



**HAL**  
open science

# Etude de l'activité antivirale d'extraits d'Euphorbia de Corse : recherche de nouveaux diterpènes d'intérêt biologique

Louis-Félix Nothias-Scaglia

► **To cite this version:**

Louis-Félix Nothias-Scaglia. Etude de l'activité antivirale d'extraits d'Euphorbia de Corse : recherche de nouveaux diterpènes d'intérêt biologique. Autre. Université Pascal Paoli, 2015. Français. NNT : 2015CORT0015 . tel-03377692

**HAL Id: tel-03377692**

**<https://theses.hal.science/tel-03377692v1>**

Submitted on 14 Oct 2021

**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.



**UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI**  
**ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE**  
**UMR CNRS 6134 (Science pour l'Environnement)**



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR EN CHIMIE**  
**Mention : Chimie analytique et organique**

**Soutenue publiquement par**  
**Louis-Félix NOTHIAS-SCAGLIA**  
le 7 décembre 2015

---

**Etude de l'activité antivirale d'extraits d'*Euphorbia* de Corse :  
recherche de nouveaux diterpènes d'intérêt biologique**

---

**Directeur(s) :**

Mr Jean COSTA, Professeur Université de Corse Pascal Paoli  
Mr Marc LITAUDON, Dr-HDR, CNRS-ICSN

**Rapporteurs :**

Mr Giovanni Battista APPENDINO, Professeur, Università degli Studi del  
Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" (Italie)  
Mr Olivier LAPREVOTE, Professeur, Université Paris Descartes

**Jury**

Mme Sophie TOMASI, Professeure, Université Rennes 1  
Mr Giovanni Battista APPENDINO, Professeur, Università degli Studi del  
Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" (Italie)  
Mr Olivier LAPREVOTE, Professeur, Université Paris Descartes  
Mr Alain MUSELLI, Professeur, Université de Corse  
Mr Marc LITAUDON, Dr-HDR, CNRS Gif-sur-Yvette  
Mr Julien PAOLINI, Dr-HDR, Université de Corse









## Résumé

Le chikungunya est une maladie transmise par des moustiques du genre *Aedes* (dont *A. albopictus*, dit "moustique tigre"). Cette maladie provoque d'intenses fièvres et des douleurs articulaires chroniques fortement invalidantes. Les moustiques potentiellement vecteurs du virus du chikungunya (CHIKV) sont des espèces invasives qui, à la faveur du réchauffement climatique, se sont récemment implantés dans plusieurs régions du monde, dont la région méditerranéenne. Sa présence constitue un terreau favorable à la survenue d'épidémie. A l'heure actuelle, il n'existe ni vaccin, ni traitement médicamenteux efficace. Toutefois, des articles scientifiques ont récemment rapporté que des esters de diterpène isolés du genre *Trigonostemon* (Euphorbiaceae), avaient une activité inhibitrice de la réplication du CHIKV.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, des extraits de plantes du genre *Euphorbia* de Corse ont été étudiés dans le but d'isoler de nouvelles molécules douées d'activité antivirale sur la réplication du CHIKV. En collaboration avec le Dr. P. Leyssen (KU Leuven, Belgique), l'évaluation de l'activité anti-CHIKV de 45 extraits, obtenus à partir de 11 Euphorbiaceae de Corse, a permis de mettre en évidence la forte activité inhibitrice et sélective des extraits d'espèces du genre *Euphorbia in cellulo*. L'activité antivirale d'une série de 27 diterpènes de type phorboïde, disponibles commercialement, a également été étudiée. Les résultats ont montré que certains dérivés avaient une forte activité inhibitrice de la réplication du CHIKV, mais aussi sur celle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ces études ont permis d'une part, de déduire des relations structure-activité inédites et d'autre part, de soutenir l'hypothèse d'un mécanisme d'action anti-CHIKV impliquant la modulation des protéines kinases C (PKCs) par les phorboïdes. Dans le but de confirmer ou d'infirmer la présence des phorboïdes dans les extraits d'*Euphorbia*, une première méthode utilisant la chromatographie liquide (LC) haute performance couplée à un spectromètre de masse à trappe d'ions ( $MS^n$ ), a été développée à partir des composés standards. L'application de cette méthodologie a révélé qu'aucun des phorboïdes ciblés n'était présent dans les extraits d'*Euphorbia*. Ainsi, une seconde procédure LC- $MS^n$  a été mise en œuvre afin de détecter - de manière non ciblée - différents types d'esters diterpéniques. L'utilisation de cette approche a révélé que de nombreux diterpènes, non-apparentés aux phorboïdes, étaient présents dans les extraits. Un extrait de l'espèce *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* a été sélectionné pour réaliser un fractionnement bio-guidé, aboutissant à l'isolement et l'identification de 14 esters de jatrophane, dont neuf nouveaux composés. Parmi eux, l'un s'est avéré inhiber la réplication du CHIKV et du VIH. Par ailleurs, la structure d'un ester de jatrophane atypique, le jatrohémicétal, a été élucidée grâce à une approche originale combinant modélisation moléculaire et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Enfin, une nouvelle procédure de purification ciblée par spectrométrie de masse tandem (MS/MS) en chromatographie en phase fluide supercritique (SFC) a été développée et appliquée sur des fractions bioactives d'*E. amygdaloïdes* subsp. *semiperfoliata*. L'interprétation des données MS/MS s'est appuyée sur la génération de réseaux moléculaires. Par cette méthodologie, quatre nouvelles molécules ont pu être détectées, purifiées et identifiées ; il s'agit de deux nouveaux esters de jatrophane et de quatre esters dérivés du 4-déoxyphorbol. L'activité anti-VIH des constituants isolés a également pu être explorée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Alcamí (CNM, Espagne). Ainsi, l'un des esters de 4-déoxyphorbol s'est révélé être doué d'un exceptionnel pouvoir inhibiteur de la réplication du VIH-1 ( $IC_{50} = 8$  nM et index de sélectivité  $> 6250$ ). Son mécanisme d'action semble s'apparenter à celui de la prostratine (molécule antivirale de référence) mais avec des propriétés antivirales environ 28 fois supérieur. Un deuxième ester de 4-déoxyphorbol s'est avéré être un des plus puissants inhibiteurs du CHIKV isolé à ce jour ( $EC_{50} = 0,34 \pm 0,12$   $\mu$ M and SI  $> 638$ ).

**Mots clés :** *Euphorbia*, activité antivirale, chikungunya, diterpène, spectrométrie de masse

## Abstract

Chikungunya fever is caused by an arthropod-borne virus that is associated with massive epidemics and severe morbidity (virus-induced arthralgia, fever, myalgia and rashes). Worldwide expansion of the mosquito vectors, such as *Aedes albopictus* ("Tiger mosquito") is responsible for the spread of Chikungunya virus (CHIKV) throughout the world. *A. albopictus* has spread throughout Mediterranean areas, which could lead to epidemics outbreaks. Currently, no antiviral drugs or vaccines are available for the treatment or prevention of CHIKV infection. Since ten years, however, recent results showed that diterpene esters from *Trignostemon* (Euphorbiaceae) possess inhibiting activity of CHIKV replication.

With the objective to discover new compounds with antiviral activities, 45 extracts from various plant parts of 11 Euphorbiaceae species native to Corsica were evaluated for selective inhibition of CHIKV replication. In collaboration with Dr. Leyssen (KU Leuven, Belgium), several extracts made from 10 *Euphorbia* species exhibited significant and selective anti-CHIKV activity in a virus-cell-based assay. The antiviral activities of 29 commercially available phorboids were studied. Some phorboids were potent inhibitors of CHIKV and human immunodeficiency virus (HIV) replication. Results allowed drawing new structure-activity relationships, which supported the hypothesis that PKC may be an important target in CHIKV replication. In order to confirm or infirm the presence of phorboids with anti-CHIKV activity in *Euphorbia* extracts, a liquid chromatography (LC) coupled to linear ion trap mass spectrometry (MS<sup>n</sup>) method was developed using standard compounds. Application of this methodology indicated that none anti-CHIKV phorboids was present in *Euphorbia* extracts. A second LC-MS<sup>n</sup> procedure was developed to profile untargeted phorboids. Results suggested that numerous other diterpene esters were present in the *Euphorbia* extracts. The species *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was selected to perform a bioassay-guided purification procedure, which led to the isolation and identification of 14 jatrophone esters, including eight new components. Among them, antiviral evaluation indicated that one jatrophone ester was possessing anti-CHIKV and anti-HIV activities. Furthermore, the structure of an atypical jatrophone ester derivative, jatrohemiketal, was determined unambiguously through an original strategy combining NMR spectroscopy and molecular modeling. Finally, an original tandem mass spectrometry (MS/MS)-targeted supercritical fluid chromatography (SFC) method was developed and used to study bioactive fractions of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata*. The MS/MS data were analyzed by molecular networking. Thanks to this approach, four 4-deoxyphorbol esters and two new jatrophone esters were targeted, isolated and identified. Collaboration with the group of Pr. Alcamí (CNM, Espagne) was started to explore the anti-HIV properties of the isolated diterpene esters. Thus, one compound derived from 4-deoxyphorbol esters proved to possess a potent inhibiting activity of HIV-1 replication (IC<sub>50</sub> = 8 nM, and selectivity index > 6250). The investigation of the mechanism of this component indicated that it acted like prostratin, but with antiviral effect more than 28-fold. Furthermore, the evaluation of the anti-CHIKV activity indicated that another 4-deoxyphorbol derivative was one of the strongest inhibitor of CHIKV replication isolated up to date (EC<sub>50</sub> = 0.34 ± 0.12 μM and selectivity index > 638).

**Keywords:** *Euphorbia*, antiviral, chikungunya, diterpene, mass spectrometry

## Riasuntu

U scicungunià hè una malatia trasmessa da e zinzale di genaru *Aedes* (chì ne face aucu parte *Aedes albopictus* detta "rinzala tigru"). Issa malatia pruvoca febbre intense è dulori articulari invalidenti. Cù l'arrughjunera ricente d'*Aedes albopictus* in parechje regioni di u mondu, epidemie massicce si sò sviluppate stultimi anni. A l'ora d'avà, ùn esiste nè vaccini, nè trattamenti medicinosi efficaci.

Da una decina d'anni, a presenza cuntinua di a zinzala tigru in Corsia è in Mediterraniu impenserisce assai chì offre un locu prupiziu a u sbocca d'epidemie. Ghjè in quessu u cuntestu, ch'ellu hè statu realizatu, u studiu di l'attività antivirale di a pianta di u genaru *Euphorbia*. Hà fattu l'obbiettu d'una cullabarazione trà u labburatoriu di Chimia di i Prudutti Naturali (Università di Corsica / CNRS) è l'Istitutu di Chimia di e Sustanze Naturali (CNRS). I risultati hanu palisatu chì i stratti d'*Euphorbia* di Corsica inibbianu a replicazione di u viru in e cellule infettate. U studiu di a cumposizione chimica di a spezia *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* hà permessu d'isulà è d'identificà molecole diterpenniche, chì quatordecì d'elle sò discritte pè a prima volta. Trà isse molecole un derivatu numatu 4-dPE A hè statu isulatu per mezu d'una avvicinata nuvatrice aduprendu a crumattograffia in fasa fluida supercritica (una tennica rispesttuosa di l'ambiente) è u trattamentu statiticu di i dati di a spettrometria di massa. A molecula 4-dPE A hà manifesteghja un attività antivirale furtussima, à tempu contra à u viru di u scicungunià, ma dinù contra à u viru di l'immunodefienza umana (VIH). L'invisticata di u mecanisimu d'azione antivirale indetta chì u 4-dPE A agisceria stimulendu e difese custitutive di e cellule infettate. Eppure hè sempre longa a strada prima di capì u potenziale antivirale di e molecole esciute da i lattifeci, di i quali a tussichezza di u lattune hè discritta dapoi l'autichità.

## Résumé vulgarisé

Le chikungunya est une maladie infectieuse tropicale transmise par des moustiques du genre *Aedes*, dont le "moustique tigre" (*Aedes albopictus*). Cette maladie provoque d'intenses fièvres et des douleurs articulaires chroniques invalidantes. Avec la récente expansion d'*Aedes albopictus*, des épidémies massives se sont produites dans plusieurs régions du monde. A l'heure actuelle, il n'existe ni vaccins, ni traitements médicamenteux efficaces. Depuis une dizaine d'années, la présence durable du moustique tigre en Corse et en Méditerranée est très préoccupante puisqu'elle constitue un terrain fertile pour la propagation de la maladie.

Dans ce contexte, l'étude de la composition chimique et de l'activité antivirale des extraits végétaux, a été réalisée à partir des espèces du genre *Euphorbia* de Corse. Le présent travail de Doctorat a fait l'objet d'une collaboration entre le Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (Université de Corse / CNRS) et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS). Les résultats ont montré que les extraits d'*Euphorbia* inhibaient la réplication du virus dans les cellules infectées. L'étude de la composition chimique de l'espèce *Euphorbia amygdaloïdes* subsp. *semiperfoliata* a permis d'isoler et d'identifier des molécules diterpéniques, dont quatorze d'entre elles sont décrites pour la première fois. Parmi ces molécules, un dérivé du 4-déoxyphorbol a été purifié par une approche novatrice utilisant la chromatographie en phase fluide supercritique (une technique respectueuse de l'environnement) et le traitement statistique des données de la spectrométrie de masse. Cette molécule manifeste une très forte activité antivirale, aussi bien contre le virus du chikungunya que contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'investigation du mécanisme d'action antiviral indique que la molécule, qui a été isolée, agit en stimulant les défenses constitutives des cellules infectées par le VIH. Cependant, la route est encore longue avant de comprendre le potentiel antiviral des métabolites produits par les euphorbes, dont la toxicité du latex est connue depuis l'antiquité.

## Remerciements

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (Université de Corse / CNRS) et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS-ICSN, Gif-sur-Yvette). Elle a fait l'objet d'une co-direction entre le Professeur Jean Costa de l'Université de Corse et le Docteur Marc Litaudon à l'ICSN.

Je souhaite exprimer ma plus sincère gratitude au Prof. Jean Costa. C'est auprès de ce maître que s'est forgé ma vocation de chimiste et se conclut la rédaction de cette thèse. Dès ma première année à l'Université de Corse, il a œuvré avec bienveillance à mon initiation au monde de la recherche, notamment en m'accueillant au cours de stages de courte durée. Plus tard, en 2011, il m'a vivement encouragé et appuyé lorsque j'ai exprimé la volonté d'effectuer un stage de six mois à l'ICSN. Sa confiance, ses avis éclairés et sa passion pour l'enseignement et la recherche m'ont guidé au long de ces quatre années. Mon entière gratitude se double d'un profond respect.

Ma plus grande reconnaissance va au Dr. Marc Litaudon, mon mentor du CNRS, sa vision scientifique aura guidé ces travaux de recherche. Ses qualités d'encadrant et son expertise de chercheur ont fait que cette thèse a été dûment nourrie de précieux conseils et de fructueux échanges. Il a su maîtriser mon enthousiasme tout en m'autorisant à proposer, quand cela était possible, des approches novatrices.

J'adresse mes plus sincères remerciements au MCF Julien Paolini (Université de Corse), qui a participé activement à la supervision de ces travaux. Nos fécondes discussions ont été décisives pour concevoir et concrétiser les expériences menées, ainsi que leurs valorisations. Il a été un allié précieux tout au long de cette thèse et ses relectures vigilantes ont été d'un secours inestimable.

J'ai eu la chance de rencontrer M. Litaudon dans le cadre de mon stage de master 2 à l'ICSN dans l'équipe du pôle « substances naturelles des plantes » dirigé par la Dr. Françoise Guéritte. Je tiens à la remercier de m'avoir accueilli et d'avoir œuvré à l'initiation de la collaboration « corso-gifoise ». Ma reconnaissance va également au Dr. Fanny Roussi, nouvelle responsable de l'équipe, pour sa bienveillance et ses nombreux conseils, aux Dr. Vincent Dumontet (ICSN) et Xavier Cachet (ICSN et Université Paris Descartes) pour leur disponibilité et leurs conseils. Ils ont tous trois grandement contribué à l'encadrement de cette thèse.

Je tiens à remercier également le Dr. Pieter Leyssen (Katholieke Universiteit, Belgique), virologue et interlocuteur privilégié de Marc Litaudon ; son professionnalisme sans faille aura été constamment disponible lors de l'évaluation de l'activité anti-chikungunya.

Par ailleurs, je tiens à exprimer toute mon admiration au Professeur Giovanni Battista Appendino (Università del Piemonte Orientale, Novara, Italie), dont les nombreux travaux précurseurs sur les euphorbes de Méditerranée ont catalysé la réalisation de cette thèse. Avec son soutien, une collaboration a été initiée entre le Dr. Marc Litaudon et le Pr. José Alcamí (Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Espagne). Celle-ci a pour but de préciser le mécanisme d'action anti-VIH des diterpènes isolés au cours de cette

thèse. Ces investigations ont été réalisées dans le cadre de la thèse d'Erick de la Torre sous la supervision du Dr. Luis Miguel Bedoya (CNM, Madrid) à qui j'exprime mes sincères remerciements. Il faut souligner la contribution décisive du Dr. Xavier Cachet, qui en résolvant qualitativement et quantitativement un ester de 4-déoxyphorbol, a été un artisan majeur de l'étude de ses propriétés antivirales. C'est grâce à l'ensemble de ces contributeurs que l'étude d'une euphorbe de Corse (*Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*) a été possible.

Je tiens à remercier les Pr. Giovanni Appendino et Oliver Laprévotte pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à la Pr. Sophie Tomasi et au Pr. Alain Muselli de participer à mon jury de thèse. Leurs suggestions éclairées auront permis d'améliorer la version finale du manuscrit.

La plateforme d'excellence que constitue l'ICSN a permis d'avoir recours à de nombreuses techniques complémentaires au travers de l'expertise de ces différents acteurs. Je tiens ici à exprimer toute mon amitié au Dr. Pascal Retailleau, cristallographe de l'institut, qui a toujours été disponible pour étudier avec la plus grande minutie mes cristaux de jatrophane - y compris lorsqu'il s'agissait de simple morceaux de verre. Je lui suis reconnaissant de m'avoir guidé chaque semaine dans les méandres des forêts de la Chevreuse, malgré mes chaussures de course *five-finger*. De plus, j'assume de mon amitié et ma reconnaissance Jean-François Gallard de l'équipe de RMN qui a réalisé de (très !) nombreuses analyses et qui n'a pas hésité à me confier les « spectro » quand les semaines étaient trop courtes. Je tiens à remercier le Dr. Marie-Thérèse Martin qui, malgré sa retraite, m'a prodigué de nombreux conseils sur l'élucidation structurale. Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance et mon amitié au Dr. Bogdan I. Iorga, qui a réalisé l'ensemble des calculs de modélisation moléculaire, et sans qui l'étude du jatrohémicétal n'aurait pu être aussi aboutie. Le Dr. Odile Thoison, que je remercie très sincèrement pour ses nombreux conseils, dont l'expertise aura été décisive pour la mise en œuvre des purifications par chromatographie en phase fluide supercritique. Enfin, je souhaite remercier le Dr. David Touboul de l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN dont la participation à ce travail de thèse aura été capitale lors de la quatrième année. Je lui exprime toute mon amitié ainsi que ma sincère gratitude pour sa disponibilité, son humour et surtout l'expertise qu'il a investie lors de la mise en place d'approches inédites et la préparation des manuscrits.

Ces quatre années de thèse ont été rythmées par une alternance de séjours de recherche entre la Corse et Gif-sur-Yvette. A cette occasion, j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes remarquables à qui j'adresse mes très chaleureuses considérations et sympathies.

Parmi elles, en Corse, la Dr. Marie-José Battesti pour sa bienveillance et sa passion de la botanique, les Dr. Stéphane Andréani et Yin Yang pour tous ces agréables moments partagés, Jimmy et Franck pour leur humour sans limites. Sans oublier, Florent, Greg, Marion, Nassim, Nico, Yoro, Pierre, ... Merci également Ghjuvan Teramu Rocchi pour la traduction du résumé en langue corse.

A l'ICSN, je remercie le Dr. Alain Brunelle pour ses passionnantes réflexions sur l'archéochimie, le Dr. Ali Almourabit pour sa bonne humeur exceptionnelle, le Dr. Laurent Chabaud pour avoir sauvé ma flash chromatographie, le Dr. Mehdi Beniddir pour sa joie à transmettre son expertise. Egalement, un grand merci au légendaire Dr. Sandy Desrat pour son alchimie de la joie de vivre, l'excellent Xavier Cachet pour son esprit lumineux (suffisamment pour dompter la chenille à trèfle caribéenne), Cécile Apel pour sa disponibilité décisive en vue de la bonne utilisation des chaînes HPLC, et enfin le Dr. Pierre-Marie Allard pour avoir été un parrain exemplaire lors de mes débuts à l'ICSN.

Je tiens également à exprimer ici tout l'espoir que je place dans la constitution de la communauté du *MS/MS molecular networking* de l'ICSN, composée des futurs Docteurs Florent Olivon, Tiphaine Péresse et Mélissa Esposito. Ils travaillent d'ailleurs tout les trois sur des Euphorbiaceae (Guyane et Nouvelle-Calédonie, Malaisie, et Corse, respectivement).

Mélissa Esposito (Université de Corse et ICSN) a repris le flambeau de la collaboration "corso-gifoise" sous la direction du Dr. Julien Paolini et du Dr. Marc Litaudon. En particulier, elle continue de développer les approches innovantes pour étudier les *Euphorbia*, que nous avons développées ensemble, avec l'introduction de la méthode du *molecular networking*. Je souhaite lui témoigner toute ma confiance pour mener à bien le projet. Par ailleurs, je lui souhaite de pouvoir laisser libre court à sa créativité de chimiste organicienne.

Par ailleurs, je voudrais saluer tout ceux avec qui j'ai partagé des moments mémorables : tous les anciens et actuels membres de l'équipe 45, mais également The Karim, Hristo, Mr. Maldy, Philippe le karatéka, Novilo le purificateur, le crew des informaticiens, Paco, le service de chromatographie et spectrométrie de masse, les Ouazzani, les Guillous, les Daubans, le Pr. Niouli Banbatou (Université nationale du Mali) et tant d'autres.

Par ailleurs, je voudrais assurer de toute mon amitié le Pr. Jean-Luc Wolfender et le Dr. Pierre-Marie Allard de l'Université de Genève avec lesquels le Dr. Marc Litaudon m'a permis de participer au projet de recherche sur les Euphorbiaceae de Nouvelle-Calédonie. Egalement, je tiens à remercier le Pr. Pieter C. Dorrestein et son doctorant Mingxun Wang de l'UC San Diego qui m'ont accompagné lors de mon apprentissage autodidacte de la méthode des réseaux moléculaires MS<sup>2</sup>.

Enfin, j'exprime ici toute mon affection aux personnes qui ont eu un rôle positif indirect sur le déroulement cette thèse, évidemment ma chère Mélissa, et mes précieux amis Aslan, David, Florent, Naym, Laurène, Sinhou, Wael, et sans oublier mon incontournable macbook pro, le projet sci-hub.org et Soulection radio.

Au terme de ces remerciements que j'espère aussi complet que possible, je fais part de tout mon amour à mes frères adorés, Toussaint, Ange et Ernest, ainsi qu'à mes exceptionnels grands parents de Corse et de Normandie, et bien évidemment à l'exceptionnel Pascal. Pour terminer, je voudrais ici témoigner de tout mon amour à mes parents, Rita et Jean-Christophe, à qui je dédie ce travail ! Merci d'avoir cru en moi lorsque j'ai voulu reprendre les études :).



# TABLE DES MATIERES

Liste des figures XI

Liste des abréviations XIII

Lexique XIV

Introduction générale 2

I. PARTIE INTRODUCTIVE 6

I. 1. Le chikungunya et la recherche de traitements médicamenteux ..... 7

I. 1. 1. Une maladie infectieuse (ré)émergente ..... 7

Généralités ..... 8

Le virus du chikungunya (CHIKV), son cycle de réplication ..... 8

Le virus et son vecteur ..... 8

Le cycle de réplication du CHIKV ..... 12

Historique des épidémies ..... 13

Analyse phylogénétique des épidémies ..... 16

Le rôle du vecteur dans la (ré)émergence ..... 17

L'invasion mondiale d'*Aedes albopictus* et d'*A. aegypti* ..... 17

La présence d'*A. albopictus* et d'*A. aegypti* en Europe et en France métropolitaine ..... 18

I. 1. 2. Les moyens de lutte contre le CHIKV ..... 20

Les traitements actuels ..... 20

La lutte contre le vecteur ..... 21

La recherche de vaccins ..... 21

La recherche de nouveaux inhibiteurs de la réplication du CHIKV ..... 22

Les médicaments en cours d'évaluation pour traiter le CHIKV ..... 22

La recherche d'inhibiteur de la réplication du CHIKV par criblage de banques de molécules ..... 25

Les produits naturels ayant démontré une activité inhibitrice de la réplication du CHIKV ..... 29

Les esters de diterpènes d'Euphorbiaceae ..... 31

I. 2. Diversité végétale en Méditerranée et en Corse ..... 36

I. 2. 1. La Flore méditerranéenne ..... 36

I. 2. 2. La flore de Corse ..... 37

I. 3. Le genre *Euphorbia* : descriptions botaniques, ethnopharmacologiques et chimiques ..... 38

I. 3. 1. Les Euphorbiacées ..... 38

I. 3. 2 Le genre *Euphorbia* ..... 39

Présentation générale ..... 39

Particularités ..... 41

Historique de la classification taxonomique ..... 41

Présentation botanique du sous-genre *Esula* ..... 43

Les *Euphorbia* de Corse ..... 43

Utilisation traditionnelle des *Euphorbia* ..... 43

Toxicité du latex d' <i>Euphorbia</i> .....	46
Principaux métabolites secondaires .....	47
I. 3. 3. Les esters de diterpènes du genre <i>Euphorbia</i> .....	49
Biogenèse .....	49
Extraction, isolement et identification .....	55
Activités biologiques .....	56
Activité modulatrice des PKCs par les diterpènes inférieurs de type "phorboïde" .....	57
Activité modulatrice des PKCs par les diterpènes inférieurs macrocycliques .....	66
Activité modulatrice des transporteurs ABC .....	68
<b>I. 4. Analyse par chromatographie liquide des esters de diterpène d'<i>Euphorbia</i> .....</b>	<b>69</b>
I. 4. 1. La chromatographie liquide haute performance .....	69
I. 4. 2. Les détecteurs couplés à la LC .....	70
I. 4. 3. Le couplage à la spectrométrie de masse .....	71
Les interfaces d'ionisation à pression atmosphérique (API) .....	72
Les sources ESI .....	73
Les sources APCI .....	74
I. 4. 4. Les spectromètres de masse .....	74
Les spectromètres de masse à basse résolution .....	74
Les spectromètres de masse à haute résolution (HRMS) .....	77
I. 4. 5. Analyse par LC des esters de diterpène du genre <i>Euphorbia</i> .....	79
<b>II. RÉSULTATS      83</b>	
II. 1. Article n°1 : LC-MS <sup>2</sup> -Based Dereplication of <i>Euphorbia</i> extracts with Anti-Chikungunya Virus Activity .....	84
II. 2. Article n°2 : Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication .....	94
II. 3. Article n°3 : Insights on Profiling of Phorbol, Deoxyphorbol, Ingenol and Jatrophone Diterpene Esters by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Multiple Stage Mass Spectrometry .....	102
II. 4. Article n°4 : Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead .....	116
II. 5. Article n°5 : Advanced Structural Determination of Diterpene Esters Using Molecular Modeling and NMR Spectroscopy .....	126
II. 6. Manuscrit : Search and isolation of antiviral deoxyphorbol esters from <i>Euphorbia amygdaloides</i> ssp. <i>semiperfoliata</i> using an SFC-based targeted purification workflow and MS/MS molecular networking .....	136
<b>III. ANALYSE TRANSVERSALE DES RESULTATS 162</b>	
III. 1. Évaluation de l'activité anti-CHIKV des <i>Euphorbia</i> de Corse .....	163
III. 2. Évaluation de l'activité anti-CHIKV de phorboïdes commerciaux .....	164

III. 3. Élaboration d'une stratégie de déréplication des phorboïdes par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse multi-niveaux (LC-MS <sup>n</sup> ) .....	166
III. 3. 1. Déréplication par une approche LC-MS <sup>n</sup> ciblée .....	166
III. 3. 2. Développement d'une méthode de détection par LC-MS <sup>n</sup> non-ciblée .....	167
III. 4. Caractérisation chimique et activité antivirale de l'extrait d' <i>Euphorbia amygdaloides</i> subsp. <i>semiperfoliata</i> .....	168
III. 4. 1. Identification de nouveaux esters de diterpène de type jatrophane .....	169
III. 4. 2. Étude de la fragmentation par MS <sup>n</sup> des esters de jatrophane .....	170
III. 4. 3. Évaluation de l'activité antivirale des esters de jatrophane .....	171
III. 4. 5. Purification en SFC guidée par réseaux moléculaires MS/MS des esters de diterpène.....	172
III. 4. 5. Évaluation de l'activité antivirale des esters diterpéniques de 4-déoxyphorbols .....	176
<b>IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>177</b>
<b>V. Références</b>	<b>180</b>
<b>VI. Annexes</b>	<b>198</b>

# Liste des figures

Figure 1. Les deux cycles de transmission sylvatique et urbain du CHIKV selon les hôtes et les vecteurs impliqués. <sup>28</sup>	9
Figure 2. Arbre phylogénétique des Alphavirus généré à partir d'une séquence de gènes codant pour l'enveloppe glycoprotéique. <sup>32</sup>	10
Figure 3. Reconstruction 3D d'un Alphavirus. <sup>33</sup>	10
Figure 4. Organisation du génome des Alphavirus. Les gènes et leur fonction sont précisés. <sup>32</sup>	11
Figure 5. Organisation du génome et de son expression chez le CHIKV. <sup>34</sup>	11
Figure 6. Cycle de répllication du CHIKV dans sa cellule hôte. ER = Réticulum endoplasmique. <sup>34</sup>	13
Figure 7. Carte indiquant les disséminations des deux lignées du virus du chikungunya. La lignée asiatique en rouge (flèches et points) et la lignée océanienne en jaune (flèches et points). <sup>46</sup>	14
Figure 8. Incidence des cas d'infection au CHIKV dans les Caraïbes et les zones avoisinantes au 18 juillet 2014. <sup>53</sup>	15
Figure 9. Relations phylogénétiques d'isolats de CHIKV basées sur des séquences nucléotidiques partielles d'E1. <sup>58</sup>	16
Figure 10. Données attestant de la présence de moustiques <i>Aedes</i> (bleu), <i>A. albopictus</i> (jaune) et <i>A. aegypti</i> (noir). <sup>64</sup>	18
Figure 11. Distribution actuelle d' <i>Aedes albopictus</i> en Europe. <sup>19</sup>	18
Figure 12. Zones colonisées par <i>A. albopictus</i> en 2013 et sites à risque d'introduction. <sup>71</sup>	19
Figure 13. Colonisation de la Corse par <i>A. albopictus</i> de 2006 à 2013. <sup>72</sup>	20
Figure 14 Les hotspots du bassin méditerranéen	36
Figure 15. <i>Euphorbia pithyusa subsp pithyusa</i> . Rogliano. Photo : Rita Scaglia	40
Figure 16. <i>Euphorbia dendroides</i> . Photo : Emma Bernardini	40
Figure 17. <i>Cyathium of Euphorbia fasciculata</i> (D'après Horn et al. 2012) <sup>155</sup>	41
Figure 18 Dessins de Pierandrea Matthioli d' <i>Euphorbia characias</i> (à gauche) et <i>Euphorbia myrsinites</i> (droite) figurant dans l'Histoire générale des plantes de Daléchamps et Des Moulins (début du XVIIème siècle). <sup>174,175</sup>	45
Figure 19. (A) Schéma de la voie du mévalonate vers l'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyle diphosphate (DMAPP). (B) Schéma de la voie du déoxyxylulose 5P diméthylallyle diphosphate vers l'IPP et le DMAPP (adapté de Dewick et al, 2012)	50
Figure 20. Schéma de la biosynthèse du géranylgeranyl diphosphate (GGPP) (adapté de Dewick et al, 2012). <sup>209</sup>	51
Figure 21. Schéma de la voie des diterpènes supérieurs à partir du GGPP. La formation du (-)-copalyl pyrophosphate et du (+)-copalyl pyrophosphate est réalisée par une kaurane synthase (a) et une abietane synthase (b), respectivement (adapté de Dewick et al, 2002). <sup>209</sup>	51
Figure 22. Schéma des relations biogénétiques des diterpènes inférieurs d' <i>Euphorbia</i> (établies à partir d'une synthèse des données de la littérature).	54
Figure 23. Schéma simplifié montrant le processus d'activation des PKCs conventionnelles. La phosphatidyl serine (PS) permet l'accrangement dans la membrane. <sup>241</sup>	60
Figure 24. Mécanisme de formation des ions dans une source ESI (Cech and Enke, 2001) <sup>349</sup>	73
Figure 25. Fonctionnement d'une source APCI. <sup>351</sup>	74
Figure 26. Mode de scan communément utilisés en MS/MS	76
Figure 27. Fonctionnement d'un spectromètre de masse MS <sup>n</sup> de type triple quadripôle à trappe d'ions (3200 QTRAP, ABSciex) <sup>355</sup>	76
Figure 28. Fonctionnement schématique d'un analyseur Q-TOF. (D'après Hoffman and Stroobant 2007) <sup>351</sup>	77

Figure 29. Représentation schématique de l'analyseur Orbitrap LTQ XL (ThermoFisher Scientific) avec (a) l'électrode centrale et (b) l'électrode extérieure <sup>356</sup>	78
Figure 30. Pertes neutres des fonctions esters en ESI en mode ionisation positive	81
Figure 31. Principales hypothèses de voies de fragmentation d'ingénanes d' <i>Euphorbia esula</i> . <sup>374</sup>	81
Figure 32. Fragmentation des IE et PE en ESI-MS en mode ionisation positive d'après Vogg et al. <sup>370</sup>	82
Figure 33. Récolte du latex d' <i>Euphorbia pithyusa</i> subsp. <i>pithyusa</i> . Photo : Rita Scaglia	84
Figure 34. <i>Euphorbia biumbellata</i> . Ota. Photo : L.-F. N.-S.	94
Figure 35. <i>Euphorbia hyberna</i> subsp. <i>insularis</i> . Bocca di Vergio. Photo : L.-F. N.-S.	102
Figure 36. <i>Euphorbia amygdaloides</i> subsp. <i>semiperfoliata</i> . Photo : Pr. Guilhan Paradis	116
Figure 38. <i>Euphorbia amygdaloides</i> subsp. <i>semiperfoliata</i> . Photo : Pr. Guilhan Paradis	136

# Liste des abréviations

$^{13}\text{C}$	carbone 13
$^1\text{H}$	proton
4-dPE	ester de 4-déoxyphorbol
ACN	acétonitrile
AcOEt	acétate d'éthyle
CC <sub>50</sub>	concentration nécessaire à 50 % de cytotoxicité
CCR5	récepteur à chimiokine c-c de type 5
CD4	glycoprotéine du cluster de différenciation 4
CDCl <sub>3</sub>	chloroforme deutéré
CHIKV	virus du chikungunya
CID	dissociation induite par collision
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CXRC4	récepteur à C-X-C chimiokine de type 4
DAD	diode array detector
DEDL	decteur à diffusion de lumière
DFT	théorie de la fonctionnelle de la densité
DMSO	diméthylsulfoxyde
dPE	ester de déoxyphorbol ( <i>deoxyphorbol ester</i> )
EC <sub>50</sub>	concentration efficace à 50 %
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
ESI-HRMS	<i>electrospray ionization high resolution - mass spectrometry</i>
EtOAc	<i>ethyl acetate</i>
EtOH	éthanol
HTLV	<i>human T lymphocyte virus</i>
GNPS	<i>global natural products social molecular networking</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
I3A	ingénol 3-angelate
I3T	ingénol 3,5,20-triacétate
IC <sub>50</sub>	concentration nécessaire à 50 % d'inhibition
ICSN	institut de chimie des substances naturelles (CNRS)
<i>J</i>	constante de couplage
JE	ester de jatrophone ( <i>jatrophone ester</i> )

JE-A	ester de jatrophone du group A
JE-B	ester de jatrophone du group B
JE-C	ester de jatrophone du group C
LC	<i>liquid chromatography</i>
LIT	<i>linear ion trap</i>
<i>m/z</i>	rapport masse sur charge
MeOH	méthanol
MHz	mégahertz
MN	<i>molecular networks</i>
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
MS <sup>2</sup>	<i>tandem mass spectrometry</i>
MS <sup>2</sup> MN	<i>tandem mass spectrometry molecular networking</i>
MS <sup>n</sup>	spectrométrie de masse multidimensionnelle
MT-2 cells	lymphocyte t humain
NIH	<i>national institute of health</i>
NL	<i>neutral loss</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
PBLs	<i>resting peripheral blood mononuclear cell</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PIS	<i>precursor ion scan</i>
PKCs	protéines kinases c
PMA	phorbol 12-myristate-13-acétate
ppm	partie par million
PTFE	polytétrafluoroéthylène
pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub>	pyridine deutérée
Q-TOF	quadripole temps de vol
QqQ	triple quadripole
RLUs	<i>luciferase activity</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROESY	<i>rotating-frame overhauser effect spectroscopy</i>
RSA	relations structure-activité
S/N	rapport signal sur bruit
SAR	<i>structure-activity relationships</i>
semiprep-SFC	<i>semipreparative supercritical fluid chromatography</i>
SFC	<i>supercritical fluid chromatography</i>
SFC-UV-MS <sup>2</sup>	<i>supercritical fluid chromatography coupled to ultra-violet detector and tandem-mass spectrometry</i>
SI	<i>selectivity index (CC<sub>50</sub>/(IC<sub>50</sub> or CC<sub>50</sub>))</i>

SIM	<i>single ion monitoring</i>
SiO <sub>2</sub>	silice
ssRNA	<i>single-strand ribonucleic acid</i>
TIC	<i>total ion chromatogram</i>
TOF	<i>time of flight analyzer</i>
TPA	12- <i>O</i> -tetradécanoylphorbol 13-acétate
UV	ultra-violet
Vero cells	cellules épithéliale de rein de singe <i>Cercopithecus aethiops</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
$\alpha$ D	pouvoir rotatoire
$\delta_C$	déplacement chimique du carbone
$\delta_H$	déplacement chimique du proton

## Lexique

apo-endémisme	Processus de spéciation sur un territoire donné impliquant des phénomènes de polyploidie et conduisant à l'apparition de taxons endémiques
inflorescence pléiochasiale	Inflorescence cymeuse portant des groupes de plus de deux branches de fleurs.
vésicatoire	Qui provoque une vésication (apparition d'une ampoule).
schizo-endémisme	Processus de spéciation sur un territoire donné impliquant des phénomènes d'isolement conduisant à l'apparition de taxons endémiques
sub-endémique	Espèce à aire de répartition limitée







# Introduction générale

Le présent travail de doctorat s'inscrit dans les thématiques de l'UMR CNRS 6134 SPE (Université de Corse) dont l'un des projets structurants concerne la caractérisation des ressources naturelles issues directement ou indirectement de la biomasse végétale. Depuis une trentaine d'années, le laboratoire « Chimie des Produits Naturels » (CPN) réalise divers travaux relatifs à la valorisation des plantes aromatiques et médicinales (PPAM) et des produits agro-alimentaires à forte typicité territoriale. Dans le cas présent, les études ont été menées en étroite collaboration avec l'équipe « Métabolites de végétaux : isolement, synthèse et bioactivité » de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif-sur-Yvette, l'une des principales unités du CNRS en chimie de France. Ce travail de thèse pluridisciplinaire, situé à l'interface chimie/biologie, s'inscrit également dans le cadre d'un partenariat avec l'Institut Rega de l'Université Catholique de Leuven (Belgique) et le *Centro Nacional de Microbiología* de Madrid (Espagne), notamment pour l'évaluation des activités biologiques.

La Corse présente une richesse floristique exceptionnelle. Au niveau de la biodiversité mondiale, elle constitue l'une des onze zones rouges ou hot-spot du « bassin méditerranéen ». Par sa topographie particulière et sa position géographique au cœur de la Méditerranée ce territoire insulaire possède des conditions environnementales propices au développement de nombreuses espèces végétales. A ce jour, près de 2500 espèces végétales ont été recensées, parmi lesquelles de multiples plantes endémiques et/ou sub-endémiques, dont certaines sont actuellement exploitées au travers de la production d'huiles essentielles et d'extraits destinés aux industries de la parfumerie, des cosmétiques ou encore de l'agroalimentaire.

Le virus du chikungunya (CHIKV) est transmis par des moustiques du genre *Aedes* ; la maladie causée par ce virus produit d'intenses fièvres et provoque des douleurs articulaires chroniques fortement invalidantes. Les vecteurs du virus sont des espèces invasives qui, à la faveur du réchauffement climatique, se sont récemment implantés dans plusieurs régions du monde. Depuis une dizaine d'année, la présence durable du "moustique tigre" (*A. albopictus*) en Méditerranée (dont la Corse) est un terreau favorable à l'apparition de la maladie, qui n'a encore jamais eu lieu pour le moment. En revanche, de nombreux épisodes épidémiques sont survenus ces dernières années en Afrique, en Asie et récemment en Amérique. A l'heure actuelle, il n'existe ni vaccin, ni traitement médicamenteux efficace pour traiter cette maladie.

Lorsque cette thèse a débuté en 2011, des esters de diterpènes de type daphnane orthoester isolés à partir d'un extrait d'Euphorbiaceae (*Trigonostemon cherrieri*) avait montré des activités inhibitrices sélectives vis-à-vis de la réplication du virus du chikungunya (Doctorat de Pierre-Marie Allard sous la direction des Dr. Françoise Guéritte et Marc Litaudon, 2008-2011, CNRS-ICSN). Il s'agissait alors du premier exemple indiquant une activité inhibitrice d'esters diterpéniques sur la réplication de cet *Alphavirus*. Par ailleurs, l'équipe « Métabolites de végétaux » (anciennement nommé Pôle Substances Naturelles :

Plantes [PSN-P]) avait participé au projet PhytoCHIK (2009-2011), dont la Dr. Françoise Guéritte (CNRS-ICSN) était la coordinatrice, qui visait à caractériser des composés sélectifs à partir de la biodiversité des îles de l'Océan Indien. Dans le cadre de ce projet, l'équipe « Métabolites de végétaux » a noué une collaboration durable avec le Dr. Pieter Leyssen du laboratoire de virologie de l'Université de Leuven (Institut Rega, KU Leuven, Belgique).

Suite au stage de Master de 2 de Louis-Félix Nothias-Scaglia dans l'équipe « Métabolites de végétaux » (CNRS-ICSN), un partenariat durable s'est établi entre le CPN et « Métabolites de végétaux », sous l'impulsion du Pr. Jean Costa (CPN, Université de Corse) et du Dr. Marc Litaudon (CNRS-ICSN). Ce partenariat s'est concrétisé au travers du projet de thèse de L.-F. Nothias-Scaglia visant à étudier le potentiel antiviral d'Euphorbiaceae de Corse.

Au sein de la Flore de Corse, la famille des Euphorbiaceae est principalement représentée par des plantes du genre *Euphorbia* et *Mercurialis*. Le genre *Euphorbia* rassemble 33 taxa, dont 22 (66 %) ont des aires de distribution euro-méditerranéennes et 5 (15 %) sont des espèces naturalisées. Plusieurs de ces espèces n'ont pas été étudiées tant sur le plan phytochimique que biologique et constituent donc un groupe taxonomique particulièrement intéressant pour entreprendre de telles études. Dans ce contexte, les trois principaux objectifs de notre étude étaient :

- de développer des approches analytiques pour caractériser la composition chimique des extraits végétaux.
- de découvrir de nouvelles séries chimiques ou de nouveaux composés valorisables à partir des Euphorbiaceae de Corse ;
- d'identifier des composés possédant une activité antivirale sélective, d'entreprendre des études de relations structure-activité, et d'approfondir le mécanisme d'actions des constituants les plus actifs.

## Au sujet du présent manuscrit

Le présent manuscrit est bâti selon le format d'une « thèse sur articles ». Il s'articule autour de trois parties.

