVIĆ, I., KIND, T., JI, J. & FIEHN, O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. *Metabolites* **8**, 31 (2018).
226. KIM, S. *et al.* PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1202-D1213 (2016).
227. HUFISKY, F. & BÖCKER, S. Mining molecular structure databases : Identification of small molecules based on fragmentation mass spectrometry data. *Mass Spectrom. Rev.* **36**, 624-633. arXiv : NIHMS150003 (2017).
228. RUTTKIES, C., SCHYMANSKI, E. L., WOLF, S., HOLLENDER, J. & NEUMANN, S. MetFrag relaunched : Incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J. Cheminform.* **8**, 3 (2016).
229. HEINONEN, M. *et al.* FiD : A software for ab initio structural identification of products from tandem mass spectrometric data. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 3043-3052 (2008).
230. WOLF, S., SCHMIDT, S., MÜLLER-HANNEMANN, M. & NEUMANN, S. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics* **11** (2010).

231. DJOUMBOU-FEUNANG, Y. *et al.* CFM-ID 3.0 : Significantly Improved ESI-MS/MS Prediction and Compound Identification. *Metabolites* **9**, 72 (2019).
232. HUFESKY, F., SCHEUBERT, K. & BÖCKER, S. New kids on the block : Novel informatics methods for natural product discovery. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 807-817 (2014).
233. DÜHRKOP, K. *et al.* SIRIUS 4 : a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* **16**, 299-302 (2019).
234. BLAŽENović, I. *et al.* Comprehensive comparison of in silico MS/MS fragmentation tools of the CASMI contest : Database boosting is needed to achieve 93% accuracy. *J. Cheminform.* **9**, 1-12 (2017).
235. Van der HOOFT, J. J. J., WANDY, J., BARRETT, M. P., BURGESS, K. E. V. & ROGERS, S. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 13738-13743 (2016).
236. Van der HOOFT, J. J. J. *et al.* Unsupervised Discovery and Comparison of Structural Families Across Multiple Samples in Untargeted Metabolomics. *Anal. Chem.* **89**, 7569-7577 (2017).
237. WANDY, J. *et al.* Ms2lda.org : web-based topic modelling for substructure discovery in mass spectrometry. *Bioinformatics* **34** (éd. STEGLE, O.) 317-318 (2018).
238. DJOUMBOU FEUNANG, Y. *et al.* ClassyFire : automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *J. Cheminform.* **8**, 1-20 (2016).
239. WATROUS, J. *et al.* Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E1743-E1752 (2012).
240. QUINN, R. A. *et al.* Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 143-154 (2017).
241. FRANK, A. M. *et al.* Clustering Millions of Tandem Mass Spectra. *J. Proteome Res.* **7**, 113-122 (2008).
242. OLIVON, F. *et al.* MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Anal. Chem.* **90**, 13900-13908 (2018).
243. LAURENS VAN DER MAATEN & GEOFFREY E., H. Visualizing Data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **164**, 10 (2008).
244. BRITO, Â. *et al.* Bioprospecting Portuguese Atlantic coast cyanobacteria for bioactive secondary metabolites reveals untapped chemodiversity. *Algal Res.* **9**, 218-226 (2015).
245. ERNST, M. *et al.* MolNetEnhancer : Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. *Metabolites* **9**, 144 (2019).
246. BEAUXIS, Y. & GENTA-JOUVE, G. MetWork : a web server for natural products anticipation. *Bioinformatics* **35**, 1795-1796 (2019).
247. SCHÜLLER, A., SCHNEIDER, G. & BYVATOV, E. SMILIB : Rapid Assembly of Combinatorial Libraries in SMILES Notation. *QSAR Comb. Sci.* **22**, 719-721 (2003).
248. SECCO, R. D. S., DA SILVA, O. L. M. & CORDEIRO, I. A new combination in sagotia (Euphorbiaceae) with an updated key for the genus. *Phytotaxa* **394**, 225-229 (2019).
249. BAILLON, H. Species Euphorbiacearum. Euphorbiacées africaines. *Adansonia* **1**, 139-173 (1860).

250. WFO. *World Flora Online. Sagotia - Accepted name* 2019. <http://www.worldfloraonline.org/> (visité le 01/08/2019).
251. GBIF. *GBIF.org* 2019. www.gbif.org (visité le 01/08/2019).
252. WEBSTER, G. L. in *Flower. Plants. Eudicots Malpighiales* 51-216 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014).
253. DE ALVARENGA, M. A., GOTTLIEB, O. R. & MAGALHÃES, M. T. Methylphenanthrenes from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry* **15**, 844-845 (1976).
254. WFO. *World Flora Online. Sandwithia - Accepted name* 2019. <http://www.worldfloraonline.org/> (visité le 01/08/2019).
255. JACOBS, H. *et al.* Applications of 2d-nmr spectroscopy to phytochemical studies : Cyprenol and cyprenolic acid. *J. Nat. Prod.* **50**, 835-842 (1987).
256. LANJOUW, J. Contributions to the Flora of Tropical America : XI. *Bull. Misc. Inf. (Royal Bot. Gard. Kew)* **1932**, 183-187 (1932).
257. WURDACK, K. J., HOFFMANN, P. & CHASE, M. W. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences. *Am. J. Bot.* **92**, 1397-1420 (2005).
258. ARAI, Y. *et al.* Structure-activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1 (CBR1). *Fitoterapia* **101**, 51-56 (2015).
259. DONG, H. *et al.* Eicosenones and methylated flavonols from *Amomum koenigii*. *Phytochemistry* **50**, 899-902 (1999).
260. LU, K. *et al.* Regioselective iodination of flavonoids by N-iodosuccinimide under neutral conditions. *Tetrahedron Lett.* **54**, 6345-6348 (2013).
261. OLIVON, F. *et al.* Natural Inhibitors of the RhoA-p115 Complex from the Bark of *Meiogyne baillonii*. *J. Nat. Prod.* **81**, 1610-1618 (2018).
262. DAVID, F. *et al.* Synthesis of further lichen depsides. *Aust. J. Chem.* **46**, 301-313 (1993).
263. YANG, D. S. *et al.* Jatrophaolane-type diterpenes from *Euphorbia sikkimensis*. *J. Nat. Prod.* **76**, 265-269 (2013).
264. REMY, S. *et al.* Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry* **167**, 112101 (2019).
265. LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F. *et al.* Stictic Acid Derivatives from the Lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities. *J. Nat. Prod.* **70**, 1218-1220 (2007).
266. ZHU, J. Y. *et al.* Natural thioredoxin reductase inhibitors from *Jatropha integerrima*. *RSC Adv.* **5**, 47235-47243 (2015).
267. REMY, S. *et al.* Structurally Diverse Diterpenoids from *Sandwithia guyanensis*. *J. Nat. Prod.* **81**, 901-912 (2018).
268. LONG, L. *et al.* Novel bioactive phenanthrene derivatives from *Domohinea perrieri*. *Tetrahedron* **53**, 15663-15670 (1997).
269. SHI, J.-G. & JIA, Z.-J. Diterpenoids from *Euphorbia micractina*. *Phytochemistry* **38**, 1445-1447 (1995).
270. DUARTE, N. & FERREIRA, M. J. U. Lagaspholones A and B : Two new jatrophaolane-type diterpenes from *Euphorbia lagascae*. *Org. Lett.* **9**, 489-492 (2007).