La première partie sera consacrée à une **étude bibliographique** traitant :

- du virus chikungunya (cf. partie I.1, p. 7) ;
- de la flore de Corse, et plus particulièrement des espèces du genre *Euphorbia* et leurs compositions en esters de diterpènes (cf. partie I.2 et I.3, p. 36) ;
- de l'analyse de ces constituants dans les extraits végétaux par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (cf. partie I.4, p. 69).

La deuxième partie regroupe cinq publications en anglais parues dans plusieurs journaux scientifiques internationaux : une dans *Fitoterapia* (IF 2,35) en 2015,<sup>1</sup> trois dans *Journal of Natural Products* (IF 3,95) en 2014 et 2015,<sup>2-4</sup> une autre sous presse (épreuve non-corrigée) dans *Journal of Chromatography A* (IF 4,26) en 2015.<sup>5</sup> Par ailleurs, un ultime manuscrit relatif aux derniers travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat a été inclus. Chaque article est associé à un document dit d'**informations complémentaires**, présentant le détail des données expérimentales. Ces documents ne sont pas inclus dans ce mémoire de thèse, puisqu'ils sont librement consultables sur les sites internet des éditeurs. Le lien est précisé au début de chaque article. Quand aux documents d'informations complémentaires du dernier manuscrit (cf. partie II. 6, p. 136), ils sont présentés en annexe de la présente étude (cf. annexes, p. 198).

Une **analyse transversale** de l'ensemble des résultats est proposée dans la dernière partie (cf. chap. III, p 162). Celle-ci suit une séquence qui cherchera à mettre en lumière le cheminement scientifique global. Pour plus d'informations sur les résultats évoqués, veuillez vous référer aux chapitres et articles concernés.

A titre de remarque, il convient de souligner que la numérotation des composés est continue dans la partie bibliographique, et qu'elle devient propre à chaque article/manuscrit par la suite. D'autre part, par soucis de cohérence avec la littérature internationale, les acronymes anglophones ont été privilégiés dans l'ensemble du manuscrit, mais sont dûment explicités.

---

(1) Nothias-Scaglia, L.-F.; Dumontet, V.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. LC-MS2-Based Dereplication of Euphorbia Extracts with Anti-Chikungunya Virus Activity. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 202–209.

(2) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retailleau, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Costa, J.; Litaudon, M. Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (6), 1505–1512.

(3) Nothias-Scaglia, L.-F.; Pannecouque, C.; Renucci, F.; Delang, L.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (6), 1277–1283.

(4) Nothias-Scaglia, L.-F.; Gallard, J.-F.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Costa, J.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; Litaudon, M. Advanced Structural Determination of Diterpene Esters Using Molecular Modeling and NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (10), 2423–2431.

(5) Nothias-Scaglia, L.-F.; Schmitz-Afonso, I.; Renucci, F.; Roussi, F.; Touboul, D.; Costa, J.; Litaudon, M.; Paolini, J. 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* **2015**, *1422*, 128–139.



# **I. PARTIE INTRODUCTIVE**

## I. 1. Le chikungunya et la recherche de traitements médicamenteux

### I. 1. 1. Une maladie infectieuse (ré)émergente

L'introduction suivante a pour but de présenter le chikungunya, une maladie infectieuse transmise par le virus éponyme (CHIKV), et de son vecteur. La chronologie des épidémies sera ensuite abordée, en mettant l'accent sur les épisodes les plus récents. Enfin, il sera traité en détail des dernières avancées de la recherche relatives à la découverte de solutions thérapeutiques, préventives et curatives pour le traitement de cette pathologie infectieuse.

Le lecteur souhaitant plus de détails sur le chikungunya, peut consulter les thèses préexistantes traitant du CHIKV,<sup>6</sup> de la physiopathologie<sup>7,8</sup> ou de l'épidémiologie de la maladie,<sup>9-11</sup> de la transmission vectorielle,<sup>12,13</sup> ainsi que diverses revues bibliographiques publiées récemment.<sup>14-22</sup>

---

(6) Weber, C. Characterization of the Chikungunya Virus Entry Process and the Development of Novel Antiviral Strategies. Thèse, Johann Wolfgang Goethe-Universität, 2014.

(7) Jaffar-Bandjee, M.-C. Étude de La Physiopathologie de L'infection Chikungunya En Phase Aiguë et Chronique Chez L'homme. Thèse, Université de la Réunion, 2010.

(8) Petitdemange, C. Etude Des Cellules NK Au Cours Des Infections Par Le Virus Du Chikungunya et Le Virus de La Dengue, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014.

(9) Moulay, D. Mathematical Modeling and Study of Dynamical Systems in Epidemiology. Case of the Chikungunya Disease. Thèse, Université du Havre, 2011.

(10) Lo Presti, A.; Ciccozzi, M.; Cella, E.; Lai, A.; Simonetti, F. R.; Galli, M.; Zehender, G.; Rezza, G. Origin, Evolution, and Phylogeography of Recent Epidemic CHIKV Strains. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12* (2), 392–398.

(11) Descures, M. Etats Des Lieux de L'évolution Du Chikungunya Sur Les Territoires Français et Rôle Du Pharmacien. Thèse de Pharmacie, Université Toulouse III, 2014.

(12) Oliva, C. Biological and Behavioral Studies of Two Disease-Transmitting Mosquito Species (*Aedes Albopictus* and *Anopheles Arabiensis*) with the Aim of Developing the Sterile Insect Technique (SIT) against These Vectors on Reunion Island. Thèse, Université de la Réunion, 2012.

(13) Legros, V. Etude Dynamique et Protéomique de L'interaction Entre *Aedes Albopictus* et Les Virus émergents de La Dengue et Du Chikungunya. Thèse d'exercice, médecine vétérinaire, Université Paul Sabatier de Toulouse, 2014.

(14) Schwartz, O.; Albert, M. L. Biology and Pathogenesis of Chikungunya Virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (7), 491–500.

(15) Caglioti, C.; Lalle, E.; Castilletti, C.; Carletti, F.; Capobianchi, M. R.; Bordini, L. Chikungunya Virus Infection: An Overview. *NEW Microbiol.* **2013**, *36*, 211–227.

(16) Thiberville, S.-D.; Moyen, N.; Dupuis-Maguiraga, L.; Nougaière, A.; Gould, E. A.; Roques, P.; de Lamballerie, X. Chikungunya Fever: Epidemiology, Clinical Syndrome, Pathogenesis and Therapy. *Antiviral Res.* **2013**, *99*, 345–370.

(17) McGraw, E. A.; O'Neill, S. L. Beyond Insecticides: New Thinking on an Ancient Problem. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11* (3), 181–193.

(18) Higgs, S.; Vanlandingham, D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 231–240.

(19) Medlock, J. m.; Hansford, K. m.; Versteirt, V.; Cull, B.; Kampen, H.; Fontenille, D.; Hendrickx, G.; Zeller, H.; Van Bortel, W.; Schaffner, F. An Entomological Review of Invasive Mosquitoes in Europe. *Bull. Entomol. Res.* **2015**, *FirstView*, 1–27.

(20) Powers, A. Chikungunya Virus Outbreak Expansion and Microevolutionary Events Affecting Epidemiology and Epidemic Potential. *Res. Rep. Trop. Med.* **2015**, *6*, 11–19.

(21) Sam, I.-C.; Kümmerer, B. M.; Chan, Y.-F.; Roques, P.; Drosten, C.; AbuBakar, S. Updates on Chikungunya Epidemiology, Clinical Disease, and Diagnostics. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 223–230.

(22) Gasque, P.; Couderc, T.; Lecuit, M.; Roques, P.; Ng, L. F. P. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 241–249.



## ***Généralités***

Dans la langue Makonde "*Chikungunya*" signifie "celui qui marche courbé", en référence à la posture des personnes souffrant de douleurs articulaires invalidantes. Le chikungunya est une maladie arbovirale causée par un *Alphavirus* et transmise par des moustiques du genre *Aedes*. Le premier épisode épidémique décrit d'infection au virus du chikungunya (CHIKV) s'est produit en 1952 en Afrique de l'Est, dans l'actuelle Tanzanie.<sup>23</sup> Depuis, de nombreux autres épisodes se sont déroulés notamment en Afrique et en Asie. Avec l'expansion des aires de répartition des vecteurs de cette maladie virale, en particulier d'*Aedes albopictus*, celle-ci est devenue l'une des principales maladies réémergentes. Les symptômes observés s'apparentent à ceux de la Dengue ; il s'agit notamment de fièvres brutales, de frissons, de céphalées, de myalgies et d'éruptions cutanées.<sup>24</sup> En revanche, elle se distingue par la survenue, dans 30 à 40 % des cas, d'une polyarthralgie invalidante pouvant durer plusieurs mois.<sup>14,25</sup> La maladie du chikungunya se déroule en trois phases : une phase aiguë (de J1 à J21), une phase subaiguë (J21 à la fin du 3ème mois) et une phase chronique (plus de trois mois). La rémission des patients est généralement spontanée.

## ***Le virus du chikungunya (CHIKV), son cycle de réplication***

### **Le virus et son vecteur**

Le virus du chikungunya fut isolé et identifié lors des premières épidémies en Tanzanie dans les années 1950.<sup>26</sup> Le lien entre l'épidémie, la saison des pluies et la forte population d'*Aedes aegypti* fut remarqué dès la survenue des premiers épisodes.<sup>27</sup> Au cours des années 1960-70, des épidémies urbaines en Asie ont permis d'établir que ce virus pouvait suivre deux cycles de transmission (Figure 1). Un cycle sylvatique où les hôtes sont le plus souvent des primates et pour lequel les principaux vecteurs sont *A. furcifer* et *A. africanus* et un cycle urbain, impliquant l'Homme comme hôte principal.<sup>28</sup> Dans ce dernier cas, les espèces *A. aegypti* et *A. albopictus* sont les vecteurs principaux.

Le CHIKV est un virus du genre *Alphavirus* appartenant à la famille des *Togaviridae*, elle-même incluse dans le groupe IV selon la classification proposée par Baltimore.<sup>29</sup> Comme tous les virus appartenant au groupe IV, le CHIKV est un virus dont le génome est constitué

---

(23) Robinson, M. C. An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. I. Clinical Features. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1955**, 49 (1), 28–32.

(24) WHO. Chikungunya [http://www.who.int/denguecontrol/arbo-viral/other\\_arboviral\\_chikungunya/en/](http://www.who.int/denguecontrol/arbo-viral/other_arboviral_chikungunya/en/) (accessed Feb 27, 2015).

(25) Queyriaux, B.; Simon, F.; Grandadam, M.; Michel, R.; Tolou, H.; Boutin, J.-P. Clinical Burden of Chikungunya Virus Infection. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, 8 (1), 2–3.

(26) Ross, R. W. The Newala Epidemic. III. The Virus: Isolation, Pathogenic Properties and Relationship to the Epidemic. *J. Hyg. (Lond.)* **1956**, 54 (2), 177–191.

(27) Lumsden, W. H. R. An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953 II. General Description and Epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1955**, 49 (1), 33–57.

(28) Powers, A. M. Chikungunya. *Clin. Lab. Med.* **2010**, 30 (1), 209–219.

(29) Baltimore, D. Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, 35 (3), 235–241.

d'un seul ARN simple brin à polarité positive (positive single strand ARN, (+)ssRNA).<sup>30</sup> Les virus de la famille des Togaviridae sont des virus de forme sphérique de 50 à 70 nm de diamètre, constitués d'une capsidie icosaédrique entourée d'une enveloppe lipidique provenant des cellules hôtes. Leur génome est constitué de 10 à 12 kilobases (kb). Cette famille est constituée de deux genres : le genre *Rubivirus*, avec pour seule espèce le virus *Rubella* causant la rubéole, et le genre *Alphavirus*, composés de 29 virus pouvant infecter divers vertébrés par l'intermédiaire d'arthropodes. Cette particularité permet de les classer dans le groupe des arbovirus (Arthropod borned virus). Les *Alphavirus* ont été divisés en deux groupes selon leur origine géographique.<sup>31</sup> Un groupe dit de "l'Ancien Monde" (comprenant Afrique et Asie) et un autre dit du "Nouveau Monde" (Amériques). Il est probable que les *Alphavirus* du Nouveau Monde soient apparus à la suite de migrations successives d'oiseaux en provenance de l'Ancien Monde.

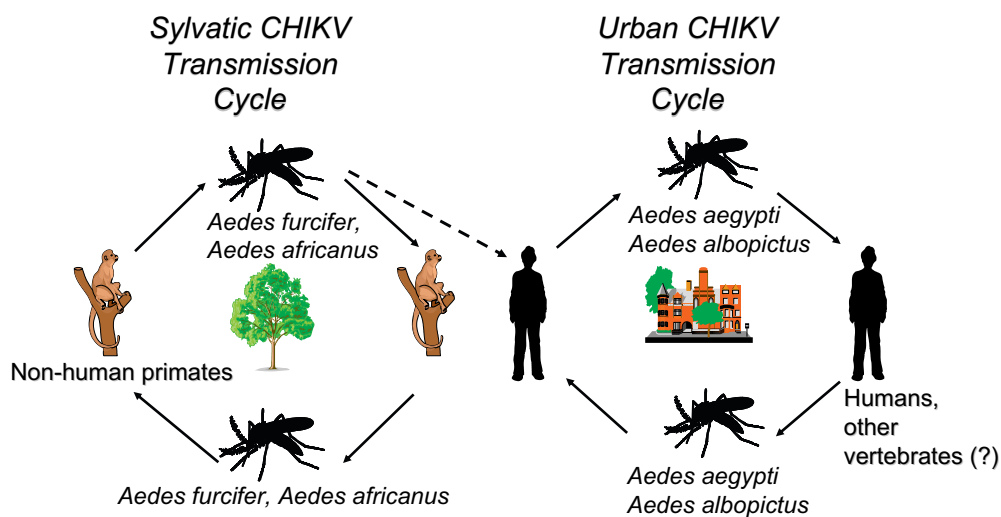


Figure 1. Les deux cycles de transmission sylvatique et urbain du CHIKV selon les hôtes et les vecteurs impliqués.<sup>28</sup>

Le CHIKV appartient aux virus de l'Ancien Monde, et il est inclus dans le sous-groupe des virus de la forêt de Semliki,<sup>32</sup> comprenant entre autres le "Semliki Forest Virus" (SFV), l'O'nyong-nyong virus (OONV), et le Ross River virus (RRV) (Figure 2). Ces derniers peuvent, tout comme le CHIKV, provoquer un syndrome inflammatoire se traduisant par des arthralgies sévères et douloureuses chez l'Homme. Les *Alphavirus* du Nouveau Monde, tels que les virus de l'encéphalite équine de l'Est, de l'Ouest (EEEV, WEEV), ou de l'encéphalite équine du Venezuela (VEEV), peuvent entraîner des encéphalites graves chez l'Homme ou d'autres mammifères, ainsi que chez plusieurs espèces d'oiseaux.

(29) Baltimore, D. Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, 35 (3), 235–241.

(30) International Committee on Taxonomy of Viruses. Togaviridae. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; Academic Press: London ; Waltham, MA, 2012.

(31) Strauss, J. H.; Strauss, E. G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiol. Rev.* **1994**, 58 (3), 491–562.

(32) Powers, A. M.; Brault, A. C.; Shirako, Y.; Strauss, E. G.; Kang, W.; Strauss, J. H.; Weaver, S. C. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *J. Virol.* **2001**, 75 (21), 10118–10131.

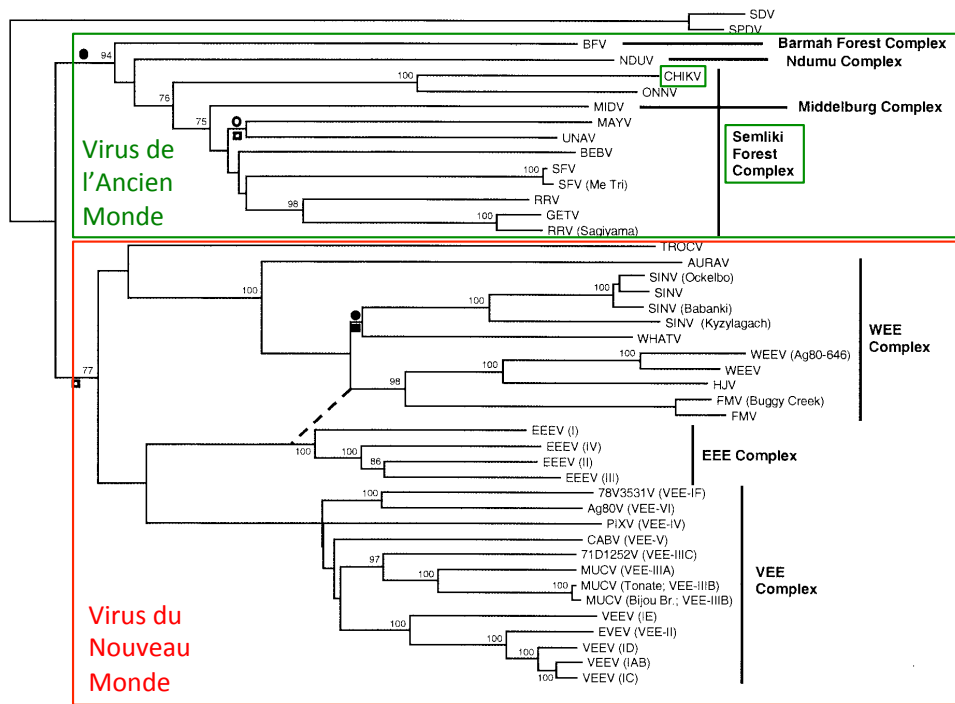


Figure 2. Arbre phylogénétique des *Alphavirus* généré à partir d'une séquence de gènes codant pour l'enveloppe glycoprotéique.<sup>32</sup>

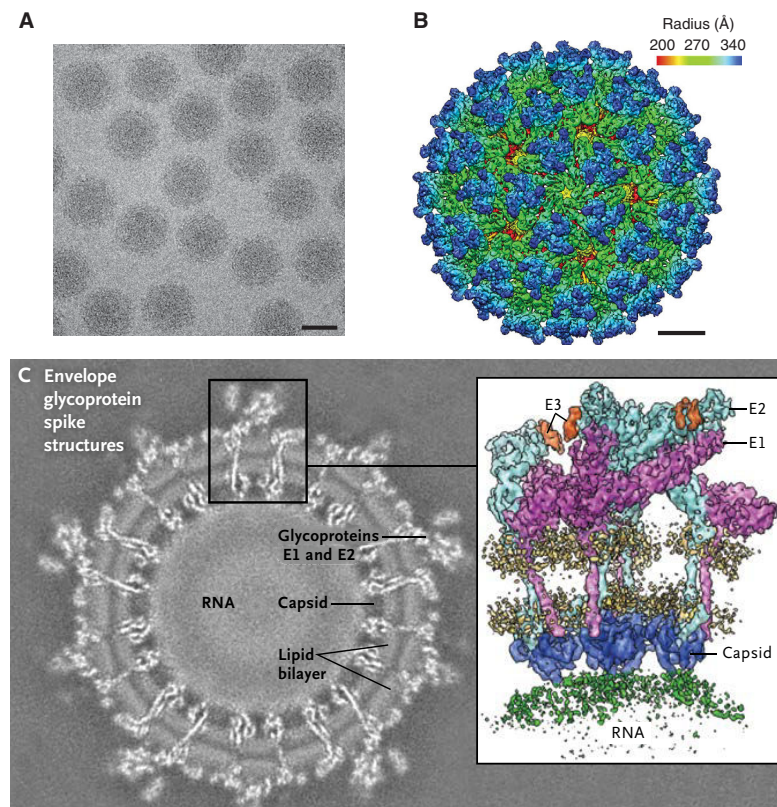


Figure 3. Reconstruction 3D d'un *Alphavirus*.<sup>33</sup> (A) Image obtenue par microscopie électronique du "Venezuelan Equine Encephalitis Virus" (VEEV) souche TC-83. Barre d'échelle : 50 nm. (B) Reconstruction 3D d'un VEEV par coloration radiale, montrant la glycoprotéine de l'enveloppe 1 (E1) (vert) et E2 (bleu). Barre d'échelle : 10 nm. (C) Coupe d'une carte de densité tridimensionnelle obtenue par microscopie électronique.

(33) Zhang, R.; Hryc, C. F.; Cong, Y.; Liu, X.; Jakana, J.; Gorchakov, R.; Baker, M. L.; Weaver, S. C.; Chiu, W. 4.4 Å Cryo-EM Structure of an Enveloped Alphavirus Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *EMBO J.* **2011**, *30* (18), 3854–3863.

Les particules virales (virions) de CHIKV ont une taille de 60 à 70 nm et sont composées de quatre protéines structurales à l'état mature : la protéine de capsid C, les glycoprotéines E1 et E2 et une protéine 6K (voir la structure d'un *Alphavirus* en Figure 3).<sup>34</sup> La nucléocapside est constituée d'un ARN génomique mesurant approximativement 12 kb ; elle est associée à d'autres protéines de la capsid.

Le génome du CHIKV a une organisation typique des *Alphavirus* (Figure 4) avec un ARN simple brin enroulé en sens positif possédant une extrémité 5' coiffée d'une 7-méthylguanosine et d'une queue poly(A) à l'extrémité 3'. Le génome est organisé suivant la séquence 5'cap-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(jonction)-C-E3-E2-6K-E1-poly(A)-3' (Figure 5). L'infection d'une cellule par le CHIKV peut être initiée par la seule introduction d'un ARN viral dans une cellule hôte. Cet ARN viral contient deux phases d'ouverture de lecture (open reading frame, ORF) dans le génome. Une première ORF composée d'une séquence de 7424 nucléotides codant pour les protéines non-structurelles nécessaires à la transcription et la réplication de l'ARN viral. Une seconde ORF de 3732 nucléotides codant pour les quatre protéines de la structure virale : la protéine C de la capsid (PC), les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2 et E3.

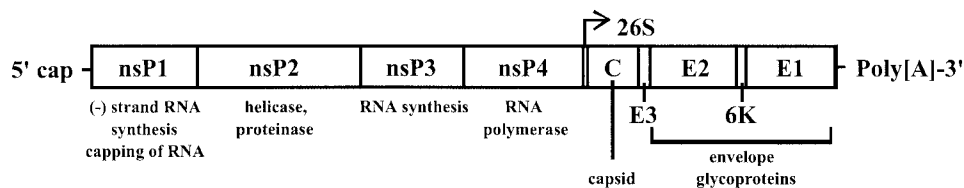


Figure 4. Organisation du génome des Alphavirus. Les gènes et leur fonction sont précisés.<sup>32</sup>

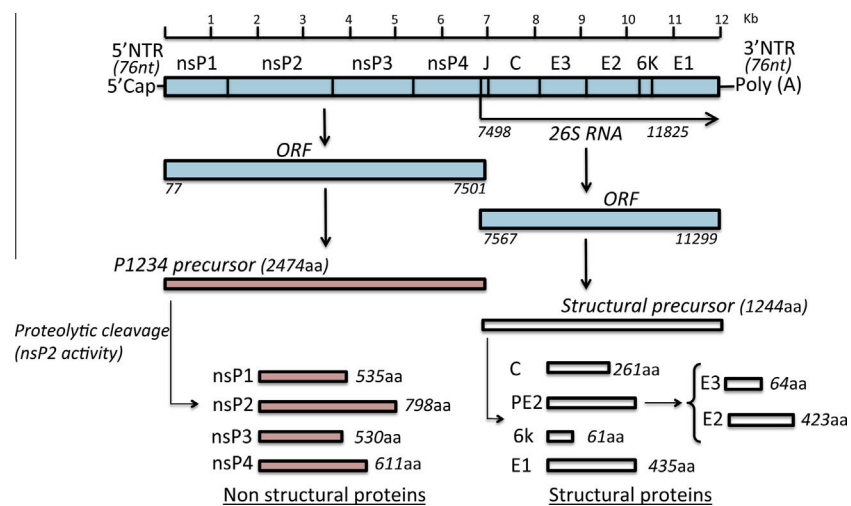


Figure 5. Organisation du génome et de son expression chez le CHIKV.<sup>34</sup>

(34) Solignat, M.; Gay, B.; Higgs, S.; Briant, L.; Devaux, C. Replication Cycle of Chikungunya: A Re-Emerging Arbovirus. *Virology* **2009**, 393 (2), 183–197.

## Le cycle de réplication du CHIKV

Chez les *Alphavirus*, la multiplication s'effectue à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte. Les particules virales pénètrent par endocytose suite à l'interaction des glycoprotéines de l'enveloppe virale avec un ou plusieurs récepteurs cellulaires. Récemment, il a été montré que la prohibitine (PHB1) était l'un des principaux récepteurs cellulaires utilisés par le CHIKV lors du processus d'internalisation.<sup>35,36</sup> Le cycle de réplication du CHIKV après internalisation des virions n'a jamais été étudié de façon détaillé,<sup>34</sup> mais il est considéré comme similaire aux autres *Alphavirus* (SFV et SINV, essentiellement) du fait de l'homologie entre les séquences codantes pour le complexe de réplication (Figure 6). Une fois la nucléocapside libérée dans le cytoplasme (par fusion de la vacuole d'endocytose et l'enveloppe virale), elle est capable de s'associer à des sous-unités ribosomales. La traduction du génome viral peut alors débiter, permettant l'édification d'un complexe répliatif durant les premières phases du cycle. Ce dernier, constitué des protéines non structurales jouant le rôle d'hélicase, de protéase, et d'ARN polymérase (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4), va synthétiser les (-)ssARN complémentaires. Cette copie de polarité négative sert alors de matrice pour la synthèse de nouvelles copies de (+)ssARN génomiques. La maturation des glycoprotéines de l'enveloppe (E1-6k-E2-E3 et C) est effectuée dans le réticulum endoplasmique. Les glycoprotéines sont ensuite transportées au niveau de la membrane plasmique. L'encapsidation des (+)ssARN génomiques s'effectue dans le cytoplasme et les néo-virions sont produits par bourgeonnement au niveau de la membrane cytoplasmique. Dans les cellules vertébrées sensibles, l'infection devient rapidement très productive et aboutit à une lyse cellulaire.

Dans les cellules de moustique, la réplication virale décroît rapidement et se stabilise à un faible niveau sans lyse cellulaire. La persistance du virus chez l'insecte vecteur est un élément essentiel dans le cycle de transmission vecteur-hôte. Les femelles moustiques piquent pour se nourrir de sang et assurer leur reproduction. Après le repas sanguin, les particules virales se répliquent au niveau de l'intestin du vecteur puis gagnent les glandes salivaires après quelques jours d'incubation. Lors de piqures ultérieures, l'injection de la salive du vecteur assure la transmission du virus à l'hôte.

---

(35) Wintachai, P.; Wikan, N.; Kuadkitkan, A.; Jaimipuk, T.; Ubol, S.; Pulmanusahakul, R.; Auewarakul, P.; Kasinrerak, W.; Weng, W.-Y.; Panyasrivanit, M.; et al. Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein. *J. Med. Virol.* **2012**, *84* (11), 1757–1770.

(36) Wintachai, P.; Thuaud, F.; Basmadjian, C.; Roytrakul, S.; Ubol, S.; Désaubry, L.; Smith, D. R. Assessment of Flavaglines as Potential Chikungunya Virus Entry Inhibitors. *Microbiol. Immunol.* **2015**, *59* (3), 129–141.

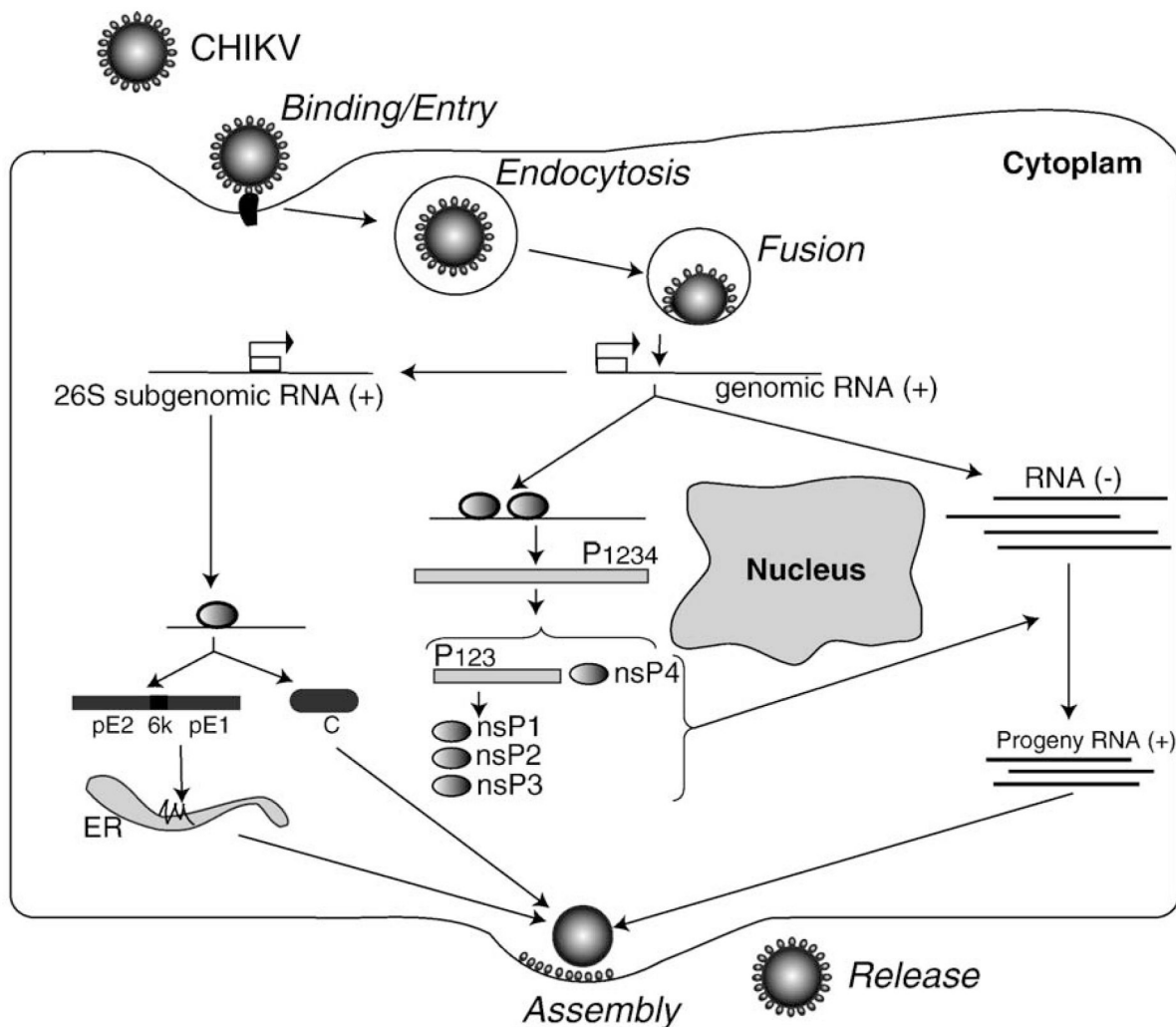


Figure 6. Cycle de réplication du CHIKV dans sa cellule hôte. ER = Réticulum endoplasmique.<sup>34</sup>

## Historique des épidémies

Les premières épidémies de chikungunya sont survenues en 1952, dans la région du plateau de Makondé situé au Sud-Est de la Tanzanie actuelle.<sup>27</sup> Durant les années 1960, le CHIKV fut détecté et isolé dans de nombreux pays de l'Afrique sub-saharienne, tels qu'au Soudan, en Ouganda, au Congo et même jusqu'en Afrique du Sud.<sup>7</sup>

En dehors du continent africain, des épidémies ont été répertoriées dans les années 1960 et 70 en Inde,<sup>37</sup> en Thaïlande,<sup>38</sup> au Vietnam,<sup>39</sup> et plus tard en Indonésie.<sup>40</sup>

Après une période de relative accalmie, plusieurs épidémies importantes, probablement importées d'Afrique, ont été observées en 2006 dans l'Océan Indien, notamment sur l'île

(36) Wintachai, P.; Thuaud, F.; Basmadjian, C.; Roytrakul, S.; Ubol, S.; Désaubry, L.; Smith, D. R. Assessment of Flavaglines as Potential Chikungunya Virus Entry Inhibitors. *Microbiol. Immunol.* **2015**, *59* (3), 129–141.

(37) De Ranitz, C. M.; Myers, R. M.; Varkey, M. J.; Isaac, Z. H.; Carey, D. E. Clinical Impressions of Chikungunya in Vellore Gained from Study of Adult Patients. *Indian J. Med. Res.* **1965**, *53* (8), 756–763.

(38) Nimmannitya, S.; Halstead, S. B.; Cohen, S. N.; Margiotta, M. R. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962–1964. I. Observations on Hospitalized Patients with Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1969**, *18* (6), 954–971.

(39) Deller, J. J.; Russell, P. K. Chikungunya Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1968**, *17* (1), 107–111.

(40) Suharyono, W. Outbreak of Chikungunya Virus in Indonesia 1982–1985. *Virus Inf. Exch. Newsl.* **1986**, *3*, 91.



Maurice et l'île de la Réunion (Figure 7). Sur cette dernière, 38 % de la population totale fut infectée (présence d'anticorps anti-CHIKV) au cours de cet épisode.<sup>41</sup> Des études sérologiques ont montré que, dans certains pays avoisinants, le taux de prévalence d'anticorps anti-CHIKV pouvait même indiquer des taux d'infections plus élevés (78% à Lamu au Kenya et 63 % aux Comores). L'épidémie s'est ensuite disséminée vers l'Asie, où dans le sous-continent indien, 1,3 millions de personnes furent ainsi contaminées par le CHIKV.<sup>42</sup> Durant la même période, les premiers cas furent importés aux Etats-Unis<sup>43</sup> et en Europe<sup>44</sup> par des voyageurs. Au cours de l'été 2007, une épidémie toucha environ 200 personnes dans la région de Ravenne en Italie.<sup>45</sup> Il s'agit du premier épisode de transmission endémique par *A. albopictus* en région tempérée.

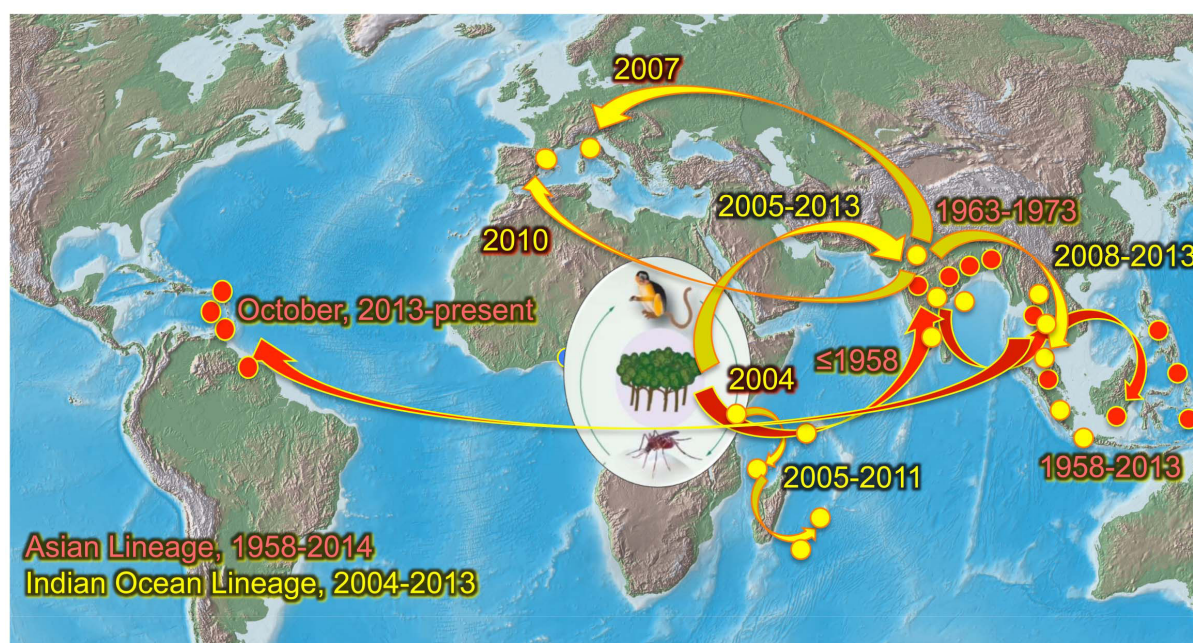


Figure 7. Carte indiquant les disséminations des deux lignées du virus du chikungunya. La lignée asiatique en rouge (flèches et points) et la lignée océanienne en jaune (flèches et points).<sup>46</sup>

Jusqu'en 2013, la plupart des patients infectés dans l'hémisphère Nord correspondent à des voyageurs ayant séjournés dans des régions où le virus est endémique.<sup>47</sup> Néanmoins,

(41) Renault, P.; Balleydier, E.; D'Ortenzio, E.; Bâville, M.; Filleul, L. Epidemiology of Chikungunya Infection on Reunion Island, Mayotte, and Neighboring Countries. *Médecine Mal. Infect.* **2012**, *42* (3), 93–101.

(42) Cecilia, D. Current Status of Dengue and Chikungunya in India. <http://www.searo.who.int/publications/journals/seajph/seajphv3n1p22.pdf?ua=1> **2014**.

(43) CDC, C. for D. C. and P. Chikungunya Fever Diagnosed among International Travelers--United States, 2005-2006. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2006**, *55* (38), 1040.

(44) Pfeffer, M.; Löscher, T. Cases of Chikungunya Imported into Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **2006**, *11* (3), E060316. 2.

(45) Rezza, G.; Nicoletti, L.; Angelini, R.; Romi, R.; Finarelli, A.; Panning, M.; Cordioli, P.; Fortuna, C.; Boros, S.; Magurano, F.; et al. Infection with Chikungunya Virus in Italy: An Outbreak in a Temperate Region. *The Lancet* **2007**, *370* (9602), 1840–1846.

(46) Weaver, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, *8* (6), e2921.

(47) Nasci, R. S. Movement of Chikungunya Virus into the Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20* (8), 1394–1395.

quelques cas de transmission autochtone furent rapportés, comme ce fut le cas à Fréjus, en France, en 2010.<sup>48</sup>

Fin 2013, une épidémie se propagea sur l'île de Saint-Martin, puis dans la plupart des îles Caraïbes touchant plus de 650 000 personnes (Figure 8). Il a été démontré que la souche impliquée était apparentée au phylogroupe asiatique<sup>49</sup> (voir l'analyse phylogénétique des épidémies 1.1.4).

Lors de l'été 2014, les premiers cas d'infections autochtones sont observés en Amérique continentale.<sup>50,51</sup> Entre fin 2013 et fin 2014, le nombre de cas autochtones du CHIKV dans les régions Caraïbe et Sud-Américaine est estimé à un million.<sup>20</sup> En Guyane française, 13 751 cas cliniquement évocateurs ont été rapportés entre fin 2014 et mars 2015.<sup>52</sup>



Figure 8. Incidence des cas d'infection au CHIKV dans les Caraïbes et les zones avoisinantes au 18 juillet 2014.<sup>53</sup>

A la même période, l'épidémie se propage au Pacifique, où la présence de moustiques du genre *Aedes* fait craindre la survenue récurrente d'épidémies.<sup>54,55</sup> Fin 2014, 25 % de la population Polynésienne aurait consulté pour des signes évocateurs du virus.<sup>56</sup>

L'apparition d'épidémies de CHIKV dans les Caraïbes et le Pacifique, associée à la présence de vecteurs de cette maladie en Europe, laisse craindre également la survenue d'épisodes sur le vieux continent.<sup>57</sup>

(48) Grandadam, M.; Caro, V.; Plumet, S.; Thiberge, J.-M.; Souarès, Y.; Failloux, A.-B.; Tolou, H. J.; Budelot, M.; Cosserrat, D.; Leparco-Goffart, I.; et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17* (5), 910–913.

(49) Leparco-Goffart, I.; Nougairède, A.; Cassadou, S.; Prat, C.; de Lamballerie, X. Chikungunya in the Americas. *The Lancet* **2014**, 383 (9916), 514.

(50) Kuehn BM. CHIKV Transmission Found in the US: US Health Authorities Brace for Wider Spread. *JAMA* **2014**, *312* (8), 776–777.

(51) Mowatt, L.; Jackson, S. T. Chikungunya in the Caribbean: An Epidemic in the Making. *Infect. Dis. Ther.* **2014**, 1–6.

(52) CIRE Antille Guyane. *Le Chikungunya En Guyane Bulletin Du 9 Au 22 Mars 2015 (S2015-11 et S2015-12)*; Bulletin 6 / 2015; 2015.

(53) Morrison, T. E. Re-Emergence of Chikungunya Virus. *J. Virol.* **2014**, JVI.01432–14.

(54) Roth, A.; Mercier, A.; Lepers, C.; Hoy, D.; Souarès, Y. Concurrent Outbreaks of Dengue, Chikungunya and Zika Virus Infections—an Unprecedented Epidemic Wave of Mosquito-Borne Viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **2013**, *19* (41).

(55) Cao-Lormeau, V.-M.; Musso, D. Emerging Arboviruses in the Pacific. *The Lancet* **2014**, 384 (9954), 1571–1572.

(56) Bureau de veille sanitaire. *Surveillance et Veille Sanitaire En Polynésie Française*; Semaine 12 2015; Polynésie française, 2015.

(57) Mansuy, J.-M.; Grouteau, E.; Mengelle, C.; Claudet, I.; Izopet, J. Chikungunya in the Caribbean—Threat for Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20* (8), 1423–1425.



## Analyse phylogénétique des épidémies

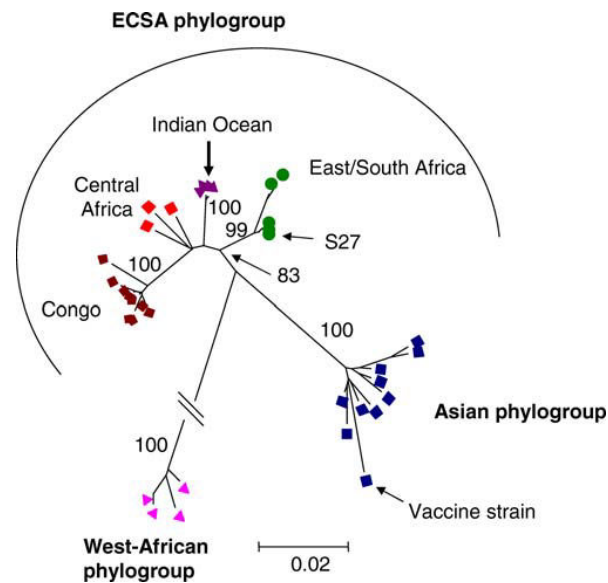


Figure 9. Relations phylogénétiques d'isolats de CHIKV basées sur des séquences nucléotidiques partielles d'E1.<sup>58</sup>

L'analyse phylogénétique des différentes souches virales de CHIKV a démontré qu'il existait trois lignées ; une première Ouest-africaine, une seconde Est-Centre africaine et Sud-africaine (ECSA) et une troisième asiatique (Figure 9).<sup>10</sup> Jusqu'en 2004, la survenue d'épidémies s'est limitée à leurs zones d'activité initiale éponyme.<sup>20</sup> L'apparition d'une nouvelle lignée, dérivée de la lignée ECSA, est à l'origine de l'épidémie de l'océan indien en 2005-2006. Celle-ci se caractérise par l'apparition de deux mutations sur des séquences codant pour des glycoprotéines de l'enveloppe. La première mutation est survenue sur la glycoprotéine E1-226-A, et elle a eu pour effet d'augmenter la capacité d'infection d'*A. albopictus* par le CHIKV d'un facteur 100, sans pour autant diminuer son infectivité pour *A. aegypti*.<sup>59</sup> La seconde glycoprotéine mutée (E1-A226V) permet au virus de réduire sa consommation de cholestérol, améliorant ses capacités de survie et de multiplication.<sup>58</sup>

Au cours des années suivantes, cette lignée s'est répandue au Moyen-Orient, en Inde et dans toute l'Asie du Sud-Est ; où elle s'est ramifiée en différents génotypes s'adaptant aux spécificités environnementales.<sup>60,61</sup>

La récente expansion du CHIKV aux Amériques et dans la région Pacifique, est quant à elle causée par une souche apparentée à la lignée asiatique.<sup>21</sup> Des résultats suggèrent que celle-ci a une forte affinité vis à vis d'*A. albopictus* et d'*A. aegypti*.<sup>62</sup>

(58) Schuffenecker, I.; Itean, I.; Michault, A.; Murri, S.; Frangeul, L.; Vaney, M.-C.; Lavenir, R.; Pardigon, N.; Reynes, J.-M.; Pettinelli, F.; et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Med* **2006**, *3* (7), e263.