271. NAENGCHOMNONG, W., THEBTARANONTH, Y., WIRIYACHITRA, P., OKAMOTO, K. T. & CLARDY, J. Isolation and structure determination of four novel diterpenes from *Jatropha curcus*. *Tetrahedron Lett.* **27**, 2439-2442 (1986).
272. SHI, J. G., JIA, Z. J., CUI, Y. X. & SHI, J. G. Novel tricyclic diterpenoids from *Euphorbia micractina*. *J. Nat. Prod.* **58**, 51-56 (1995).
273. TIAN, Y. *et al.* Diterpenoids with diverse skeletons from the roots of *Euphorbia micractina*. *J. Nat. Prod.* **76**, 1039-46 (2013).
274. NAENGCHOMNONG, W., THEBTARANONTH, Y., WIRIYACHITRA, P., OKAMOTO, K. T. & CLARDY, J. Isolation and structure determination of two novel Lathyrenes from *Jatropha Curcus*. *Tetrahedron Lett.* **27**, 5675-5678 (1986).
275. TANG, G. H. *et al.* Trigohowilols A-G, degraded diterpenoids from the stems of *Trigonostemon howii*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1962-1966 (2012).
276. NOTHIAS-SCAGLIA, L. F. *et al.* Insights on profiling of phorbol, deoxyphorbol, ingenol and jatrophone diterpene esters by high performance liquid chromatography coupled to multiple stage mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1422**, 128-139 (2015).
277. GERSHENZON, J. & DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 408-414 (2007).
278. LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids : a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* **20**, 58 (1994).
279. OBST, J. R. Special (Secondary) Metabolites from wood. *For. Prod. Biotechnol.* **10**, 151-165 (1998).
280. VALARES MASA, C., SOSA DÍAZ, T., ALÍAS GALLEGO, J. C. & CHAVES LOBÓN, N. Quantitative Variation of Flavonoids and Diterpenes in Leaves and Stems of *Cistus ladanifer* L. at Different Ages. *Molecules* **21**, 275 (2016).
281. GAO, J. & AISA, H. A. Terpenoids from *Euphorbia soongarica* and Their Multidrug Resistance Reversal Activity. *J. Nat. Prod.* **80**, 1767-1775 (2017).
282. GAO, J. *et al.* Diterpenoid constituents of *Euphorbia macrorrhiza*. *Phytochemistry* **122**, 246-253 (2016).
283. SHI, J.-G., JIA, Z.-J. & YANG, L. Diterpenoids from *Euphorbia micractina*. *Phytochemistry* **32**, 208-210 (1992).
284. VASAS, A., HOHMANN, J., FORGO, P. & SZABÓ, P. New tri- and tetracyclic diterpenes from *Euphorbia villosa*. *Tetrahedron* **60**, 5025-5030 (2004).
285. XU, J. J., FAN, J. T., ZENG, G. Z. & TAN, N. H. A new tetracyclic diterpene from *Jatropha curcas*. *Helv. Chim. Acta* **94**, 842-846 (2011).
286. SHI, Q.-W., SU, X.-H. & KIYOTA, H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chem. Rev.* **108**, 4295-4327 (2008).
287. HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1983).
288. BERA, A. K., KUHN, R. J. & SMITH, J. L. Functional characterization of cis and trans activity of the flavivirus NS2B-NS3 protease. *J. Biol. Chem.* **282**, 12883-12892 (2007).
289. PEYRAT, L. A. *et al.* Chemical diversity and antiviral potential in the pantropical *Diospyros* genus. *Fitoterapia* **112**, 9-15 (2016).

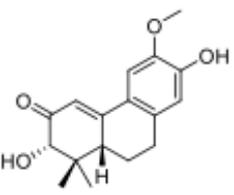
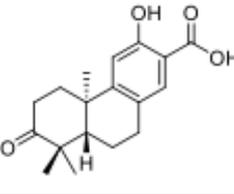
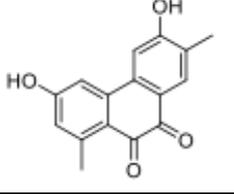
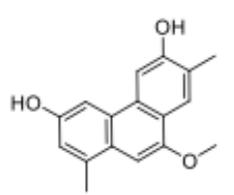
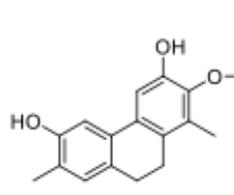
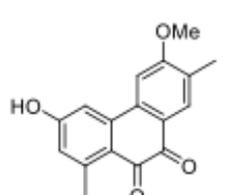
-
290. OLIVON, F. *et al.* Searching for original natural products by molecular networking : Detection, isolation and total synthesis of chloroaustralasines. *Org. Chem. Front.* **5**, 2171-2178 (2018).
291. MC PHERSON, G. & TIREL, C. *Flore de la Nouvelle-Calédonie et dépendances Vol. 14 Euphorbiaceae 1* (éd. MORAT, P. & MACKEE, H.) (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, 1987).
292. OVENDEN, S. P. *et al.* Actepphilol A and epiactepphilol A : Two novel aromatic terpenoids isolated from *Actephila excelsa*. *Tetrahedron Lett.* **42**, 7695-7697 (2001).
293. BOULTON, S. *et al.* Mechanisms of Specific versus Nonspecific Interactions of Aggregation-Prone Inhibitors and Attenuators. *J. Med. Chem.* **62**, 5063-5079 (2019).
294. FENG, B. Y. *et al.* A high-throughput screen for aggregation-based inhibition in a large compound library. *J. Med. Chem.* **50**, 2385-2390 (2007).
295. MCGOVERN, S. L., CASELLI, E., GRIGORIEFF, N. & SHOICHET, B. K. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J. Med. Chem.* (2002).
296. MCGOVERN, S. L., HELFAND, B. T., FENG, B. & SHOICHET, B. K. A Specific Mechanism of Nonspecific Inhibition. *J. Med. Chem.* **46**, 4265-4272 (2003).
297. OWEN, S. C., DOAK, A. K., WASSAM, P., SHOICHET, M. S. & SHOICHET, B. K. Colloidal aggregation affects the efficacy of anticancer drugs in cell culture. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1429-1435 (2012).
298. SEIDLER, J., MCGOVERN, S. L., DOMAN, T. N. & SHOICHET, B. K. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *J. Med. Chem.* **46**, 4477-4486 (2003).
299. RISHTON, G. M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discov. Today* **8**, 86-96 (2003).
300. COAN, K. E., MALTBY, D. A., BURLINGAME, A. L. & SHOICHET, B. K. Promiscuous aggregate-based inhibitors promote enzyme unfolding. *J. Med. Chem.* **52**, 2067-2075 (2009).
301. JADHAV, A. *et al.* Quantitative analyses of aggregation, autofluorescence, and reactivity artifacts in a screen for inhibitors of a thiol protease. *J. Med. Chem.* **53**, 37-51 (2010).
302. WALTERS, W. P., MURCKO, A. & MURCKO, M. A. Recognizing molecules with drug-like properties. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 384-387 (1999).
303. ACKER, M. G. & AULD, D. S. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspect. Sci.* **1**, 56-73 (2014).
304. COAN, K. E. D. & SHOICHET, B. K. Stability and equilibria of promiscuous aggregates in high protein milieus. *Mol. Biosyst.* **3**, 208-213 (2007).
305. POTISOPON, S., FERRON, F., FATTORINI, V., SELISKO, B. & CANARD, B. Substrate selectivity of Dengue and Zika virus NS5 polymerase towards 2'-modified nucleotide analogues. *Antiviral Res.* **140**, 25-36 (2017).
306. MCCHESENEY, J. D., VENKATARAMAN, S. K. & HENRI, J. T. Plant natural products : Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* **68**, 2015-2022 (2007).
307. FIRN, R. D. & JONES, C. G. A Darwinian view of metabolism : Molecular properties determine fitness. *J. Exp. Bot.* **60**, 719-726 (2009).