(59) Tsetsarkin, K. A.; Vanlandingham, D. L.; McGee, C. E.; Higgs, S. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathog* **2007**, *3* (12), e201.

(60) Tsetsarkin, K. A.; Chen, R.; Leal, G.; Forrester, N.; Higgs, S.; Huang, J.; Weaver, S. C. Chikungunya Virus Emergence Is Constrained in Asia by Lineage-Specific Adaptive Landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (19), 7872–7877.

(61) Tsetsarkin, K. A.; Chen, R.; Yun, R.; Rossi, S. L.; Plante, K. S.; Guerbois, M.; Forrester, N.; Perng, G. C.; Sreekumar, E.; Leal, G.; et al. Multi-Peaked Adaptive Landscape for Chikungunya Virus Evolution Predicts Continued Fitness Optimization in *Aedes Albopictus* Mosquitoes. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4084.

## *Le rôle du vecteur dans la (ré)émergence*

Pour mieux comprendre l'épidémiologie et la réémergence du chikungunya, il est nécessaire d'étudier ses vecteurs et l'interaction de ces derniers avec l'hôte. Dans le cas du CHIKV, la transmission s'effectue par le biais de moustiques femelles appartenant au genre *Aedes* (famille : Culicidae).

En Afrique, la persistance du virus s'explique par l'existence d'un cycle sylvatique impliquant un réservoir de primates hôtes (cercopithèques et babouins) et de plusieurs espèces de moustiques du genre *Aedes*, tels qu'*A. furcifer* et *A. africanus*.<sup>63</sup> Dans ce cycle, ni l'hôte, ni le vecteur ne semblent présenter de signes cliniques de la maladie. Ce cycle n'a pu être mis en évidence qu'en Afrique, ce qui suggère l'origine africaine du CHIKV. En Asie, il a été démontré que le CHIKV était impliqué uniquement dans un cycle urbain (et péri-urbain), impliquant l'Homme comme hôte et *A. aegypti* ou *A. albopictus* comme vecteurs.<sup>18</sup>

### **L'invasion mondiale d'*Aedes albopictus* et d'*A. aegypti***

Au cours des trente dernières années, les aires de répartition des deux espèces de moustiques, *A. albopictus* et *A. aegypti*, ont considérablement augmenté du fait de la mondialisation et du réchauffement climatique Figure 10.<sup>64</sup> Ces deux espèces sont ainsi devenues les vecteurs privilégiés du virus de la dengue (DENV) et du CHIKV pour *A. aegypti* et *A. albopictus*, respectivement.<sup>65</sup> En effet, la prédominance d'*A. albopictus* dans la plupart des épidémies récentes de CHIKV est à rapprocher de la survenue d'une mutation sur la protéine E1 du CHIKV facilitant sa répllication chez *A. albopictus*.<sup>66</sup> D'autre part, il a été montré qu'*A. albopictus* savait tirer parti du milieu urbain,<sup>67,68</sup> et cela y compris dans les régions à climat tempéré.<sup>69</sup> Les dernières projections climatiques suggèrent qu'à l'horizon 2050, *A. albopictus* pourrait être présent sur plus de 70 % de la surface terrestre, zone où 2,4 milliards d'êtres humains vivent aujourd'hui.<sup>70</sup>

---

(62) Vega-Rúa, A.; Zouache, K.; Girod, R.; Failloux, A.-B.; Lourenço-de-Oliveira, R. High Level of Vector Competence of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J. Virol.* **2014**, *88* (11), 6294–6306.

(63) Diallo, M.; Thonnon, J.; Traore-Lamizana, M.; Fontenille, D. Vectors of Chikungunya Virus in Senegal: Current Data and Transmission Cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *60* (2), 281–286.

(64) Campbell, L. P.; Luther, C.; Moo-Llanes, D.; Ramsey, J. M.; Danis-Lozano, R.; Peterson, A. T. Climate Change Influences on Global Distributions of Dengue and Chikungunya Virus Vectors. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *370* (1665), 0135–0144.

(65) Lambrechts, L.; Scott, T. W.; Gubler, D. J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes Albopictus* for Dengue Virus Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4* (5), e646.

(66) Tsatsarkin, K. A.; Weaver, S. C. Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence. *PLoS Pathog* **2011**, *7* (12), e1002412.

(67) Knudsen, A. B.; others. Global Distribution and Continuing Spread of *Aedes Albopictus*. *Parassitologia* **1995**, *37* (2-3), 91–97.

(68) Li, Y.; Kamara, F.; Zhou, G.; Puthiyakunnon, S.; Li, C.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Yao, L.; Yan, G.; Chen, X.-G. Urbanization Increases *Aedes Albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, *8* (11), e3301.

(69) Fischer, D.; Thomas, S. M.; Suk, J. E.; Sudre, B.; Hess, A.; Tjaden, N. B.; Beierkuhnlein, C.; Semenza, J. C. Climate Change Effects on Chikungunya Transmission in Europe: Geospatial Analysis of Vector's Climatic Suitability and Virus' Temperature Requirements. *Int J Health Geogr* **2013**, *12* (1), 51.

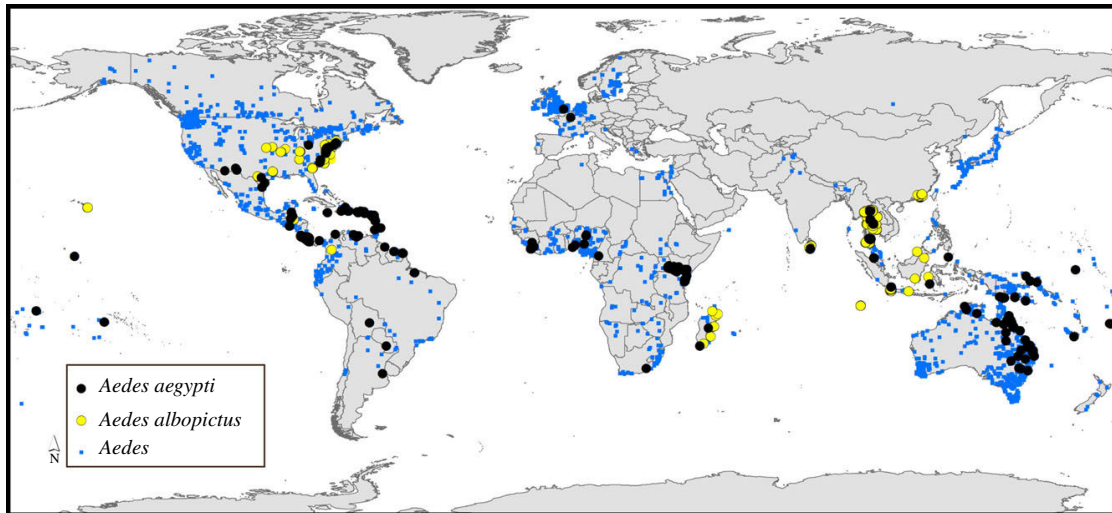


Figure 10. Données attestant de la présence de moustiques *Aedes* (bleu), *A. albopictus* (jaune) et *A. aegypti* (noir).<sup>64</sup>

### La présence d'*A. albopictus* et d'*A. aegypti* en Europe et en France métropolitaine

En Europe, la présence d'*A. albopictus* a été signalée au début des années 1980 en Albanie et des années 90 en Italie. Ce vecteur est désormais répertorié dans 25 pays européens et notamment sur le pourtour nord de la Méditerranée occidentale (Figure 11).<sup>19</sup> *Aedes aegypti* s'est, quant à lui, essentiellement implanté sur la rive orientale de la mer Caspienne.

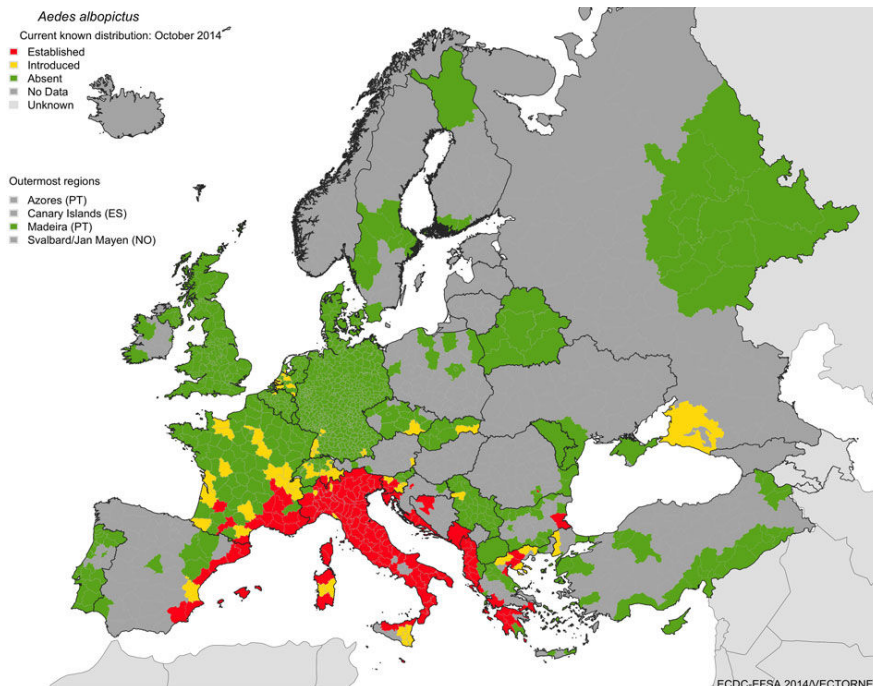


Figure 11. Distribution actuelle d'*Aedes albopictus* en Europe.<sup>19</sup>

(70) Proestos, Y.; et al. Present and Future Projections of Habitat Suitability of the Asian Tiger Mosquito, a Vector of Viral Pathogens, from Global Climate Simulation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2015**, 370 (1665), 20130554.

En France métropolitaine, *A. albopictus* a été détecté pour la première fois à Menton en 2004. L'existence d'un dispositif national de surveillance entomologique, composé de pièges pondoirs, a permis de suivre sa propagation.<sup>71</sup> Cette dernière s'effectue passivement via les transports routiers.

En 2013, l'aire de répartition d'*A. albopictus* en France métropolitaine n'a jamais été aussi importante. L'espèce s'est durablement implantée dans les régions PACA et Corse (Figure 12). Elle est également présente de façon plus ponctuelle entre Marseille et la frontière espagnole.

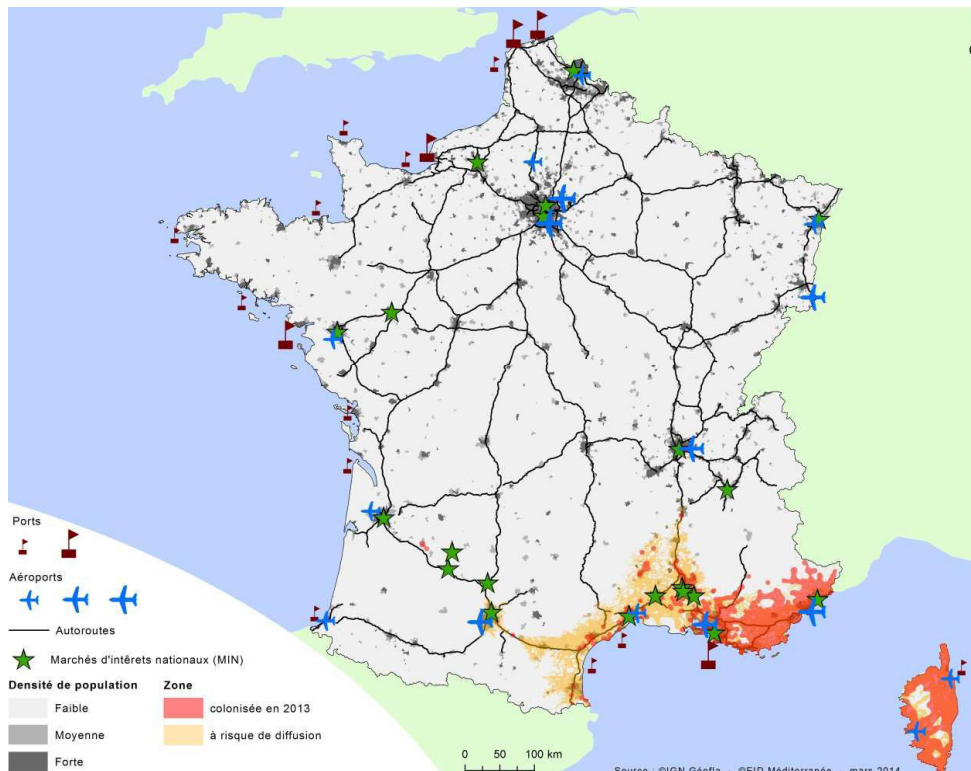


Figure 12. Zones colonisées par *A. albopictus* en 2013 et sites à risque d'introduction.<sup>71</sup>

En Corse, la présence *A. albopictus* a été observée dès 2005. Grâce à la surveillance entomologique mise en place par l'agence régionale de la santé, il a pu être établi que l'aire de répartition de l'espèce s'agrandissait d'année en année.<sup>72</sup> En 2013, *A. albopictus* avait ainsi colonisé l'ensemble du territoire insulaire (Figure 13). Celui-ci fut même signalé dans certains villages situés à 900 m d'altitude. Quelques zones relativement isolées (Niolu) semblent néanmoins épargnées.

En dépit de la présence durable d'*A. albopictus* en Corse, aucune épidémie de CHIKV n'a été rapportée. Sur la période 2010-2014, seuls deux cas de CHIKV importés ont été dénombrés. En réaction, les autorités ont réalisé des actions préventives de démoustication.<sup>73</sup>

(71) Ministère des affaires sociales et de la santé. *Surveillance Du Moustique Aedes Albopictus En France Métropolitaine - Bilan 2013*; EID - Entente interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen: Corte, 2013.

(72) Cardi, H. *Surveillance d'Aedes Albopictus En Corse - Bilan Entomologique 2012*; Agence régionale de santé de Corse: Corte, 2012.

(73) Un cas suspect de chikungunya ou de dengue décelé chez un habitant de Bastia et de Sisco | Bastia | Corse-Matin <http://www.corsematin.com/article/bastia/un-cas-suspect-de-chikungunya-ou-de-dengue-decele-chez-un-habitant-de-bastia-et-de-si.1462850.html> (accessed Mar 9, 2015).

Par ailleurs, il a été démontré que la population corse d'*A. albopictus* était susceptible d'être infectée par le virus, mais aussi de le transmettre.<sup>74</sup>

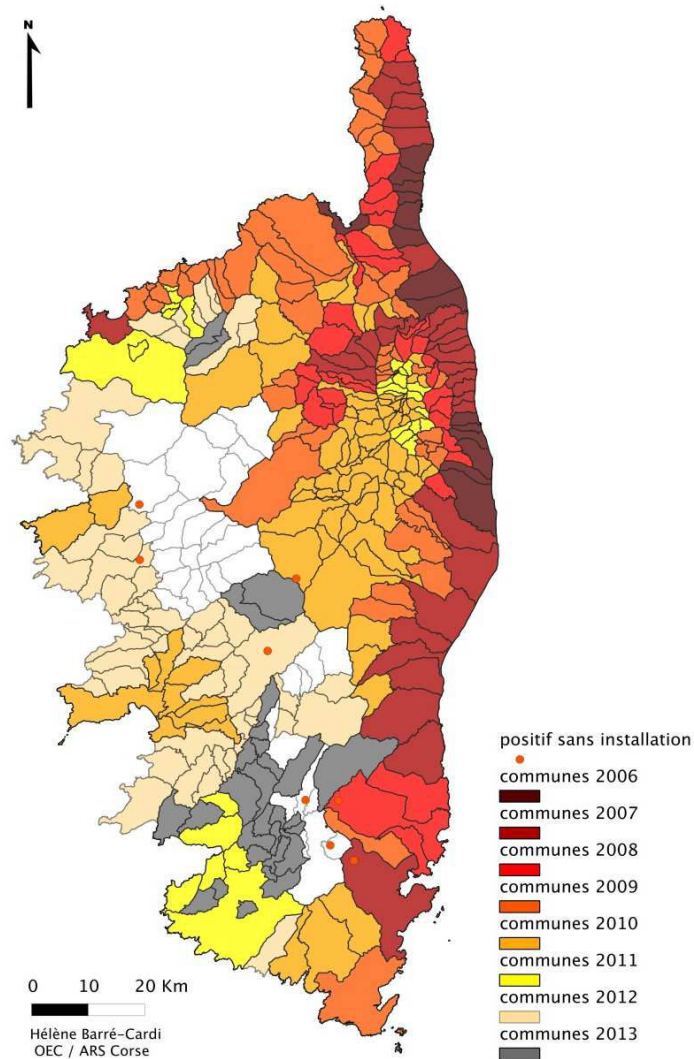


Figure 13. Colonisation de la Corse par *A. albopictus* de 2006 à 2013.<sup>72</sup>

## I. 1. 2. Les moyens de lutte contre le CHIKV

### *Les traitements actuels*

A l'heure actuelle, il n'existe ni traitement antiviral, ni vaccin pour lutter contre le virus du chikungunya. Toutefois, les malades ayant contractés le CHIKV peuvent recevoir différents traitements symptomatiques visant notamment à diminuer la fièvre et les douleurs articulaires. Ces médicaments sont essentiellement des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, des antipyrétiques et des analgésiques.<sup>75</sup>

(74) Moutailler, S.; Barré, H.; Vazeille, M.; Failloux, A.-B. Recently Introduced *Aedes Albopictus* in Corsica Is Competent to Chikungunya Virus and in a Lesser Extent to Dengue Virus. *Trop. Med. Int. Health* **2009**, *14* (9), 1105–1109.

(75) Parashar, D.; Cherian, S. Antiviral Perspectives for Chikungunya Virus. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, e631642.



## ***La lutte contre le vecteur***

La lutte contre les moustiques du genre *Aedes* est rendue difficile par leur capacité à proliférer dans des environnements peu accessibles, mais aussi en raison de leur faculté à tirer parti de l'accélération des échanges liés à la mondialisation.<sup>19</sup> Différentes approches permettent de lutter contre la prolifération des vecteurs : (i) les modifications environnementales, (ii) le contrôle biologique, (iii) le traitement chimique et (iv) les modifications génétiques.<sup>17</sup>

Afin de limiter les zones propices à la reproduction du moustique, des mesures contribuant à modifier l'environnement (assèchement de marais, élimination des nids potentiels) peuvent être prises. Elles concernent aussi les habitations humaines. L'ensemble de ces mesures a engendré une nette diminution des piqûres de moustiques.

Le contrôle biologique consiste en l'utilisation de prédateurs ou de pathogènes naturels pouvant réduire les populations d'*Aedes*.<sup>17</sup> Il peut s'agir de l'utilisation de copépodes (petits crustacés) introduits dans des marais où les larves prolifèrent. Une autre stratégie utilise des relargages d'*Aedes* mâles rendus infertiles par une bactérie endosymbiotique, *Wolbachia pipientis*. Ces largages peuvent diminuer voire éliminer les populations de moustiques.

Une approche plus classique consiste en l'utilisation de traitements insecticides "chimiques" tels que des carbamates, des pyréthriinoïdes, des organophosphorés et des organochlorés. Ces derniers sont utilisés depuis plusieurs décennies afin de contrôler localement la prolifération des vecteurs. Cependant, l'utilisation abusive de ces insecticides a conduit à l'apparition de population vectorielle résistante. C'est notamment le cas d'*A. aegypti*, pour lequel des populations sont devenues insensibles aux quatre classes précitées.<sup>76</sup> En comparaison, ce phénomène est moins avancé chez *A. albopictus*. Néanmoins, des populations résistantes d'*A. albopictus* devraient émerger à court terme du fait de l'utilisation de pesticides à grande échelle dans le cadre de l'agriculture intensive.

Il est également possible de lutter contre les vecteurs par des stratégies impliquant des modifications génétiques. Par exemple, dans le cas de la technique dite de la « stérilisation », de larges populations de mâles sont exposées à des rayonnement ionisants induisant ainsi des mutations aléatoires dans le sperme des insectes.<sup>77</sup> Une fois ces mâles relargués, la fécondation des femelles est rarement viable.

## ***La recherche de vaccins***

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin disponible pour prévenir l'infection au CHIKV. Les forces armées américaines avaient réussi à obtenir un vaccin à partir de souches

---

(76) Vontas, J.; Kioulos, E.; Pavlidi, N.; Morou, E.; della Torre, A.; Ranson, H. Insecticide Resistance in the Major Dengue Vectors *Aedes Albopictus* and *Aedes Aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2012**, *104* (2), 126–131.

(77) Alphey, L.; Benedict, M.; Bellini, R.; Clark, G. G.; Dame, D. A.; Service, M. W.; Dobson, S. L. Sterile-Insect Methods for Control of Mosquito-Borne Diseases: An Analysis. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2009**, *10* (3), 295–311.

atténuées dans les années 2000.<sup>78</sup> Bien qu'ayant démontré une certaine efficacité au cours d'essais cliniques de phase II, ce dernier a été abandonné car il ne représentait pas une priorité stratégique pour l'armée américaine de l'époque.

Suite à la recrudescence d'épidémies dans de nombreuses régions du globe, plusieurs vaccins utilisant différentes stratégies immunitaires sont actuellement en cours de développement. Deux revues détaillées existent sur le sujet.<sup>79,80</sup> Récemment, un vaccin à pseudo-virions a terminé avec succès la phase clinique I.<sup>81</sup> Il est donc raisonnable d'espérer qu'un vaccin soit disponible à moyen terme.

## ***La recherche de nouveaux inhibiteurs de la réplication du CHIKV***

Suite à la réémergence de la maladie, la recherche de nouveaux inhibiteurs de la réplication du CHIKV a connu un regain d'activité ces dernières années. Les inhibiteurs du CHIKV peuvent être regroupés en trois classes en fonction de leur nature : (i) les molécules organiques, (ii) les séquences d'acide ribonucléique interfèrent (RNAi) et, (iii) les facteurs cellulaires de croissance. Plusieurs revues exhaustives regroupent l'ensemble des travaux sur ces trois classes d'inhibiteurs jusqu'en 2014.<sup>75,82-84</sup> Dans la partie suivante, il sera discuté uniquement des molécules synthétiques et naturelles les plus prometteuses, inhibant efficacement la réplication in vitro et/ou in vivo du CHIKV.

### **Les médicaments en cours d'évaluation pour traiter le CHIKV**

Au début des années 1980, la chloroquine (**1**) fut la première molécule décrite comme ayant une activité antivirale sur le CHIKV ( $EC_{50}$  entre 5 et 20  $\mu$ M) ainsi que sur deux autres *Alphavirus*, le Sindbis virus (SINV) et le Semliki forest virus (SFV).<sup>85,86</sup> En 1984, les résultats d'une étude pilote effectuée sur dix patients atteints de CHIKV indiquèrent que

---

(78) Edelman, R.; Tacket, C. O.; Wasserman, S. S.; Bodison, S. A.; Perry, J. G.; Mangiafico, J. A. Phase II Safety and Immunogenicity Study of Live Chikungunya Virus Vaccine TSI-GSD-218. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *62* (6), 681–685.

(79) Singh, P.; Chhabra, M.; Mittal, V.; Sharma, P.; Rizvi, M. A.; Chauhan, L.; Rai, A. Current Research and Clinical Trials for a Vaccine against Chikungunya Virus. *Vaccine Dev. Ther.* **2013**, 35–46.

(80) Ahola, T.; Courderc, T.; Ng, L. F. P.; Hallengård, D.; Powers, A.; Lecuit, M.; Esteban, M.; Merits, A.; Roques, P.; Liljeström, P. Therapeutics and Vaccines Against Chikungunya Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 250–257.

(81) Chang, L.-J.; Dowd, K. A.; Mendoza, F. H.; Saunders, J. G.; Sitar, S.; Plummer, S. H.; Yamshchikov, G.; Sarwar, U. N.; Hu, Z.; Enama, M. E.; et al. Safety and Tolerability of Chikungunya Virus-like Particle Vaccine in Healthy Adults: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *The Lancet* **2014**, *384* (9959), 2046–2052.

(82) Rashad, A. A.; Mahalingam, S.; Keller, P. A. Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2013**, *57* (4), 1147–1166.

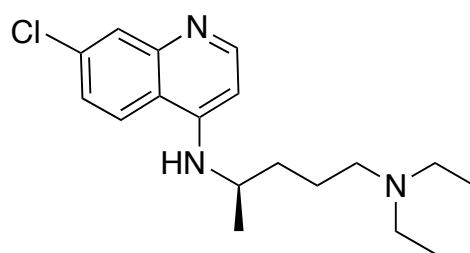
(83) Kaur, P.; Chu, J. J. H. Chikungunya Virus: An Update on Antiviral Development and Challenges. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 969–983.

(84) Jadav, S. S.; Korupolu, P.; Sinha, B. N.; Jayaprakash, V. Chikungunya Epidemiological Survey and Current Available Inhibitors. *J. Pharm. Chem.* **2014**, *1* (3), 59–67.

(85) Coombs, K.; Mann, E.; Edwards, J.; Brown, D. T. Effects of Chloroquine and Cytochalasin B on the Infection of Cells by Sindbis Virus and Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* **1981**, *37* (3), 1060–1065.

(86) Helenius, A.; Marsh, M.; White, J. Inhibition of Semliki Forest Virus Penetration by Lysosomotropic Weak Bases. *J. Gen. Virol.* **1982**, *58 Pt 1*, 47–61.

l'administration de 250 mg de phosphate de chloroquine avait soulagée l'arthralgie chronique de 50 % des individus.<sup>87</sup> A l'inverse, en 1991, une étude préclinique suggéra que cette molécule augmentait la réplication virale et aggravait les symptômes de la maladie.<sup>88</sup> Ces résultats furent confirmés, lors de l'épidémie qui sévit sur l'île de la Réunion en 2006, où un essai clinique randomisé en double-aveugle a pu mettre en évidence que l'utilisation de phosphate de chloroquine n'avait pas d'effet antiviral et ne soulageait pas les douleurs articulaires.<sup>89</sup> Des travaux plus récents ont corroboré ces observations.<sup>90,91</sup>



chloroquine (1)

#### *La ribavirine, 6-Azauridine et la doxycycline*

La ribavirine (2) et la 6-azauridine (3) sont des antiviraux ayant démontré une activité inhibitrice sur plusieurs virus à ARN dont le CHIKV dans des cellules Vero ( $EC_{50} = 83 \mu\text{g/mL}$  et index de sélectivité (SI, *selectivity index*) = 24,  $EC_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$  et IS = 204, respectivement).<sup>92</sup> De plus, dans cette même étude, une synergie a été observée *in vitro* entre la ribavirine et des interférons. Lors d'une étude réalisée sur dix patients, une amélioration des symptômes associés à l'arthralgie fut constatée.<sup>93</sup> Une récente publication indique que l'association de la ribavirine (1) ( $EC_{50} = 15,5 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ) et de la doxycycline (4) ( $EC_{50} = 11 \pm 2 \mu\text{M}$ ) dans un rapport 1:1, inhibe efficacement la réplication du virus *in cellulo* ( $EC_{50} = 4,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) et réduit l'infektivité du CHIKV dans un modèle murin.<sup>94</sup> La doxycycline (4) est un antibiotique de la classe des tétracyclines, pouvant être utilisé pour inhiber la synthèse protéique de micro-organismes, dont le rétrovirus de la leucémie murine et de la dengue *in cellulo*, ainsi que pour traiter des patients humains infectés par le virus de la grippe aviaire.

(89) De Lamballerie, X.; Boisson, V.; Reynier, J.-C.; Enault, S.; Charrel, R. N.; Flahault, A.; Roques, P.; Le Grand, R. On Chikungunya Acute Infection and Chloroquine Treatment. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* **2008**, 8 (6), 837–839.

(90) Padmakumar, B.; Jayan, J. B.; Menon, R. M.; Krishnankutty, B.; Payippallil, R.; Nisha, R. Comparative Evaluation of Four Therapeutic Regimes in Chikungunya Arthritis: A Prospective Randomized Parallel-Group Study. *Indian J. Rheumatol.* **2009**, 4 (3), 94–101.

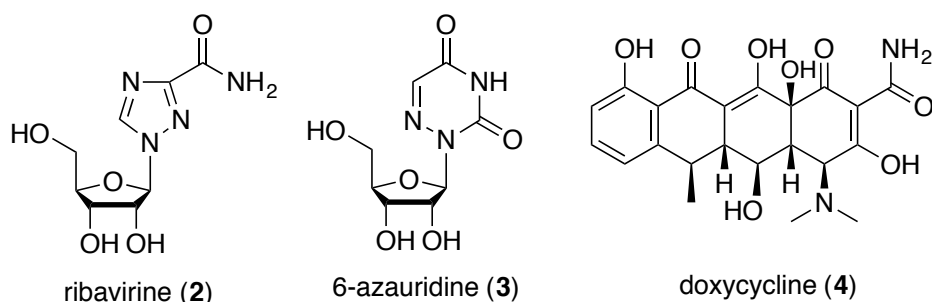
(91) Chopra, A.; Saluja, M.; Venugopalan, A. Effectiveness of Chloroquine and Inflammatory Cytokine Response in Patients with Early Persistent Musculoskeletal Pain and Arthritis Following Chikungunya Virus Infection. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **2014**, 66 (2), 319–326.

(92) Briolant, S.; Garin, D.; Scaramozzino, N.; Jouan, A.; Crance, J. M. In Vitro Inhibition of Chikungunya and Semliki Forest Viruses Replication by Antiviral Compounds: Synergistic Effect of Interferon- $\alpha$  and Ribavirin Combination. *Antiviral Res.* **2004**, 61 (2), 111–117.

(93) Ravichandran, R.; Manian, M. Ribavirin Therapy for Chikungunya Arthritis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2008**, 2 (02), 140–142.

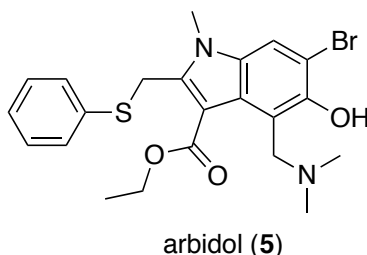
(94) Rothan, H. A.; Bahrani, H.; Mohamed, Z.; Teoh, T. C.; Shankar, E. M.; Rahman, N. A.; Yusof, R. A Combination of Doxycycline and Ribavirin Alleviated Chikungunya Infection. *PLoS ONE* **2015**, 10 (5), e0126360.





### L'arbidol

L'arbidol (5) a initialement été développé pour traiter le virus de la grippe. Il a été découvert que cette molécule avait un effet antiviral sur une large gamme de virus à ADN et à ARN, dont le CHIKV ( $IC_{50} 12 \pm 2 \mu\text{M}$ , cellules MRC-5).<sup>95</sup> Une souche de CHIKV résistante (4) a été obtenue par culture. Celle-ci diffère du *wild-type* par un seul acide aminé appartenant à la protéine E2.



### Le bindarit

Le bindarit (6) est un alcaloïde indazolique possédant des propriétés anti-inflammatoires, il est actuellement en phase clinique III pour le traitement du diabète de type II.<sup>96</sup> C'est un modulateur sélectif de la réponse inflammatoire (cytokine/chémokine) qui agit par activation de la voie du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B.<sup>97</sup> En 2011, une étude a décrit le potentiel de cette molécule pour traiter efficacement les inflammations arthritiques chez les souris infectées par le CHIKV.<sup>98</sup> Depuis, d'autres études sont venues confirmer le potentiel thérapeutique du bindarit (6) pour traiter les souris infectées par le CHIKV, mais aussi pour traiter un autre *Alphavirus* apparenté, le RRV (Ross River virus).<sup>99</sup> Malgré le fait que le bindarit (6) ne soit cité que par une seule revue sur le CHIKV,<sup>20</sup> ce composé est actuellement

(95) Delogu, I.; Pastorino, B.; Baronti, C.; Nougairède, A.; Bonnet, E.; de Lamballerie, X. In Vitro Antiviral Activity of Arbidol against Chikungunya Virus and Characteristics of a Selected Resistant Mutant. *Antiviral Res.* **2011**, *90* (3), 99–107.

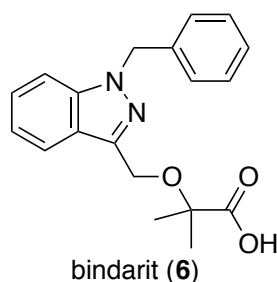
(96) Herrero, L. J.; Taylor, A.; Mahalingam, S. Antivirals: Bindarit—The Future in Alphavirus Treatment. *J Antivir Antiretrovir* **2013**, *5*.

(97) Mora, E.; Guglielmotti, A.; Biondi, G.; Sassone-Corsi, P. Bindarit: An Anti-Inflammatory Small Molecule That Modulates the NF $\kappa$ B Pathway. *Cell Cycle* **2012**, *11* (1), 159–169.

(98) Rulli, N. E.; Rolph, M. S.; Srikiatkachorn, A.; Anantapreecha, S.; Guglielmotti, A.; Mahalingam, S. Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204* (7), 1026–1030.

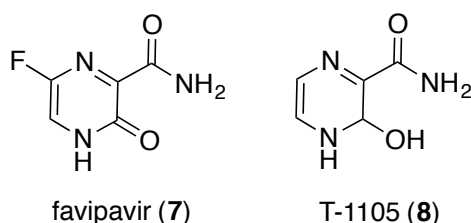
(99) Chen, W.; Foo, S.-S.; Taylor, A.; Lulla, A.; Merits, A.; Hueston, L.; Forwood, M. R.; Walsh, N. C.; Sims, N. A.; Herrero, L. J.; et al. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection. *J. Virol.* **2015**, *89* (1), 581–593.

le mieux positionné pour être utilisé dans le traitement de la maladie puisque sa toxicologie est déjà connue.



### Le favipavir

Le favipavir (7) est un analogue de nucléobases en phase clinique III pour le traitement de l'infection par le virus de la grippe. Il a récemment été démontré que celui-ci était un inhibiteur à large spectre d'*Alphavirus* dont le CHIKV *in cellulo* ( $EC_{50} = 25 \pm 3 \mu\text{M}$ , SI > 25, Vero cells, Indian ocean strain 899) et *in vivo* sur modèle murin.<sup>100</sup> Le dérivé nommée T-1105 (8) s'est montré encore plus actif que le favipavir (7) dans les mêmes conditions expérimentales ( $EC_{50} = 7 \pm 1 \mu\text{M}$ , SI > 81). Il a pu être établi qu'un changement de séquence codant pour l'ARN polymérase était suffisant pour induire l'apparition de résistance chez certaines souches modifiées par génie génétique. Or, la séquence concernée est hautement conservée chez les virus à ARN simple brin positif, ce qui expliquerait l'activité à large spectre du composé 7.



## La recherche d'inhibiteur de la réplication du CHIKV par criblage de banques de molécules

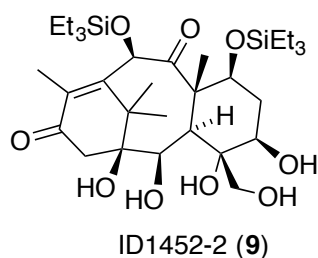
### Criblage de la nsP2 du CHIKV au CNRS-ICSN

Un criblage de 3040 molécules provenant de la chimiothèque du CNRS-ICSN a été réalisé pour identifier des molécules inhibitrices de la nsP2 (*non structural protein 2*) du CHIKV.<sup>101</sup> Un taxane synthétique (9) a montré un pouvoir inhibiteur sur la nsP2 et le CHIKV

(100) Delang, L.; Guerrero, N. S.; Tas, A.; Quérat, G.; Pastorino, B.; Froeyen, M.; Dallmeier, K.; Jochmans, D.; Herdewijn, P.; Bello, F.; et al. Mutations in the Chikungunya Virus Non-Structural Proteins Cause Resistance to Favipiravir (T-705), a Broad-Spectrum Antiviral. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69* (10), 2770–2784.

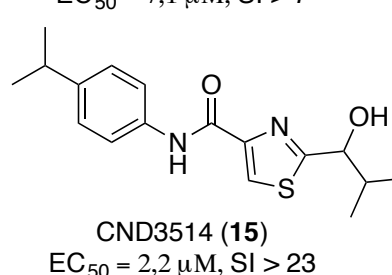
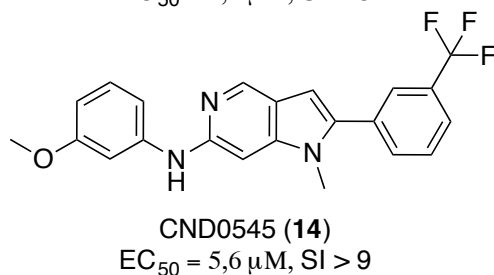
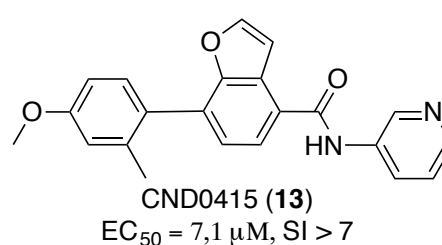
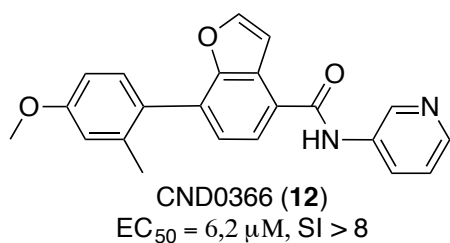
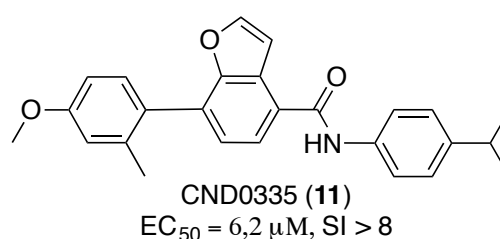
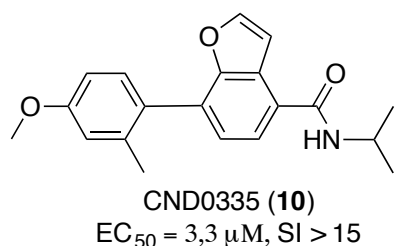
(101) Lucas-Hourani, M.; Lupan, A.; Desprès, P.; Thoret, S.; Pamlard, O.; Dubois, J.; Guillou, C.; Tangy, F.; Vidalain, P.-O.; Munier-Lehmann, H. A Phenotypic Assay to Identify Chikungunya Virus Inhibitors Targeting the Nonstructural Protein nsP2. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18* (2), 172–179.

*in vitro* (IC<sub>50</sub> 31 μM). Néanmoins, il faut préciser que la toxicité de ce dérivé n'a pas encore été évaluée.



### Criblage d'inhibiteur de kinases

Le criblage d'une banque de 4000 inhibiteurs de kinases a été réalisé afin d'évaluer leur potentiel inhibiteur de la réplication du CHIKV (cellules HuH-7).<sup>102</sup> Parmi les « hits », nous pouvons citer les molécules (10-13) ayant un squelette benzofurane, le composé (14) à squelette pyrrolopyridine ou encore thiazol-carboxamide (15).

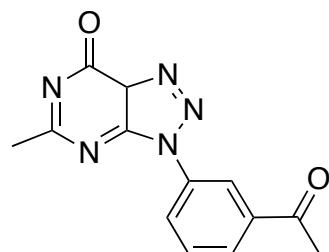


### Criblage de la chimiothèque du CSIC

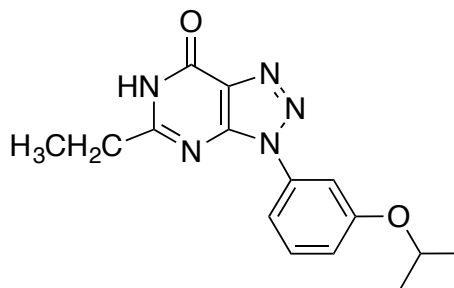
Au cours d'un criblage de la banque de composés du CSIC (Consejo superior de investigaciones científicas de Madrid, il a été démontré qu'une molécule de type

(102) Cruz, D. J. M.; Bonotto, R. M.; Gomes, R. G. B.; da Silva, C. T.; Taniguchi, J. B.; No, J. H.; Lombardot, B.; Schwartz, O.; Hansen, M. A. E.; Freitas-Junior, L. H. Identification of Novel Compounds Inhibiting Chikungunya Virus-Induced Cell Death by High Throughput Screening of a Kinase Inhibitor Library. *PLoS Negl Trop Dis* 2013, 7 (10), e2471.

[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-one (**16**) avait une activité inhibitrice sélective sur la réplication du CHIKV sur cellules Vero.<sup>103</sup> Un programme de chimie médicinale fut alors débuté et permit la synthèse de 31 analogues ; parmi eux, le composé (**17**) a présenté la meilleure activité antivirale.



**(16)**  
EC<sub>50</sub> = 19 ± 2 μM, SI > 743

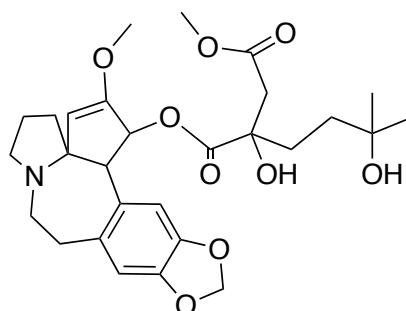


**(17)**  
EC<sub>50</sub> = 3 ± 1 μM, SI > 668

#### *Criblage de produits naturels effectué par une équipe de l'Université de Thaïlande*

Le criblage d'une banque de produits naturels (502 composés, BioMol, Plymouth Meeting, PA) issus de plantes, de micro-organismes et d'organismes marins a permis la découverte de l'activité anti-CHIKV de plusieurs molécules grâce à un essai *in cellulo*.<sup>104</sup>

Parmi l'ensemble des composés référencés dans cette banque, l'harringtonine (**18**), un ester de céfalotoxine isolé de *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae), est le constituant ayant montré la meilleure activité anti-CHIKV (EC<sub>50</sub> = 0,24 μM, cellule BHK21). Celui-ci est commercialisé aux USA depuis 2012 pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique.<sup>105</sup> Concernant le mécanisme d'action contre le CHIKV, l'harringtonine (**18**) agit en inhibant la synthèse de protéines virales. Dans cette même publication, les auteurs décrivent une activité anti-CHIKV pour, la rottlerin et la daunorubicine. Toutefois, ces résultats sont très certainement des faux-positifs dus aux propriétés cytotoxiques de ces deux molécules.<sup>106,107</sup>



**harringtonine (18)**

(103) Gigante, A.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (10), 4000–4008.

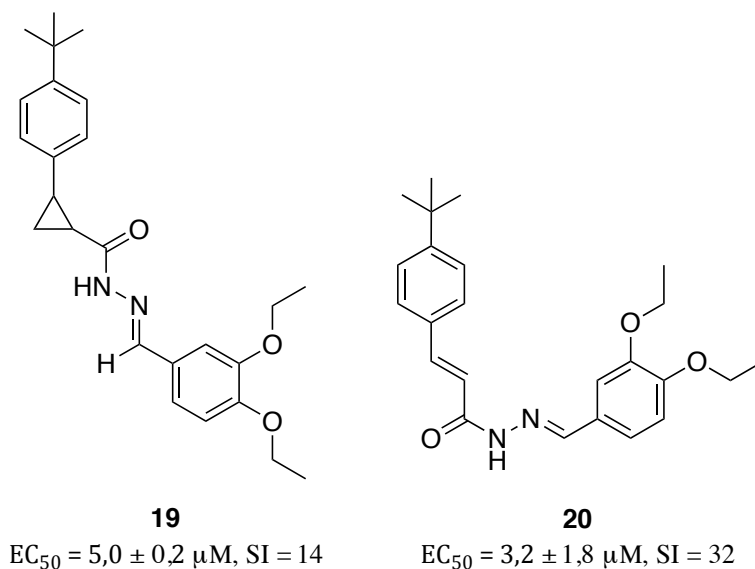
(104) Kaur, P.; *et al.* Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57 (1), 155–167.