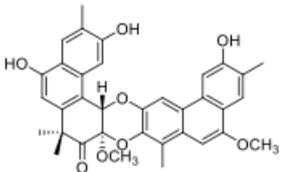
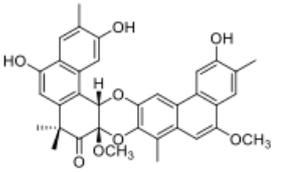
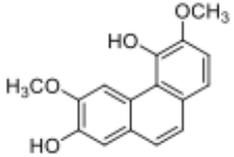
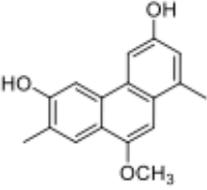
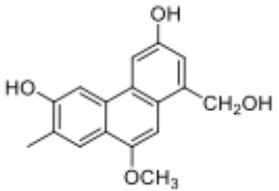
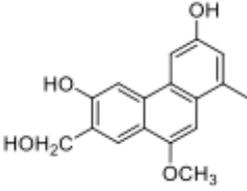
308. THORNBURG, C. C. *et al.* NCI Program for Natural Product Discovery : A Publicly-Accessible Library of Natural Product Fractions for High-Throughput Screening. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2484-2497 (2018).
309. MISHRA, B. B. & TIWARI, V. K. Natural products : An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4769-4807 (2011).
310. HAN, J. *et al.* Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Metabolomics* **4**, 128-140 (2008).
311. OLIVON, F. *Nouvelle stratégie de priorisation pour l'étude des produits naturels par l'approche des réseaux moléculaires multi-informatifs* thèse de doct. (Paris-Saclay, 2018).
312. JOHNSON, S. R. & LANGE, B. M. Open-access metabolomics databases for natural product research : Present capabilities and future potential. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 22 (2015).
313. FENG, Q. *et al.* Integrated metabolomics and metagenomics analysis of plasma and urine identified microbial metabolites associated with coronary heart disease. *Sci. Rep.* **6**, 22525 (2016).
314. BARTLETT, R. J. & MUSIAL, M. Coupled-cluster theory in quantum chemistry. *Rev. Mod. Phys.* **79**, 291-352 (2007).
315. SUN, J. *et al.* Accurate first-principles structures and energies of diversely bonded systems from an efficient density functional. *Nat. Chem.* **8**, 831-836 (2016).
316. DENCHEV, V. S. *et al.* What is the computational value of finite-range tunneling? *Phys. Rev. X* **6**, 031015 (2016).
317. WANG, H. *et al.* High-efficiency multiphoton boson sampling. *Nat. Photonics* **11**, 361-365 (2017).
318. Von LINNÉ, C. *Clavis medicinae* (éd. SALVIUS, L.) (Stockholm, 1766).
319. RUTZ, A. *et al.* Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation. *bioRxiv*, 702308 (2019).

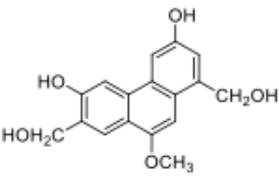
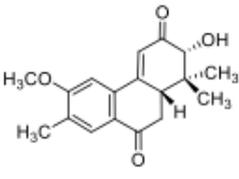
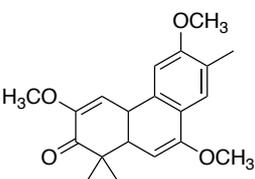
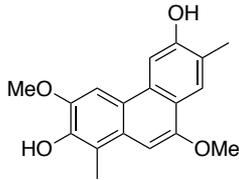
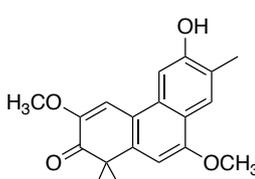
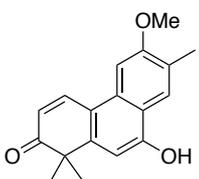
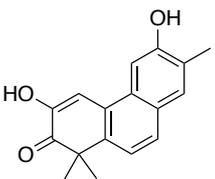
Annexes

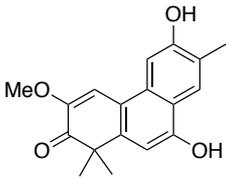
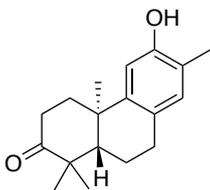
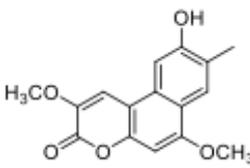
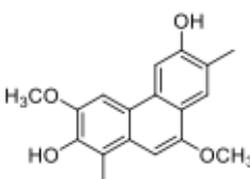
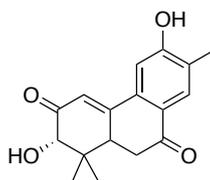
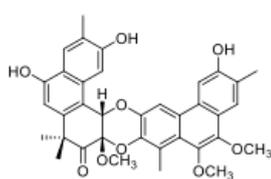
Phenanthrènes isolés d'Euphorbiaceae

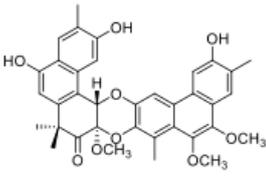
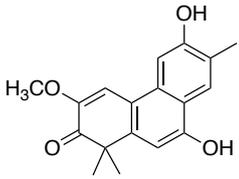
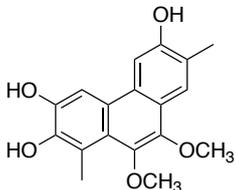
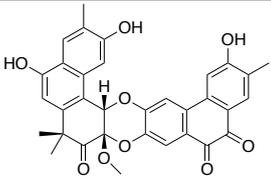
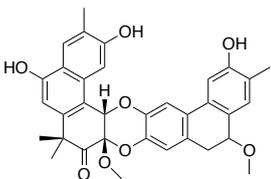
	Structure	Name	Species	Mass	Molecular formula	Reference
1		micrandrol A	<i>Micrandropsis scleroxylon</i>	238.10	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	(De Alvarenga and Gottlieb, 1974)
2		micrandrol B	<i>Micrandropsis scleroxylon</i>	240.12	C ₁₆ H ₁₆ O ₂	(De Alvarenga et al., 1976)(De Alvarenga and Gottlieb, 1974)
3		micrandrol C	<i>Micrandropsis scleroxylon</i>	270.07	C ₁₆ H ₁₆ O ₂	(De Alvarenga and Gottlieb, 1974)
4		micrandrol E	<i>Sagotia racemosa</i>	252.12	C ₁₇ H ₁₆ O ₂	(De Alvarenga et al., 1976)
5		micrandrol F	<i>Sagotia racemosa</i>	254.13	C ₁₇ H ₁₈ O ₂	(De Alvarenga et al., 1976)
6		compound 1	<i>Sandwithia guyanensis</i>	302.15	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	(Remy et al., 2018)

7		compound 2	<i>Sandwithia guyanensis</i>	288.14	C ₁₇ H ₂₀ O ₄	(Remy et al., 2018)
8		compound 3	<i>Sandwithia guyanensis</i>	302.15	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	(Remy et al., 2018)
9		neomacrodione	<i>Neoboutonia macrocalyx</i>	268.07	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	(Maffo et al., 2018)
10		compound 2	<i>Neoboutonia macrocalyx</i>	268.11	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	(Namukobe et al., 2015)
11		compound 10	<i>Neoboutonia macrocalyx</i>	270.13	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	(Namukobe et al., 2014)
12		manniorthoquinone	<i>Neoboutonia mannii</i>	282.09	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	(Tene et al., 2008)

13		acetphilol A	<i>Actephila excelsa</i>	580.21	C ₃₂ H ₃₂ O ₈	(Ovenden et al., 2001)
14		epiacetphilol A	<i>Actephila excelsa</i>	580.21	C ₃₅ H ₃₂ O ₈	(Ovenden et al., 2001)
15		crotoflavol	<i>Croton flavens</i>	270.09	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	(Eisenreich and Bracher, 2001)
16		compound 1	<i>Domohinea perrieri</i>	268.11	C ₁₇ H ₁₆ O ₃	(Long et al., 1997)
17		compound 2	<i>Domohinea perrieri</i>	284.10	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	(Long et al., 1997)
18		compound 3	<i>Domohinea perrieri</i>	284.10	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	(Long et al., 1997)

19		compound 4	<i>Domohinea perrieri</i>	300.10	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	(Long et al., 1997)
20		domohinone	<i>Domohinea perrieri</i>	300.14	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	(Long et al., 1997)
21		trigonostemone	<i>Trigonostemon reidioides</i>	328.17	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	(Kokpol et al., 1990)
22		trigonochinenes E	<i>Trigonostemon chinensis</i>	298.121	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	(Yin et al., 2008)
23		trigonostemon E	<i>Trigonostemon chinensis</i>	312.14	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	(Zhu et al., 2010)
24		trigohowilols A	<i>Trigonostemon howii</i>	282.13	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	(Tang et al., 2012b)
25		trigohowilols B	<i>Trigonostemon howii</i>	268.11	C ₁₇ H ₁₆ O ₃	(Tang et al., 2012b)

26		compound 9	<i>Trigonostemon howii</i>	298.12	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	(Tang et al., 2012b)
27		compound 10	<i>Trigonostemon howii</i>	272.18	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	(Tang et al., 2012b)
28		trigoflavidol C	<i>Trigonostemon flavidus</i>	286.08	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	(Tang et al., 2012a)
29		trigochinene E	<i>Trigonostemon flavidus</i>	298.12	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	(Tang et al., 2012a)
30		trigoxyphin G	<i>Trigonostemon xyphophylloides</i>	286.12	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	(Lin et al., 2010)
31		trigoxyphins V	<i>Trigonostemon lii</i>	610.22	C ₃₆ H ₃₄ O ₉	(Li et al., 2015)

32		trigoxyphins W	<i>Trigonostemon lii</i>	610.22	C ₃₆ H ₃₄ O ₉	(Li et al., 2015)
33		compound 2	<i>Trigonostemon lii</i>	298.12	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	(Hu et al., 2009)
34		thrigosomone B	<i>Trigonostemon lii</i>	314.12	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	(Hu et al., 2009)
35		acetphilol B	<i>Codiaeum peltatum</i>	581.18	C ₃₄ H ₂₈ O ₉	(Olivon et al., 2019)
36		acetphilol C	<i>Codiaeum peltatum</i>	595.23	C ₃₆ H ₃₅ O ₈	(Olivon et al., 2019)

References

- De Alvarenga, M.A., Gottlieb, O.R., 1974. Methyl- and methylthio-phenanthrenes from *Micrandropsis scleroxylon*. *Phytochemistry* 13, 1283–1288. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(74\)80119-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(74)80119-6)
- De Alvarenga, M.A., Gottlieb, O.R., Magalhães, M.T., 1976. Methylphenanthrenes from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry* 15, 844–845. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94480-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94480-7)
- Eisenreich, W.J., Bracher, F., 2001. Crotoflavol, a new phenanthrene from *Croton flavens*. *Nat. Prod. Lett.* 15, 147–150. <https://doi.org/10.1080/10575630108041272>
- 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., 2009. New phenanthrenes from *Trigonostemon lii* Y.T. Chang. *Tetrahedron Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.03.186>