(105) Quintás-Cardama, A.; Cortes, J. Homoharringtonine for the Treat. of Chr. Myelogenous Leuk.. *Expet Opin Pharmacother* **2008**, 9 (6).

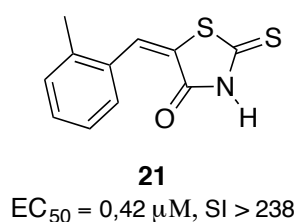
(106) Su, H.-Y.; Waldron, R.; Gong, R.; Pandol, S.; Lugea, A. Rottlerin Induces ER Stress-Mediated Cell Death in Pancreatic Stellate Cells. *Cancer Res.* **2015**, 75 (15 Supplement), 1769–1769.

### Criblage *in silico* sur la protéase nsP2 du CHIKV

Suite à un criblage virtuel de cinq millions de molécules sur la protéase nsP2 du CHIKV, une nouvelle classe d'inhibiteurs a pu être découverte.<sup>108</sup> A partir de l'un des hits, 26 analogues ont été créés par synthèse puis évalués sur le CHIKV *in cellulo* (cellules Vero) ; les composés **19** et **20** se sont avérés les plus actifs.<sup>109</sup>



Une série de dérivés de type 1,3-thiazolidin-4-one a été évaluée sur le CHIKV *in cellulo* (cellule Vero). Le composé **21** s'est révélé être le plus actif. La réalisation d'expérience de *docking* moléculaire suggère que la cible de cette molécule pourrait être la protéase nsP2 du CHIKV.<sup>110</sup>



Récemment, une série d'ural-coumarin-arene a été évaluée sur la réplication du CHIKV. Plusieurs dérivés dont le composé **22** ont montré une activité sélective sur le CHIKV.<sup>111</sup>

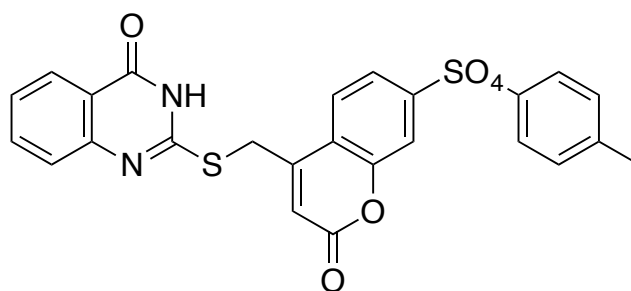
(107) Bertoli, S.; Récher, C. Nouv. Approches Thérap. Dans Les Leucé. Aiguës Myéloïdes. *Rev. Francoph. Lab.* **2015**, 2015 (471), 65–73.

(108) Bassetto, M.; De Burghgraeve, T.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Brancale, A. Computer-Aided Design and Evaluation of Novel Anti-CHIKV Compounds. *Antiviral Res.* **2011**, 90 (2), A67.

(109) Bassetto, M.; De Burghgraeve, T.; Delang, L.; Massarotti, A.; Coluccia, A.; Zonta, N.; Gatti, V.; Colombano, G.; Sorba, G.; Silvestri, R.; et al. Computer-Aided Identification, Design and Synthesis of a Novel Series of Compounds with Selective Antiviral Activity against Chikungunya Virus. *Antiviral Res.* **2013**, 98 (1), 12–18.

(110) Jadav, S. S.; Sinha, B. N.; Hilgenfeld, R.; Pastorino, B.; de Lamballerie, X.; Jayaprakash, V. Thiazolidone Derivatives as Inhibitors of Chikungunya Virus. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 89, 172–178.

(111) Hwu, J. R.; Kapoor, M.; Tsay, S.-C.; Lin, C.-C.; Hwang, K. C.; Horng, J.-C.; Chen, I.-C.; Shieh, F.-K.; Leyssen, P.; Neyts, J. Benzouracil–coumarin–arene Conjugates as Inhibiting Agents for Chikungunya Virus. *Antiviral Res.* **2015**, 118, 103–109.



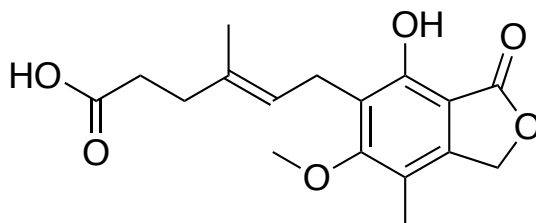
**22**

EC<sub>50</sub> = 10,2 μM, SI = 12

### Les produits naturels ayant démontré une activité inhibitrice de la réplication du CHIKV

#### *L'acide mycophénolique*

L'acide mycophénolique (**23**), un dérivé isolé de *Penicillium stoloniferum* peut réduire la réplication du CHIKV *in cellulo* en inhibant sélectivement l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMDPH).<sup>112</sup> Il a ainsi été démontré que l'IMDPH était impliqué dans la réplication du CHIKV. L'IMDPH intervient dans l'incorporation de guanosine dans la synthèse d'ARN viral.



acide mycophénolique (**23**)

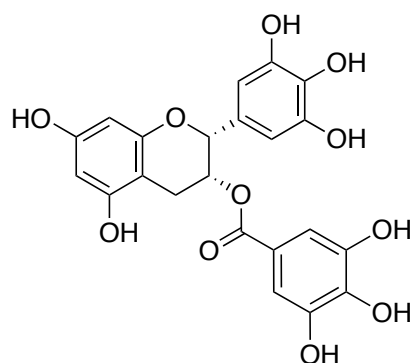
EC<sub>50</sub> = 0,2 μM, SI = 150

#### *L'épigallocatechine-3-gallate*

L'épigallocatechine-3-gallate (**24**) est l'un des constituants majoritaires du thé vert. De récents travaux ont indiqué que cette molécule pouvait bloquer l'entrée du CHIKV dans la cellule et donc empêcher la propagation de l'infection aux cellules saines.<sup>113</sup> L'index de sélectivité du composé **24** n'a pas été estimé au cours de cette étude.

(112) Khan, M.; Dhanwani, R.; Patro, I. K.; Rao, P. V. L.; Parida, M. M. Cellular IMPDH Enzyme Activity Is a Potential Target for the Inhibition of Chikungunya Virus Replication and Virus Induced Apoptosis in Cultured Mammalian Cells. *Antiviral Res.* **2011**, *89* (1), 1–8.

(113) Weber, C.; Sliva, K.; von Rhein, C.; Kümmerer, B. M.; Schnierle, B. S. The Green Tea Catechin, Epigallocatechin Gallate Inhibits Chikungunya Virus Infection. *Antiviral Res.* **2014**, *113*, 1–3.

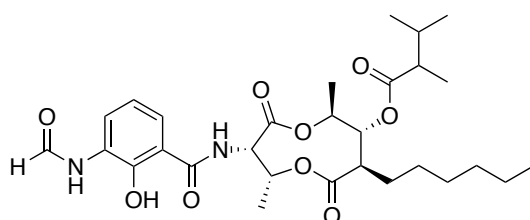


épigallocatechin-3-gallate (**24**)

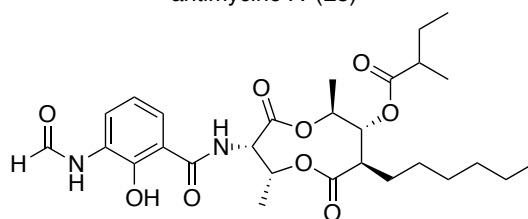
EC<sub>50</sub> = 20 μM, SI > n. d.

### Les dérivés de l'antimycine A

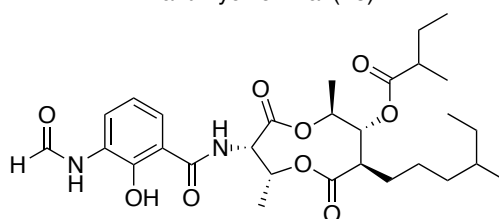
Une campagne d'évaluation d'extraits obtenus à partir d'actinomycètes marins (*Streptomyces kaviengensis*) a permis l'isolement de l'antimycine A (**25**) et de deux dérivés, l'antimycine A1a (**26**) et l'antimycine A10a (**27**). Ces molécules sont capables d'inhiber de nombreux virus à ARN dont un représentant des *Alphavirus* (WEEV).<sup>114</sup> L'antimycine A (**25**), un inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons mitochondriales, est utilisé comme piscicide. Suite à ces résultats, les chercheurs de l'Université du Michigan ont mis en évidence que le composé **25** avait également un fort effet antiviral. L'administration d'antimycine A (**25**) chez la souris infectée par le WEEV a fortement diminué la sévérité des signes cliniques et le titre viral dans le système nerveux central.<sup>114</sup>



antimycine A (**25**)



antimycine A1a (**26**)

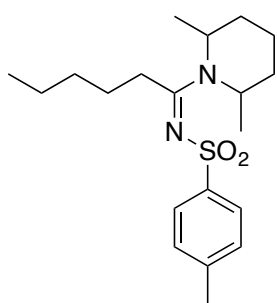


antimycine A10a (**27**)

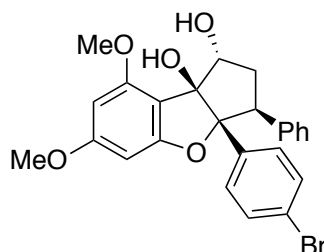
(114) Raveh, A.; Delekta, P. C.; Dobry, C. J.; Peng, W.; Schultz, P. J.; Blakely, P. K.; Tai, A. W.; Matainaho, T.; Irani, D. N.; Sherman, D. H.; et al. Discovery of Potent Broad Spectrum Antivirals Derived from Marine Actinobacteria. *PLoS ONE* **2013**, 8 (12), e82318.

## Les flavaglines

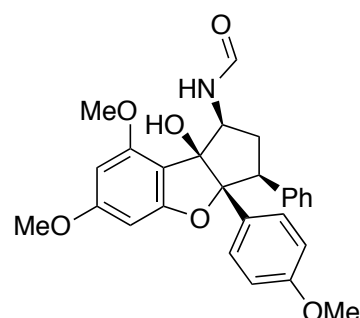
L'équipe de Duncan R. Smith a montré que le principal récepteur cellulaire utilisé par le CHIKV pour pénétrer dans la cellule hôte était la prohibitine.<sup>35</sup> Dans une récente publication, cette même équipe a évalué l'activité des molécules connues pour interagir avec la prohibitine (PHB) : la sulfonamide 1m (**28**) et les flavaglines de synthèse, FL3 (**29**) et FL23 (**30**).<sup>35</sup> Les résultats ont montré que ces trois molécules pouvaient réduire le nombre de cellules infectées et diminuer la production virale. De plus, la sulfonamide 1m (**28**) et le FL23 (**30**) n'ont pas d'effet s'ils sont ajoutés post-infection par le CHIKV, alors que FL23 (**30**) a un effet bénéfique jusqu'à 1h après l'infection. Notons que les flavaglines sont une classe de produits naturels retrouvée dans les plantes du genre *Aglaia* (Meliaceae)<sup>115</sup> et que ces constituants sont connus pour leur forte activité cytotoxique.



sulfonamide 1m (**28**)  
IC<sub>50</sub> ≈ 20 nM, SI ≈ 7



FL3 (**29**)  
IC<sub>50</sub> = 22.4 nM, SI = 5.3



FL23 (**30**)  
IC<sub>50</sub> ≈ 20 nM, SI ≈ 5

## Les esters de diterpènes d'Euphorbiaceae

Au cours des dernières années, des études menées sur des plantes de la famille des Euphorbiaceae par l'équipe « Métabolites de végétaux » du CNRS-ICSN ont permis la découverte de diterpénoïdes possédant une forte activité inhibitrice sur la réplication du CHIKV. Ces diterpènes possèdent un squelette de type daphnane<sup>116,117</sup> ou tigliane.<sup>118-120</sup>

(115) Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Nebigil, C.; Désaubry, L. Recent Advances in the Biology and Chemistry of the Flavaglines. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (6), 1857–1864.

(116) Allard, P.-M.; Leyssen, P.; Martin, M.-T.; Bourjot, M.; Dumontet, V.; Eydoux, C.; Guillemot, J.-C.; Canard, B.; Poullain, C.; Guéritte, F.; et al. Antiviral Chlorinated Daphnane Diterpenoid Orthoesters from the Bark and Wood of *Trigonostemon* Cherrieri. *Phytochemistry* **2012**, *84*, 160–168.

(117) Bourjot, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Litaudon, M. Trigocherrierin A, a Potent Inhibitor of Chikungunya Virus Replication. *Molecules* **2014**, *19* (3), 3617–3627.

(118) Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Prostratin and 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Are Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (12), 2183–2187.

(119) Corlay, N.; Delang, L.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Clerc, P.; Smadja, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Tigliane Diterpenes from *Croton Mauritianus* as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *Fitoterapia* **2014**, *97*, 87–91.

(120) Olivon, F.; Palenzuela, H.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Roussi, F.; Grondin, I.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Antiviral Activity of Flexibilane and Tigliane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (5), 1119–1128.

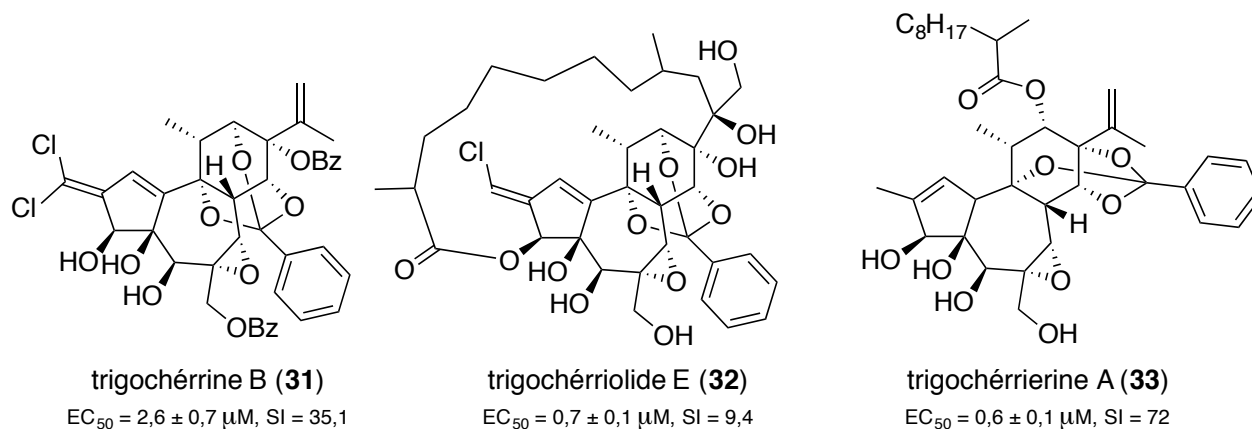
(121) Allard, P.-M.; Martin, M.-T.; Tran Huu Dau, M.-E.; Leyssen, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Trigocherrierin A, the First Natural Chlorinated Daphnane Diterpene Orthoester from *Trigonostemon* Cherrieri. *Org. Lett.* **2012**, *14* (1), 342–345.



### Les esters de diterpense de type daphnane

A partir d'un extrait d'écorces de tronc de *Trigonostemom cherrieri*, Euphorbiaceae de Nouvelle-Calédonie, des composés appartenant à deux séries de « daphnane orthoester halogéné » ont été identifiés ; il s'agit des trigocherrines et des trigocheriolides. Ces molécules diffèrent de celles précédemment isolées par la présence d'un macrocycle.<sup>121</sup> L'évaluation de l'activité antivirale de ces dérivés a montré que les trigocherrines A, B (**31**) et F, et le trigocherriolide E (**32**) inhibaient fortement la réplication du CHIKV de façon sélective mais également, avec une efficacité moindre, celle de deux autres *Alphavirus* (SINV et SFV).<sup>116</sup>

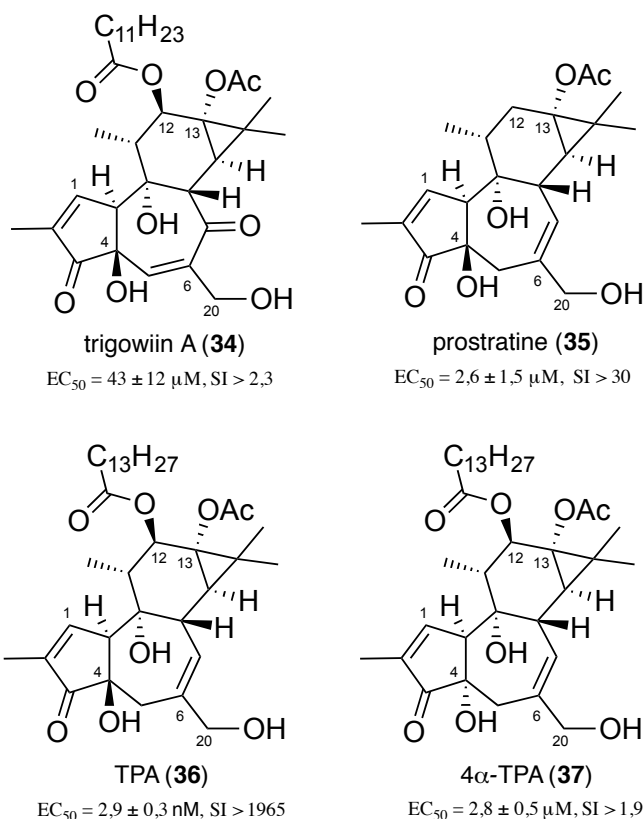
La poursuite des travaux sur *T. cherrieri* a permis d'isoler un nouveau dérivé non chloré à partir des feuilles, la trigocherrierine A (**33**) ; ce constituant a également exhibé un fort pouvoir inhibiteur de la réplication du CHIKV.



### Les esters de diterpenes de type tigliane

A la suite de ces travaux, d'autres études réalisées dans l'équipe « Métabolites de végétaux » (CNRS-ICSN) ont permis de mettre en évidence l'activité anti-CHIKV d'esters de diterpènes de type tigliane. L'investigation chimique d'un extrait de feuilles de *Trigonostemon howii*, récoltées dans le Nord Vietnam, a conduit à l'isolement de la trigowiin A (**34**).<sup>118</sup> La structure de ce constituant est très proche de celle de la prostratine (**35**), un ester de 12-déoxyphorbol isolé d'*Homalanthus nutans* et connu pour ses propriétés anti-HIV, d'une part, et de celle de l'ester de phorbol 12-*O*-tétradécanoatephorbol 13-acétate (TPA, **36**) isolé de *Croton tiglium*, d'autre part. Ces molécules, ainsi que le 4 $\alpha$ -TPA (**37**), ont été évaluées sur la réplication du CHIKV *in vitro*. Les résultats des essais ont montré que le TPA (**36**), et à un moindre degré la prostratine, possédaient un fort pouvoir inhibiteur sur la réplication du virus.<sup>118</sup> Des relations de structure-activité ont souligné l'importance pour l'activité anti-CHIKV de la configuration du carbone C-4 (**36** vs **37**) sur le squelette tigliane. Il faut souligner que le TPA (**36**) est l'un des plus puissants promoteurs de tumeurs décrits.<sup>122</sup> Cette propriété rend son utilisation thérapeutique improbable. A l'inverse, la prostratine (**35**)

possède un profil toxicologique différent. Elle est actuellement en phase clinique III aux USA pour le traitement du VIH.<sup>123,124</sup>

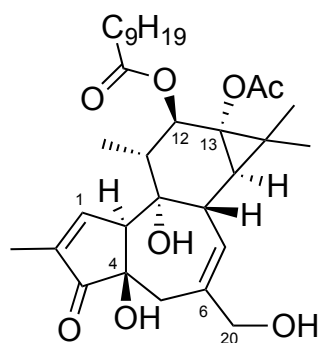


Les esters de phorbol **38** et **39** ont été isolés des feuilles de *Croton mauritanus*, une Euphorbiaceae endémique des îles Mascareignes.<sup>119</sup> Ces dérivés, bien que structurellement proches du TPA, se sont révélés être fortement cytotoxiques. De la comparaison avec le TPA (**36**) il a pu être déduit que la longueur de la chaîne carbonée en C-12 avait une influence sur la sélectivité vis-à-vis du CHIKV.

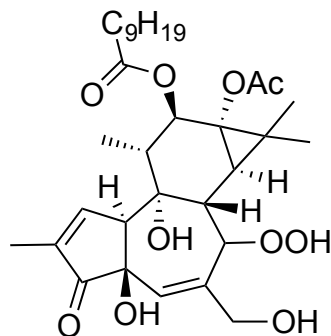
(122) Evans, F. J.; Schmidt, R. J. An Assay Procedure for the Comparative Irritancy Testing of Esters in the Tiglane and Daphnane Series. *Inflammation* **1979**, 3 (3), 215–223.

(123) AIDS Research Alliance. Moving Ahead: Prostratin Experiments Requested by the FDA <http://aidsresearch.org/news-events/news/moving-ahead-prostratin-experiments-requested-by-the-fda> (accessed Apr 3, 2015).

(124) AIDS Research Alliance. Preparing to Test Prostratin on Human Reservoir Cells <http://aidsresearch.org/news-events/news/getting-ready-to-test-prostratin-on-the-reservoir-cells> (accessed Jun 20, 2015).

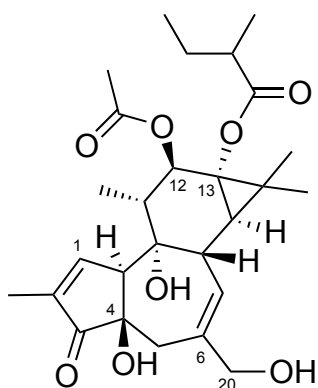


12-*O*-décanoyl-4β-phorbol 13-acétate (**38**)  
 $EC_{50} = 2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ , SI > 2,0

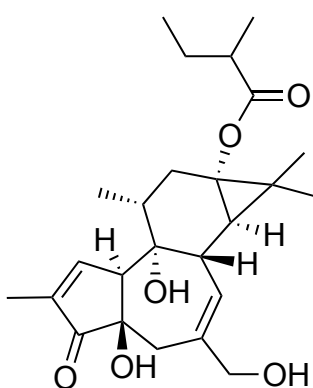


12-*O*-décanoyl-7-hydroperoxy-5-ène-4β-phorbol 13-acétate (**39**)  
 $EC_{50} = 4,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ , SI > 1,9

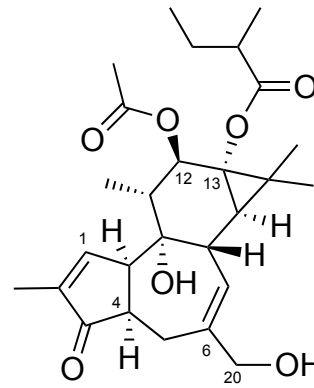
Enfin, l'étude de *Stillingia lineata*, une autre Euphorbiaceae endémique des îles Mascareignes, a conduit à l'isolement de différents types d'esters diterpéniques, ainsi que des molécules possédant un squelette flexibilane. L'évaluation biologique de ces composés a révélé que le 12-*O*-acétyl-4β-phorbol 13-méthylbutyrate (**41**) et le 12-déoxy-4β-phorbol 13-méthylbutyrate (**42**) possédait une forte activité sélective, à la fois sur la réplication du virus du CHIKV mais aussi sur celle du VIH. La faible activité du 12-*O*-acétyl-4α-déoxyphorbol 13-méthylbutyrate (**43**) révéla que l'absence d'un groupe hydroxyle en 4β était défavorable à l'activité antivirale.



**41**  
 $EC_{50} = 3,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ , SI = 41



**42**  
 $EC_{50} = 1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , SI > 240



**43**  
 $EC_{50} = 77 \mu\text{M}$ , SI = 1,4



## I. 2. Diversité végétale en Méditerranée et en Corse

### I. 2. 1. La Flore méditerranéenne

L'ensemble du bassin méditerranéen est considéré comme l'un des principaux hotspots de la biodiversité végétale avec plus de 25 000 espèces, rassemblant 4,3 % des espèces endémiques mondiales.<sup>125</sup> Néanmoins, la communauté scientifique s'accorde sur le fait qu'il est plus approprié de parler d'une association de nombreux hotspots au sein du bassin méditerranéen, considérant la diversité d'associations biogéographiques existantes.<sup>126</sup> D'un point de vue paléobotanique, la région méditerranéenne s'est comportée à la fois comme une aire de refuge, une aire d'échange, mais aussi une aire permettant la spéciation.<sup>126</sup> Plus précisément, dans la Méditerranée occidentale, les forts taux d'endémisme observés sont dus à la présence d'espèces relictuelles (paléo- et patro-endémique) en lien avec l'âge des formations géologiques, tandis qu'à l'est, l'endémisme vicariant (c'est à dire l'apparition d'espèces schizo- et apo-endémique) serait causé par la prédominance de roches ultramafiques (ultrabasique = riche en magnésium et fer) et à l'impact moindre des phases paléoclimatiques froides.<sup>127</sup>

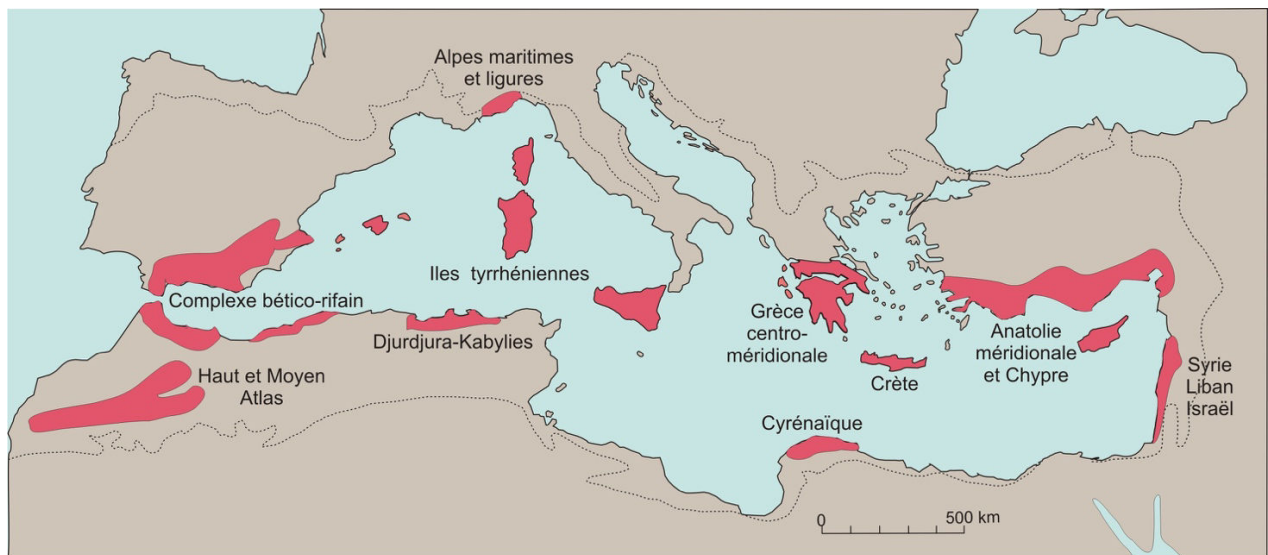


Figure 14. Les hotspots du bassin méditerranéen.<sup>126</sup>

(125) Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Da Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature* **2000**, *403* (6772), 853–858.

(126) Médail, F.; Quézel, P. Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. *Conserv. Biol.* **1999**, *13* (6), 1510–1513.

(127) Verlaque R; Médail F; Quézel P; Babinot JF. Endémisme Vég. et Paléog. Dans Le Bassin Méditer.. *Geobios* **1997**, No. 21, 159–166.

## I. 2. 2. La flore de Corse

La flore de Corse est constituée de plus de 2468 espèces, dont 13,6 % sont des endémiques *sensu lato* (sub-endémiques) aux aires de répartitions limitées, et 6,3 % d'endémiques corses strictes.<sup>128</sup> Ce taux d'endémisme, qui peut être considéré comme élevé, est à mettre en relation avec l'isolement relativement ancien du microcontinent corso-sarde (- 20 millions d'années) et la diversité d'habitats de cette île montagneuse (de nombreux sommets dépassent 2500 m d'altitude). La Corse est constituée de plusieurs régions naturelles (ensembles biogéologiques), résultant d'interactions complexes entre les zones géologiques, la topologie complexe, la présence de différents étages climatiques et de microclimats.<sup>129</sup> Les régions géologiques de la Corse sont :

- la Corse cristalline (incluant les principaux massifs du nord-ouest au sud constitués de granites et rhyolites) ;
- la Corse alpine (localisée dans le nord-est de l'île, composée de schistes lustrés) ;
- la Corse calcaire (regroupant les affleurements calcaires, comme à Saint-Florent et à Bonifacio).

La richesse végétale de la Corse s'inscrit dans le continuum floristique des îles tyrrhéniennes (Baléares, Corse, Sardaigne et Sicile) comme l'indique le taux d'espèces sub-endémiques à aire de répartition tyrrhénienne (environ 5%). Les îles méditerranéennes, et plus spécialement les îles montagneuses, ont constitué des refuges pour des espèces végétales lors des dernières périodes glaciaires.<sup>127</sup>

---

(128) Jeanmonod, D.; Gamisans, J. *Flora Corsica*, Edisud 921.; Aix-En-Provence, 2007; Vol. 1.

(129) Gamisans, J.; Sierra i Rafols, E.; Nuet i Badia, J. *Compléments au prodrome de la flore corse, Annexe / éd. par D. Jeanmonod & H.M. Burdet.* - Genève: Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. *Compléments au prodrome de la Flore corse*; Ed. des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève: Genève, Suisse, 1991.

## I. 3. Le genre *Euphorbia* : descriptions botaniques, ethnopharmacologiques et chimiques

### I. 3. 1. Les Euphorbiacées

Les Euphorbiacées forment une famille de plantes appartenant au clade des angiospermes eudicotylédones,<sup>130</sup> comprenant plus de 6300 espèces regroupées en 245 genres.<sup>131</sup> Sa distribution est cosmopolite, mais c'est dans les régions tropicales et subtropicales qu'elle exprime toute sa diversité.

La famille a été décrite pour la première fois par Antoine Laurent de Jussieu en 1789.<sup>132</sup> La taxonomie des Euphorbiacées a fait l'objet de nombreuses évolutions et discussions<sup>133,134</sup> jusqu'à l'apport de la phylogénie moléculaire à partir des années 2000. Sa classification est longtemps restée incertaine du fait d'une grande variabilité anatomique intrafamiliale, probablement liée à la diversité d'habitats dans lesquelles les membres de cette famille ont évolués.<sup>133,134</sup>

Les principaux critères de reconnaissance de cette famille sont :

- la présence de fleurs unisexuées, réunies en inflorescences ;
- des fruits constitués d'une capsule à déhiscence triple ;
- la présence d'un latex, dont l'aspect est variable selon les genres. Notons que certains genres, comme le genre *Mercurialis*, en sont dépourvus.

La dernière classification botanique de la famille des Euphorbiacées, telle que définie par Webster,<sup>134</sup> comprenait cinq sous-familles (Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Phyllanthoideae et Oldfieldoideae). Elle a ensuite été divisée en cinq familles distinctes lors de la classification moléculaire APGII: Euphorbiaceae (*sensu stricto*), Pandaceae, Phyllanthaceae, Picrodendraceae, Putranjivaceae.<sup>135</sup> Au cours de la dernière décennie, les progrès de la biologie moléculaire ont permis de clarifier les relations phylogénétiques au sein des Euphorbiacées.<sup>136,137</sup> Notamment, au niveau de la famille Euphorbiaceae (*sensu stricto*) qui a été organisée en trois sous-familles :

---

(130) The Angiosperm Phylogeny Group. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**, 161 (2), 105–121.

(131) Govaerts, R.; Frodin, D. G.; Radcliffe-Smith, A.; Carter, S. *World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)*; Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.

(132) Jussieu, A.-L. de. *Antonii Laurentii de Jussieu, ... Genera plantarum secundum naturales disposita, juxta methodum in horto regio parisiensi exarata, anno 1774 ([Reprod.]*); Herissant et T. Barrois (Parisiis), 1789.

(133) Webster, G. L. The Saga of the Spurge: A Review of Classification and Relationships in the Euphorbiales. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, 94 (1-2), 3–46.

(134) Webster, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1994**, 81 (1), 33–144.

(135) (APG), A. P. G. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II. *Bot J Linn Soc* **2003**, 141, 399–436.

(136) 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.* **2005**, 92 (8), 1397–1420.

(137) Tokuoka, T. Molecular Phylogenetic Analysis of Euphorbiaceae *Sensu Stricto* Based on Plastid and Nuclear DNA Sequences and Ovule and Seed Character Evolution. *J. Plant Res.* **2007**, 120 (4), 511–522.

- les Acalyphoideae (comprenant le genre *Mercurialis*)
- les Crotonoideae (dont le genre *Croton* regroupant approximativement 1300 espèces)
- les Euphorbioideae (incluant les espèces du genre *Euphorbia*)

Plusieurs Euphorbiacées ont trouvé une place de choix dans nos sociétés modernes malgré le fait qu'elles soient souvent dotées de propriétés toxiques. C'est le cas de *Hevea brasiliensis* utilisé pour la production de caoutchouc, ou de *Manihot esculenta* pour la préparation du Kassava, aliment de base chez de nombreuses populations des régions tropicales et sub-tropicales (Afrique subsaharienne, Asie du Sud-Est, Amérique du Sud, Caraïbes).<sup>138</sup> Par ailleurs, plusieurs espèces d'*Euphorbia* sont devenues des "classiques" de l'ornementation végétale telles que *E. poinsettia* et *E. characias*. Dans un autre registre, *Jatropha curcas* fait l'objet d'une mise en culture à grande échelle pour la production de biodiesel agricole.<sup>139</sup>

Parmi les substances toxiques emblématiques des Euphorbiacées, il faut citer la ricine, glycoprotéine de 66 000 Da, présente dans les graines de *Ricinus communis*. Chez l'Homme, la dose létale de cette molécule est estimée entre 1 et 20 mg.kg<sup>-1</sup>. Il s'agit d'une des plus puissantes toxines connues dans le règne végétal.<sup>140</sup> Nous pouvons également citer le 12-*O*-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA, parfois appelée PMA, phorbol 12-myristate-13-acétate), un ester diterpénique de phorbol isolé à partir des graines de *Croton tiglium*, qui possède une puissante activité promotrice de tumeurs (cf. partie I. 3. 3, p. 60).<sup>141,142</sup>

## I. 3. 2 Le genre *Euphorbia*

### Présentation générale

Le genre *Euphorbia* - avec environ 2000 espèces répertoriées - est le plus grand de la famille des Euphorbiacées.<sup>131,143</sup> Il est suivi du genre *Croton* avec environ 1300 espèces.<sup>134,144</sup> C'est le deuxième genre d'angiosperme par le nombre d'espèce, après *Astragalus* (environ 3200 espèces).<sup>145</sup>

(138) Schultes, R. E. Members of Euphorbiaceae in Primitive and Advanced Societies. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94* (1-2), 79–95.

(139) Pandey, V. C.; Singh, K.; Singh, J. S.; Kumar, A.; Singh, B.; Singh, R. P. *Jatropha Curcas*: A Potential Biofuel Plant for Sustainable Environmental Development. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16* (5), 2870–2883.

(140) Sehgal, P.; Khan, M.; Kumar, O.; Vijayaraghavan, R. Purification, Characterization and Toxicity Profile of Ricin Isoforms from Castor Beans. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48* (11), 3171–3176.

(141) Van Duuren, B. L.; Orris, L.; Arroyo, E. Tumour-Enhancing Activity of the Active Principles of *Croton Tiglium* L. *Nature* **1963**, *200* (4911), 1115–1116.

(142) Rohrschneider, L. R.; Boutwell, R. K. Phorbol Esters, Fatty Acids and Tumour Promotion. *Nature* **1973**, *243* (128), 212–213.

(143) Horn, J. W.; Xi, Z.; Riina, R.; Peirson, J. A.; Yang, Y.; Dorsey, B. L.; Berry, P. E.; Davis, C. C.; Wurdack, K. J. Evolutionary Bursts in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) Are Linked with Photosynthetic Pathway. *Evolution* **2014**, *68* (12), 3485–3504.

(144) Berry, P. E.; Hipp, A. L.; Wurdack, K. J.; Ee, B. V.; Riina, R. Molecular Phylogenetics of the Giant Genus *Croton* and Tribe Crotonae (Euphorbiaceae Sensu Stricto) Using ITS and TRNL-TRNF DNA Sequence Data. *Am. J. Bot.* **2005**, *92* (9), 1520–1534.

(145) Frodin, D. G. History and Concepts of Big Plant Genera. *Taxon* **2004**, *53* (3), 753.





Figure 15. *Euphorbia pithyusa* subsp *pithyusa*. Rogliano. Photo : Rita Scaglia

Les espèces du genre *Euphorbia* ont une distribution cosmopolite et peuvent revêtir des morphotypes très différents. En effet, les euphorbes se caractérisent par une exceptionnelle diversité de formes xéromorphiques. On y trouve des annuelles prostrées, des arbres de 20 m, et même des succulentes ayant un aspect cactiforme. Francis Hallé *et al*<sup>146</sup> ont montré que parmi l'ensemble des plantes à graines (Spermaphytes), les espèces du genre *Euphorbia* pouvaient adopter le plus grand nombre d'architectures possibles, soit 12 sur 23 architectures connues. Le genre *Euphorbia* atteint une diversité maximale en région aride, où de nombreuses espèces ont la forme de cactus.<sup>147</sup> En Europe, une centaine d'espèces d'*Euphorbia* ont été recensées, dont un grand nombre en région méditerranéenne.<sup>147</sup>



Figure 16. *Euphorbia dendroides*. Photo : Emma Bernardini

---

(146) Halle, F.; Oldeman, R. A. A.; Tomlinson, P. B. *Tropical Trees and Forests: An Architectural Analysis*; Springer Science & Business Media, 2012.

(147) Smith A.R.; Tutin T.G. *Euphorbia L.*; Flora Europaea; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1968.

## Particularités

Les espèces du genre *Euphorbia* sont remarquables à plus d'un titre. En premier lieu, elles produisent un latex blanchâtre, le plus souvent irritant, jouant un rôle défensif vis-à-vis des insectes et des herbivores.<sup>148–150</sup>

Au niveau botanique, les espèces du genre *Euphorbia* se caractérisent par leurs inflorescences originales appelées cyathium (Figure 17). Celles-ci miment l'aspect d'une fleur grâce au regroupement d'organes mâles et femelles au sein d'un involucre caliciforme associé à des bractées.<sup>151</sup> Le cyathium est considéré comme l'une des innovations ayant permise la diversification du clade par dérive évolutive. Cette particularité morphologique est supposée avoir induit le passage d'une pollinisation par le vent à une pollinisation par les insectes.<sup>152</sup> En effet, des glandes nectarifères sont positionnées sur les côtés de l'involucre du cyathium afin d'attirer les insectes. Ces glandes peuvent présenter des appendices de diverses formes dont le but est d'augmenter l'attrait visuel du cyathium auprès des insectes.

D'un point de vue écophysio-logique, elles ont également développé des adaptations remarquables à la sécheresse.<sup>153</sup> De plus, il s'agit du seul genre où peut être retrouvés les trois principaux types de photosynthèse ( $C_3$ ,  $C_4$  et CAM).<sup>153,154</sup>

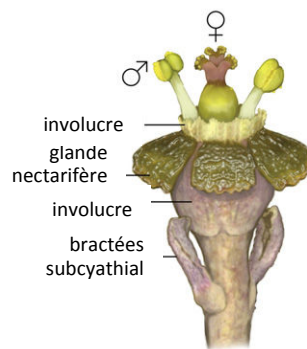


Figure 17. Cyathium of *Euphorbia fasciculata* (D'après Horn et al. 2012)<sup>155</sup>

## Historique de la classification taxonomique

Il faut remonter à l'antiquité pour trouver la première mention du mot *Euphorbia* pour désigner une de ces plantes.<sup>156</sup> D'après Pline l'Ancien (23-79 ap. J.-C.) dans son livre *Historia Naturalis*,<sup>157</sup> *Euphorbium* est le nom donné par Juba II (50 av. J.-C. - 23 ap. J.-C.), roi de

(148) Kotaro, K. Plant Latex and Other Exudates as Plant Defense Systems: Roles of Various Defense Chemicals and Proteins Contained Therein. *Phytochemistry* **2011**, 72 (13), 1510–1530.

(149) Souza, D. P.; Freitas, C. D. T.; Pereira, D. A.; Nogueira, F. C.; Silva, F. D. A.; Salas, C. E.; Ramos, M. V. Laticifer Proteins Play a Defensive Role against Hemibiotrophic and Necrotrophic Phytopathogens. *Planta* **2011**, 234 (1), 183–193.

(150) Sytwala, S.; Günther, F.; Melzig, M. F. Lysozyme- and Chitinase Activity in Latex Bearing Plants of Genus *Euphorbia* - a Contribution to Plant Defense Mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, 95, 35–40.

(151) 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.* **2007**, 94 (10), 1612–1629.

(152) Croizat, L. On the Classification of *Euphorbia* II. How Should the Cyathium Be Interpreted? *Bull. Torrey Bot. Club* **1937**, 523–536.

(153) Yang, Y. Phylogenetics and Evolution of *Euphorbia* Subgenus *Chamaesyce*. 2012.

(154) Sage, R. F.; Christin, P.-A.; Edwards, E. J. The  $C_4$  Plant Lineages of Planet Earth. *J. Exp. Bot.* **2011**, err048.

(155) Horn, J. W.; van Ee, B. W.; Morawetz, J. J.; Riina, R.; Steinmann, V. W.; Berry, P. E.; Wurdack, K. J. Phylogenetics and the Evolution of Major Structural Characters in the Giant Genus *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2012**, 63 (2), 305–326.

(156) Appendino, G.; Szallasi, A. *Euphorbium*: Modern Research on Its Active Principle, Resiniferatoxin, Revives an Ancient Medicine. *Life Sci.* **1997**, 60 (10), 681–696.

(157) Secundus, G. P.; Hardouin, J. *Naturalis Historia: Libri 20 - 32*; Franciscus Muguet, 1685; Vol. 4.

Mauritanie, à une drogue médicinale produite à partir du latex d'*Euphorbia resinifera* en l'honneur d'un de ses médecins grecs nommé *Euphorbius*. Il est possible de supposer que Juba II a choisi un nom évocateur puisque *Euphorbius*, signifie "bien nourrie" en grec ancien, ce qui peut être rapporté à la morphologie des *Euphorbia* succulentes d'Afrique du Nord et à la présence de latex d'aspect laiteux.<sup>156</sup>

Le terme d'*Euphorbium* est également employé au début du I<sup>er</sup> siècle ap. J.-C dans l'ouvrage *De Materia Medica* de Dioscorides (30-90 ap. J.-C.).<sup>158</sup> Dans cet ouvrage, les espèces d'*Euphorbia* sont également décrites sous le nom de tithymales (*tithymalus*). L'utilisation de cette dénomination est très ancienne (*tithymulos*) puisqu'elle a été utilisée par le père de la médecine, le grec Hippocrate (470-370 av. J.-C.), pour désigner des espèces d'euphorbes méditerranéennes.<sup>159</sup> L'étymologie de *tithymulos* est inspirée de *tithòs* (mamelles) et de *malos* (pernicieux). Cette appellation fut reprise le siècle suivant par le naturaliste grec Théophraste, puis par les auteurs latins Plin l'Ancien et Dioscorides.<sup>159</sup> Dans un autre ouvrage de Dioscorides, *Naturalis Historia*, des espèces caractéristiques de la Méditerranée sont décrites, telles que *Tithymalus characias* (*E. characias*), *T. mursinites* (*E. myrsinites*), *T. dendrites* (*E. dendroïdes*), *T. paralias* (*E. paralias*), ou *T. pituouosa* (*E. pithyusa*). Le nom de *Tithymalus* a été utilisé par l'ensemble des auteurs jusqu'à la classification de Linnée, où le terme *Euphorbia* L. (1753) fut instauré.<sup>159</sup>

Des études phylogénétiques effectuées au cours de la dernière décennie ont permis de réviser la classification du genre *Euphorbia*.<sup>160-163</sup> De nombreuses espèces qui appartenaient à d'autres genres d'Euphorbiacées y ont été intégrées (*Chamaesyce*, *Cubanthus*, *Elaeophorbia*, *Endadenium*, *Monadenium*, *Pedilanthus*, *Poinsettia*, et *Synadenium* pour ne citer que les principaux). Par ailleurs, les relations intragénériques ont pu être précisées. Ces études s'accordent sur l'existence de quatre sous-genres (subg.) : - *E.* subg. *Euphorbia* ; - *E.* subg. *Athymalus* Neck. ex Rchb. ; - *E.* subg. *Chamaesyce* Raf. ; - *E.* subg. *Esula* Pers. Au cours des dix dernières années, la réalisation d'analyses moléculaires sur de nombreuses espèces a permis de préciser les sections au sein des quatre *subgenera* du genre *Euphorbia*.<sup>153,164-166</sup>

Le clade du subg. *Euphorbia* est le plus polymorphe et se distribue dans les régions tropicales et subtropicales, notamment à Madagascar.<sup>164</sup> Le subg. *Athymalus* est essentiellement présent en Afrique,<sup>166</sup> tandis que le subg. *Chamaesyce* est constitué

---

(158) Dioscorides Pedanius. *De Materia Medica*; IBIDIS: Johannesburg, South Africa, 2000.