- Kokpol, U., Thebpatiphat, S., Boonyaratavej, S., Chedchuskulchai, V., Ni, C.Z., Clardy, J., Chaichantipyuth, C., Chittawong, V., Howard Miles, D., 1990. Structure of trigonostemone, a new phenanthrene from the thai plant t *Trigonostemon reidioides*. J. Nat. Prod. 53, 1148–1151. <https://doi.org/10.1021/np50071a002>
- Li, S.F., He, H.P., Hao, X.J., 2015. Three new phenanthrene constituents from *Trigonostemon lii*. Nat. Prod. Res. 29, 1845–1849. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1009066>
- Lin, B.D., Han, M.L., Ji, Y.C., Chen, H.D., Yang, S.P., Zhang, S., Geng, M.Y., Yue, J.M., 2010. Trigoxypins A-G: Diterpenes from *Trigonostemon xyphophylloides*. J. Nat. Prod. 73, 1301–1305. <https://doi.org/10.1021/np100320h>
- Long, L., Lee, S.K., Chai, H.B., Rasoanaivo, P., Gao, Q., Navarro, H., Wall, M.E., Wani, M.C., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 1997. Novel bioactive phenanthrene derivatives from *Domohinea perrieri*. Tetrahedron 53, 15663–15670. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10058-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10058-8)
- Maffo, T., Melong, R., Nganteng, D.N.D., Wafo, P., Ali, M.S., Ngadjui, B.T., 2018. Neomacrodione: a new degraded diterpenoid from the roots of *Neoboutonia macrocalyx* Beng (Euphorbiaceae). Nat. Prod. Res. 32, 85–90. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1335729>
- Namukobe, J., Kiremire, B.T., Byamukama, R., Kasenene, J.M., Akala, H.M., Kamau, E., Dumontet, V., 2015. Antiplasmodial compounds from the stem bark of *Neoboutonia macrocalyx* pax. J. Ethnopharmacol. 162, 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.018>
- Namukobe, J., Kiremire, B.T., Byamukama, R., Kasenene, J.M., Dumontet, V., Guéritte, F., Krief, S., Florent, I., Kabasa, J.D., 2014. Cycloartane triterpenes from the leaves of *Neoboutonia macrocalyx* L. Phytochemistry 102, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.02.005>
- Olivon, F., Remy, S., Grelier, G., Apel, C., Eydoux, C., Guillemot, J.C., Neyts, J., Delang, L., Touboul, D., Roussi, F., Litaudon, M., 2019. Antiviral compounds from *Codiaeum peltatum* targeted by a multi-informative molecular networks approach. J. Nat. Prod. 82, 330–340. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00800>
- Ovenden, S.P.B., Yew, A.L.S., Glover, R.P., Ng, S., Rossant, C.J., Regalado, J.C., Soejarto, D.D., Buss, A.D., Butler, M.S., 2001. Actephilol A and epiactephilol A: Two novel aromatic terpenoids isolated from *Actephila excelsa*. Tetrahedron Lett. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01628-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01628-8)
- Remy, S., Olivon, F., Desrat, S., Blanchard, F., Eparvier, V., Leyssen, P., Neyts, J., Roussi, F., Touboul, D., Litaudon, M., 2018. Structurally Diverse Diterpenoids from *Sandwithia guyanensis*. J. Nat. Prod. 81, 901–912. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01025>
- Tang, G.H., Zhang, Y., Gu, Y.C., Li, S.F., Di, Y.T., Wang, Y.H., Yang, C.X., Zuo, G.Y., Li, S.L., He, H.P., Hao, X.J., 2012a. Trigoflavoids A-C, degraded diterpenoids with antimicrobial activity, from *Trigonostemon flavidus*. J. Nat. Prod. 75, 996–1000. <https://doi.org/10.1021/np3001128>
- Tang, G.H., Zhang, Y., Yuan, C.M., Li, Y., Gu, Y.C., Di, Y.T., Wang, Y.H., Zuo, G.Y., Li, S.L.S.F., Li, S.L.S.F., He, H.P., Hao, X.J., 2012b. Trigohowilols A-G, degraded diterpenoids from the stems of *Trigonostemon howii*. J. Nat. Prod. 75, 1962–1966. <https://doi.org/10.1021/np3006315>
- Tene, M., Tane, P., de Dieu Tamokou, J., Kuate, J.R., Connolly, J.D., 2008. Degraded diterpenoids from the stem bark of *Neoboutonia mannii*. Phytochem. Lett. 1, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.06.003>
- Yin, S., Su, Z.S., Zhou, Z.W., Dong, L., Yue, J.M., 2008. Antimicrobial diterpenes from *Trigonostemon chinensis*. J. Nat. Prod. 71, 1414–1417.

<https://doi.org/10.1021/np800256x>

Zhu, Q., Tang, C.P., Ke, C.Q., Li, X.Q., Liu, J., Gan, L.S., Weiss, H.C., Gesing, E.R., Ye, Y.,
2010. Constituents of *Trigonostemon chinensis*. J. Nat. Prod. 73, 40–44.

<https://doi.org/10.1021/np9006074>

Production scientifique

Congrès

- 67th International Congress of GA, Innsbrück (2019) : **communication orale** et poster, bourse de voyage
- 2nd international symposium AFERP-STOLON, Rennes (2018) : flash communication et poster, bourse de voyage
- Applied Natural Products, Palaiseau (2018) : poster
- Journées scientifiques du RFMF, Liège (2018) : poster, bourse de voyage
- Mass Spectrometry, Metabolomic and Proteomic Analysis (SMAPP), Disneyland Paris (2017) : **communication orale** et poster
- 5^{èmes} Journées Internationales de l'AFERP, Angers (2017) : flash communication et poster, bourse de voyage
- Journées de la chimiothèque nationale , Paris (2017) : flash communication
- Ecole printanière du RFMF, Saint Lambert des Bois (2017) : **communication orale**

Récompenses :

- Young Researcher Workshop Award Bionorica. Congrès annuel du GA (2019)
- Prix des Sciences Végétales de l'Académie Nationale de Pharmacie. (2018)
- Meilleure flash communication de la Journée Annuelle de la Chimiothèque Nationale. (2017)
- Meilleure flash communication du Symposium AFERP-STOLON. (2018)

Enseignement : introduction aux réseaux moléculaires

- 1 journée, ICSN (5 étudiants et 1 chercheur)
- 5 jours, Institut de Biochimie Marine, Hanoi, Vietnam (8 chercheurs)

Publications : Cette thèse a permis la publication de 4 articles scientifiques, dont la première page est présentée ci-après :

- Remy, S., and Litaudon, M. Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbiaceae as A Source of Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *Molecules*, **2019** 24 (12), 2336.
- Remy, S., Olivon, F., Desrat, S., Blanchard, F., Eparvier, V., Leyssen, P., Neyts, J., Roussi, F., Touboul, D. and Litaudon, M. Structurally Diverse Diterpenoids from *Sandwithia guyanensis* *J. Nat. Prod.* **2018**, 81 (4) 901-912.
- Remy, S., Solis, D., Silland, P., Neyts, J., Roussi, F., Touboul, D., and Litaudon, M. (2019). Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry*, **2019** 167, 112101.