(159) *Dictionnaire des sciences médicales*; C.L.F. Panckoucke: Paris, 1821.

(160) Steinmann, V. W.; Porter, J. M. Phylogenetic Relationships in Euphorbiaceae (Euphorbiaceae) Based on ITS and ndhF Sequence Data. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **2002**, 453–490.

(161) Bruyns, P. V.; Mapaya, R. J.; Hedderson, T. A New Subgeneric Classification for Euphorbia (Euphorbiaceae) in Southern Africa Based on ITS and psbA-trnH Sequence Data. *Taxon* **2006**, 55 (2), 397–420.

(162) Park, K.-R.; Jansen, R. K. A Phylogeny of Euphorbiaceae Subtribe Euphorbiinae (Euphorbiaceae) Based on Molecular Data. *J. Plant Biol.* **2007**, 50 (6), 644–649.

(163) Zimmermann, N. F. A.; Ritz, C. M.; Hellwig, F. H. Further Support for the Phylogenetic Relationships within Euphorbia L. (Euphorbiaceae) from nrITS and trnL–trnF IGS Sequence Data. *Plant Syst. Evol.* **2010**, 286 (1–2), 39–58.

(164) Dorsey, B. L.; Haevermans, T.; Aubriot, X.; Morawetz, J. J.; Riina, R.; Steinmann, V. W.; Berry, P. E. Phylogenetics, Morphological Evolution, and Classification of Euphorbia Subgenus Euphorbia. *Taxon* **2013**, 62 (2), 291–315.

(165) Riina, R.; Peirson, J. A.; Geltman, D. V.; Molero, J.; Frajman, B.; Pahlevani, A.; Barres, L.; Morawetz, J. J.; Salmaki, Y.; Zarre, S.; et al. A Worldwide Molecular Phylogeny and Classification of the Leafy Spurge, Euphorbia Subgenus Esula (Euphorbiaceae). *Taxon* **2013**, 62 (2), 316–342.

(166) Peirson, J. A.; Bruyns, P. V.; Riina, R.; Morawetz, J. J.; Berry, P. E. A Molecular Phylogeny and Classification of the Largely Succulent and Mainly African Euphorbia Subg. Athymalus (Euphorbiaceae). *Taxon* **2013**, 62 (6), 1178–1199.

principalement d'espèces du Nouveau-Monde.<sup>153</sup> Quant au subg. *Esula*, la majorité des taxons est acclimatée aux régions tempérées de l'hémisphère Nord, notamment d'Europe et de Méditerranée.<sup>33-34</sup> Le subg. *Esula* est le sous-genre qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études phylogénétiques.<sup>165,167,168</sup>

### Présentation botanique du sous-genre *Esula*

Comme indiqué précédemment, la majorité des taxons retrouvés en Europe appartiennent au subg. *Esula* Pers.<sup>147</sup> Ce dernier comprend environ 500 espèces ayant souvent la forme d'herbacée annuelle, de buisson, d'arbuste, ou parfois de succulente.<sup>161</sup> Les taxons du subg. *Esula* sont caractérisés par la présence de feuilles alternées, exstipulées, sessiles ou subsessiles, caulines ainsi que d'inflorescences pléiochasiales. Ce subgenus est présent sur tous les continents à l'exception de l'Australie et l'Antarctique, mais c'est en Asie centrale et à l'Est de la Méditerranée qu'il atteint sa plus grande diversité en nombre d'espèces référencées.<sup>161</sup>

### Les *Euphorbia* de Corse

En Corse, le genre *Euphorbia* est représenté par 33 taxa, dont 22 (66 %) ont des aires de distribution euro-méditerranéennes et 5 (15 %) sont des espèces naturalisées.<sup>128</sup> Trois espèces d'*Euphorbia* présentes en Corse sont inscrites sur la liste rouge des espèces en danger (*Euphorbia corsica* Req., *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* (Bertol) A. R. Sm et *Euphorbia peplis* L.).<sup>169</sup> L'espèce *E. corsica*, apparentée à *E. myrsinites*, est la seule espèce endémique corse stricte. Cette dernière, présente sur quelques stations de haute montagne, notamment dans la haute vallée du Tavignano.<sup>128</sup> Quand à l'endémique "corso-sarde", *E. pithyusa* subsp. *cupanii*, elle ne peut être observée en Corse que sur une seule station (entre Ponte-Leccia et Morosaglia), mais est relativement abondante en Sardaigne. Concernant, *E. peplis*, c'est une espèce à aire de distribution euro-méditerranéenne protégée en France métropolitaine. Notons l'existence de *Mercurialis corsica*, une Euphorbiaceae à l'aire de répartition corse-stricte.<sup>170</sup>

### Utilisation traditionnelle des *Euphorbia*

Il n'existe pas de revue d'ethnopharmacologie systématique des espèces du genre *Euphorbia*. Néanmoins, il faut souligner l'existence d'une revue sur l'*Euphorbium* réalisée par G. Appendino et A. Szallasi.<sup>156</sup> Cette revue est une œuvre précieuse consacrée à l'histoire de cette drogue végétale en Méditerranée et en Europe, depuis l'antiquité jusqu'aux études contemporaines sur son principe actif, la résiniferatoxine.

---

(167) Frajman, B.; Schönschwetter, P. Giants and Dwarfs: Molecular Phylogenies Reveal Multiple Origins of Annual Spurge within *Euphorbia* Subg. *Esula*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2011**, *61* (2), 413–424.

(168) Barres, L.; Vilatersana, R.; Molero, J.; Susanna, A.; Galbany-Casals, M. Molecular Phylogeny of *Euphorbia* Subg. *Esula* Sect. *Aphyllis* (Euphorbiaceae) Inferred from nrDNA and cpDNA Markers with Biogeographic Insights. *Taxon* **2011**, *60* (3), 705–720.

(169) La Liste rouge des espèces menacées en France - Comité français de l'UICN <http://www.uicn.fr/liste-rouge-france.html> (accessed Sep 22, 2015).

(170) Migliore, J.; Baumel, A.; Juin, M.; Diadema, K.; Hugot, L.; Verlaque, R.; Médail, F. Genetic Diversity and Structure of a Mediterranean Endemic Plant in Corsica (*Mercurialis Corsica*, Euphorbiaceae). *Popul. Ecol.* **2011**, *53* (4), 573–586.

Les textes de l'antiquité gréco-romaine attestent de la connaissance du caractère toxique du latex des euphorbes. Par exemple, Dioscoride écrit dans *De materia medica* : "Quand une personne récolte son latex, elle ne doit pas faire face au vent, ni se toucher les yeux avec les mains, et doit au préalable s'enduire la peau avec de graisse et du vin".<sup>158</sup> Ou encore Hippocrate qui rapporte deux cas d'empoisonnement à la tithymale dans son livre *Epidémies*.<sup>171</sup> De manière générale, les principaux auteurs de tradition gréco-romaine s'accordaient pour reconnaître aux *Euphorbia* des propriétés émétiques et purgatives, et pour lesquelles le latex était considéré comme la quintessence.<sup>159</sup> Ce dernier pouvait être également utilisé comme caustique, ou vésicatoire pour détruire les callosités, cors, et verrues.<sup>158</sup> Dioscoride décrit quelques modes de préparation à partir de la matière végétale d'*Euphorbia*, tels que des figues imprégnées de latex utilisées comme purgatif, ou encore la confection d'*acetabulum* (considéré comme possédant des propriétés similaires au latex) avec les parties aériennes mélangées à du vinaigre et du miel.<sup>158</sup>

Les traités médicaux et pharmacologiques du XVI-XIX<sup>ème</sup> siècles discutent de l'usage des tithymales.<sup>172-175</sup> Ils s'inscrivent dans le mouvement de la Renaissance en redécouvrant les textes des auteurs de l'antiquité gréco-romaine. On peut citer l'ouvrage de Dodoens, botaniste et médecin flamand du XVI<sup>ème</sup> siècle, dans lequel sont repris les principaux éléments des textes de l'antiquité.<sup>172</sup> L'auteur mentionne notamment que Galien (II<sup>ème</sup> siècle après J.-C.) considérait l'usage interne des tithymales si violent ("écorchant le gosier et rude") qu'elles ne devaient être employées qu'avec la plus "grande discrétion".

Dans l'*Histoire Générale des Plantes* de Jacques Daléchamps et Jean Des Moulins publié en 1615, sont décrites les caractéristiques botaniques et médicinales de plusieurs tithymales.<sup>174</sup> Le pouvoir émétique, purgatif et caustique du latex de ces plantes y est mentionné. Le terme d'espurge était le nom français donné à l'espèce *Euphorbia lathyris*, une plante phare de la pharmacopée européenne de l'époque.<sup>174</sup> Comme son nom l'indique, elle était réputée pour purger "le phlegme, les humeurs bilieuses". Le nom d'espurge a donné naissance au nom anglais *spurge* toujours en usage, pour désigner les euphorbes.

Le *Diction(n)aire des sciences Médicales* publié en 1821, consacre un article aux tithymales, et indique que leurs usages étaient devenus courant en France au XVI<sup>ème</sup> siècle.<sup>159</sup> Les drogues issues de ces plantes étaient utilisées comme émétique et purgatif mais toujours en association avec des "correctifs" émoulinants (tel que de la gomme) ou atténuées en *acetabulum* à la façon de Dioscoride, ou encore après torréfaction. Toutefois, il semblerait que le recours aux tithymales ait été délaissé par la suite, au profit de purgatifs plus doux et

---

(170) Migliore, J.; Baumel, A.; Juin, M.; Diadema, K.; Hugot, L.; Verlaque, R.; Médail, F. Genetic Diversity and Structure of a Mediterranean Endemic Plant in Corsica (*Mercurialis Corsica*, Euphorbiaceae). *Popul. Ecol.* **2011**, 53 (4), 573–586.

(171) Cazin. *Traité Des Plantes Médicinales*; uses.plantnet-project.org, 1868.

(172) Dodoens, R.; Clusius, C. *Histoire des plantes, en laquelle est contenue l'histoire entière des herbes...*; de l'imprimerie de Jean Loë, 1557.

(173) Geoffroy, E. F. *Tractatus de materia medica: sive de medicamentorum simplicium historia, virtute, delectu et usu*, Apud Nicolaum Pezzana.; 1756.

(174) Daléchamps, J.; Moulins, J. D. *Histoire générale des plantes*; chez les heritiers Guillaume Rouille, 1615.

(175) Mattioli, P. *Commentaires de M. Pierre André Matthiole médecin sennois, sur les six livres de Ped. Dioscoride Anazarbeen de la matière médicinale : avec certaines tables médicinales, tant des qualités & vertus des simples médicamens, que des remèdes pour toutes maladies, qui peuvent avenir au corps humain, comme aussi des sentences, mots & matières traictées esdicts commentaires ([Reprod.]) / mis en français sur la dernière éd. latine de l'auteur par M. Jean des Moulins, docteur en médecine*; par Guillaume Rouille (Lyon), 1579.



moins dangereux, tel que l'ipécacuanha, une drogue importée d'Amérique du Sud fabriquée à partir de *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae).<sup>171</sup> Ils concluent que "(les) *tithymales* et les *euphorbes indigènes* ne doivent pas être regardées comme dangereuses, et qu'elles ne peuvent produire aucun mauvais effet, qu'on ne les emploiera, comme tous les médicaments énergiques, qu'à des doses convenables ; mais qu'ainsi administrées, elles peuvent être mises au rang des médicaments émétiques et purgatifs dont les propriétés sont bien constantes et reconnues". Les tithymales sont aussi mentionnées comme des vésicatoires. C'est notamment le cas dans l'*Encyclopédie ou Dictionnaire Universel de Diderot* (orthographié tithimale).<sup>176</sup> Par ailleurs, il est attesté que, certains pharmaciens français du début du XIX<sup>ème</sup> siècle réalisaient des préparations vésicatoires à base d'euphorbes.<sup>159</sup>



Figure 18 Dessins de Pierandrea Matthioli d'*Euphorbia characias* (à gauche) et *Euphorbia myrsinites* (droite) figurant dans l'*Histoire générale des plantes* de Daléchamps et Des Moulins (début du XVII<sup>ème</sup> siècle).<sup>174,175</sup>

L'utilisation d'euphorbes est également attestée dans les grandes traditions médicales d'autres régions du monde. Les euphorbes figurent notamment dans la pharmacopée de la médecine traditionnelle multimillénaire (Ayurveda) de l'Inde. Ainsi dans l'*Ayurveda saukhyam* (encyclopédie Tadarānanda, XVI<sup>ème</sup> siècle), ensemble de texte rassemblant les connaissances antérieures, les propriétés de deux *Euphorbia* sont décrites.<sup>177</sup> La première est *Euphorbia thymifolia*, qui est utilisée pour plusieurs indications, comme le traitement de la constipation, des maladies de peau,<sup>177</sup> ou comme vermifuge chez les animaux et les

(177) Dash, B.; Kashyap, L. *Materia Medica of Ayurveda: Based on Ayurveda Saukhyam of Tadarānanda*; Concept, 1980.

(178) Mali, P. Y.; Panchal, S. S. A Review on Phyto-Pharmacological Potentials of *Euphorbia Thymifolia* L. *Anc. Sci. Life* **2013**, 32 (3), 165–172.

humains.<sup>178</sup> La seconde, *Euphorbia neriifolia*, est préconisée comme purgatif.<sup>177</sup> La médecine ayurvédique s'est diffusée dans toute l'Asie du Sud-Est. Par exemple, dans la tradition ayurvédique de Thaïlande, *Euphorbia resinifera* était utilisée comme purgatif et vermifuge.<sup>179</sup> De nos jours, la médecine ayurvédique est la forme de médecine la plus utilisée en Inde et au Népal.<sup>180</sup>

En Chine, deux euphorbes ont toujours une place de choix dans la pharmacopée traditionnelle, il s'agit d'*Euphorbia kansui* et d'*Euphorbia peginensis*. Ces deux espèces sont classées comme de puissants purgatifs et diurétiques, dont l'usage est réservé aux tradipraticiens expérimentés.<sup>181</sup>

En Italie, dans le Latium, *E. lathyris* était plantée dans les jardins pour tenir les taupes éloignées.<sup>182</sup> Cette pratique a également existé dans d'autres pays méditerranéens.<sup>183</sup> Dans le Sud de la France, les euphorbes ont surtout été employées pour leur propriété caustique, qui a été mis à profit pour traiter les verrues et les dents malades. Cette pratique est encore d'actualité.<sup>183</sup>

Des études ethnopharmacologiques récentes rapportent que l'usage des *Euphorbia* est toujours bien présent dans les traditions des îles de la mer tyrrhénienne. En Sardaigne et Sicile, le latex d'*Euphorbia characias* était utilisé pour le braconnage des truites et des anguilles, et l'est peut être encore.<sup>184,185</sup> Il est intéressant de signaler, qu'en Corse, *Daphne gnidium* L. (Thymeleaceae) était préférée pour réaliser ce type de pêche.<sup>186</sup> Ces pratiques semblaient communes à de nombreuses régions méditerranéennes.<sup>183</sup> Selon Marcelle Conrad, les habitants de Galéria en Corse avaient recours à *Euphorbia peplis* pour traiter des cas de lithiases.<sup>187</sup>

### Toxicité du latex d'*Euphorbia*

Comme cela a été mentionné ci-dessus, la connaissance de la très grande toxicité oculaire du latex d'euphorbe est connue depuis l'antiquité.<sup>158</sup>

Les conséquences de l'exposition au latex d'*Euphorbia* sont encore, aujourd'hui, une cause d'accident courante, notamment lors des travaux horticoles.<sup>183</sup> Des articles récents décrivent des cas de dermatites causées par le latex d'*Euphorbia*.<sup>188-191</sup> Les effets disparaissent

---

(179) Adolf, W.; Chanai, S.; Hecker, E. 3-O-Angeloylingenol, the Toxic and Skin Irritant Factor from Latex of *Euphorbia Anitiquorum* L. (euphorbiaceae) and from a Derived Thai Purgative and Anthelmintic (vermifuge) Drug. **1983**, 9, 081–088.

(180) Ayurvedic Medicine: An Introduction <https://nccih.nih.gov/health/ayurveda/introduction.htm> (accessed Sep 30, 2015).

(181) Hempen, C.-H.; (MD.), T. F. *A Materia Medica for Chinese Medicine: Plants, Minerals, and Animal Products*; Elsevier Health Sciences, 2009.

(182) Guarrera, P. M.; Forti, G.; Marignoli, S. Ethnobotanical and Ethnomedicinal Uses of Plants in the District of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 96 (3), 429–444.

(183) Lieutaghi, P. *Petite ethnobotanique méditerranéenne*; Actes Sud: Arles (Bouches-du-Rhône), 2006.

(184) Bruni, A.; Ballero, M.; Poli, F. Quantitative Ethnopharmacological Study of the Campidano Valley and Urzulei District, Sardinia, Italy. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, 57 (2), 97–124.

(185) Leto, C.; Tuttolomondo, T.; La Bella, S.; Licata, M. Ethnobotanical Study in the Madonie Regional Park (Central Sicily, Italy)—Medicinal Use of Wild Shrub and Herbaceous Plant Species. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, 146 (1), 90–112.

(186) Conrad, M. *Les plantes sauvages dans la vie quotidienne des Corses: essai d'ethnobotanique*, Société des sciences historiques et naturelles de la Corse.; Bastia, 1973.

(187) Conrad, M. *Le maquis de Filosorma et Essai d'Ethnobotanique III*, BSSHNC.; Bastia, 1977; Vol. 4° tr.

(188) Ballero, M.; Piu, G.; Appendino, G. Immediate Urticaria to Euphorbiaceae. *Allergy* **1999**, 54 (1), 91–92.

(189) Buchwald, A. Spurge Contact Dermatitis. *J. Emerg. Med.* **2011**, 40 (6), 680–681.

(190) Otang, W. M.; Grierson, D. S.; Afolayan, A. J. A Survey of Plants Responsible for Causing Irritant Contact Dermatitis in the Amathole District, Eastern Cape, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, 157, 274–284.

(191) Almiş, H.; et al.. Acute Irritant Bullous Contact Dermatitis Caused by *Euphorbia Helioscopia*. *Contact Derm.* **2015**, 72 (3), 184–185.

généralement spontanément après quelques jours. Le latex d'*Euphorbia dendroides* appliqué sur la peau provoque une vésication indolore (dermatite bulleuse) se résorbant au bout de quelques jours.<sup>192</sup> L'utilisation de stéroïdes (prednisone) a montré une certaine efficacité pour soigner les érythèmes et œdèmes provoqués par le latex d'*Euphorbia polychroma*.<sup>189</sup>

La toxicité du latex pour les yeux est une toxicité aiguë qui peut altérer la vue de façon irréversible. Un cas de patient ayant perdu l'usage d'un œil suite à une exposition au latex d'*Euphorbia royleana* a été rapporté.<sup>193</sup> Une kératite accompagnée de fortes douleurs sont généralement la conséquence de cette exposition.<sup>194-196</sup> Il s'ensuit généralement une baisse de l'acuité visuelle qui se rétablit spontanément au bout de quelques semaines. Un rinçage abondant et immédiat avec de l'eau est préconisé pour éviter certaines complications.<sup>194</sup> Récemment, des médecins français ont montré que le lavage des yeux exposés au latex d'*Euphorbia lathyris*, par une solution de polyamphotère, avait permis de diminuer efficacement la douleur. Le lavage réalisé (250 mL par œil) a fait disparaître toute sensation de douleur au bout d'une heure et n'a laissé qu'une légère conjonctivite.<sup>197</sup>

Comme le stipulent et le rappellent certains auteurs bienveillants,<sup>198-200</sup> il est primordial de manipuler la matière végétale, les extraits et fractions dérivés d'euphorbes avec la plus grande prudence. L'utilisation de protections adaptées (visière protectrice, gants, vêtements couvrants) est essentielle de la collecte jusqu'au laboratoire.

### Principaux métabolites secondaires

Depuis les études pionnières réalisées au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses études sur la composition chimique d'extraits d'*Euphorbia* ont été réalisées.<sup>141,201-205</sup> Plusieurs revues bibliographiques,<sup>206,207</sup> dont l'une de 2014,<sup>208</sup> ont répertorié l'ensemble des métabolites

---

(192) Nothias-Scaglia, Louis-Félix. Observation Personnelle.

(193) Sofat, B. K.; Sood, G. C.; Chandel, R. D.; Mehrotra, S. K. *Euphorbia Royleana* Latex Keratitis. *Am. J. Ophthl.* **1972**, *74* (4), 634–637.

(194) Eke, T.; Al-Husainy, S.; Raynor, M. K. The Spectrum of Ocular Inflammation Caused by *Euphorbia* Plant Sap. *Arch. Ophthalmol.* **2000**, *118* (1), 13–16.

(195) Pr. Giovanni Appendino. Communication Personnelle à L'auteur, 2012.

(196) Shlamovitz, G. Z.; Gupta, M.; Diaz, J. A. A Case of Acute Keratoconjunctivitis from Exposure to Latex of *Euphorbia Tirucalli* (Pencil Cactus). *J. Emerg. Med.* **2009**, *36* (3), 239–241.

(197) Fortin, J. L.; Bitar, M.-P.; N'Guedia Kenfack, F.; Jabour, S.; Fortin, L.; Coste, S.; Savio, C. Toxicité Par *Euphorbia Lathyris* : Efficacité Des Solutions Polyamphotères de Lavage. *Toxicol. Anal. Clin.* **2014**, *26* (4), 221.

(198) Appendino, G.; Tron, G. C.; Cravotto, G.; Palmisano, G.; Jakupovic, J. An Expedient Procedure for the Isolation of Ingenol from the Seeds of *Euphorbia Lathyris*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62* (1), 76–79.

(199) Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Tron, G. C.; Appendino, G. Bisnorsesquiterpenoids from *Euphorbia Resinifera* Berg. and an Expedient Procedure to Obtain Resiniferatoxin from Its Fresh Latex. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002* (1), 71–78.

(200) Appendino, G.; Della Porta, C.; Conseil, G.; Sterner, O.; Mercalli, E.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. A New P-Glycoprotein Inhibitor from the Caper Spurge (*Euphorbia Lathyris*). *J. Nat. Prod.* **2003**, *66* (1), 140–142.

(201) Ponsinet, G.; Ourisson, G. Études Chimio-Taxonomiques Dans La Famille Des Euphorbiacées—I: Introduction Générale et Séparation et Identification Des Triterpènes Tétracycliques Monohydroxylés Naturels. *Phytochemistry* **1965**, *4* (6), 799–811.

(202) Hecker, E. Cocarcinogenic Principles from the Seed Oil of *Croton Tiglium* and from Other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* **1968**, *28* (11), 2338–2348.

(203) Adolf, W.; Hecker, E.; et al. "Euphorbiasteroid" (Epoxy-Lathyrol) A New Tricyclic Diterpene from *Euphorbia Lathyris* L. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11* (26), 2241–2244.

(204) Hecker, E.; Schmidt, R. The Irritants and Cocarcinogens of *Croton Tiglium* L. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., Eds.; Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Springer Vienna, 1974; pp 377–467.

(205) Evans, F. J.; Kinghorn, A. D. A Comparative Phytochemical Study of the Diterpenes of Some Species of the Genera *Euphorbia* and *Elaeophorbium* (Euphorbiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **1977**, *74* (1), 23–35.

(206) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chem Rev* **2008**, *108* (10), 4295–4327.

(207) Vasas, A.; Rédei, D.; Csupor, D.; Molnár, J.; Hohmann, J. Diterpenes from European *Euphorbia* Species Serving as Prototypes for Natural-Product-Based Drug Discovery. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (27), 5115–5130.



secondaires isolés et identifiés au sein de ce genre. Les terpénoïdes constituent, de très loin, la classe de métabolites secondaires la plus couramment isolée et caractérisée, suivi par les dérivés phénoliques (notamment les flavonoïdes et tannins).<sup>206</sup> Les terpènes isolés d'*Euphorbia* sont généralement constitués de trois (sesquiterpènes), quatre (diterpènes) ou six unités isopréniques (triterpènes). D'après la revue de Shi *et al* (2008),<sup>206</sup> le nombre de sesquiterpènes isolés était de 7, le nombre de triterpène de 87 et le nombre de diterpènes de 447. Entre l'année 2008 et 2012, plus de 220 diterpènes supplémentaires ont été décrits.<sup>208</sup> Ainsi, les diterpènes constituent, de loin, la classe de métabolites la plus communément retrouvée chez les *Euphorbia*.

---

(208) Vasas, A.; Hohmann, J. Euphorbia Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (17), 8579–8612.

### I. 3. 3. Les esters de diterpènes du genre *Euphorbia*

#### **Biogenèse**

Chez les végétaux supérieurs, les diterpènes sont formés à partir du géranylgeranyl diphosphate (GGPP).<sup>209</sup> Celui-ci est constitué de quatre unités isopréniques. Ces derniers sont produit par le biais de deux voies biosynthétiques différentes<sup>210</sup> : la voie du mévalonate via l'acide mévalonique (AMV) et la voie, récemment découverte, du D-déoxyxylulose 5-phosphate (DXP).<sup>211</sup> Ces deux voies co-existent chez les végétaux supérieurs. La voie d'AMV se déroule essentiellement dans le cytoplasme, tandis la voie du DXP a lieu dans les chloroplastes.<sup>212</sup>

Dans la voie du mévalonate (Figure 19A), la biogenèse des unités isopréniques activées débute par la condensation de trois acétyl-SCoA, permettant l'obtention d'acide mévalonique (AMV) après réduction par le NADPH, puis finalement la production d'isopentényl diphosphate (IPP) grâce à trois ATP (adénosine tri-phosphate). Ce dernier est ensuite isomérisé en diméthyllallyl diphosphate (DMAPP).

La voie de biogenèse du D-déoxyxylulose 5-phosphate (DXP) (Figure 19B) commence par la réaction entre l'acide pyruvique et le D-glyceraldéhyde 3-phosphate pour former du DXP, qui est ensuite réduit par le NADPH en un intermédiaire cyclique après phosphorylation.<sup>213</sup> La production d'IPP et du DMAPP est réalisée par une série d'élimination et tautomérisation.

Le GGPP est formé par la réaction entre un IPP et un DMAPP (Figure 20) selon une addition tête-à-queue (les extrémités gem-diméthyl du DMAP étant appelée tête, et la partie de l'unité isoprénique liée au diphosphate étant appelée queue), pour générer le géranyl diphosphate (GPP), qui réagira en suite avec un autre IPP pour obtenir le farnésyl diphosphate (FPP), puis enfin le GGPP.

Les diterpènes présents chez les Euphorbiaceae sont divisés en deux groupes selon leur voie de biogenèse à partir du GGPP :

- Les **diterpènes supérieurs**. Ils résultent d'une séquence de cyclisations concertées permettant la formation de copalyl diphosphate (Figure 21). Selon l'enzyme impliquée, la cyclisation du GGPP peut produire du (-)-copalyl diphosphate (Figure 21A) ou (+)-copalyl diphosphate (Figure 21B). Ces derniers servent ensuite de précurseurs à de nombreux diterpènes polycycliques, tels que les labdanes, clérodanes, abiétanes et atisanes. Ces constituants sont aussi retrouvés dans de nombreuses familles de végétaux supérieurs.

---

(209) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3. ed., repr. with corr., repr.; Wiley: Chichester, West Sussex, England ; New York, NY, USA, 2012.

(210) Lanzotti, V. Diterpenes for Therapeutic Use. In *Natural Products*; Springer, 2013; pp 3173–3191.

(211) Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahn, H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (11), 2564–2566.

(212) Roberts, S. C. Production and Engineering of Terpenoids in Plant Cell Culture. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (7), 387–395.

(213) Dubey, V. S.; Bhalla, R.; Luthra, R. An Overview of the Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis in Plants. *J. Biosci.* **2003**, *28* (5), 637–646.

- Les **diterpènes inférieurs**. La diversité structurale au sein de cette classe est exceptionnelle, puisqu'environ 650 dérivés appartenant à plus de 20 types de squelettes diterpéniques ont pu être identifiés rien que dans le genre *Euphorbia*.<sup>206,208</sup> D'un point de vue chimiotaxonomique, les diterpènes inférieurs de type tigliane, ingénane et daphnane sont retrouvés dans de nombreux genres d'Euphorbiaceae (*sensu stricto*) et de Thymelaeaceae (tels que *Daphne* sp. et *Thymelaea* sp.). Toutefois, de nombreux squelettes carbonés de diterpènes inférieurs d'*Euphorbia* (en particulier les dérivés macrocycliques) n'ont été identifiées que dans ce genre. Ainsi, les diterpènes inférieurs d'*Euphorbia* constituent un réservoir de molécules unique en vue de la découverte de produits naturels originaux.

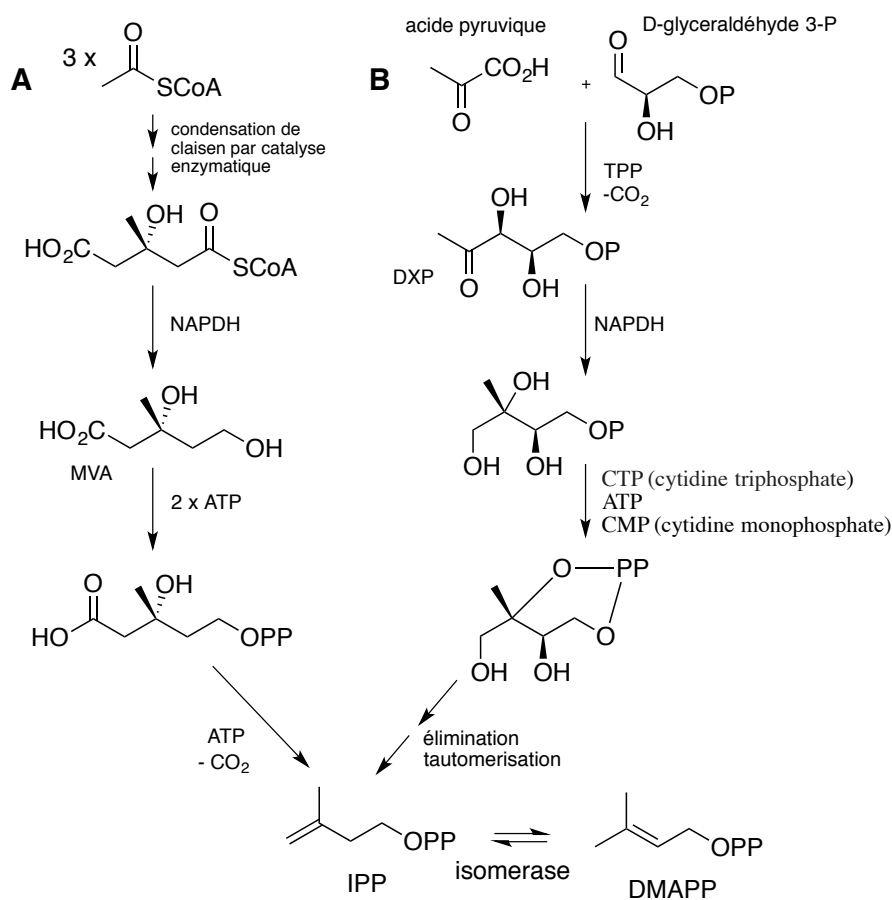


Figure 19. (A) Schéma de la voie du mévalonate vers l'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyle diphosphate (DMAPP). (B) Schéma de la voie du déoxyxylulose 5P diméthylallyle diphosphate vers l'IPP et le DMAPP (adapté de Dewick *et al.*, 2012)

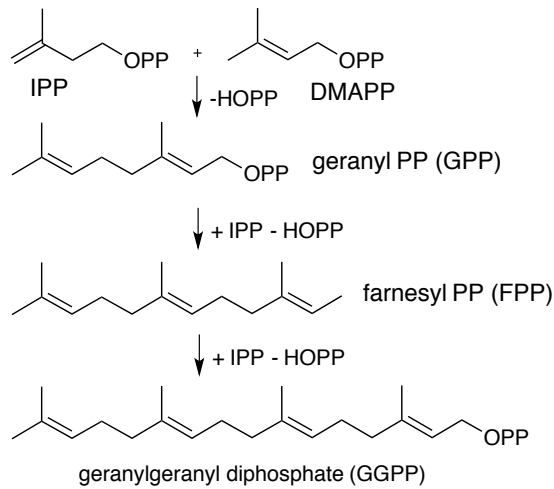


Figure 20. Schéma de la biosynthèse du géranylgeranyl diphosphate (GGPP) (adapté de Dewick *et al*, 2012).<sup>209</sup>

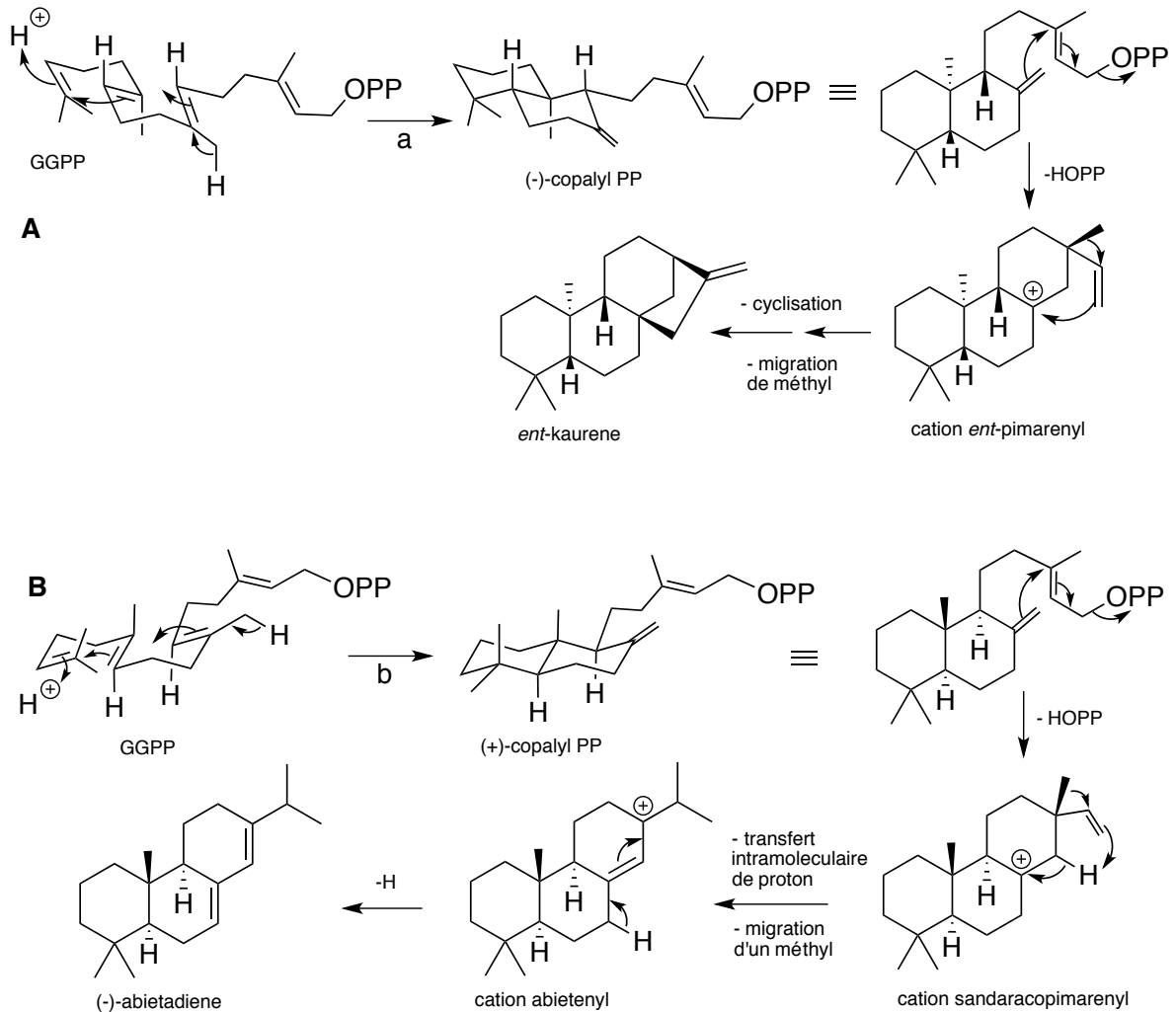


Figure 21. Schéma de la voie des diterpènes supérieurs à partir du GGPP. La formation du (-)-copalyl pyrophosphate et du (+)-copalyl pyrophosphate est réalisée par une kaurane synthase (a) et une abietane synthase (b), respectivement (adapté de Dewick *et al*, 2002).<sup>209</sup>

Les diterpènes inférieurs sont dérivés du GGPP par le biais d'une cyclisation intramoléculaire pouvant être qualifiée de tête-à-queue. Les diterpènes inférieurs

d'Euphorbiaceae et de Thymelaeaceae sont produits par une série de réactions permettant la formation du casbène et du cembrène (Figure 22).

L'hypothèse de la biosynthèse du casbène (et du cembrène) à partir du GGPP a été proposée initialement par Robinson et West en 1970.<sup>214</sup> Ces mêmes auteurs ont réussi à caractériser partiellement l'enzyme responsable de la cyclisation du GGPP en casbène (casbène synthase), à partir de *Ricinus communis*.<sup>214</sup> L'utilisation de cette enzyme, *in vitro*, a permis aux auteurs d'observer la conversion du GGPP en casbène. L'enzyme casbène synthase a été isolée et caractérisée pour la première fois en 1985 par West.<sup>215</sup>

Les diterpénoïdes inférieurs des *Euphorbia* sont donc dérivés du casbène et du cembrène par une suite de cyclisations intramoléculaires, d'oxydations et d'acylations (Figure 22). En 1977, Adolf et Hecker avaient déjà formulé cette hypothèse pour expliquer la biogénèse des diterpènes inférieurs des Euphorbiaceae et des Thymelaeaceae. Les auteurs ont proposé que le squelette lathyrane soit l'intermédiaire probable de la formation d'autres squelettes tels que les jatrophanes, tiglianes et ingénanes. A la même époque, le chercheur Richard Schmidt a émis l'hypothèse que d'autres isomères de configuration du GGPP étaient probablement impliqués dans la synthèse des diterpénoïdes inférieurs des Euphorbiaceae.<sup>216</sup>

En 2010, Kirby *et al.* ont analysé le génome de cinq espèces d'Euphorbiaceae (*Euphorbia esula*, *Euphorbia resinifera*, *Homolanthus nutans*, *Sapium sebiferum* et *Ricinus communis*) dans le but de détecter des gènes codant pour des casbène et néocembrène synthases.<sup>217</sup> Les résultats ont indiqué que le gène codant pour une casbène synthase était présent chez les cinq espèces. Les auteurs ont ainsi conclu que le casbène était le précurseur probable de la grande majorité des diterpènes inférieurs d'Euphorbiaceae. Dans cette même étude, les auteurs ont également constaté que, seul *Ricinus communis* possédait un gène codant pour une néocembrène synthase. Ainsi, ils ont proposé que certains diterpénoïdes (dont les daphnanes et les rhamnofolanes) puissent être des dérivés du néocembrène plutôt que du casbène. Par ailleurs, il convient de souligner que cette publication décrit pour la première fois l'identification de la néocembrène synthase.

Le génome de *Jatropha curcas* a été entièrement séquencé en 2010.<sup>218</sup> Un gène analogue à la casbène synthase y a été détecté. L'étude de son expression a mis en évidence que celui-ci n'était pas exprimé dans les graines, bien que celles-ci contiennent une forte concentration d'esters de phorbol.<sup>219</sup> Les auteurs proposent deux hypothèses pour expliquer ce résultat. La première est que, si le précurseur des esters de phorbol est effectivement le casbène, celui-ci pourrait être synthétisé par d'autres parties de la plante puis être transporté jusqu'aux graines. La seconde est que d'autres gènes analogues codant pour la casbène synthase soient exprimés dans les graines.

---

(214) 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 (Mosc.)* **1970**, *9* (1), 70–79.

(215) Moesta, P.; West, C. A. Casbene Synthetase: Regulation of Phytoalexin Biosynthesis in *Ricinus Communis* L. Seedlings: Purification of Casbene Synthetase and Regulation of Its Biosynthesis during Elicitation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *238* (1), 325–333.

(216) Schmidt, R. The Biosynthesis of Tigliane and Related Diterpenoids; an Intriguing Problem. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94* (1-2), 221–230.

(217) Kirby, J.; Nishimoto, M.; Park, J. G.; Withers, S. T.; Nowroozi, F.; Behrendt, D.; Rutledge, E. J. G.; Fortman, J. L.; Johnson, H. E.; Anderson, J. V.; et al. Cloning of Casbene and Neocembre Synthases from Euphorbiaceae Plants and Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Phytochemistry* **2010**, *71* (13), 1466–1473.

Une étape importante pour la compréhension de la biogenèse des diterpènes inférieurs d'Euphorbiaceae a été récemment franchie lors de travaux publiés en 2014.<sup>220</sup> Cette étude décrit la découverte d'un groupe de gènes associés à une casbène synthase de *R. communis* (dont le génome est séquencé depuis 2010).<sup>221</sup> Un total de huit cytochromes P450, une acyltransférase, et deux alcool-déshydrogénases ont pu être identifiés. Les cytochromes P450 sont des enzymes responsables de la plupart des réactions d'oxydation connues dans le métabolisme des végétaux supérieurs.<sup>220</sup> Ces enzymes peuvent aussi être impliquées dans les réactions de cyclisations carbone-carbone intramoléculaires,<sup>222</sup> qui sont indispensables à la formation des diterpènes inférieurs à partir du casbène. A l'aide d'outils bioinformatiques, les auteurs de cette étude ont recherché et détecté des groupes de gènes analogues dans le génome de deux autres Euphorbiaceae : *Euphorbia peplus* et *Jatropha curcas*. Un cytochrome P450, caractérisé chez *Euphorbia peplus* (CYP726A19), a été co-exprimé avec une casbène synthase dans un hôte végétal (*Nicotiana Benthamiana*). Les résultats de ces travaux ont montré que le casbène était majoritairement transformé en 5-keto-casbène, et de façon moindre en 5-hydroxy-casbène. Constatant la présence systématique d'un atome d'oxygène en position 5 de tous les diterpènes inférieurs d'Euphorbiaceae, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'oxydation du casbène en position 5 était une étape préalable aux modifications ultérieures (cyclisation/oxydation/acylation) nécessaires à leur formation. Ils indiquent également que d'autres cytochromes P450 (casbène oxydase) pourraient être conservés chez les espèces d'Euphorbiaceae, puisque certaines oxydations sont systématiquement retrouvées aux mêmes positions (comme pour les tiglianes et les ingénanes).

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, la compréhension de la biosynthèse des diterpènes d'Euphorbiaceae (et par extension des Thymeleaceae) a considérablement progressé au cours des cinq dernières années. Les hypothèses selon lesquelles le casbène dériverait du GGPP d'une part, et qu'il serait le précurseur de la plupart des diterpènes inférieurs d'Euphorbiaceae d'autre part, ont pu être confirmées. En revanche, les étapes suivantes qui catalysent les cyclisations intramoléculaires, les oxydations et les acylations indispensables à la formation des diterpénoïdes inférieurs à partir du casbène, sont encore inexplorées. Les récents travaux de King *et coll.* ont montré que les cytochromes P450 pouvaient être impliqués dans les cascades enzymatiques de cette voie de biogenèse.<sup>220</sup> Néanmoins, certaines hypothèses formulées sur la base d'analogies structurales, comme la possibilité que le squelette lathyrane soit un intermédiaire préalable vers la formation de la plupart des diterpènes inférieurs d'Euphorbiaceae, n'ont jamais été prouvées.