- Olivon, F. ; Remy, S. ; Apel, C. ; Eydoux, C. ; Guillemot, J-C. ; Neyts, J. ; Delang, L. ; Touboul, D. ; Roussi, F. and Litaudon, M. Antiviral Compounds from *Codiaeum peltatum* Targeted by Multi-informative Molecular Networks Approach *J. Nat. Prod.* **2019** 82 (2) 330-340.

Review

Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbiaceae as A Source of Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication

Simon Remy  and Marc Litaudon * 

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS ICSN, UPR 2301, Université Paris Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France; simon.remy@cnrs.fr

* Correspondence: marc.litaudon@cnrs.fr; Tel.: +33-1-6982-3085

Academic Editor: Raphaël E. Duval

Received: 3 June 2019; Accepted: 19 June 2019; Published: 25 June 2019



Abstract: Macrocyclic diterpenoids produced by plants of the Euphorbiaceae family are of considerable interest due to their high structural diversity; and their therapeutically relevant biological properties. Over the last decade many studies have reported the ability of macrocyclic diterpenoids to inhibit in cellulo the cytopathic effect induced by the chikungunya virus. This review; which covers the years 2011 to 2019; lists all macrocyclic diterpenoids that have been evaluated for their ability to inhibit viral replication. The structure–activity relationships and the probable involvement of protein kinase C in their mechanism of action are also detailed.

Keywords: chikungunya; Euphorbiaceae; phorbol; tigiane; daphnane; ingenane; jatrophane; pre-myrsinane; flexibilane; PKC

1. Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthropod-borne virus causing an infectious disease characterized by fever, arthralgia and, sometimes, a maculopapular rash [1]. Despite high morbidity rate, there is currently no approved vaccine or antiviral treatment. Different classes of compounds that target either a viral or a host factor have been reported to inhibit CHIKV replication in vitro [2], but none have progressed to further development. The development of potent antiviral drugs against CHIKV is, therefore, urgently needed.

Plant species of the Euphorbiaceae family are known to produce a vast array of macrocyclic diterpenoids. They possess various types of carbon skeletons (e.g., jatrophane, lathyrane, myrsinane, ingenane, tigiane, daphnane etc.), many of which are unique to this large plant family [3,4]. The genus *Euphorbia*, which includes more than 2000 species, alone provided several hundred macrocyclic diterpenoids, representative of more than 20 skeletal types [5,6]. With regard to their biogenesis, these compounds also called lower diterpenoids are formed by a head-to-tail cyclization of a tetraprenylphosphate precursor through the agency of a type I cyclase, leading to the formation in a step-wise fashion of the monocyclic cembranes, the bicyclic casbanes and the tricyclic lathyrane derivatives, the latter may lead to jatrophane after cyclopropane ring opening [7]. From a structural standpoint phorboids, i.e., tiglianes, daphnanes, ingenanes and rhamnopholanes, are polycyclic diterpenoids but are biogenetically derived from macrocyclic precursors. However, Appendino pointed out that the relationship between macrocyclic diterpenoids and phorboids has remained a mechanistic black box, despite obvious structural similarities between the lathyrane and the tigiane skeletons [7].

Macrocyclic diterpenoids are of considerable interest due to their therapeutically relevant biological properties, one of the most widely described being their ability to modulate protein kinase C (PKCs)

Structurally Diverse Diterpenoids from *Sandwithia guyanensis*

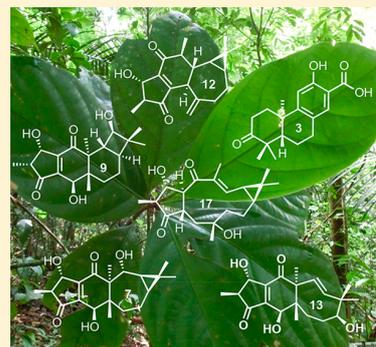
Simon Remy,[†] Florent Olivon,[†] Sandy Desrat,[†] Florent Blanchard,[†] Véronique Eparvier,^{†,‡} Pieter Leyssen,[§] Johan Neyts,[§] Fanny Roussi,^{†,‡} David Touboul,^{†,‡} and Marc Litaudon^{*,†,‡}

[†]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS ICSN, UPR 2301, University of Paris Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[§]Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Supporting Information

ABSTRACT: Bioassay-guided fractionation of an EtOAc extract of the trunk bark of *Sandwithia guyanensis*, using a chikungunya virus (CHIKV)-cell-based assay, afforded 17 new diterpenoids 1–17 and the known jatrontelones A and C (18 and 19). The new compounds included two tetranorditerpenoids 1 and 2, a trinorditerpenoid 3, euphoractines P–W (4–11), and euphactine G (13) possessing the rare 5/6/7/3 (4–7), 5/6/6/4 (8–11), and 5/6/8 (13) fused ring skeletons, sikkimenoid E (12), and jatrontelones J–M (14–17) possessing jatropholane and lathyrane carbon skeletons, respectively. Jatrontelones J (14) and M (17) represent the first naturally occurring examples of C-15 nonoxidized lathyrane-type diterpenoids. The structures of the new compounds were elucidated by NMR spectroscopic data analysis. The relative configuration of compound 16 and the absolute configurations of compounds 3–6 and 14 were determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. In addition, jatrontelone K (15) was chemically transformed to euphoractine T (8) supporting the biosynthetic relationships between the two types of diterpenoids. Only compound 15 showed a moderate anti-CHIKV activity with an EC₅₀ value of 14 μM. Finally, using a molecular networking-based dereplication strategy, several close analogues of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), one of the most potent inhibitors of CHIKV replication, were dereplicated.



As part of an ongoing program aiming at the discovery of novel inhibitors of chikungunya virus (CHIKV) replication from plants of the Euphorbiaceae family, the species *Sandwithia guyanensis* Lanj. was selected for in-depth chemical investigation. The EtOAc extract of the trunk bark showed a significant antiviral activity (EC₅₀ = 7.9 μg/mL). *S. guyanensis* is an endemic species of the Guyana plateau region, belonging to a genus including only two species.¹ *S. guyanensis* has only been chemically investigated once in 1987, leading to the isolation of two sesquiterpenoids, cyperenol and cyperenoic acid, from the root wood and bark.²

RESULTS AND DISCUSSION

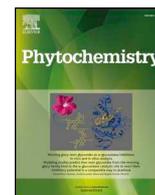
The bioassay-guided fractionation of the EtOAc extract of the trunk bark of *S. guyanensis* led to the isolation of 19 diterpenoids of six different structural types. The EtOAc extract was first suspended in *n*-heptane and partitioned with MeCN to yield an MeCN soluble extract. This sample was subjected to a normal-phase flash chromatography, yielding 19 fractions (F1–F19). Based on their strong anti-CHIKV activity (0.6 < EC₅₀ < 8 μg/mL) fractions F3–F5, F10, F11, and F13–F15, along with fraction F6 (EC₅₀ > 100 μg/mL) were purified using semipreparative and/or analytical RP-HPLC to yield 17 new compounds 1–17: three degraded diterpenoids 1–3; euphoractines P–W (4–11), sikkimenoid E (12), euphactine G (13), and jatrontelones J–M (14–17); and the known jatrontelones A (18) and C (19). The structural elucidations of these

compounds were performed via NMR and MS data analysis. The relative configuration of compound 16 and the absolute configurations of compounds 3–6 and 14 were determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. The structures of jatrontelones A (18) and C (19) were elucidated through comparison with literature data.³ The ¹H and ¹³C NMR data of new compounds 1–17 are reported in Tables 1–5.