---

(218) Sato, S.; Hirakawa, H.; Isobe, S.; Fukai, E.; Watanabe, A.; Kato, M.; Kawashima, K.; Minami, C.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; et al. Sequence Analysis of the Genome of an Oil-Bearing Tree, *Jatropha Curcas* L. *DNA Res.* **2010**, dsq030.

(219) Nakano, Y.; Ohtani, M.; Polsri, W.; Usami, T.; Sambongi, K.; Demura, T. Characterization of the Casbene Synthase Homolog from *Jatropha* (*Jatropha Curcas* L.). *Plant Biotechnol.* **2012**, *29* (2), 185–189.

(220) King, A. J.; Brown, G. D.; Gilday, A. D.; Larson, T. R.; Graham, I. A. Production of Bioactive Diterpenoids in the Euphorbiaceae Depends on Evolutionarily Conserved Gene Clusters. *Plant Cell* **2014**, *26* (8), 3286–3298.

(221) Chan, A. P.; Crabtree, J.; Zhao, Q.; Lorenzi, H.; Orvis, J.; Puiui, D.; Melake-Berhan, A.; Jones, K. M.; Redman, J.; Chen, G.; et al. Draft Genome Sequence of the Oilseed Species *Ricinus Communis*. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (9), 951–956.

(222) Rontein, D.; Onillon, S.; Herbet, G.; Lesot, A.; Werck-Reichhart, D.; Sallaud, C.; Tissier, A. CYP725A4 from Yew Catalyzes Complex Structural Rearrangement of Taxa-4(5),11(12)-Diene into the Cyclic Ether 5(12)-Oxa-3(11)-Cyclotaxane. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (10), 6067–6075.

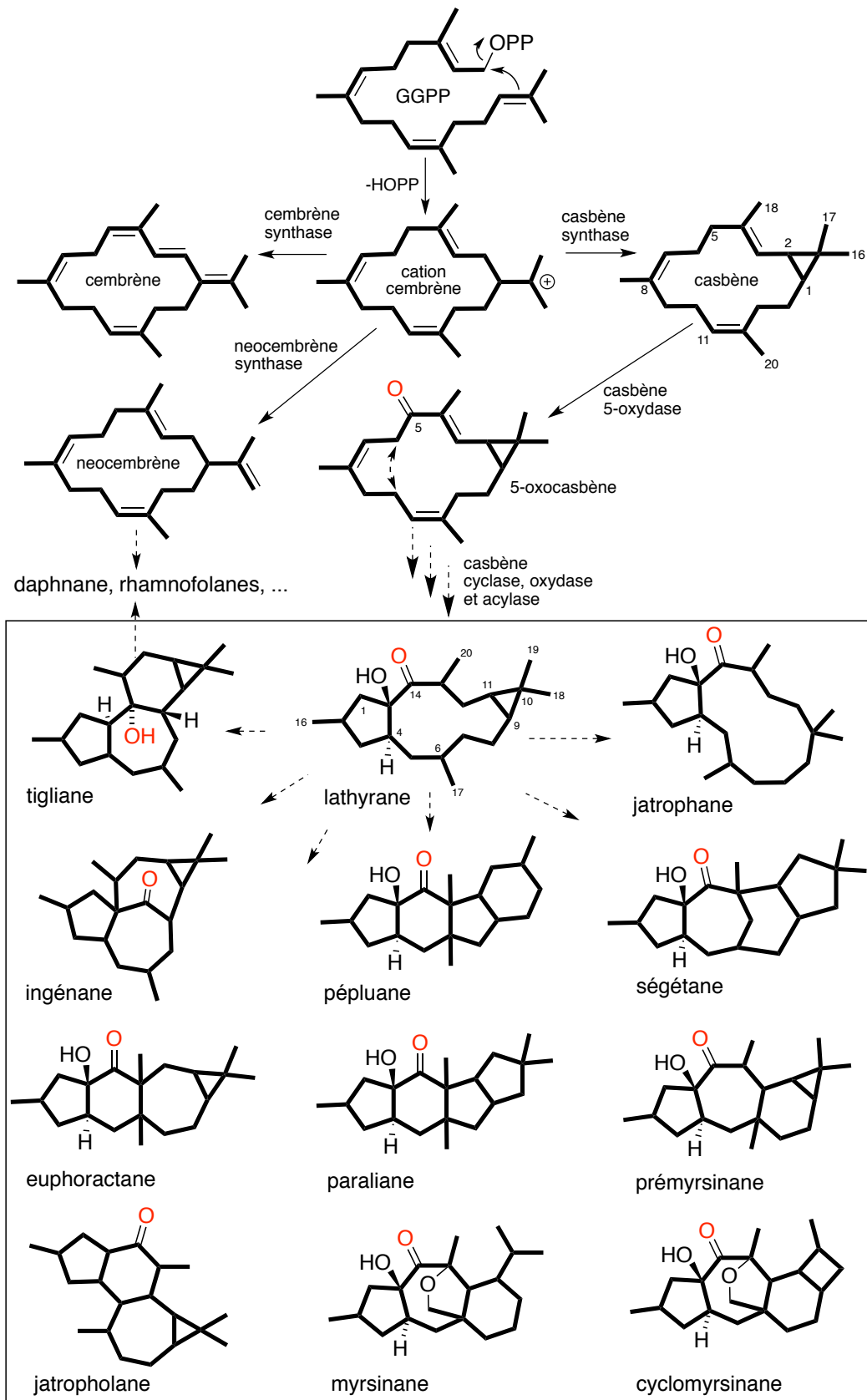


Figure 22. Schéma des relations biogénétiques des diterpènes inférieurs d'*Euphorbia* (établies à partir d'une synthèse des données de la littérature). Les flèches pleines sont des réactions validées par des résultats scientifiques. Les flèches pointillées sont des réactions probables, mais encore incertaines. L'oxydation en position 5 du casbène (oxygène représenté en rouge) est considérée comme une étape préalable aux réactions (cyclisation/oxydation/acylation) permettant la formation des diterpénoïdes inférieurs.

## ***Extraction, isolement et identification***

Les diterpènes inférieurs peuvent être isolés à partir du latex, mais également à partir de toutes les parties des *Euphorbia*.<sup>206,208</sup> Le latex est produit par des cellules spécialisées, appelées laticifères, présentes sur l'ensemble de la plante.<sup>223</sup> Chez les *Euphorbia*, les laticifères se comportent comme une poche remplie d'un mélange complexe incluant diverses enzymes, de la gomme, des terpènes et d'autres métabolites.<sup>224</sup> Ces laticifères réagissent en exsudant le latex lors d'une agression mécanique de la plante. Cette propriété a pour but de défendre la plante contre les insectes et les phytopathogènes, mais aussi de faciliter la cicatrisation.<sup>148</sup> Par ailleurs, les métabolites présents dans le latex jouent un rôle dissuasif vis-à-vis des herbivores. Chez l'Homme, le latex d'*Euphorbia* est fortement irritant pour les yeux et les muqueuses.<sup>158,159</sup> En Corse, les euphorbes sont, avec les plantes ligneuse-épineuses, parmi les rares plantes à proliférer dans les paturages de bovidés.<sup>225</sup> Les tissus et les organes où se déroule la biogenèse des diterpènes inférieurs ne sont pas formellement connus. Néanmoins, il est probable que la formation de ces métabolites ait lieu (au moins partiellement) dans les laticifères, puisque de nombreux diterpènes inférieurs ont été isolés dans des extraits de latex.

Les diterpènes d'*Euphorbia* sont extraits de la matière végétale broyée, à l'aide de solvants organiques (acétate d'éthyle, méthanol, acétone, dichlorométhane) par macération.<sup>206,208</sup> Ces métabolites sont ensuite concentrés grâce à des extractions liquide-liquide ou solide-liquide (sur C<sub>18</sub> ou polyamide, voir par trituration avec de l'acétonitrile).<sup>207,199</sup> Une approche complémentaire, employée par Appendino et ses collaborateurs, consiste à dissoudre l'extrait dans une solution éthanolique de diacétate de plomb.<sup>226</sup> Cette méthode permet l'élimination de la chlorophylle par filtration. Le Pb<sup>2+</sup> dissous vient remplacer le Mg<sup>2+</sup> présent sur les dérivés de chlorophylle et entraîne sa précipitation.

La purification des diterpènes inférieurs d'*Euphorbia* est réalisée par une suite d'étapes chromatographiques sur phase normale (SiO<sub>2</sub>) et sur phase inverse (C<sub>18</sub>) à basse, moyenne ou haute pression. En première intention, une ou plusieurs chromatographies flash sont réalisées, puis la réalisation de chromatographie liquide préparative haute performance (HPLC-prep) permet l'isolement des diterpènes.<sup>206-208</sup>

Dans de nombreuses études, les diterpènes inférieurs (et supérieurs) ont pu être obtenues par cristallisation spontanée faisant suite à une colonne de chromatographie en phase normale et à une évaporation des solvants organiques.<sup>200,226,227</sup>

L'identification des diterpènes inférieurs est faite par l'approche combinant les méthodes spectrométriques (spectrométrie de masse haute résolution) et spectroscopiques

---

(223) Pickard, W. F. Laticifers and Secretory Ducts: Two Other Tube Systems in Plants. *New Phytol.* **2008**, *177* (4), 877–888.

(224) Pintus, F.; Medda, R.; Rinaldi, A. C.; Spanò, D.; Floris, G. Euphorbia Latex Biochemistry: Complex Interactions in a Complex Environment. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* **2010**, *144* (2), 381–391.

(225) Nothias-Scaglia, Louis-Félix. Observation Personnelle de L'auteur Dans Le Cap Corse.

(226) Appendino, G.; Jakupovic, S.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Milon, V.; Ballero, M. Macrocyclic Diterpenoids from *Euphorbia Semiperfoliata*. *J Nat Prod* **1998**, *61* (6), 749–756.

(227) Appendino, G.; Spagliardi, P.; Ballero, M.; Seu, G. Macrocyclic Diterpenoids from *Euphorbia Hyberna* L. Subsp. *Insularis* and Their Reaction with Oxyphilic Reagents. *Fitoterapia* **2002**, *73* (7-8), 576–582.



(principalement par résonance magnétique nucléaire).<sup>206,208</sup> L'élucidation de la structure tridimensionnelle peut s'avérer complexe et elle a requis l'utilisation de modèles moléculaires simulés pour décrire certains nouveaux dérivés.<sup>4</sup> Comme l'indique le grand nombre d'esters de diterpènes inférieurs pour lesquels des structures cristallines ont été publiées, ces molécules peuvent être considérées comme ayant une tendance cristallogène.<sup>206,208</sup> Lorsque des cristaux peuvent être obtenus, la structure tridimensionnelle, et parfois la configuration absolue, peut être déterminée directement par l'analyse des cristaux par diffraction des rayons X. De plus, la configuration absolue peut être déduite de la configuration relative sur la base de la conservation biosynthétique de la configuration de la jonction de cycle *trans* (C4-C15), avec un proton H4 $\alpha$  et une fonction O-15 $\beta$ , tel que déterminée sur les squelettes lathyrane,<sup>228–232</sup> jatrophane<sup>233–236</sup> et autres squelette affiliés.<sup>206,208</sup>

## Activités biologiques

Bien que les *Euphorbia* aient été employées dans de nombreuses formulations de médecine traditionnelle (cf. partie I.3.2, p. 43) leur utilisation en phytothérapie est assez limitée en raison de leur propriété fortement irritante. Dans la dernière partie du XX<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques ont été entreprises sur les diterpènes inférieurs d'*Euphorbia*. Cette partie bibliographique n'a pas vocation à traiter de façon exhaustive l'ensemble de la littérature traitant de ces sujets. Le lecteur souhaitant approfondir les thèmes abordés ci-dessous peut se référer aux différentes revues publiées.<sup>206–208,237</sup>

Historiquement, les diterpènes d'*Euphorbia* ont été étudiés pour leur propriété irritante, parfois pro-tumorale. Les diterpènes inférieurs possédant ces activités ont été désignés sous l'appellation de phorboïdes.<sup>122,238–240</sup> Celle-ci englobe les diterpènes de type

- 
- (228) Zechmeister, K.; Röhr, M.; Brandl, F.; Hechtfisher, S.; Hoppe, W.; Hecker, E.; Adolf, W.; Kubinyi, H. Röntgenstrukturanalyse eines Neuen Makrozyklischen Diterpenesters aus der Springwolfsmilch (*Euphorbia lathyris* L.). *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11* (35), 3071–3073.
- (229) Tian, Y.; Xu, W.; Zhu, C.; Lin, S.; Li, Y.; Xiong, L.; Wang, S.; Wang, L.; Yang, Y.; Guo, Y.; et al. Lathyrane Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia micractina* and Their Biological Activities. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (5), 1221–1229.
- (230) Xu, J.; Jin, D.; Song, H.; Guo, Y.; He, Y. Lathyrane Diterpenes from *Euphorbia prolifera* and Their Inhibitory Activities on LPS-Induced NO Production. *Fitoterapia* **2012**, *83* (7), 1205–1209.
- (231) Jiao, W.; Wan, Z.; Chen, S.; Lu, R.; Chen, X.; Fang, D.; Wang, J.; Pu, S.; Huang, X.; Gao, H.; et al. Lathyrane Diterpenes as Modulators of P-Glycoprotein Dependent Multidrug Resistance: Structure–Activity Relationship Studies on *Euphorbia* Factor L3 Derivatives. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (9), 3720–3728.
- (232) Jiao, W.; Yu, K. B.; Lu, R. H. Configuration Confirmation of *Euphorbia* Factor L-1 by Single-Crystal X-Ray Diffraction. *Chin. J. Struct. Chem.* **2008**, *27* (12), 1431–1434.
- (233) Kupchan, S. M.; Sigel, C. W.; Matz, M. J.; Saenz Renauld, J. A.; Haltiwanger, R. C.; Bryan, R. F. Jatrophane, a Novel Macrocyclic Diterpenoid Tumor Inhibitor from *Jatropha gossypifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (14), 4476–4477.
- (234) Yamamura, S.; Kosemura, S.; Ohba, S.; Ito, M.; Saito, Y. The Isolation and Structures of Euphoscopins A and B. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (52), 5315–5318.
- (235) Manners, G. D.; Wong, R. Y. The Absolute Stereochemical Characterization of Two New Jatrophane Diterpenes from *Euphorbia esula*. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1985**, 2075–2081.
- (236) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retailliau, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Costa, J.; Litaudon, M. Jatrophane Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (6), 1505–1512.
- (237) 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.* **2015**, *115* (9), 2975–3011.
- (238) Opferkuch, H. J.; Hecker, E. On the Active Principles of the Spurge Family (Euphorbiaceae). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1982**, *103* (3), 255–268.
- (239) Evans, F. J.; Taylor, S. E. Pro-inflammatory, Tumor-Promoting and Anti-Tumour Diterpenes of the Plants of Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Fortschritte Chem. Org. Naturstoffe* **1983**, *44*, 1–99.
- (240) Krauter, G.; Von Der Lieth, C.-W.; Schmidt, R.; Hecker, E. Structure/Activity Relationships of Polyfunctional Diterpenes of the Tiglane Type. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242* (2), 417–427.

tigliane, ingénane et daphnane retrouvés chez les Euphorbiacées et les Thymeleacées. Parmi ces dérivés, ceux ayant la plus puissante activité irritante et pro-tumorale sont les esters de phorbol isolés de *Croton tiglium* (*Euphorbiaceae*).<sup>202,239</sup> Ces deux propriétés biologiques sont liées à leur capacité à moduler différentes isoenzymes des protéines kinases C (PKCs) (cf. partie I.3.3, p. 57).<sup>241</sup> L'activation des PKCs est également à la base de l'activité antivirale des phorboïdes vis-à-vis du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il convient ici de souligner que l'ensemble des travaux publiés<sup>118-120</sup> et non-publiés par le laboratoire du CNRS-ICSN, ainsi que ceux présentés dans ce manuscrit,<sup>2,3</sup> convergent vers la probable implication des PKCs dans le mécanisme d'action anti-CHIKV des esters de diterpènes inférieurs (cf. partie I.1.2, p. 31).

L'évaluation biologique des esters de diterpènes macrocycliques, tels que les lathyranes ou jatrophanes et leurs dérivés, a montré qu'ils étaient dépourvus d'activités pro-tumorales et pro-irritantes caractéristiques des phorboïdes.<sup>242-244</sup> Néanmoins, deux études décrivent que certains de ces dérivés macrocycliques, peuvent moduler les PKCs, comme le font les phorboïdes, et avoir des effets antiviraux sur le virus du VIH (cf. partie I.3.3, p. 66).

En premier lieu, nous présenterons donc les PKCs et leur activation par le TPA (12-*O*-tétradécanoylphorbol 13-acétate), parfois appelé phorbol 12-myristate-13-acétate (PMA), la molécule ayant servi de modèle pour la compréhension de l'interaction de cette protéine avec les phorboïdes. Cette molécule a aussi été le premier diterpène inférieur pour lequel une activité anti-VIH a été découverte, et son mécanisme d'action élucidé comme dépendant des PKCs. A la suite, nous discuterons des principaux représentants des diterpènes inférieurs d'*Euphorbia* ayant montré des activités modulatrices des PKCs : ceux à squelette tigliane (dont le TPA, la protratine et EBC-46), à squelette ingénane (notamment l'ingénol-3-angélate), et à squelette macrocyclique (essentiellement SJ23B). Pour terminer, nous aborderons brièvement le potentiel de modulation des glycoprotéine-P (Pg-P) par des diterpènes macrocycliques, activité la plus étudiée pour cette classe de diterpènes inférieurs.<sup>245,246</sup>

### Activité modulatrice des PKCs par les diterpènes inférieurs de type "phorboïde"

Certains phorboïdes ont de fortes propriétés irritante et pro-tumorale.<sup>122,238-240</sup> Dans les années 1980, il a pu être établi que ces activités étaient liées à leur capacité modulatrice des protéines kinases C (PKCs).<sup>247,248</sup> Depuis, de très nombreux travaux ont été réalisés pour

(241) Das, J.; Rahman, G. M. C1 Domains: Structure and Ligand-Binding Properties. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (24), 12108–12131.

(242) Seip, E. H.; Hecker, E. Lathyrane Type Diterpenoid Esters from *Euphorbia* Characias. *Phytochemistry* **1983**, *22* (8), 1791–1795.

(243) Seip, E. H.; Hecker, E. Derivatives of Characiol, Macrocyclic Diterpene Esters of the Jatrophane Type from *Euphorbia* Characias. *Phytochemistry* **1984**, *23* (8), 1689–1694.

(244) Hohmann, J.; et al. Jatrophane Diterpenoids from *Euphorbia* Peplus. *Phytochemistry* **1999**, *51* (5), 673–677.

(245) Corea, G.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. Jatrophane Diterpenes from *Euphorbia* Spp. as Modulators of Multidrug Resistance in Cancer Therapy. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8* (2), 431–447.

(246) Ferreira, M.-J. U.; et al. *Euphorbia* and *Momordica* Metabolites for Overcoming Multidrug Resistance. *Phytochem. Rev.* **2014**.

(247) Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U.; Nishizuka, Y. Direct Activation of Calcium-Activated, Phospholipid-Dependent Protein Kinase by Tumor-Promoting Phorbol Esters. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257* (13), 7847–7851.

(248) Saraiva, L.; Fresco, P.; Pinto, E.; Gonçalves, J. Characterization of Phorbol Esters Activity on Individual Mammalian Protein Kinase C Isoforms, Using the Yeast Phenotypic Assay. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *491* (2–3), 101–110.

étudier l'effet des esters de phorbol sur les PKCs. Une récente revue bibliographique détaille l'ensemble des travaux sur ce sujet.<sup>241</sup>

Les PKCs constituent une superfamille de protéines de type serine-thréonine kinase qui jouent un rôle central dans la transduction de signaux cellulaires régulant de nombreuses fonctions des cellules ; telles que la croissance, la différenciation et l'apoptose.<sup>241,249</sup> Les PKCs sont réparties en trois classes : les conventionnelles ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), les nouvelles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ) et les atypiques ( $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ). Alors que les trois classes de PKCs peuvent être activées par des unités de diacylglycérol (DAGs) qui sont des messagers cellulaires endogènes, seules les PKCs classiques et conventionnelles peuvent être activées par les esters de phorbol. En effet, ces derniers miment l'action des DAGs, mais avec un ordre de grandeur trois fois supérieur. Les PKCs conventionnelles et nouvelles sont constituées de quatre domaines principaux notés C1-C4. Les domaines C1 et C2 sont des domaines régulateurs, alors que le domaine C3 est un domaine de liaison à l'ATP et le domaine C4 est un domaine catalytique d'interaction avec le substrat. Les esters de phorbol et les DAGs modulent les PKCs classiques et nouvelles en interagissant avec le domaine C1.<sup>250-252</sup> Ce domaine est constitué de deux sous-domaines, C1A et C1B, composés d'une cinquantaine d'acides aminés dont une séquence répétée de cystéine hautement conservées chez les PKCs. Les PKCs atypiques ont un domaine C1 qui ne se lie pas aux DAGs et aux esters de phorbol. Une soixantaine de variante du domaine C1 a été identifié à ce jour.

Les isoformes des PKCs nouvelles peuvent se lier aux DAGs par leur domaine C1 avec une affinité suffisante pour permettre leur déplacement du cytoplasme vers la membrane cytoplasmique, tandis que pour les PKCs conventionnelles, cette affinité est moindre et la translocation des PKCs n'est permise que si le site C2 est activé (). Le site C2 est régulé par la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme. Lorsque les PKCs ont atteint la membrane plasmique, le site catalytique est libéré du pseudo-substrat lors de l'interaction du domaine C1 avec les DAGs, et l'enzyme devient capable de phosphoryler ses protéines cibles.

La structure cristalline d'une PKC nouvelle (PKC  $\delta$ ) complexée avec le phorbol 13-acétate a permis de mieux comprendre le site d'interaction du domaine C1.<sup>253</sup> En particulier, le phorbol 13-acétate interagit avec un résidu de protéine du domaine C1 par le biais de quatre liaisons hydrogènes. Les oxygènes de l'hydroxy OH-4 et du carbonyle en position 3 sont impliqués chacun dans une liaison hydrogène, tandis que celui de l'hydroxy OH-20 est impliqué dans les deux dernières. Par ailleurs, un groupe de résidus hydrophobes de la PKC permet l'insertion dans la membrane.

---

(249) Breitskreutz, D.; Braiman-Wiksmann, 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.* **2007**, *133* (11), 793–808.

(250) Parker, P. J.; Coussens, L.; Totty, N.; Rhee, L.; Young, S.; Chen, E.; Stabel, S.; Waterfield, M. D.; Ullrich, A. The Complete Primary Structure of Protein Kinase C—the Major Phorbol Ester Receptor. *Science* **1986**, *233* (4766), 853–859.

(251) Slater, S. J.; Kelly, M. B.; Taddeo, F. J.; Rubin, E.; Stubbs, C. D. Evidence for Discrete Diacylglycerol and Phorbol Ester Activator Sites on Protein Kinase C. Differences in Effects of 1-Alkanol Inhibition, Activation by Phosphatidylethanolamine and Calcium Chelation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (25), 17160–17165.

(252) Slater, S. J.; Ho, C.; Kelly, M. B.; Larkin, J. D.; Taddeo, F. J.; Yeager, M. D.; Stubbs, C. D. Protein Kinase C Contains Two Activator Binding Sites That Bind Phorbol Esters and Diacylglycerols with Opposite Affinities. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (9), 4627.

(253) Zhang, G.; Kazanietz, M. G.; Blumberg, P. M.; Hurley, J. H. Crystal Structure of the Cys2 Activator-Binding Domain of Protein Kinase C $\delta$  in Complex with Phorbol Ester. *Cell* **1995**, *81* (6), 917–924.

Le fort pouvoir modulateur des PKCs des esters de phorbol ne s'explique pas seulement par la forte affinité de ces dérivés pour le domaine C1. En effet, contrairement aux DAGs qui sont rapidement métabolisés, les esters de phorbol sont dégradés moins rapidement et agissent comme des activateurs permanents.<sup>254</sup> De plus, la structure des esters de phorbol est plus rigide, en comparaison de celle des DAGs, ce qui est un facteur entropique supplémentaire pour expliquer les différences d'affinité avec le site d'interaction, mais aussi avec la membrane.<sup>255</sup> Les diverses variantes existantes de sous-domaines C1A ont des affinités différentes pour les DAGs et les esters de phorbol. De plus, il a été constaté que tous les esters de phorbol ne provoquaient pas le même type de translocation des PKCs. Par exemple, les esters de phorbol fortement hydrophobes favorisent la translocation de PKC $\delta$  vers la membrane plasmique, tandis que les esters de phorbol plus hydrophiles les déplaçaient vers la membrane nucléaire.<sup>256</sup> A l'inverse, l'évaluation d'une série de DAGs hémisynthétique a montré que les DAGs les plus hydrophiles ne déplaçaient pas pour autant les PKC $\delta$  vers la membrane nucléaire.<sup>257,258</sup>

L'étude des PKCs est un domaine de recherche très actif puisqu'elles sont impliquées dans de nombreux états pathologiques<sup>241,254</sup> tels que le cancer, le diabète, les défaillances cardiaques, les complications pulmonaires et rénales, le désordre bipolaire, les troubles auto-immuns, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, et de nombreuses atteintes dermatologiques.

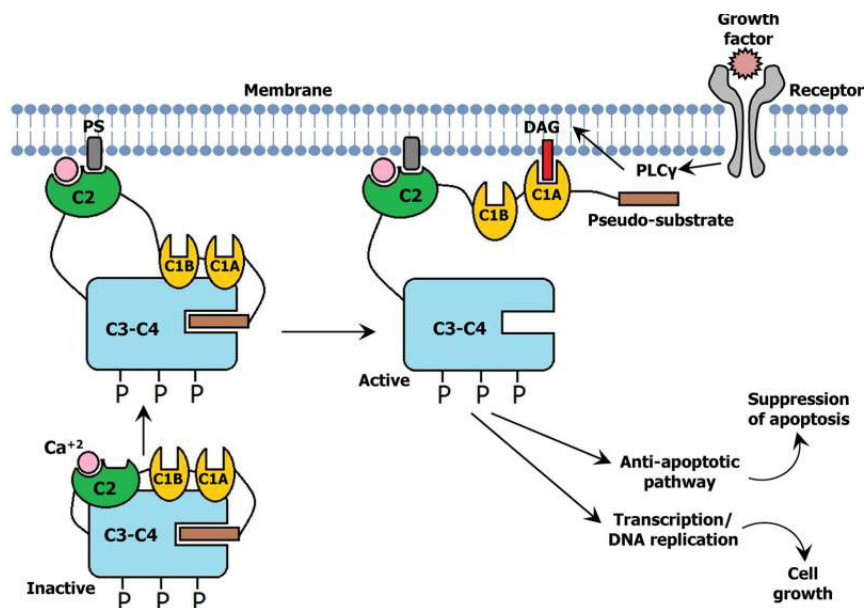


Figure 23. Schéma simplifié montrant le processus d'activation des PKCs conventionnelles.

(254) Newton, A. C. Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2353–2364.

(255) Kazanietz, M. G.; Caloca, M. J.; Eroles, P.; Fujii, T.; Garcí'a-Bermejo, M. L.; Reilly, M.; Wang, H. Pharmacology of the Receptors for the Phorbol Ester Tumor Promoters: Multiple Receptors with Different Biochemical Properties. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60* (10), 1417–1424.

(256) Wang, Q. J.; Fang, T.-W.; Fenick, D.; Garfield, S.; Bienfait, B.; Marquez, V. E.; Blumberg, P. M. The Lipophilicity of Phorbol Esters as a Critical Factor in Determining the Pattern of Translocation of Protein Kinase C  $\delta$  Fused to Green Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (16), 12136–12146.

(257) Stahelin, R. V.; Digman, M. A.; Medkova, M.; Ananthanarayanan, B.; Rafter, J. D.; Melowic, H. R.; Cho, W. Mechanism of Diacylglycerol-Induced Membrane Targeting and Activation of Protein Kinase C  $\delta$ . *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (28), 29501–29512.

(258) Hui, X.; Reither, G.; Kaestner, L.; Lipp, P. Targeted Activation of Conventional and Novel Protein Kinases C through Differential Translocation Patterns. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34* (13), 2370–2381.

### *Le TPA et les esters de phorbol*

Les phorboïdes d'Euphorbiaceae font partie des modulateurs les plus puissants des PKCs conventionnelles et nouvelles. Parmi les tiglianes, les dérivés qui ont le plus d'affinité pour les PKCs sont des esters de phorbol isolés de *Croton tiglium* (Euphorbiaceae), notamment le TPA (**36**) qui est un activateur à large de spectre de toutes les PKCs conventionnelles et nouvelles.<sup>259,260</sup> De plus, il a été montré que les esters de phorbol qui avaient les plus fortes activités pro-inflammatoire et pro-tumorale étaient ceux portant des groupements acyles à longue chaîne carbonée.<sup>204,261</sup> L'épimérisation du TPA en 4 $\alpha$ -TPA (**37**) induit une perte de ces activités.<sup>261</sup> L'activité des esters de phorbol est telle que ces molécules sont utilisées comme références dans les modèles animaux pour l'étude de la carcinogénèse. Leur potentiel thérapeutique est donc à priori limité. Toutefois, la toxicologie du TPA a été étudiée dans le cadre de deux études précliniques (en Chine et aux Etats-Unis). Les résultats ont montré que son utilisation à des doses thérapeutiques n'induisait pas d'effets secondaires graves.<sup>262</sup> En revanche, une étude clinique en double aveugle de phase I sur des patients atteints de cancers résistants aux traitements médicamenteux a donné lieu à de nombreux effets indésirables (graves) tel que de l'hématurie, des crises d'épilepsies et des syncopes.<sup>263</sup> De plus, les tumeurs de patients malades n'ont pas répondu favorablement au traitement par le TPA.

En 1986, une équipe de l'Université de Yamaguchi au Japon a démontré que le TPA augmentait la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) *in cellulo*.<sup>264</sup> Quelques années plus tard, la même équipe a mis en évidence que le TPA inhibait la formation de particules virales (virions), bien qu'il ait un effet stimulateur sur la transcription du matériel génétique virale.<sup>265</sup> Dans cette même étude, les chercheurs ont montré que le TPA agissait en régulant à la baisse les récepteurs CD4 via une activation de PKCs. Les récepteurs CD4 sont des récepteurs membranaires qui interviennent dans les processus de production de nouveaux virions (par syncytia) chez les cellules infectées par le VIH, mais ils sont également utilisés par les virions du VIH pour pénétrer dans les cellules saines.<sup>265,266</sup> L'activité anti-VIH est de l'ordre du nanomolaire (IC<sub>50</sub> = 1 nM, VIH-1, cellules MAGI-CXCR4).<sup>267</sup>

De nombreuses études sont venues compléter la compréhension du mécanisme d'action anti-VIH du TPA. Celui-ci peut se décomposer en deux voies :

- d'une part, l'activation des PKCs par le **36** va activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B en désactivant sa protéine inhibitrice I $\kappa$ B par le biais d'une phosphorylation. La stimulation de la voie du NF- $\kappa$ B induit ensuite le recrutement d'histones acétyl transférase dans le noyau.

(263) Schaar, D.; Goodell, L.; Aisner, J.; Cui, X. X.; Han, Z. T.; Chang, R.; Martin, J.; Grospe, S.; Dudek, L.; Riley, J.; et al. A Phase I Clinical Trial of 12- O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate for Patients with Relapsed/refractory Malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *57* (6), 789–795.

(264) Harada, S.; Koyanagi, Y.; Nakashima, H.; Kobayashi, N.; Yamamoto, N. Tumor Promoter, TPA, Enhances Replication of HTLV-III/LAV. *Virology* **1986**, *154* (2), 249–258.

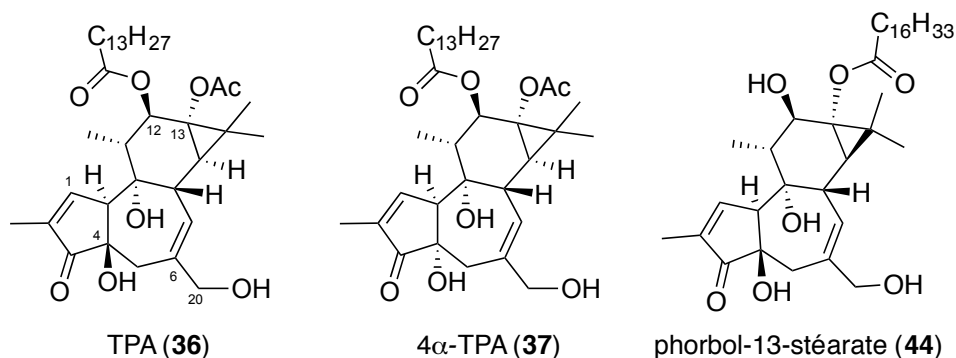
(265) Hossain Chowdhury, M. I.; Koyanagi, Y.; Kobayashi, S.; Hamamoto, Y.; Yoshiyama, H.; Yoshida, T.; Yamamoto, N. The Phorbol Ester TPA Strongly Inhibits HIV-1-Induced Syncytia Formation but Enhances Virus Production: Possible Involvement of Protein Kinase C Pathway. *Virology* **1990**, *176* (1), 126–132.

(266) Jiang, G.; Dandekar, S. Targeting NF- $\kappa$ B Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2014**, *31* (1), 4–12.

(267) Warrillow, D.; Gardner, J.; Darnell, G. A.; Suhrbier, A.; Harrich, D. HIV Type 1 Inhibition by Protein Kinase C Modulatory Compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2006**, *22* (9), 854–864.

L'acétylation des histones nucléaires va permettre l'ouverture des nucléosomes, ce qui induit la transcription des particules virales de VIH latentes ;<sup>266</sup>

- d'autre part, le TPA agit en diminuant l'expression des récepteurs membranaires CD4 (et son corécepteur CXCR4), qui sont utilisés pour la production de nouveaux virions et pour que ces derniers pénètrent dans les cellules saines.<sup>267,268</sup>



L'utilisation de ce type d'agent pourrait donc permettre de développer des thérapies curatives originales pour soigner les malades atteints par le VIH.<sup>266,267</sup> Cette stratégie, désignée par l'expression anglo-saxonne *shock and kill*, consisterait à utiliser des activateurs de PKC pour purger des réservoirs viraux latents présents dans les cellules infectées, puis à éliminer les particules virales à l'aide d'antiretroviraux, tout en empêchant la réinfection des cellules purgées par la "reinternalisation" des récepteurs qu'utilisent le VIH.

Du fait de la forte toxicité du TPA, son utilisation dans le cadre d'un traitement curatif contre le VIH semble improbable. Toutefois, des études ont montré que d'autres dérivés d'esters de phorbol avaient un profil d'activité biologique similaire sur la réplication du VIH.<sup>269-272</sup>

Parmi ces dérivés, il faut remarquer l'évaluation d'une série d'esters de phorbol monoacylés en position 13 par Giovanni Appendino et Eduardo Muñoz.<sup>272</sup> Les dérivés, possédant un ester avec une chaîne carbonée de plus de six carbones, ont montré de puissantes activités anti-VIH via la modulation des PKCs. Le phorbol 13-stéarate (**44**) a montré la plus forte activité (EC<sub>50</sub> = 60 nM, VIH-1, cellules Jurkat-LAT-GFP). Sur la base de l'observation de la faible translocation des PKCs vers la membrane cellulaire, mais aussi de l'effet délétère de la présence d'un hydroxy OH-12 pour l'activité pro-tumorale, il a pu être déduit que ces dérivés étaient probablement dépourvus d'activité pro-tumorale, et qu'ils représentaient par conséquent une alternative thérapeutique intéressante.

(268) Signoret, N.; Oldridge, J.; Pelchen-Matthews, A.; Klasse, P. J.; Tran, T.; Brass, L. F.; Rosenkilde, M. M.; Schwartz, T. W.; Holmes, W.; Dallas, W.; et al. Phorbol Esters and SDF-1 Induce Rapid Endocytosis and Down Modulation of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Cell Biol.* **1997**, *139* (3), 651–664.

(269) El-Mekkawy, S.; Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T. Anti-HIV-1 Phorbol Esters from the Seeds of *Croton Tiglium*. *Phytochemistry* **2000**, *53* (4), 457–464.

(270) Hattori, M. Phorbol Derivatives Having Antivirus Activity. U.S. Patent 6,268,395 B1, 2001.

(271) Zhong, Y.; Matsuya, Y.; Nemoto, H.; Mori, M.; Saito, H.; Yamamoto, N. Novel Phorbol Esters Exert Dichotomous Effects on Inhibition of HIV-1 Infection and Activation of Latent HIV-1 Expression. *Antivir. Chem. Chemother.* **2005**, *16* (5), 303–313.

(272) Márquez, N.; Calzado, M. A.; Sánchez-Duffhues, G.; Pérez, M.; Minassi, A.; Pagani, A.; Appendino, G.; Diaz, L.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Muñoz, E. Differential Effects of Phorbol-13-Monoesters on Human Immunodeficiency Virus Reactivation. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75* (6), 1370–1380.

### *Les tiglianes modifiés de type déoxyphorbol*

Le 12-déoxyphorbol 13-acétate (prostratine, **35**) est un analogue du TPA. Il a été isolé initialement de *Pimelea prostrata* (Thymeleaceae),<sup>273</sup> puis à partir de plusieurs espèces d'*Euphorbia* (*E. fischeriana*, *E. cornigera*, *E. triangularis*) et également d'*Homalanthus nutans*. C'est à la suite d'une étude du *National Institute of Health* (NIH) aux États-Unis sur *H. nutans*, qu'en 1992 a été découvert la forte activité inhibitrice de la prostratine vis-à-vis du virus du VIH.<sup>274</sup> Bien qu'ayant une concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub> = 1.3 μM, VIH-1, MAGI-CXCR4)<sup>267</sup> plus élevée que celle du TPA, cette molécule est particulièrement intéressante du fait de son profil toxicologique différent. En effet, la prostratine ne possède pas l'activité pro-tumorale du TPA et se comporte comme un anti-promoteur de tumeur en inhibant l'activité pro-tumorale du TPA.<sup>275,276</sup> Quelques années plus tard, il a pu être établi que la prostratine agissait en stimulant les PKCs, ce qui induisait une réactivation des réservoirs de latence virale et une régulation à la baisse des récepteurs CD4 et CXCR4.<sup>277,278</sup> L'organisation de recherche médicale américaine, à but non-lucratif, l'AIDS Research Alliance, a acquis l'exclusivité de l'exploitation des droits sur l'utilisation de la prostratine auprès du NIH.<sup>279</sup> Un brevet sur son administration pour le traitement du VIH, ainsi que celle de ces analogues, a été déposée par cette organisation en 2009.<sup>280</sup> En 2014, la prostratine est entrée en phase clinique I aux États-Unis comme adjuvant au traitement antirétroviral des patients séropositifs au VIH.<sup>123,124,281</sup> Notons, que le 12-déoxyphorbol 13-phénylacétate, un analogue de la prostratine isolé de *Sapium sebiferum* (Euphorbiaceae), a montré une activité anti-VIH 20 à 40 fois supérieure à celle de la prostratine, tout en conservant un profil biologique similaire. (dénué d'activité pro-tumorale).<sup>282</sup>

---

(273) Cashmore, A. R.; Seelye, R. N.; Cain, B. F.; Mack, H.; Schmidt, R.; Hecker, E. The Structure of Prostratin: A Toxic Tetracyclic Diterpene Ester from *Pimelea Prostrata*. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17* (20), 1737–1738.

(274) Gustafson, K. R.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Gulakowski, R. J.; Ishitoya, J.; Szallasi, Z.; Lewin, N. E.; Blumberg, P. M.; Weislow, O. S. A Nonpromoting Phorbol from the Samoan Medicinal Plant *Homalanthus Nutans* Inhibits Cell Killing by HIV-1. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (11), 1978–1986.

(275) Szallasi, Z.; Krausz, K. W.; Blumberg, P. M. Non-Promoting 12-Deoxyphorbol 13-Esters as Potent Inhibitors of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-Induced Acute and Chronic Biological Responses in CD-1 Mouse Skin. *Carcinogenesis* **1992**, *13* (11), 2161–2167.

(276) Szallasi, Z.; Krsmanovic, L.; Blumberg, P. M. Nonpromoting 12-Deoxyphorbol 13-Esters Inhibit Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Induced Tumor Promotion in CD-1 Mouse Skin. *Cancer Res.* **1993**, *53* (11), 2507–2512.

(277) Gulakowski, R. J.; McMahon, J. B.; Buckheit Jr., R. W.; Gustafson, K. R.; Boyd, M. R. Antireplicative and Anticytopathic Activities of Prostratin, a Non-Tumor-Promoting Phorbol Ester, against Human Immunodeficiency Virus (HIV)1. *Antiviral Res.* **1997**, *33* (2), 87–97.

(278) Williams, S. A.; Chen, L.-F.; Kwon, H.; Fenard, D.; Bisgrove, D.; Verdin, E.; Greene, W. C. Prostratin Antagonizes HIV Latency by Activating NF-κB. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (40), 42008–42017.

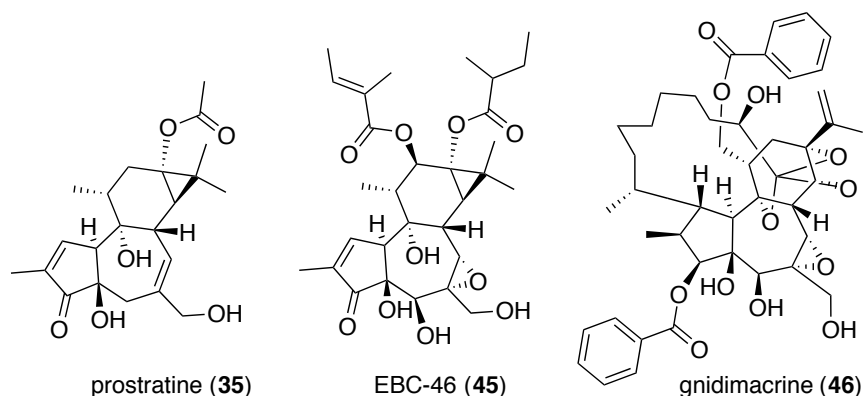
(279) AIDS Research Alliance: About Prostratin <http://aidsresearch.org/cure-research/prostratin/> (accessed Sep 30, 2015).

(280) Wender, P. A.; Warrington, J.; Kee, J. Prostratin and Structural or Functional Analogs Thereof. U.S. Patent 8,546,378 B2, 2013.

(281) Lewin, S. R.; Rouzioux, C. HIV Cure and Eradication: How Will We Get from the Laboratory to Effective Clinical Trials? *AIDS Lond. Engl.* **2011**, *25* (7), 885–897.

(282) 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.* **2003**, *59* (2), 89–98.





EBC-46 (45) est un ester de phorbol modifié, isolé de *Fontainea picrosperma*, une Euphorbiaceae d'Australie. A la différence des esters de phorbol, EBC-46 présente des fonctions hydroxy et époxy supplémentaires en position C-5 et C-6—C-7, respectivement. Des chercheurs australiens ont montré qu'il agissait comme un activateur spécifique de certaines PKCs conventionnelles (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  et PKC $\gamma$ ).<sup>283</sup>

Lors d'un essai préclinique, des injections intra-tumorales d'EBC-46 se sont montrées efficaces pour traiter différentes tumeurs solides chimiorésistantes. L'injection d'EBC-46 provoque une forte inflammation conduisant à la formation d'escarres (nécrose), permettant ensuite l'ablation aisée de la tumeur et une guérison définitive. Cette molécule, développée par QBiotech, a été homologuée en 2011 en Australie pour un usage vétérinaire. Elle est aujourd'hui en phase clinique I.<sup>284</sup>

### *Les daphnanes*

Les daphnanes sont des phorboïdes ayant un profil d'activité comparable aux esters de phorbol (pro-irritant et promoteur de tumeurs).<sup>285,286</sup> Ce type de phorboïde n'a été que très rarement isolé d'*Euphorbia*. Il est plutôt isolé d'autres genres comme le genre *Trigonostemon*, et il est également présent chez les espèces de la famille des Thymelaeaceae.<sup>206,208,287</sup> Ce type de diterpène inférieur ne sera donc pas traité exhaustivement dans ce manuscrit. Notons que certains daphnanes ont montré de très fortes activités anti-VIH. A titre d'exemple, la gnidimacrine (46), un daphnane orthoester isolé de différentes espèces du genre *Daphne* (Thymelaeaceae), a montré une très forte activité inhibitrice du VIH-1 (IC<sub>50</sub> = 2.5 nM, VIH-1,

(283) Boyle, G. M.; D'Souza, M. M. A.; Pierce, C. J.; Adams, R. A.; Cantor, A. S.; Johns, J. P.; Maslovskaya, L.; Gordon, V. A.; Reddell, P. W.; Parsons, P. G. Intra-Lesional Injection of the Novel PKC Activator EBC-46 Rapidly Ablates Tumors in Mouse Models. *PLoS One* **2014**, *9* (10), e108887.

(284) Rainforest cancer drug EBC-46 set for human trials <http://www.couriermail.com.au/news/queensland/rainforest-plant-seed-leads-to-cancer-drug/story-e6freoof-1225879154124> (accessed Jul 9, 2013).

(285) Adolf, W.; Hecker, E. Diterpenoid Irritants and Cocarcinogens in Euphorbiaceae and Thymelaeaceae: Structural Relationships in View of Their Biogenesis. *Isr. J. Chem.* **1977**, *16* (1), 75–83.

(286) Adolf, W.; Hecker, E. On the Active Principles of the Thymelaeaceae. *Planta Med.* **1982**, *45* (07), 177–182.

(287) Liao, S.-G.; Chen, H.-D.; Yue, J.-M. Plant Orthoesters. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (3), 1092–1140.

(288) Huang, L.; Ho, P.; Yu, J.; Zhu, L.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H. Picomolar Dichotomous Activity of Gnidimacrine Against HIV-1. *PLoS ONE* **2011**, *6* (10), e26677.

(289) Sorg, B.; Schmidt, R.; Hecker, E. Structure/activity Relationships of Polyfunctional Diterpenes of the Ingenane Type. I. Tumor-Promoting Activity of Homologous, Aliphatic 3-Esters of Ingenol and of Delta 7,8-Isoingenol-3-Tetradecanoate. *Carcinogenesis* **1987**, *8* (1), 1–4.

(290) Vogg, G.; Mattes, E.; Rothenburger, J.; Hertkorn, N.; Stefan Achatz; Sandermann Jr., H. Tumor Promoting Diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. *Phytochemistry* **1999**, *51* (2), 289–295.

(291) Fujiwara, M.; Ijichi, K.; Tokuhisa, K.; Katsuura, K.; Shigeta, S.; Konno, K.; Wang, G.; Uemura, D.; Yokota, T.; Baba, M. Mechanism of Selective Inhibition of Human Immunodeficiency Virus by Ingenol Triacetate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40* (1), 271.



cellule MT-4) avec un index de sélectivité supérieur à 80 000.<sup>288</sup> Son mécanisme d'action implique également les PKCs.

### *Les esters d'ingénol*

Les esters d'ingénol ont des propriétés similaires aux autres phorboïdes. Comme pour les esters de phorbol, ils peuvent être doués de fortes activités pro-inflammatoires et pro-tumorales, notamment lorsqu'ils portent des acyles à longue chaîne carbonée.<sup>261,289,290</sup> Il a été montré dès 1996, que l'ingénol 3,5,20-triacétate (I3T, **47**) inhibait la réplication du VIH *in vitro* (IC<sub>50</sub> de 0.051 à 0.65  $\mu$ M, VIH-1, cellules MT-4), bien que celui-ci soit un activateur faible des PKCs en comparaison du TPA.<sup>291</sup> Tout comme le TPA, l'I3T induit une régulation à la baisse des récepteurs CD4. Les mêmes auteurs ont également évalué le profil d'activité anti-VIH de différents dérivés hémisynthétiques d'ingénol.<sup>291</sup> Plusieurs dérivés ont montré une forte activité inhibitrice. Cependant, les auteurs ont constaté que certains dérivés anti-VIH activaient la voie du NF- $\kappa$ B via la modulation des PKCs, tandis que d'autres non. Ces résultats ont amené les auteurs à proposer l'existence d'une "voie anti-VIH" des esters d'ingénol indépendante des PKCs.

Des travaux menés par G. Appendino et E. Muñoz, ont montré les propriétés de promoteur de tumeurs et modulatrices de la voie du NF- $\kappa$ B d'une série d'ingénols modifiés.<sup>292</sup> Les auteurs ont constaté que ces propriétés n'obéissaient pas aux mêmes règles de relations structure-activité et qu'il était donc possible de concevoir des dérivés sélectifs. La nature de l'acyle sur l'oxygène en position 5 et la présence de l'hydroxy OH-20 semblent déterminantes à cet égard.

D'autres travaux décrivent également l'activité anti-VIH de dérivés d'ingénol.<sup>293–296</sup> Ces molécules ont des propriétés comparables à l'I3T et aux autres phorboïdes anti-VIH. L'un de ces dérivés est l'ingénol 3-angélate.

---

(292) Blanco-Molina, M.; Tron, G. C.; Macho, A.; Lucena, C.; Calzado, M. A.; Muñoz, E.; Appendino, G. Ingenol Esters Induce Apoptosis in Jurkat Cells through an AP-1 and NF- $\kappa$ B Independent Pathway. *Chem. Biol.* **2001**, *8* (8), 767–778.

(293) Hong, K.-J.; Lee, H. S.; Kim, Y.; Kim, S. S. Ingenol Protects Human T Cells From HIV-1 Infection. *Osong Public Health Res. Perspect.* **2011**, *2* (2), 109–114.

(294) Pandeló, J. D.; Bartholomeeusen, K.; da Cunha, R. D.; Abreu, C. M.; Gliński, J.; da Costa, T. B. F.; Bacchi Rabay, A. F. M.; Pianowski Filho, L. F.; Dudycz, L. W.; Ranga, U.; et al. Reactivation of Latent HIV-1 by New Semi-Synthetic Ingenol Esters. *Virology* **2014**, *462–463*, 328–339.

(295) Abreu, C. M.; Price, S. L.; Shirk, E. N.; Cunha, R. D.; Pianowski, L. F.; Clements, J. E.; Tanuri, A.; Gama, L. Dual Role of Novel Ingenol Derivatives from *Euphorbia Tirucalli* in HIV Replication: Inhibition of De Novo Infection and Activation of Viral LTR. *PLoS ONE* **2014**, *9* (5), e97257.

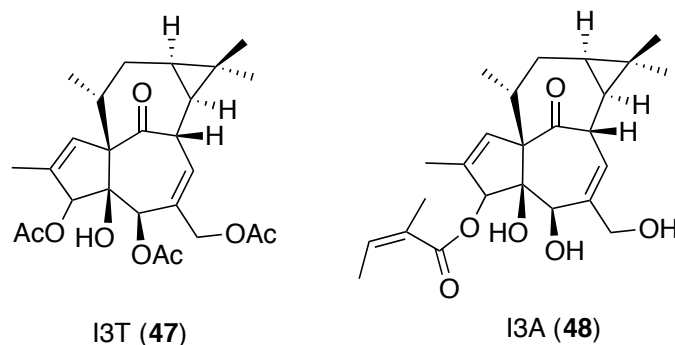
(296) Jiang, G.; Mendes, E. A.; Kaiser, P.; Sankaran-Walters, S.; Tang, Y.; Weber, M. G.; Melcher, G. P.; Thompson, G. R.; Tanuri, A.; Pianowski, L. F.; et al. Reactivation of HIV Latency by a Newly Modified Ingenol Derivative via Protein Kinase C $\delta$ -NF- $\kappa$ B Signaling: *AIDS* **2014**, *28* (11), 1555–1566.

(297) Weedon, D.; Chick, J. Home Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Med. J. Aust.* **1976**, *1* (24), 928.

(298) Green, A. C.; Beardmore, G. L. Home Treatment of Skin Cancer and Solar Keratoses. *Australas. J. Dermatol.* **1988**, *29* (3), 127–130.

(299) Ramsay, J. r.; Suhrbier, A.; Aylward, J. h.; Ogbourne, S.; Cozzi, S.-J.; Poulsen, M. g.; Baumann, K. c.; Welburn, P.; Redlich, G. l.; Parsons, P. g. The Sap from *Euphorbia Peplus* Is Effective against Human Nonmelanoma Skin Cancers. *Br. J. Dermatol.* **2011**, *164* (3), 633–636.

(300) Ogbourne, S. M.; Parsons, P. G. The Value of Nature's Natural Product Library for the Discovery of New Chemical Entities: The Discovery of Ingenol Mebutate. *Fitoterapia* **2014**, *98*, 36–44.



L'ingénol-3-angélate (I3A, **48**) ou ingénol 3-mébutate, ou PEP005, est une molécule isolée de plusieurs *Euphorbia* (dont *E. resinifera* et *E. peplus*).<sup>206,208</sup> Elle a été décrite dans les années 1980 comme possédant un effet pro-inflammatoire transitoire et n'ayant pas d'effet promoteur de tumeur.<sup>179</sup> En Australie, au début des années 2000, sur la base d'observation décrivant l'efficacité du latex d'*E. peplus* pour traiter les tumeurs de la peau,<sup>297,298</sup> un essai clinique de phase I/II a été réalisé.<sup>299</sup> Les résultats ont montré l'efficacité de ce traitement.<sup>300</sup> En 2004, des chercheurs australiens ont également montré que ce phorboïde était un activateur des PKCs à large spectre, et ce malgré sa faible lipophilicité.<sup>259</sup> Cependant, l'investigation des effets d'I3A sur différentes lignées cancéreuses a révélé qu'il produisait des translocations de PKCs différentes du TPA. La même année, une autre étude menée par des équipes australiennes, montra que l'I3A était capable d'induire l'apoptose dans des tumeurs cancéreuses de la peau *in vivo*.<sup>301</sup> Il a pu être établi que l'application d'I3A sur des cellules cancéreuses *in vitro* causait des perturbations de leur membrane plasmique et une perte du découplage mitochondrial conduisant à l'apoptose. L'effet pro-apoptotique de l'I3A a été identifié comme lié à sa capacité modulatrice des PKCs.<sup>302</sup> Lors de l'application cutanée, ce composé provoque une stimulation du système immunitaire par le recrutement des neutrophiles au niveau de la tumeur, induisant un effet tumoricide, qui se manifeste par la survenue d'un érythème. Il s'en suit une nécrose (escarre) évoluant vers une guérison de la peau.<sup>303</sup> La licence de l'I3A, initialement développée par une start-up australienne Peplin Ltd, a été rachetée par le laboratoire pharmaceutique LEO Pharma en 2009. Le produit est depuis commercialisé dans plusieurs pays sous le nom de Picato® (PEP005, ingénol mebutate).<sup>304</sup> Il a bénéficié en 2012 d'une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et en 2014 dans l'Union Européenne pour le traitement de la kératose actinique non-hyperkératique et non-hypertrophique.<sup>305</sup> En France, il est homologué depuis 2013 pour ces mêmes applications.<sup>306</sup> Il est intéressant de noter que l'I3A est à l'heure actuelle toujours extrait d'*E. peplus*.<sup>300</sup>

(301) Ogbourne, S. M.; Suhrbier, A.; Jones, B.; Cozzi, S.-J.; Boyle, G. M.; Morris, M.; McAlpine, D.; Johns, J.; Scott, T. M.; Sutherland, K. P.; et al. Antitumor Activity of 3-Inganyl Angelate Plasma Membrane and Mitochondrial Disruption and Necrotic Cell Death. *Cancer Res.* **2004**, *64* (8), 2833–2839.

(302) Challacombe, J. M.; Suhrbier, A.; Parsons, P. G.; Jones, B.; Hampson, P.; Kavanagh, D.; Rainger, G. E.; Morris, M.; Lord, J. M.; Le, T. T. T.; et al. Neutrophils Are a Key Component of the Antitumor Efficacy of Topical Chemotherapy with Ingenol-3-Angelate. *J. Immunol.* **2006**, *177* (11), 8123–8132.

(303) Rosen, R. H.; Gupta, A. K.; Tyring, S. K. Dual Mechanism of Action of Ingenol Mebutate Gel for Topical Treatment of Actinic Keratoses: Rapid Lesion Necrosis Followed by Lesion-Specific Immune Response. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *66* (3), 486–493.

(304) LEO Pharma - 2009-sep-03 LEO Pharma to Acquire Peplin for US\$287.5m | LEO Pharma [http://www.leo-pharma.com/Home/LEO-Pharma/Media-Centre/News/News-2009/2009-sep-03-LEO-Pharma-to-Acquire-Peplin-for-US\\$287.5m.aspx](http://www.leo-pharma.com/Home/LEO-Pharma/Media-Centre/News/News-2009/2009-sep-03-LEO-Pharma-to-Acquire-Peplin-for-US$287.5m.aspx) (accessed Sep 28, 2015).

(305) Tzogani, K.; Nagercoil, N.; Hemmings, R. J.; Samir, B.; Gardette, J.; Demolis, P.; Salmonson, T.; Pignatti, F. The European Medicines Agency Approval of Ingenol Mebutate (Picato) for the Cutaneous Treatment of Non-Hyperkeratotic, Non-Hypertrophic Actinic Keratosis in

Depuis sa commercialisation, l'I3A s'est aussi montré efficace pour soigner d'autres pathologies épidermiques, tels que le mélanome de Dubreuil,<sup>307</sup> le carcinome basal superficiel,<sup>308</sup> des tumeurs cancéreuses non-mélanome,<sup>309</sup> et des condylomes (verruës génitales provoquées par le virus *Condylomata acuminata*).<sup>310</sup>

Parallèlement aux études relatives aux pathologies cutanées, il a été montré dès 2006 que l'I3A avait un profil d'activité anti-VIH similaire à la prostratine et au TPA. L'I3A active la transcription du matériel viral latent dans les cellules infectées en inhibant l'infection des cellules saines via la modulation des PKCs.<sup>267</sup> Le mécanisme implique également une régulation à la baisse des récepteurs CD4 et CXCR4. Depuis, d'autres études sont venues préciser le mécanisme de l'I3A contre le VIH, qui comme les autres phorboïdes, est médié par la voie du NF- $\kappa$ B.<sup>266,294,311</sup> Son pouvoir réactivant vis-à-vis des virus latents a été évalué *in vitro* comme comparable à celui du TPA (à 10 nM, cellules J-Lat A1), et sept fois supérieur à la prostratine.<sup>311</sup> De plus, il a été montré que son utilisation en association avec JQ1, un agoniste de p-TEFb (un activateur constitutif de transcription), multipliait par huit l'effet de l'I3A *ex vivo*. Du fait de sa faible toxicité systémique chez l'animal,<sup>312</sup> cette molécule est un candidat prometteur pour le traitement curatif du VIH de type *shock and kill*.

### Activité modulatrice des PKCs par les diterpènes inférieurs macrocycliques

Plusieurs études récentes indiquent que des esters de diterpènes macrocycliques ont des profils d'activité sur la latence et la réplication du VIH comparables aux phorboïdes. Parmi ces études, l'une d'entre elles, réalisée en 2009 par José Alcami, G. Appendino et coll. décrit l'activité anti-VIH d'un ester de jatrophone (SJ23B, **49**) isolé d'une euphorbe endémique de Corse et de Sardaigne, *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* (et non *Euphorbia hyberna* subsp. *insularis* comme indiqué dans l'article en question).<sup>195</sup> L'activité est dix fois supérieure à celle de la prostratine pour réactiver les provirus latents du VIH-1 *in vitro* (IC<sub>50</sub> = 50 nM, cellules Jukart-LAT-GFP). Son mécanisme est apparenté à celui des phorboïdes anti-VIH (activation de PKCs classiques, réactivation via la voie du NF- $\kappa$ B et internalisation des récepteurs CD4, CXCR4 et CCR5).

---

Adults: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Eur. J. Dermatol.* **2014**, *24* (4), 457–463.

(306) Haute Autorité de Santé - PICATO (mébutate d'ingenol), chimiothérapie à usage local [http://has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1623645/fr/picato-mebutate-d-ingenol-chimiotherapie-a-usage-local](http://has-sante.fr/portail/jcms/c_1623645/fr/picato-mebutate-d-ingenol-chimiotherapie-a-usage-local) (accessed Sep 28, 2015).

(307) Karam, A.; Misery, L. Mélanome de Dubreuilh Traité Par Mébutate D'ingénol Topique. *Ann. Dermatol. Vénérologie* **2014**, *141* (12, Supplement), S404.

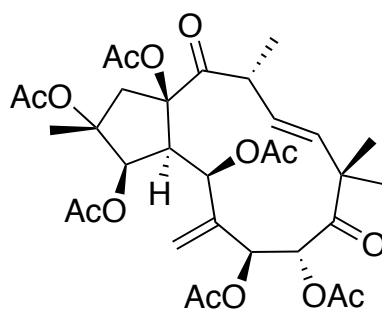
(308) Siller, G.; Rosen, R.; Freeman, M.; Welburn, P.; Katsamas, J.; Ogbourne, S. M. PEP005 (ingenol Mebutate) Gel for the Topical Treatment of Superficial Basal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase IIa Trial. *Australas. J. Dermatol.* **2010**, *51* (2), 99–105.

(309) Lebwohl, M.; Sohn, A. Ingenol Mebutate (ingenol 3-Angelate, PEP005): Focus on Its Uses in the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer. *Expert Rev. Dermatol.* **2012**, *7* (2), 121–128.

(310) Braun, S. A.; Jansen, T. M.; Homey, B.; Gerber, P. D. P. A. Erfolgreiche Therapie von Condylomata acuminata mit Ingenolmebutat. *Hautarzt* **2015**, *66* (4), 223–225.

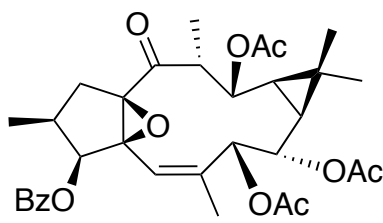
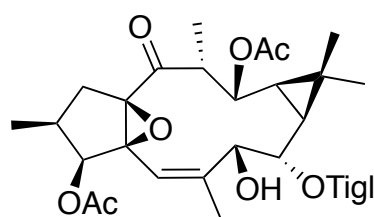
(311) Jiang, G.; Mendes, E. A.; Kaiser, P.; Wong, D. P.; Tang, Y.; Cai, I.; Fenton, A.; Melcher, G. P.; Hildreth, J. E. K.; Thompson, G. R.; et al. Synergistic Reactivation of Latent HIV Expression by Ingenol-3-Angelate, PEP005, Targeted NF- $\kappa$ B Signaling in Combination with JQ1 Induced P-TEFb Activation. *PLoS Pathog* **2015**, *11* (7), e1005066.

(312) European Medicines Agency. *Assessment Report of PICATO*; 2012.

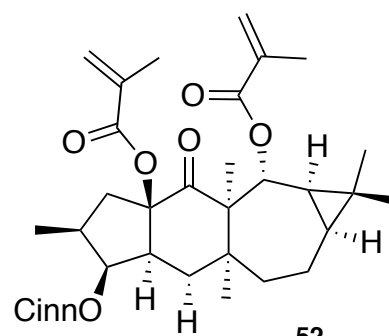


SJ23B (49)

D'autres dérivés de diterpènes inférieurs macrocycliques isolés d'*Euphorbia*, tels que les ingols, ont montré des activités anti-VIH via les PKCs (**50**,  $EC_{50} = 1 \mu\text{M}$ , VIH-1, sur cellules Jurkat-LTR-GFP).<sup>313</sup> Par ailleurs d'autres diterpènes inférieurs de type ingol comme le **51** ( $IC_{50}$  non précisé, sur cellules Jurkat-LTR-GFP)<sup>314</sup> et l'euphoractine (**52**,  $IC_{50} 8,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ , VIH-1, cellules VSVG)<sup>315</sup> ont présenté des activités anti-VIH, mais sans investigation du mécanisme d'action.



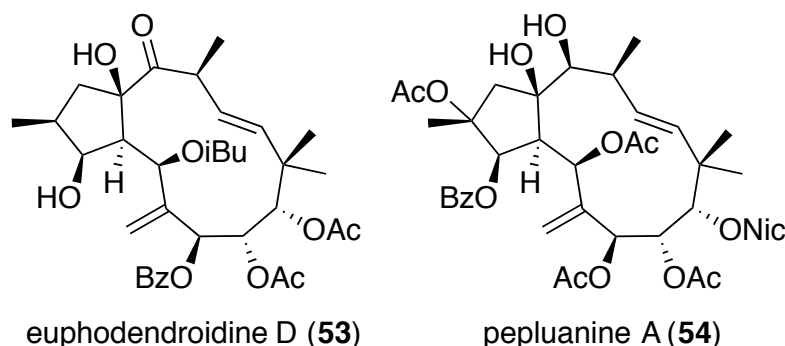
51



52

## Activité modulatrice des transporteurs ABC

Les diterpènes inférieurs de type macrocyclique d'*Euphorbia* sont plus connus pour leur propriété inhibitrice des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Les transporteurs ABC, protéines transmembranaires, sont surexprimés chez certaines lignées cancéreuses. Ceci confère à ces dernières la capacité de résister à des doses létales de drogues cytotoxiques.<sup>200,245</sup> Les dérivés ayant montré la plus forte activité inhibitrice du transporteur nommé P-glycoprotéine (P-gp) sont l'euphodendroidine D (**53**) et la pepluanine A (**54**) (voir ci-dessous).<sup>316,317</sup> Ces molécules sont environ deux fois plus actives que l'inhibiteur de référence (la cyclosporine). Plusieurs revues récapitulent l'ensemble des travaux relatifs au pouvoir inhibiteur des transporteurs ABC par les diterpènes inférieurs macrocycliques.<sup>207,318,319</sup> Ces composés peuvent être des dérivés de jatrophane,<sup>316,320</sup> lathyrane,<sup>200,231,321</sup> ségétane,<sup>322</sup> pépluane et paraliane,<sup>245</sup> prémyrsinane et cyclomyrsinane.<sup>323</sup> Récemment, des esters de jatrophane ont montré de très fortes activités modulatrices des transporteurs ABC de *Candida albicans*.<sup>324</sup>



(313) Avila, L.; Perez, M.; Sanchez-Duffhues, G.; Hernández-Galán, R.; Muñoz, E.; Cabezas, F.; Quiñones, W.; Torres, F.; Echeverri, F. Effects of Diterpenes from Latex of *Euphorbia Lactea* and *Euphorbia Laurifolia* on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reactivation. *Phytochemistry* **2010**, *71* (2–3), 243–248.

(314) Daoubi, M.; Marquez, N.; Mazoir, N.; Benharref, A.; Hernández-Galán, R.; Muñoz, E.; Collado, I. G. Isolation of New Phenylacetylglucoside Derivatives That Reactivate HIV-1 Latency and a Novel Spirotriterpenoid from *Euphorbia Officinatum* Latex. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (13), 4577–4584.

(315) Tian, Y.; Xu, W.; Zhu, C.; Lin, S.; Guo, Y.; Shi, J. Diterpenoids with Diverse Skeletons from the Roots of *Euphorbia Micractina*. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (6), 1039–1046.

(316) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Modified Jatrophane Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance from *Euphorbia Dendroides* L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (23), 5221–5227.

(317) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Motti, R.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Jatrophane Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance. Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of the Potent Lead Pepluanin A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (4), 988–992.

(318) Ferreira, R. J.; dos Santos, D. J.; Ferreira, M.-J. U. P-Glycoprotein and Membrane Roles in Multidrug Resistance. *Future Med. Chem.* **2015**, *7* (7), 929–946.

(319) Ferreira, M.; Duarte, N.; Lage, H.; Molnar, J. Reversal of Multidrug Resistance by Macrocyclic and Polycyclic Diterpenoids from *Euphorbia* Species. *RPMP* **2011**, *32*.

(320) Aljančić, I. S.; Pešić, M.; Milosavljević, S. M.; Todorović, N. M.; Jadranin, M.; Milosavljević, G.; Povrenović, D.; Banković, J.; Tanić, N.; Marković, I. D.; et al. Isolation and Biological Evaluation of Jatrophane Diterpenoids from *Euphorbia Dendroides*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (7), 1613–1620.

(321) Vieira, C.; Duarte, N.; Reis, M. A.; Spengler, G.; Madureira, A. M.; Molnár, J.; Ferreira, M.-J. U. Improving the MDR Reversal Activity of 6,17-Epoxyjatrophane Diterpenes. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (22).

(322) Madureira, A. M.; Gyémánt, N.; Ascenso, J. R.; Abreu, P. M.; Molnár, J.; Ferreira, M.-J. U. Euphorportlandols A and B, Tetracyclic Diterpene Polyesters from *Euphorbia Portlandica* and Their Anti-MDR Effects in Cancer Cells. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (6), 950–953.

(323) Vasas, A.; et al. Cyclomyrsinane and Premyrsinane Diterpenes from *Euphorbia Falcata* Modulate Resistance of Cancer Cells to Doxorubicin. *Tetrahedron* **2012**, *68* (4), 1280–1285.

(324) Prasad, R.; Sharma, M.; Rawal, M. K. Functionally Relevant Residues of Cdr1p: A Multidrug ABC Transporter of Human Pathogenic *Candida Albicans*. *J. Amino Acids* **2011**, *2011*, e531412.

## I. 4. Analyse par chromatographie liquide des esters de diterpène d'*Euphorbia*

La polyvalence de la chromatographie en phase liquide haute-performance (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) en termes de cibles d'étude (pesticides, polluants, sucres, acides aminés, composés thermosensibles, etc.) est à l'origine de l'essor de cette technique dans divers secteurs d'activités. Ses multiples atouts (rapidité d'analyse, sensibilité, résolution) en font aujourd'hui la méthode de référence pour l'analyse chimique des mélanges complexes dans les domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.<sup>325</sup> Du fait de leur masse moléculaire élevée (400-900 g/mol), l'analyse des esters diterpéniques (*diterpene esters*, DE) des espèces du genre *Euphorbia* est réalisée par LC. Ainsi, dans la partie suivante, nous présenterons la technique de LC et les détecteurs - plus particulièrement, les spectromètres de masse tandem - pouvant y être associés. Puis, nous passerons en revue les différentes approches ayant été développées pour la caractérisation des DE en mélange.

### I. 4. 1. La chromatographie liquide haute performance

La HPLC est une technique incontournable de la chimie analytique moderne. Elle est couramment utilisée pour la séparation, l'identification et/ou la quantification (sans dérivatisation préalable) de composés non volatils, thermolabiles et/ou de haut poids moléculaire dans un mélange.<sup>326</sup> Ce dernier est mis en solution dans la phase mobile (solvants) puis est injecté sous haute pression en tête de la colonne (tube en acier inoxydable) contenant la phase stationnaire.<sup>327</sup> L'un des principaux avantages de cette méthode réside dans sa flexibilité ; en effet, la diversité des phases mobiles et stationnaires permettent d'adapter les conditions analytiques en fonction des constituants ciblés. D'une manière générale, l'éluion des métabolites dépend de leur polarité, de leur adsorption sur la phase stationnaire et de leur affinité avec la phase mobile (solubilité dans les solvants). Trois principaux types de chromatographie de partage peuvent être réalisés : le mode normal (*normal phase LC*, NPLC), le mode inverse (*reverse-phase LC*, RPLC) et le mode interaction hydrophile (*hydrophilic interaction LC*, HILIC).

Dans les trois cas, la phase stationnaire est typiquement composée de micro particules de silice non greffée ou greffée avec divers motifs organiques. En mode normal, les molécules greffées sur la silice sont des groupements polaires tels que  $-NH_2$  ou  $-CN$  et la phase mobile est généralement apolaire et non aqueuse (hexane pur ou en mélange avec une faible proportion de méthanol ou d'acétonitrile). Le mode inverse est souvent utilisé en première intention, puisque il permet une consommation moindre de solvant organique tout en

---

(325) Wolfender, J.-L.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. Current Approaches and Challenges for the Metabolite Profiling of Complex Natural Extracts. *J. Chromatogr. A*.

(326) Corradini, D. *Handbook of HPLC, Second Edition*; CRC Press, 2010.

(327) Dong, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*; John Wiley & Sons, 2006.

permettant une séparation efficace des analytes. Dans ce mode, la phase stationnaire est composée de gel de silice greffé de chaînes alkyles hydrophobes (C18, C8, phényle, etc.), tandis que la phase mobile est une solution hydro-organique, typiquement constituée d'un mélange de méthanol ou d'acétonitrile et d'eau. Cette méthode s'est considérablement développée depuis les années 70 au détriment de la phase normale du fait d'une meilleure reproductibilité des temps de rétention. Ceux-ci, spécifiques de chaque constituant, sont dépendants de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile (pourcentage de solvants et pH) et des conditions opératoires (débit, pression et température).<sup>327</sup> Le mode HILIC a été mis en œuvre plus récemment ; il utilise également une phase mobile hydro-organique, mais utilise en revanche une phase stationnaire de nature polaire (gel de silice non greffée ou greffé de groupements polaires). Le partage des composés repose alors sur des interactions par liaison hydrogène et des interactions électrostatiques. Ce mode est particulièrement approprié pour la séparation de composés polaires.

L'efficacité de la séparation chromatographique est pour partie liée à la taille des particules de la phase stationnaire. Les premières colonnes développées pour les systèmes de HPLC, étaient constituées de particules de 10 ou 5  $\mu\text{m}$ . Grâce à l'amélioration des systèmes chromatographiques, il est désormais possible d'utiliser des colonnes avec des particules de taille sub-3  $\mu\text{m}$  voir sub-2  $\mu\text{m}$  pour les systèmes disposant de pompes à ultra haute pression (*high pressure liquid chromatography*, UHPLC).<sup>328</sup> Les avantages des systèmes UHPLC sont une augmentation de la résolution chromatographique, une diminution des temps d'analyse et une moindre consommation de solvants.

Généralement en HPLC, les molécules sont ensuite détectées et caractérisées en sortie de colonne grâce à un détecteur spectrophotométrique ou spectrométrique ; il enregistre un signal qui est ensuite transformé par l'ordinateur en un chromatogramme.<sup>327</sup>

## I. 4. 2. Les détecteurs couplés à la LC

Les détecteurs à absorbance ultraviolet (UV) sont les plus communément utilisés pour la caractérisation des métabolites élués en LC. Initialement mono-longueur d'onde, ces derniers permettent la détection de composés possédant un chromophore. Grâce à l'apparition de détecteur UV à barrette de diode (diode array detector, DAD), l'obtention de spectres UV sur une gamme spectrale prédéfinie donne des informations qualitatives sur la nature des chromophores des constituants préalablement individualisés. Par ailleurs, ce couplage permet une analyse quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique rapportée sur une courbe d'étalonnage externe.

L'utilisation de détecteurs dit "universels", tels que les détecteurs évaporatifs à diffusion de lumière (*evaporating light scattering detector*, ELSD) ou encore les détecteurs d'aérosol chargé (*charged aerosol detector*, CAD), est de plus en plus répandue en couplage

---

(328) Xu, Q. A. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*; Wiley: Hoboken, N.J., 2013.

avec la LC. Ces détecteurs ne procurent pas d'information qualitative sur les analytes mais ils permettent la détection de diverses molécules non-volatiles ou semi-volatiles. Pour ces deux détecteurs, la première étape consiste en une nébulisation de la phase mobile. Dans le cas de l'ELSD, la phase mobile est ensuite éliminée par chauffage et la détection des analytes est permise grâce à l'intensité de l'interférence de ces derniers avec un faisceau de lumière. Pour le détecteur CAD, la nébulisation est suivie d'une ionisation en mode positif et d'une détection par un électromètre. Le CAD permet également de détecter divers métabolites ; en outre, il présente une meilleure sensibilité et une gamme de linéarité améliorée en comparaison du DEDL.

Il existe également d'autres détecteurs, tels que les détecteurs à fluorescence ou à index de réfraction, toutefois ces derniers bien qu'étant en mesure de fournir une détection pseudo-universelle sont peu répandus puisque bien moins sensible que l'UV et le DEDL, et sont plutôt indiqués dans le cas d'applications spécifiques tel que le dosage des sucres.

Les développements technologiques en spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, MS), notamment l'apparition d'interface d'ionisation à pression atmosphérique (*atmospheric pressure ionisation*, API) dans les années 80, ont permis de favoriser le couplage avec la LC ; en effet, ces détecteurs se sont relevés être de puissants outils aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif.<sup>329,330</sup>

### I. 4. 3. Le couplage à la spectrométrie de masse

Généralement, les composés non-ionisables ne peuvent être détectés par MS. En effet, les analyseurs de masse fonctionnent sous vide et nécessitent l'utilisation de sources d'ionisation permettant de charger les molécules. Les premiers couplages HPLC-MS ont été mis au point au cours des années 1970, relativement tardivement en comparaison de la chromatographie en phase gazeuse. L'émergence de ce couplage a été ralenti par les difficultés techniques liées à l'introduction d'un liquide à un système sous vide. Ainsi, les premiers couplages réalisés ont été conçus sur un mode *off-line*, où les fractions chromatographiques d'intérêts sont transférées sur des sondes solides, puis introduit dans le spectromètre de masse où l'ionisation est effectuée par désorption de champ.<sup>331,332</sup> En 1973 furent développés les premiers couplages *on-line* où le flux en provenance de la HPLC est directement introduit dans le spectromètre de masse.<sup>333,334</sup>

Dans les années 1980, d'autres types de couplages LC-MS *on-line* ont également été développés, notamment des couplages à des spectromètres de masse à bombardement

---

(329) Griffiths, W. J.; Wang, Y. Mass Spectrometry: From Proteomics to Metabolomics and Lipidomics. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (7), 1882.

(330) Carter, G. T. NP/MS since 1970: From the Basement to the Bench Top. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 711–717.

(331) Abian, J. The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 157–168.

(332) Beckey, H. D.; Schulten, H.-R. Field Desorption Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14 (6), 403–415.

(333) Lovins, R. E.; Ellis, S. R.; Tolbert, G. D.; McKinney, C. R. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Coupling of a Liquid Chromatograph to a Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **1973**, 45 (8), 1553–1556.

(334) Baldwin, M. A.; McLafferty, F. W. Direct Chemical Ionization of Relatively Involatile Samples. Application to Underivatized Oligopeptides. *Org. Mass Spectrom.* **1973**, 7 (12), 1353–1356.



d'atomes rapides par flux continu (*flow fast atom bombardment*, flow-FAB)<sup>335,336</sup> et à des spectromètres de masse à ionisation secondaire (*liquid secondary ionisation*, LSI).<sup>337</sup> Dans ces deux types d'ionisation, la solution contenant l'analyte en provenance de la colonne est mélangée à un solvant à haut point d'ébullition (généralement du glycérol aqueux) puis l'analyte est ionisé par bombardement d'ions césium (LSI) ou par des atomes d'argon ou de xénon (flow-FAB) à haute énergie. A la même époque, d'autres techniques d'ionisation ont été développées dont le Thermospray (TSP) où l'effluent de la LC est amené à une chambre d'évaporation par le biais d'un tube capillaire<sup>338</sup>, mais aussi les méthodes d'ionisation à pression atmosphérique (*atmospheric pressure ionisation*, API). Ces dernières méthodes de couplage LC-MS se sont imposées à partir des années 1990.<sup>331,339</sup>

### *Les interfaces d'ionisation à pression atmosphérique (API)*

Comme indiqué précédemment, le couplage de la LC à des spectromètres de masse a été permis par le développement de sources API. Parmi ces dernières, les principales sont l'ionisation par l'électrospray (*electrospray ionisation*, ESI)<sup>340</sup> et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (*atmospheric pressure chemical ionisation*, APCI).<sup>341</sup> Ces techniques dites « douces » génèrent des ions avec un faible excès d'énergie interne. Par rapport aux autres méthodes, l'information sur la masse moléculaire des constituants est donc préservée. De plus, elles permettent la détection d'ions positifs et négatifs ainsi que l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans la majorité des cas, l'analyse par LC-MS est réalisée avec des sources de type ESI.<sup>342</sup> Ces dernières permettent l'ionisation d'une grande diversité de constituants aussi bien au niveau de la gamme de masses que de la polarité; elles sont donc couramment utilisées pour l'analyse des métabolites secondaires et la protéomique.<sup>343</sup> Néanmoins, les adduits formés et les fragmentations observés peuvent différer selon le type de sources API.<sup>344</sup> Ainsi, les sources APCI sont parfois préférées aux sources ESI pour des applications spécifiques dédiées à certaines classes de composés<sup>344-346</sup> ou pour l'analyse de certaines matrices.<sup>347,348</sup>

(335) Ito, Y.; Takeuchi, T.; Ishii, D.; Goto, M. Direct Coupling of Micro High-Performance Liquid Chromatography with Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1985**, *346*, 161–166.

(336) Caprioli, R. M.; Fan, T.; Cottrell, J. S. A Continuous-Flow Sample Probe for FAB-MS. *Anal. Chem.* **1986**, *58* (14), 2949–2954.

(337) Aberth, W.; Burlingame, A. L. Comparison of Three Geometries for a Cesium Primary Beam Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry Source. *Anal. Chem.* **1984**, *56* (14), 2915–2918.

(338) Blakley, C. R.; Carmody, J. J.; Vestal, M. L. LC-MS for Analysis of Nonvolatile Samples. *Anal. Chem.* **1980**, *52* (11), 1636–1641.

(339) Niessen, W. M. A. State-of-the-Art in Liquid Chromatography–mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *856* (1–2), 179–197.

(340) Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Interface for LC-MS. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (3), 675–679.

(341) Horning, E. C.; et al. Liquid Chromatograph–mass Spectrometer–computer Analytical Systems: A Continuous-Flow System Based on Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1974**, *99*, 13–21.

(342) Schappler, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; Guilleme, D. Coupling UHPLC with MS: The Needs, Challenges, and Applications. In *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*; John Wiley & Sons, 2013; pp 95–132.

(343) Gika, H. G.; Theodoridis, G. A.; Plumb, R. S.; Wilson, I. D. Current Practice of Liquid Chromatography–mass Spectrometry in Metabolomics and Metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 12–25.

(344) Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Barceló, D. Choosing between APCI and ESI Interfaces for the HPLC/MS Analysis of Pesticides. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (22), 5441–5449.

(345) Montange, D.; Bérard, M.; Demarchi, M.; Muret, P.; Piédoux, S.; Kantelip, J. P.; Royer, B. An APCI LC-MS/MS Method for Routine Determination of Capcitabine and Its Metabolites in Human Plasma. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45* (6), 670–677.

(346) Li, W.; Zhang, J.; Tse, F. L. S. Strategies in Quantitative LC-MS/MS Analysis of Unstable Small Molecules in Biological Matrices. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25* (1–2), 258–277.

(347) Dams, R.; Huestis, M. A.; Lambert, W. E.; Murphy, C. M. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14* (11), 1290–1294.

(348) Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. Matrix Effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-Line and on-Line Extraction Procedures. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1058* (1–2), 61–66.

## Les sources ESI

La méthode ESI est mise en œuvre à pression atmosphérique et à température ambiante. L'échantillon en solution est introduit dans la source du spectromètre de masse au moyen d'une aiguille métallique portée à un potentiel de plusieurs kilovolts (typiquement 2 à 5 kV). Le mécanisme d'ionisation repose donc sur l'application d'une différence de potentiel entre un capillaire situé à l'interface LC-ESI et une électrode à contre-courant (Figure 24).<sup>349</sup> L'ajout d'un gaz de nébulisation permet la formation d'un spray aérosol. L'accumulation de charges à la surface du liquide situé à l'extrémité du capillaire provoque l'apparition d'un cône de Taylor.<sup>350</sup> Lorsque les forces de répulsion coulombiennes sont égales à la tension superficielle, la surface se rompt et forme des gouttelettes. Ce processus induit ainsi un transfert de charge entre la phase mobile et l'analyte (Eq. 1).

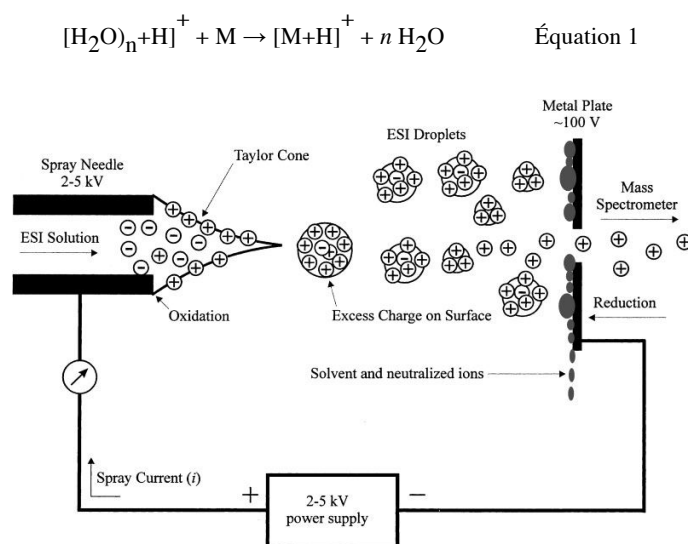


Figure 24. Mécanisme de formation des ions dans une source ESI (Cech and Enke, 2001)<sup>349</sup>

Par la suite, les ions contenus dans les gouttelettes sont désorbés grâce à l'utilisation d'un gaz de séchage. Sous l'effet de la chaleur et d'un flux de diazote, les gouttelettes chargées sont désolvatées jusqu'à ce que le rapport entre le nombre de charges et la surface de la gouttelette ait atteint un seuil critique produisant une explosion coulombienne et provoquant la formation des gouttelettes chargées de plus petites tailles.<sup>350</sup> Ce phénomène se poursuit jusqu'à ce que l'ensemble des molécules volatiles (dont le solvant) soit évaporé, permettant l'obtention des analytes mono-chargés en phase gazeuse. Ces ions sont ensuite dirigés vers le spectromètre de masse (quadripôle) à l'aide de potentiels appliqués sur plusieurs cônes d'échantillonnages. Généralement, les sources ESI permettent l'obtention d'ions sous forme protoné  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ou déprotoné  $[\text{M} - \text{H}]^-$  selon la polarité de l'ionisation. En mode positif, divers adduits, tels que le cation sodium  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , le cation hydronium  $[\text{M} + \text{H}_3\text{O}]^+$  ou le cation ammonium  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  sont régulièrement détectés en fonction des phases mobiles utilisées.<sup>344</sup>

(349) Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20* (6), 362–387.

(350) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, 1–40.

## Les sources APCI

Dans les sources APCI, l'ionisation est réalisée en phase gazeuse à pression atmosphérique à une température située usuellement entre 300 et 500°C (**Figure 25**).<sup>351</sup> L'analyte est ensuite introduit dans la source par le biais d'un capillaire dont l'extrémité débouche dans un vaporisateur. Le spray formé est évaporé puis mélangé à un gaz nébuliseur (diazote) qui va transporter les analytes jusqu'à une aiguille corona. Une tension est appliquée à cette aiguille (généralement entre 3 et 5 kV) provoquant une décharge de quelques  $\mu\text{A}$  qui ionise l'air ambiant et crée un plasma autour de la pointe de l'aiguille. Les molécules contenues dans l'échantillon réagissent alors avec les ions radicalaires du plasma, ce qui conduit à leur ionisation par transfert de protons avec les molécules de solvants.