The HRESIMS of compound 1 showed a sodium adduct ion at *m/z* 325.1422 [M + Na]⁺ (calcd for 325.1410) consistent with a molecular formula, C₁₈H₂₂O₄, indicating eight indices of hydrogen deficiency. Analysis of NMR spectroscopic data indicated that 1 was a phenanthrene-type diterpenoid structurally close to domohinone isolated from *Domohinea perrieri*.⁴ Its ¹³C NMR spectrum accounted for 18 carbon resonances, comprising one carbonyl, eight aromatic/olefinic carbons, two methyl and two methoxy groups, an aliphatic CH and two aliphatic CH₂, an oxymethine, and a quaternary carbon (Table 1). However, when compared with domohinone, no ketocarbonyl at C-7 was detected, and compound 1 displayed a methoxy group at C-13 (δ_C 56.1; δ_H 3.89) instead of a methyl group in domohinone. The complete assignments of the ¹H and ¹³C NMR spectra of 1 were done by COSY, HSQC, and HMBC NMR experiments as shown in Figure 1. The relative

Received: December 5, 2017

Published: March 1, 2018



Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from *Sagotia racemosa*

Simon Remy^a, Deyvis Solis^a, Pierre Silland^b, Johan Neyts^c, Fanny Roussi^a, David Touboul^a, Marc Litaudon^{a,*}

^a Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS ICSN, UPR 2301, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette, France

^b 97351, Matoury, Guyane Française, France

^c Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, 3000, Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

Sagotia racemosa
Euphorbiaceae
Phenanthrenes
Phorbols
Chikungunya
Feature-based molecular networking
Network annotation propagation

ABSTRACT

In an effort to identify inhibitors of Chikungunya virus (CHIKV) replication, a systematic study of 594 extracts of plant species originating from the French Guiana plateau region was performed in a virus-cell-based assay for CHIKV assay. The extract obtained from the stem bark of *Sagotia racemosa* was selected for its potent antiviral activity. Using a classical bioassay-guided procedure, three undescribed degraded diterpenoids, *i.e.* trigohowilols C and D and trigoflavolidol D, as well as trigoxyphin K, stictic acid, hyperhomosekikaic acid and five known flavonoids were isolated. The structures of these compounds were elucidated by extensive NMR spectroscopic data analysis. Although trigohowilols C and D were isolated from the most active fraction they didn't show any antiviral activity. By using the Feature-Based Molecular Networking (FBMN) and Network Annotation Propagation (NAP) workflows, it has been shown that the strong anti-CHIKV activity found for this fraction might be due to the presence of analogues of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), one of the most potent inhibitors of CHIKV replication identified to date.

1. Introduction

As part of our ongoing program aiming at the discovery of inhibitors of chikungunya virus (CHIKV) replication (Bourjot et al., 2012a, 2012b; Corlay et al., 2014; Nothias-Scaglia et al., 2015a; Remy et al., 2018) from plants originating from the French Guiana plateau region, we selected the species *Sagotia racemosa* Baill. (Euphorbiaceae) for in-depth chemical investigation, from which the EtOAc extract of the trunk bark showed the most potent antiviral activity. *S. racemosa* is an endemic species belonging to a genus including only two species, *S. racemosa* and *S. brachysepala* (Müll.Arg) Secco ("World Flora Online", n. d.). *S. racemosa* has only been chemically investigated once in 1976 leading to the isolation of two phenanthrene-type diterpenoids from the trunk wood (De Alvarenga et al., 1976).

The chemical study of *S. racemosa* was also of chemotaxonomic relevance since this species is phylogenetically very close to *Sandwithia guyanensis* (Wurdack et al., 2005). The two species, which can be considered as "sister" species (bootstrap percentage is 92% in the Bayesian analysis) cohabit in same biotopes and are particularly difficult to discriminate in the field even in case of the presence of fruits or flowers. Moreover, many misidentifications can be found on the herbaria stored at the IRD Cayenne Herbarium ("Herbier de Guyane," n. d.), one species being quite regularly confused with the other.

The present report describes the bioassay-guided isolation and structural elucidation of three phenanthrene derivatives, trigohowilols C and D (**1** and **2**) and trigoflavolidol D (**3**), stictic acid, hyperhomosekikaic acid, trigoxyphin K and five known flavonoids from the stem bark of *S. racemosa*. In addition, the identification of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) analogues by a molecular networking approach could explained the strong anti-CHIKV activity of the crude extract.

2. Results and discussion

A total of 577 EtOAc extracts previously filtered on polyamide cartridge and 17 alkaloids extracts obtained from different parts of 324 plant species collected in French Guiana were screened in a CHIKV virus-cell-based assay. The extracts were prepared from bark or twigs (46%), leaves (38%), fruits or flowers (9%), whole plants (6%), and roots (1%). From the 594 organic extracts tested, approximately 10% showed potent anti-CHIKV activities, with EC₅₀ values < 10 µg/mL, of which the EtOAc bark extract of *S. racemosa* exhibited the most potent activity with an EC₅₀ value of 0.8 µg/mL. To remove the lipid part, this extract was first suspended in n-heptane and partitioned with CH₃CN to yield an CH₃CN soluble extract. This sample was subjected to a normal-phase flash chromatography to afford 12 fractions (F1–F12). Based on

* Corresponding author.

E-mail address: marc.litaudon@cnrs.fr (M. Litaudon).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112101>

Received 10 May 2019; Received in revised form 20 August 2019; Accepted 21 August 2019

0031-9422/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

Antiviral Compounds from *Codiaeum peltatum* Targeted by a Multi-informative Molecular Networks Approach

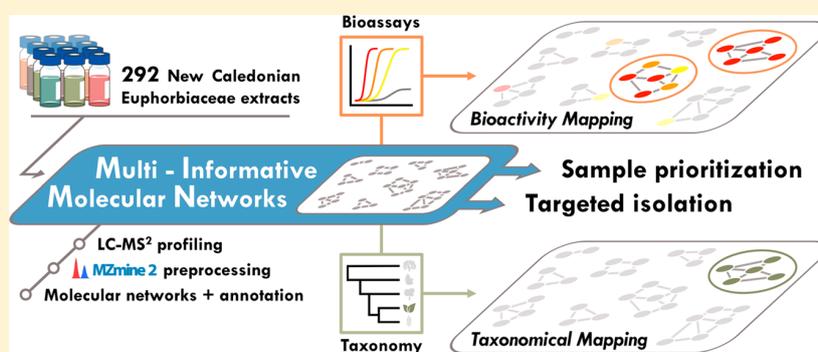
Florent Olivon,[†] Simon Remy,[†] Gwendal Grelier,[†] Cécile Apel,[†] Cécilia Eydoux,[‡] Jean-Claude Guillemot,[‡] Johan Neyts,[§] Leen Delang,[§] David Touboul,[†] Fanny Roussi,[†] and Marc Litaudon^{*,†}

[†]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS-ICSN, UPR 2301, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette, France

[‡]Aix Marseille University, CNRS, AFMB, AD2P, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France

[§]Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Supporting Information



ABSTRACT: From a set of 292 Euphorbiaceae extracts, the use of a molecular networking (MN)-based prioritization approach highlighted three clusters (MN1–3) depicting ions from the bark extract of *Codiaeum peltatum*. Based on their putative antiviral potential and structural novelty, the MS-guided purification of compounds present in MN1 and MN2 afforded two new daphnane-type diterpenoid orthoesters (DDO), codiapeltines A (1) and B (2), the new acetphilols B (3) and C (4), and four known 1,4-dioxane-fused phenanthrene dimers (5–8). The structures of the new compounds were elucidated by NMR spectroscopic data analysis, and the absolute configurations of compounds 1 and 2 were deduced by comparison of experimental and calculated ECD spectra. Codiapeltine B (2) is the first daphnane bearing a 9,11,13-orthoester moiety, establishing a new major structural class of DDO. Compounds 1–8 and four recently reported monoterpenyl quinolones (9–12) detected in MN3 were investigated for their selective activities against chikungunya virus replication and their antipolymerase activities against the NS5 proteins of dengue and zika viruses. Compounds 3–8 exhibited strong inhibitory activities on both dengue and zika NS5 in primary assays, but extensive biological analyses indicated that only acetphilol B (3) displayed a specific interaction with the NS5 targets.

Recent outbreaks of chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), and zika (ZIKV) massive epidemics highlighted the worldwide public health threat that emerging and reemerging viruses represent.¹ These viruses, which belong to the *Alphavirus* (CHIKV) and *Flavivirus* (ZIKV and DENV) genera, are responsible for severe infectious diseases associated with fever, rashes, and headache.^{2,3} ZIKV is also associated with neurological disorders such as Guillain-Barre syndrome and other congenital syndromes in newborns such as microcephaly.^{4–6} In *Flaviviruses*, the nonstructural protein 5 (NS5) polymerase plays an essential role in viral replication.^{7–9} Since DENV and ZIKV NS5 proteins harbor highly similar RdRp domains, these enzymes are considered as targets of particular interest in the prospect of discovering dual inhibitors.¹⁰ The discovery of such dual inhibitors could be particularly relevant given that the similarity of dengue and zika

symptoms renders their differential diagnosis difficult.^{11,12} In order to identify novel CHIKV inhibitors, several Euphorbiaceae species have been investigated in the past few years using bioassay-guided purification procedures. This has resulted in the isolation of tigliane, jatrophone, flexibilane, daphnane, and myrsinane diterpenoids showing micro- to nanomolar range activities.^{13–19} However, bioassay-guided fractionation has several limitations. As a noteworthy example, its workflow, which relies on bioactivity concerns only, does not take full advantage of the inherent structural diversity embedded in crude extract collections. Thus, this approach frequently leads to the reisolation of known bioactive compounds or analogues

Received: September 20, 2018

Published: January 25, 2019

Titre : Diversité chimique et potentialités antivirales d'Euphorbiacées tropicales

Mots clés : chikungunya, zika, dengue, réseaux moléculaire, euphorbiaceae, phytochimie

Résumé : Dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs du chikungunya (CHIKV), de la dengue (DENV) et du zika (ZIKV), une étude systématique portant sur 339 extraits d'Euphorbiaceae tropicales a été réalisée grâce à un test cellulaire d'inhibition du CHIKV et à des tests d'inhibition de l'ARN-polymérase de DENV et ZIKV. *Sandwithia guyanensis* et *Sagotia racemosa*, deux espèces guyanaises, dont les extraits d'écorce présentaient une forte activité anti-CHIKV, ont d'abord été étudiées. À la suite d'un processus d'isolement bioguidé classique, plus de 20 nouveaux diterpènes ont été caractérisés, mais aucun d'entre eux ne présentait une activité antivirale significative. Pour résoudre ce problème, des réseaux moléculaires (MN) ont été construits grâce aux données de LC-MS/MS obtenues à partir des fractions chromatogra-

phiques des deux extraits. L'annotation des MN, a permis l'identification d'analogues du phorbol, connus pour être de puissants inhibiteurs du CHIKV. Présents à l'état de traces, ces composés fournissent une explication plausible à l'activité anti-CHIKV des deux extraits. Dans une deuxième étude, une stratégie de priorisation des extraits de plantes basée sur la fusion de données taxonomiques et d'essais biologiques au sein d'un MN a conduit à l'isolement et à la caractérisation ciblée de plusieurs inhibiteurs doubles de *Codiaeum peltatum*. Les deux études illustrent comment les MN et les progrès récents en matière d'annotation des données de LC-MS/MS peuvent être mis en œuvre dans les études phytochimiques pour améliorer le processus découverte de composés bioactifs.

Title : Chemical diversity and antiviral potential of tropical Euphorbiaceae

Keywords : chikungunya, zika, dengue, molecular networking, euphorbiaceae, phytochemistry

Abstract : In order to identify new inhibitors of chikungunya (CHIKV), dengue fever (DENV) and zika (ZIKV), systematic study with 339 extracts from tropical Euphorbiaceae species was performed in a virus-cell-based assay for CHIKV and DENV and ZIKA NS5 inhibition assays. The French Guianese species *Sandwithia guyanensis* and *Sagotia racemosa*, from which bark extracts exhibited significant anti-CHIKV activities, were first investigated. Following a classical bioguided isolation workflow, more than 20 new diterpenes were characterized but none of them showed significant antiviral activity. To address this issue, molecular networks (MN) were built from the LC-MS/MS data acquired from the chromatographic fractions of

both extracts. The annotation the MNs led to the identification of phorbol analogues, known to be potent CHIKV inhibitors. Present at trace levels, these compounds provide a plausible explanation for the anti-CHIKV activity of both extracts. In a second study, a strategy to prioritize plant extracts based on the fusion of taxonomic data and bioassays within a MN led to the isolation and targeted characterization of several dual inhibitors from *Codiaeum peltatum*. Both studies illustrate how MN and recent advances in LC-MS/MS data annotation can be implemented in phytochemical studies to improve the bioactive compounds discovery process.