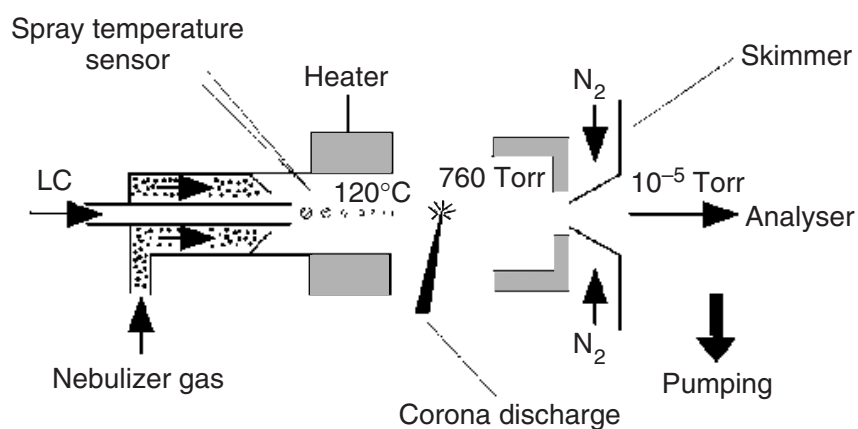


Figure 25. Fonctionnement d'une source APCI.<sup>351</sup>

## I. 4. 4. Les spectromètres de masse

Le principe général d'un spectromètre de masse repose sur la capacité de ces détecteurs à focaliser et accélérer sous vide des ions produits par une source d'ionisation, puis à les discriminer en fonction de leurs rapports  $m/z$ .<sup>351</sup> Chaque spectromètre de masse possède ses spécificités : pouvoir résolutif, exactitude de la mesure, vitesse d'acquisition, etc. Selon ces caractéristiques, les appareils sont classés en spectromètre de masse à basse résolution (MS) ou spectromètre de masse à haute résolution (HRMS).

### *Les spectromètres de masse à basse résolution*

Ces analyseurs sont constitués autour d'un ou plusieurs quadripôles.<sup>351</sup> Il s'agit d'appareils robustes ayant une résolution comprise entre 0,1 et 0,3  $m/z$ . Les spectromètres de masse à basse résolution constitués d'un seul quadripôle permettent l'obtention d'un spectre MS en mode dit "*full scan*" par un balayage d'une gamme prédéterminée de  $m/z$ . Ils peuvent également être utilisés en mode "*selected ion monitoring*" (SIM), afin d'augmenter le rapport

(351) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, 2007.

signal/bruit (S/N) d'un ion  $m/z$  préalablement fixé. Le but principal du couplage LC-MS est de séparer les analytes afin d'obtenir les spectres de masse des composés individualisés. Toutefois, dans le cas des mélanges complexes, la présence de coélutions et d'interférents issus de la matrice limite l'interprétation des spectres obtenus.

Pour pallier à ces difficultés analytiques, des analyseurs comprenant deux spectromètres de masse en tandem (MS/MS) ont été développés. Les premiers MS/MS ont été élaborés par la mise en série de trois quadripôles disposés en série. Ces appareils enrichissent la palette d'expériences réalisables tout en augmentant drastiquement le rapport S/N.<sup>352</sup> Le premier quadripôle (Q1) et le troisième quadripôle (Q3) peuvent être utilisés en mode SIM ou en mode détection (*full scan*). Tandis que le quadripôle intermédiaire (q2) fait office de cellule de collision ; dans cette dernière, les ions rentrent en contact avec un gaz inerte, généralement du diazote. L'énergie interne ainsi acquise par l'ion provoque sa décomposition en multiples fragments.<sup>350</sup> Ce type de fragmentation est appelé dissociation induite par collision (*collision-induced dissociation*, CID). Les analyseurs en tandem sont fréquemment utilisés en couplage avec la LC. En effet, la présence d'une cellule de collision (q2), où se déroule une fragmentation CID permet l'obtention de spectres riches en fragments informatifs, que les sources d'ionisation API ne peuvent produire seules. Différents modes d'acquisition sont possibles à partir de ces triples quadripôles comme le balayage d'ions produits (*product ion scan*, MS<sup>2</sup>), le balayage d'ions précurseurs (*precursor ion scan*, PIS), le balayage de pertes neutres (*neutral loss scan*, NL) ou encore le balayage sélectif d'ions (*single reaction monitoring*, SRM). Le fonctionnement général de ces différents modes est représenté dans la Figure 26 :

- en mode MS<sup>2</sup>, un ion de masse  $m/z$  est sélectionné en Q1, fragmenté en q2, puis les ions produits sont balayés en Q3. Ainsi, un spectre de masse correspondant à un ion prédéfini (i.e. l'ion quasi-moléculaire) est obtenu ;
- en mode PIS, la séquence analytique est la suivante : un balayage d'une gamme de masse en Q1, une fragmentation des ions en q2 et la sélection d'un ion en Q3. Les ions précurseurs se fragmentant en un ion spécifique sont détectés par cette procédure ;
- en mode NL, les quadripôles Q1 et Q3 balayent une différence de  $m/z$  (issue de la fragmentation des ions dans la cellule de collision) correspondante à la perte de molécules neutres entre un ion parent et un ion fils ;
- en mode SRM, un ion précurseur est sélectionné en Q1, fragmenté en q2 et un ion prédéfini est détecté en Q3. Le mode SRM est le plus largement utilisé pour l'analyse quantitative. Enfin, le mode MRM (*multiple reaction monitoring*) consiste en une succession alternative de SRM par l'analyseur.

Il existe également des MS/MS hybrides associant des triples quadripôles et une trappe d'ions. Les trappes d'ions linéaires (*linear ion trap*, LIT) sont constituées d'un quadripôle, d'un hexapôle ou d'un octopôle fonctionnant en mode trappe ou sélection grâce à l'application de radio fréquence.<sup>353</sup> En mode trappe, la LIT peut piéger les ions dans la trappe,

---

(352) Gross, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*; Springer Science & Business Media, 2011.

alors qu'en mode sélection, la LIT peut éjecter spécifiquement certains ions au détecteur. Ainsi, dans les MS/MS hybrides associant QqQ et LIT sont en mesure de réaliser des expériences de spectrométrie de masse multidimensionnelle ( $MS^n$ ), c'est à dire où les ions résultants de la fragmentation d'un précurseur peuvent être fragmentés une deuxième fois, apportant des informations structurales supplémentaire sur l'analyte. De plus, les MS/MS hybrides à LIT offrent une meilleure sensibilité qu'un triple quadripôle.<sup>354</sup>

Dans le cadre de ces travaux de doctorat, nous avons utilisé un spectromètre de masse  $MS^n$  hybride associant un triple quadripôle en série et une LIT (3200 QTRAP, ABSciex) (Figure 27).

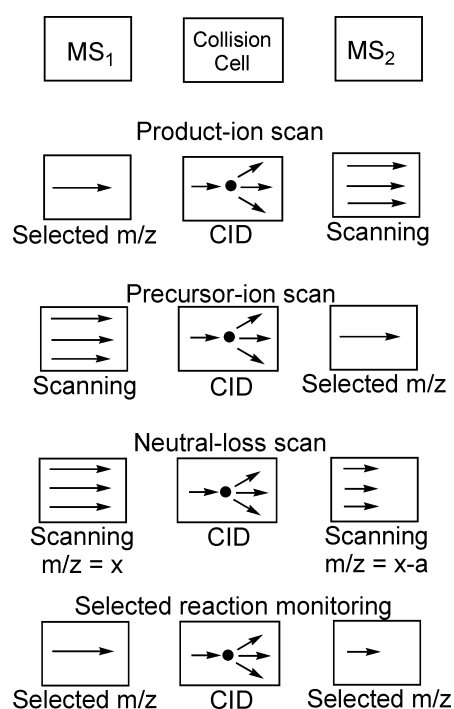


Figure 26. Mode de scan communément utilisés en MS/MS

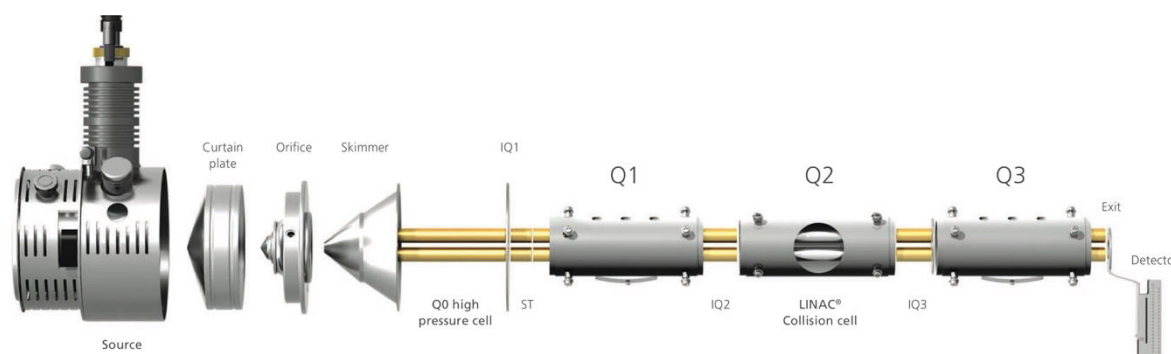


Figure 27. Fonctionnement d'un spectromètre de masse  $MS^n$  de type triple quadripôle à trappe d'ions (3200 QTRAP, ABSciex)<sup>355</sup>

(354) Wong, P. S.; Graham Cooks, R. Ion Trap Mass Spectrometry. *Curr. Sep.* **1997**, *16*, 85–92.

(355) 3200 QTRAP® LC/MS/MS System | Mass Spectrometer with Excellent Value | AB SCIEX <http://www.absciex.com/products/mass-spectrometers/qtrap-lcms-systems/3200-qtrap-lcms-system> (accessed Feb 24, 2015).

## Les spectromètres de masse à haute résolution (HRMS)

Nous pouvons distinguer deux principaux types de HRMS : les analyseurs à temps de vol (TOF) et ceux à transformée de Fourier (orbitrap, FT). Ils permettent de déterminer la formule brute d'un composé grâce à la précision de la mesure de l'ion monoisotopique ( $\pm 5-1$  ppm) et de l'ensemble du massif isotopique.

Les analyseurs de masse à temps de vol (*time-of-flight*, TOF) sont des appareils de HRMS qui mesurent le temps de vol nécessaire à un ion pour parcourir une distance.<sup>352</sup> Ainsi, il est possible de déduire précisément le rapport  $m/z$  d'un ion ; ce dernier étant directement proportionnel à son temps de parcours. Grâce à l'application transitoire d'un potentiel dans la zone d'accélération, des paquets d'ions peuvent être projetés par intermittence vers le détecteur. Des améliorations ont été apportées au TOF ; notamment, l'ajout d'un miroir électrostatique (nommé réflectron) permettant de refocaliser et d'augmenter la distance de parcours et donc de préciser la mesure du temps de vol. Une autre innovation majeure a consisté en l'injection orthogonale des paquets d'ions en provenance de la source, limitant ainsi la dispersion temporelle des ions de même  $m/z$ .

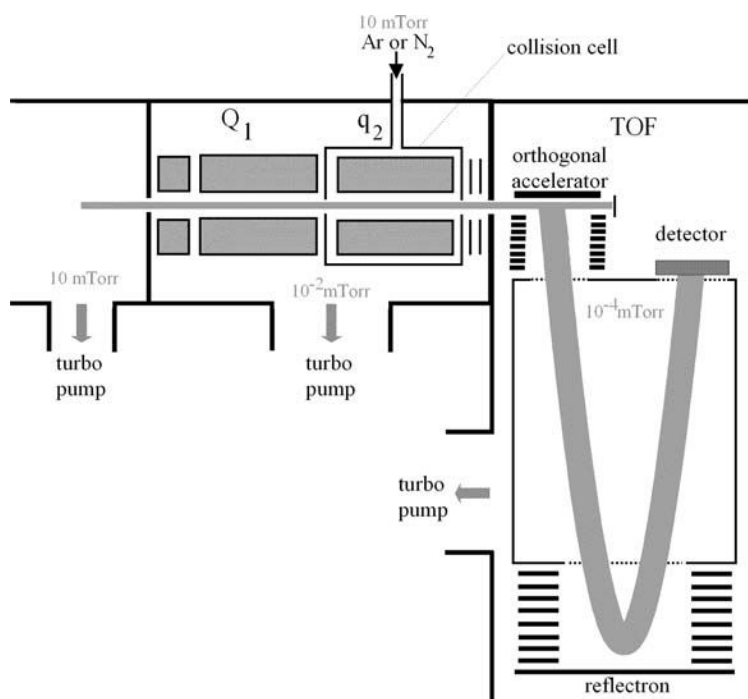


Figure 28. Fonctionnement schématique d'un analyseur Q-TOF. (D'après Hoffman and Stroobant 2007)<sup>351</sup>

Des analyseurs Q-TOF capables de réaliser des expériences en MS/MS ont récemment été développés (Figure 28). A l'instar d'un triple quadripôle, il s'agit de détecteurs possédant un analyseur TOF à la place du troisième quadripôle. Par ailleurs, il existe également des analyseurs TOF/TOF constitués de deux TOF avec, entre les deux, une cellule de collision. Ces derniers permettent notamment de filtrer les ions ayant un rapport  $m/z$  proche et d'obtenir leurs spectres MS<sup>2</sup> en haute résolution.

L'orbitrap est un analyseur de masse à transformée de Fourier reposant sur l'injection tangentielle d'ions dans un champ électrique produit par deux électrodes dont l'une est centrale.<sup>352</sup> Les ions sont piégés électrostatiquement entre les électrodes et oscillent autour de l'électrode centrale. L'oscillation axiale de ces ions s'effectue à une fréquence directement proportionnelle au rapport  $m/z$ . Ces analyseurs sont capables de procurer une très haute résolution. En outre, certains appareils hybrides offrent la possibilité de travailler en mode MS/MS voir  $MS^n$  lorsqu'ils présentent un quadripôle et une trappe ionique devant l'analyseur orbitrap.

Lors de la présente étude, des analyses ont été effectuées avec un spectromètre hybride LIT-Orbitrap (LTQ XL Orbitrap, ThermoFisher Scientific) pouvant réaliser de la  $MS^n$  (Figure 29). La séquence avec cet appareil est basée, tout d'abord, sur une fragmentation de type dissociation induite par collision (CID) dans la trappe LIT. Ensuite, les ions sont guidés, concentrés et filtrés par une trappe d'ion radiofréquence (C-Trap). Une autre cellule de collision HCD (high energy collisional dissociation) peut également être utilisée en complément de la C-Trap. Celle-ci permet de réaliser une fragmentation à haute énergie permettant l'observation d'ions ayant un rapport  $m/z$  faible, mais aussi la réalisation d'expériences en  $MS^n$ . Enfin, les ions sont conduits vers l'analyseur orbitrap afin de mesurer avec précision le rapport  $m/z$ .

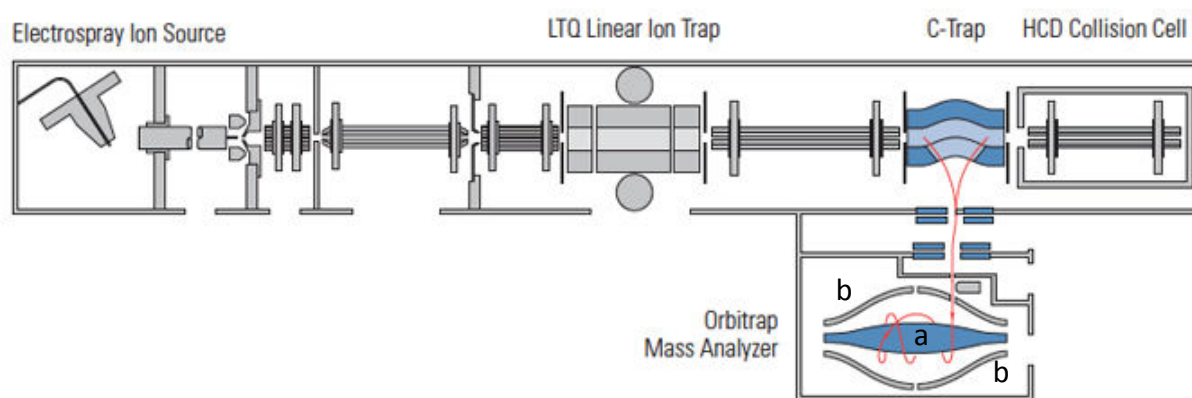


Figure 29. Représentation schématique de l'analyseur Orbitrap LTQ XL (ThermoFisher Scientific) avec (a) l'électrode centrale et (b) l'électrode extérieure<sup>356</sup>

(356) Thermo Fisher :: Orbitrap :: LTQ Orbitrap XL <http://planetorbitrap.com/lq-orbitrap-xl#tab:schematic> (accessed Feb 25, 2015).

## I. 4. 5. Analyse par LC des esters de diterpène du genre *Euphorbia*

La première initiative visant à étudier le contenu en esters diterpéniques d'extraits d'Euphorbiaceae et de Thymeleaceae a été entreprise par Evans et Kinghorn en 1971.<sup>357</sup> Les extraits ont été initialement soumis à une hydrolyse basique dans le but de transformer les fonctions esters des esters diterpenes en alcools libres. Ces derniers ont ensuite été acétylés et séparés par chromatographie sur couche mince. L'identification a notamment été réalisée par comparaison de leurs facteurs de rétention (Rf) avec ceux de standards ; dont le phorbol triacétate, le 4 $\alpha$ -phorbol triacétate, le 12-déoxyphorbol diacétate, le 4 $\alpha$ -déoxyphorbol triacétate et l'ingénol triacétate. Cette approche présente l'avantage de reposer sur des techniques usuelles et peu coûteuses. Néanmoins, celle-ci fournit uniquement des informations sur la présence de certaines squelettes diterpéniques dans les extraits. En effet, l'hydrolyse préalable des esters en alcools correspondants entraîne une simplification du mélange initial (perte des groupements esters). Par ailleurs, les auteurs soulignent une certaine variabilité des résultats en fonction des conditions expérimentales de CCM utilisées. Cette démarche analytique a été appliquée avec succès par cette même équipe pour caractériser la composition de 60 espèces d'*Euphorbia* et d'*Elaeophorbia*.<sup>205</sup> Les résultats obtenus ont permis de démontrer que les esters de diterpène dérivés de l'ingénol et du 12-déoxyphorbol étaient communément retrouvés dans ces deux genres.

En 1993, Girin et coll.<sup>358</sup> ont développé une méthode HPLC-UV permettant de caractériser la présence d'esters d'ingénol dans des extraits d'*Euphorbia*. L'analyse des mélanges, soumis au préalable à une hydrolyse basique, a permis l'identification et la quantification de l'ingénol par comparaison avec le standard commercial. En 1999, la même stratégie fut employée par Vogg et coll.<sup>290</sup> dans le but d'étudier l'activité pro-tumorale d'*E. leuconera*. Dans ce travail, les concentrations en phorbol et en 12-déoxyphorbol ont également été déterminées. En 2001, Veuthey et coll.<sup>359</sup> ont mis en œuvre une stratégie basée sur l'utilisation conjointe de l'HPLC-UV et de l'HPLC-ESI-MS pour identifier et quantifier des ingénoïdes et des lathyroïdes dans un extrait *E. lathyris*. De façon analogue à la méthode de Girin *et al.*,<sup>358</sup> ils ont mesuré les teneurs des dérivés (ingénol, lathyrol, époxylathyrol, hydroxylathyrol) obtenus après saponification des esters correspondants (hydrolyse basique). D'autres méthodes utilisant la HPLC ont été utilisées pour caractériser le contenu en esters de diterpène au sein de matrices végétales ou animales. L'analyse des constituants en mélange

---

(357) Evans, F. J.; Kinghorn, A. D. Thin-Layer Chromatographic Behaviour of the Acetates of Some Polyfunctional Diterpene Alcohols of Toxicological Interest. *J. Chromatogr. A* **1973**, 87 (2), 443–448.

(358) Girin, M. A.; Paphassarang, S.; David-Eteve, C.; Chaboud, A.; Raynaud, J. Determination of Ingenol in Homoeopathic Mother Tinctures of Euphorbia Species by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **1993**, 637 (2), 206–208.

(359) Bicchi, C.; Appendino, G.; Cordero, C.; Rubiolo, P.; Ortellì, D.; Veuthey, J.-L. HPLC-UV and HPLC-Positive-ESI-MS Analysis of the Diterpenoid Fraction from Caper Spurge (*Euphorbia Lathyris*) Seed Oil. *Phytochem. Anal.* **2001**, 12 (4), 255–262.



est réalisée avec des détecteurs UV,<sup>360,361</sup> MS,<sup>362–365</sup> ou MS/MS<sup>366–369</sup> par comparaison avec les caractéristiques spectrales de références.

Grâce au développements de la spectrométrie ESI-MS/MS, les voies de fragmentation de composés de type tigliane,<sup>370–372</sup> ingénane<sup>373,374</sup> et lathyranes<sup>375</sup> ont pu être décrites. Dans certains cas, des régioisomères ont pu être discriminés par l'observation d'ions spécifiques<sup>374</sup> ou l'utilisation combinée des intensités relatives et des modélisations moléculaires.<sup>373</sup> À l'inverse, des squelettes diterpéniques différents de constituants isobariques ne peuvent être différenciés par MS en raison de fragmentations identiques. C'est notamment le cas des DE et des IE.<sup>370</sup> En spectrométrie de masse, l'ionisation des esters diterpéniques dans la source est effectuée en mode positif. Le cation sodium  $[M+Na]^+$  est l'adduit le plus couramment observé. Dans certains cas, l'utilisation d'une solution tampon d'acétate d'ammonium à 100 mM induit la formation préférentielle d'adduits ammonium  $[M+NH_4]^+$  au détriment des adduits sodium.<sup>290,370</sup> Pour ces deux adduits, la fragmentation résultante de l'ionisation en ESI positive est caractérisée par la formation d'ions résultants de l'élimination des fonctions esters. Ces éliminations surviennent par une perte neutre se produisant de part et d'autre de l'oxygène  $sp^3$  des fonctions esters (Figure 30) :

- un premier clivage en (a) abouti à la perte de l'acide correspondant suite à l'arrachage d'un proton du squelette diterpénique ;
- un seconde clivage en (b) entraîne l'élimination de la partie acyle de la fonction ester par migration d'un proton sur le noyau diterpénique.

---

(360) Hou, J.-J.; Wu, W.-Y.; Liang, J.; Yang, Z.; Long, H.-L.; Cai, L.-Y.; Fang, L.; Wang, D.-D.; Yao, S.; Liu, X.; et al. A Single, Multi-Faceted, Enhanced Strategy to Quantify the Chromatographically Diverse Constituents in the Roots of *Euphorbia Kansui*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *88*, 321–330.

(361) Devappa, R. K.; Bingham, J.-P.; Khanal, S. K. High Performance Liquid Chromatography Method for Rapid Quantification of Phorbol Esters in *Jatropha Curcas* Seed. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 211–219.

(362) Zhang, S.; Zhang, F.; Li, X.; Dong, W.; Wen, L.; Wang, S. Evaluation of Daphne Genkwa Diterpenes: Fingerprint and Quantitative Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* **2007**, *18* (2), 91–97.

(363) Hou, X.-R.; Wan, L.-L.; Zhan, Z.-J.; Li, C.-P.; Shan, W.-G. Analysis and Determination of Diterpenoids in Unprocessed and Processed *Euphorbia Lathyris* Seeds by HPLC–ESI-MS. *J. Pharm. Anal.* **2011**, *1* (3), 197–202.

(364) Tang, Q.; Su, Z.; Han, Z.; Ma, X.; Xu, D.; Liang, Y.; Cao, H.; Wang, X.; Qu, X.; et al. LC–MS Method for Detecting Prostratin in Plant Extracts and Identification of a High-Yielding Population of *Euphorbia Fischeriana*. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5* (1), 214–218.

(365) Liu, X.; Li, L.; Li, W.; Lu, D.; Chen, F.; Li, J. Quantitative Determination of Phorbol Ester Derivatives in Chinese *Jatropha Curcas* Seeds by High-Performance Liquid Chromatography/mass Spectrometry. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *47*, 29–32.

(366) Chow, S.; Fletcher, M. T.; McKenzie, R. A. Analysis of Daphnane Orthoesters in Poisonous Australian *Pimelea* Species by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *58* (12), 7482–7487.

(367) Wang, J.-H.; Zhou, Y.-J.; Bai, X.; He, P. Jolkinolide B from *Euphorbia Fischeriana* Steud Induces Apoptosis in Human Leukemic U937 Cells through PI3K/Akt and XIAP Pathways. *Mol. Cells* **2011**, *32* (5), 451–457.

(368) Jarret, M.; Katsamas, J.; Cawkill, K.; Henderson, L.; Welburn, P. A Pharmacokinetic Study Using a Highly Sensitive and Specific Method to Determine Systemic Exposure of Ingenol Mebutate and Its Two Main Metabolites, PEP015 and PEP025 in Human Whole Blood after Topical Administration. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2013**, *68* (4, Supplement 1), AB156.

(369) Zhang, L.; Shu, X.; Ding, A.; Yu, L.; Tang, Y.; Duan, J.; Shang, E.; Shen, X. LC–DAD–ESI–MS–MS Separation and Chemical Characterization of the Inflammatory Fraction of the Roots of *Euphorbia Kansui*. *Chromatographia* **2009**, *70* (5), 805–810.

(370) Vogg, G.; Achatz, S.; Kettrup, A.; Sandermann Jr., H. Fast, Sensitive and Selective Liquid Chromatographic–tandem Mass Spectrometric Determination of Tumor-Promoting Diterpene Esters. *J. Chromatogr. A* **1999**, *855* (2), 563–573.

(371) Ichihashi, K.; Yuki, D.; Kurokawa, H.; Igarashi, A.; Yajima, T.; Fujiwara, M.; Maeno, K.; Sekiguchi, S.; Iwata, M.; Nishino, H. Dynamic Analysis of Phorbol Esters in the Manufacturing Process of Fatty Acid Methyl Esters from *Jatropha Curcas* Seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88* (6), 851–861.

(372) Baldini, M.; Ferfuaia, C.; Bortolomeazzi, R.; Verardo, G.; Pascali, J.; Piasentier, E.; Franceschi, L. Determination of Phorbol Esters in Seeds and Leaves of *Jatropha Curcas* and in Animal Tissue by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *59*, 268–276.

(373) Xia, B.; Xu, K.; Liu, X.; Chai, Y.; Sun, C.; Gu, Y.; Ding, L.; Zhou, Y. Tandem Mass Spectrometric Analysis and Density Functional Theory Calculations on the Fragmentation Behavior of Two Tetradecanoylgenol Regioisomers from *Euphorbia Wallichii*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26* (21), 2502–2508.

(374) Yang, M.; Lu, Z.; Yu, K.; Wang, Q.; Chen, X.; Li, Y.; Liu, X.; Wu, W.; Guo, D. Studies on the Fragmentation Pathways of Ingenol Esters Isolated from *Euphorbia Esula* Using IT-MSn and Q-TOF-MS/MS Methods in Electrospray Ionization Mode. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *323–324*, 55–62.

(375) Jiao, W.; Fang, D.-M.; Wu, Z.-J.; Chen, J.-Z.; Shao, H.-W.; Zhang, G.-L. Analysis of Lathyrane Diterpenes Using Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: Letter to the Editor. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (1), 276–280.

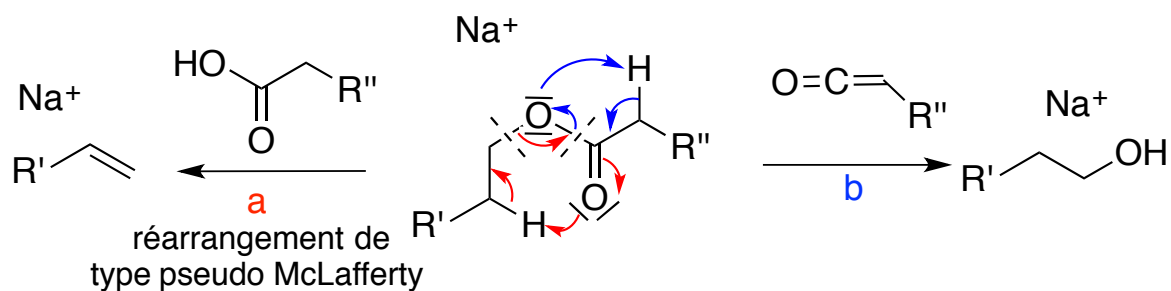


Figure 30. Pertes neutres des fonctions esters en ESI en mode ionisation positive

Après ces éliminations, diverses fragmentations résultantes de la perte de molécules neutres à partir des atomes fonctionnalisés des squelettes diterpéniques sont observées ; typiquement, il s'agit de H<sub>2</sub>O (-18 u) pour les fonctions hydroxyles restantes et de C=O (-28 u) pour les carbonyles, suivi par différents fragments alkyles. A titre d'exemple, les hypothèses de fragmentations d'ingénanes en mode ESI positive sont présentées dans la Figure 31.

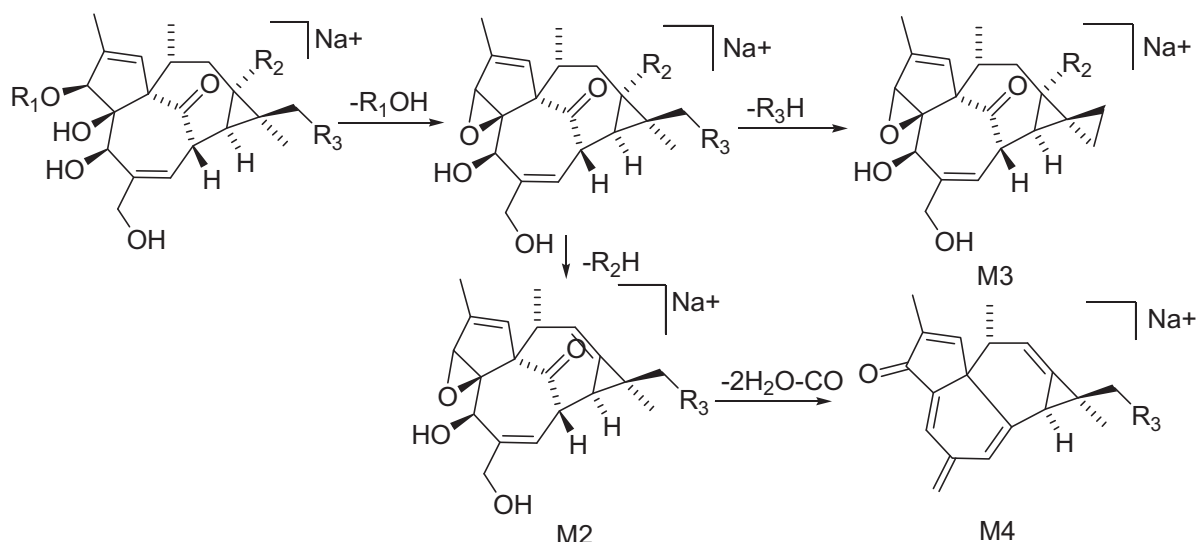


Figure 31. Hypothèse de fragmentation d'ingénanes d'*Euphorbia esula* par Yang *et al.*<sup>374</sup>

Vogg et coll.<sup>370</sup> ont publié en 1999, une méthode HPLC-MS/MS permettant de cibler (*profiling*) les esters de phorbol (PEs), de déoxyphorbol (dPE) et d'ingénol (IE). Après avoir étudié les fragmentations de ces squelettes (Figure 32). Ils ont conçu une stratégie innovante utilisant trois séquences analytiques successives. La première étape consiste en une analyse en mode MRM (*multiple reaction monitoring*) des fragmentations caractéristiques :  $m/z$  311  $\rightarrow$  293 / 293  $\rightarrow$  265 pour les PE et  $m/z$  313  $\rightarrow$  295 / 295  $\rightarrow$  267 pour les dPE/IE. La deuxième étape est une analyse réalisée en mode PIS (*precursor ion scan*). Dans cette séquence, le troisième quadripôle (Q3) est fixé sur un ion  $m/z$  311 pour les PE ou  $m/z$  313 pour les dPE/IE

tandis que les ions produits en source sont balayés en Q1, puis fragmentés en Q2. La troisième étape est réalisée par infusion directe dans le spectromètre de masse (*flow injection analysis*, FIA) en mode MS/MS en ciblant les  $m/z$  précurseurs détectés au cours de la deuxième étape. Par la suite, cette démarche de « *profiling* » a été appliquée à un extrait de *Croton tiglium* (principale source naturelle des PEs) ; elle a permis d'identifier une trentaine d'esters diterpéniques dont une vingtaine correspondait à des composés précédemment rapportés dans cette espèce.<sup>290</sup>

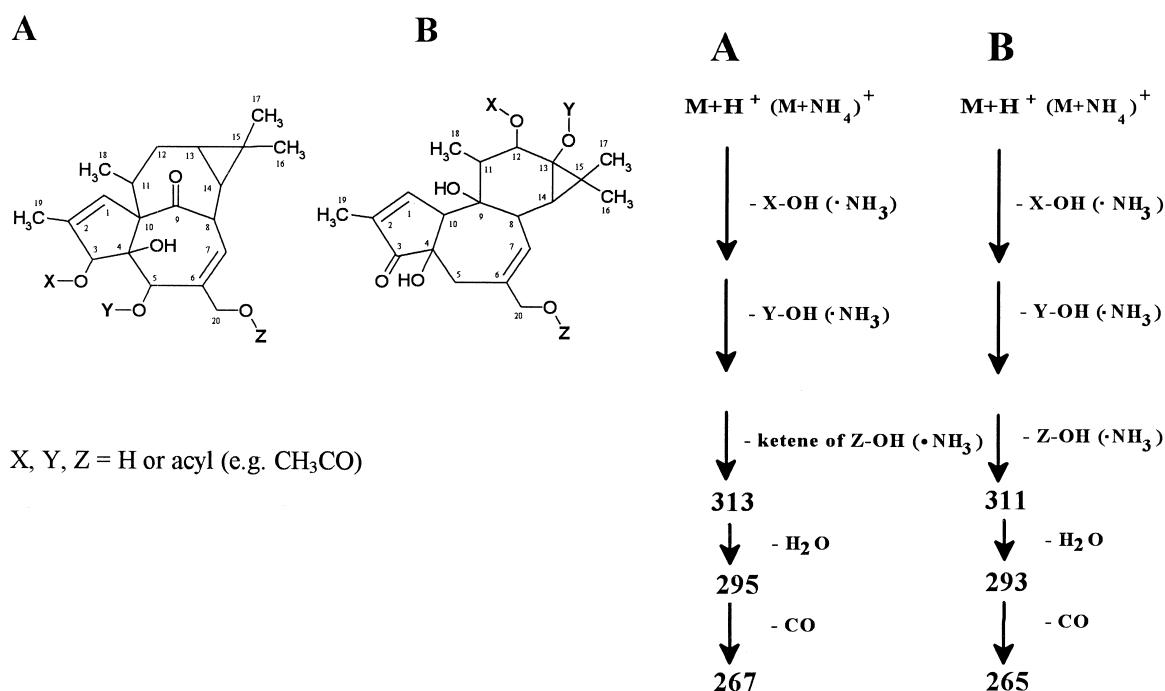


Fig. 1. Principle of fragmentation: Diterpene esters of the ingenane (A) and the tigliane type (B) are fragmented by eliminating their ester groups as free acids (X-OH), resulting in a diterpene nucleus of  $m/z$  313 and 311, respectively. Starting from these skeletons, they further fragment by losing H<sub>2</sub>O (-18 u) and CO (-28 u). This characteristic pattern can be used to establish specific detection of these compounds.

Figure 32. Fragmentation des IE et PE en ESI-MS en mode ionisation positive d'après Vogg *et al.*<sup>370</sup>

Plus récemment, le contenu en TPA (12-*O*-tétradécanoylphorbol 13-acétate) et PE dans des biofertilisateurs issues de tourteaux de *Jatropha curcas* a été étudié par HPLC-ESI-MS/MS en mode SRM (*single reaction monitoring*) grâce à la transition  $m/z$  311 → 293.<sup>376</sup> Sur cette même espèce, deux méthodes HPLC-ESI-MS/MS de *profiling* ont été récemment développées pour étudier le contenu en PE (transition  $m/z$  293 → 265)<sup>372</sup> et en esters de 12-déoxy-16-hydroxyphorbol (transition  $m/z$  311 → 165)<sup>371</sup> dans les extraits végétaux. Les ions observés pour les 12-déoxy-16-hydroxyphorbol ( $m/z$  311 et  $m/z$  293) sont similaires à ceux mis en évidence pour les PEs. Toutefois, les auteurs justifient l'utilisation de la transition  $m/z$  311 → 165 pour les 12-déoxy-16-hydroxyphorbol par le fait qu'elle est la plus abondante à une énergie de collision de 50 V (*collision energy*, CE).

(376) Punsuvon, V.; Nokkaew, R.; Karnasuta, S. Determination of Toxic Phorbol Esters in Biofertilizer Produced with *Jatropha Curcas* Seed Cake. *ScienceAsia* **2012**, *38* (2), 223.

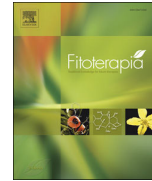
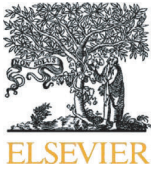
## **II. RÉSULTATS**

## II. 1. Article n°1 : LC-MS<sup>2</sup>-Based Dereplication of Euphorbia extracts with Anti-Chikungunya Virus Activity

*Les informations complémentaires sont disponibles sur internet à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X15300368>*



Figure 33. Récolte du latex d'*Euphorbia pithyusa* subsp. *pithyusa*. Photo : Rita Scaglia



## LC-MS<sup>2</sup>-Based dereplication of *Euphorbia* extracts with anti-Chikungunya virus activity



Louis-Félix Nothias-Scaglia<sup>a,b</sup>, Vincent Dumontet<sup>b</sup>, Johan Neyts<sup>c</sup>, Fanny Roussi<sup>b</sup>, Jean Costa<sup>a</sup>, Pieter Leyssen<sup>c</sup>, Marc Litaudon<sup>b,\*</sup>, Julien Paolini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie de Produits Naturels, UMR CNRS SPE 6134, University of Corsica, 20250 Corte, France

<sup>b</sup> Institut de Chimie des Substances Naturelles ICSN-CNRS UPR 2301, Univ. Paris-Sud, 1 avenue de la terrasse, Labex CEBA, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>c</sup> Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, B-3000 Leuven, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 May 2015

Received in revised form 23 June 2015

Accepted 24 June 2015

Available online 4 July 2015

#### Chemical compounds studied in this article:

12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

(PubChem CID:27924)

12-Deoxyphorbol-13-acetate (PubChem

CID:45217)

Phorbol-12,13-didecanoate (PubChem

CID:71308620)

Ingenol-3-mebutate (PubChem CID:6918670)

Ingenol-3,20-dibenzoate (PubChem: 442043)

Resiniferatoxin (PubChem CID:5702546)

#### Keywords:

*Euphorbia*

Diterpene esters

LC-MS<sup>2</sup>

Antiviral activity

Chikungunya virus

### ABSTRACT

Recently, phorbol esters from Euphorbiaceae have been shown to elicit potent and selective antiviral activity on the replication of Chikungunya virus (CHIKV) in cell culture. With the objective to find new compounds with anti-CHIKV activities, 45 extracts from various plant parts of 11 Mediterranean *Euphorbia* and one *Mercurialis* species were evaluated for selective inhibition of CHIKV replication. All EtOAc extracts, especially those prepared from latex, exhibited significant and selective antiviral activity in a Chikungunya virus-cell-based assay. An LC-MS<sup>2</sup> dereplication method was then developed to investigate whether known diterpenoids with anti-CHIKV activity, such as the potent anti-CHIKV 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), phorbol-12,13-didecanoate, and prostratin as well as 24 other commercially available diterpenoids of tiglane-, ingenane-, and daphnane-type for which the anti-CHIKV activity have been established in advance (Nothias-Scaglia et al. 2015), were present in the *Euphorbia* extracts. Only ingenol-3-mebutate, 13-O-isobutyryl-12-deoxyphorbol-20-acetate, and ingenol-3,20-dibenzoate, all exhibiting weak anti-CHIKV activities, were detected in the EtOAc extracts of *Euphorbia peplus*, *Euphorbia segetalis* ssp. pinea, and *Euphorbia pithyusa* ssp. *pithyusa*. Given the potent anti-CHIKV activities of these *Euphorbia* extracts, the present study suggested that their antiviral activities are probably due to untargeted diterpenoids.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chikungunya fever is caused by an arthropod-borne virus that is associated with massive epidemics and severe morbidity (virus-induced arthralgia, fever, myalgia and rashes). Worldwide expansion of the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is responsible for the spread of Chikungunya virus (CHIKV) from Africa and the Indian subcontinent to Southeast Asia, around the Indian Ocean, and more recently to the Caribbean islands, Central and South America [1–3]. Currently, no antiviral drugs or vaccines are available for the treatment or prevention of CHIKV infection [4]. Recent scientific reviews have highlighted issues and latest developments in the search for new therapeutic solutions [5,6].

In an effort to identify novel inhibitors of CHIKV replication, Euphorbiaceae species have been selected and investigated by means of bioassay-guided purification, which resulted in the isolation of daphnane- and tiglane-type esters with anti-CHIKV activities [7–9]. In particular tiglane-type esters, such as 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (13), phorbol-12,13-didecanoate (11) and prostratin (21), were found to be potent and selective inhibitors of CHIKV (and HIV) replication in vitro [10,11]. TPA, along with other phorbol esters, are known to possess pro-inflammatory and tumor-promoting activities [12–15] through broad activation of PKCs (Protein kinase C isoenzymes), which makes them unsuitable as antiviral drugs for clinical use [16,17].

The genus *Euphorbia* is the largest genus in the family Euphorbiaceae with over 2,000 species, ranging from prostrate annuals, cactus-like succulents to tall trees [18]. In Europe, this genus is represented by more than hundred species that mainly belong to the subgenus (subg.) *Esula* Pers., which vary from annual herbs to small shrubs

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [marc.litaudon@cnrs.fr](mailto:marc.litaudon@cnrs.fr) (M. Litaudon), [paolini@univ-corse.fr](mailto:paolini@univ-corse.fr) (J. Paolini).

growing in the wild in the Mediterranean region [19,20]. In Corsica, the *Euphorbia* genus consists of 33 taxa, of which 22 are endemic to Euro-Mediterranean areas [21]. Spurge (*Euphorbia* spp.) produce an irritant milky-white sap (latex), which acts as a chemical defense barrier when the plant is wounded. The toxicity of the latex to the skin, mucosae and eyes has been known since ancient time [22] and is still a common cause of gardening mishaps [23]. According to Greek and Roman literature, medical utilization of spurge included treatment of cancerous conditions, relieve of chronic pain and as drastic purgative [22,24]. In Corsica, an ethnobotanical study revealed that latex of *Euphorbia* spp. was traditionally used as vesicant agent to remove warts [25]. In Sardinia and in Central Italy, ethnobotanical studies reported that *Euphorbia characias* and *Euphorbia rigida* were used as fish poison to flush out eels [26,27].

Diterpenoids isolated from *Euphorbia* species represent a unique group of structurally diverse compounds that possess remarkable biological activities [28–32], such as potent antiviral activity against human immunodeficiency virus (HIV) for tiglane- [33], ingenane- [29,34,35] and macrocyclic-type esters [36–38], or powerful P-glycoprotein modulation activity for macrocyclic diterpene esters [39,40].

Several LC-MS-based methods targeting commercial and isolated compounds were developed in order to monitor diterpene esters of tiglane- [41,42], ingenane- [41,43–45], lathyran- [45–47], and daphnane-type [48,49]. In the present study, 45 extracts from different plant parts of 11 Euphorbiaceae, ten *Euphorbia* and one *Mercurialis* species, were evaluated for selective inhibition of CHIKV replication in a virus-cell-based assay. With the objective to select the most promising extracts for subsequent bioactivity guided-purification procedure, an LC-MS<sup>2</sup>-based method was developed to dereplicate the possible presence of 27 commercially available lower diterpenoids belonging to tiglane-, ingenane-, and daphnane-type, for which the antiviral properties (anti-CHIKV and/or anti-HIV) were established in advance [11]. Following the results described hereby, the study of the Corsican species *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was carried out [50].

## 2. Experimental

### 2.1. Plant material

The samples of various Euphorbiaceae were collected on different locations in Corsica island (France) during July and August 2011 (Table 1). Botanical identifications of all species were performed by L.-F. Nothias-Scaglia. A voucher specimen of each species has been deposited at the Herbarium of the CPN laboratory at the University of Corsica (Corte).

### 2.2. Extract preparation

Harvested plants were air-dried for a period of three weeks at ambient temperature. The vegetal materials were powdered using a

blade miller (PX-MCF 90D Kinematica). All samples were extracted with 3 × 100 mL of ethyl acetate (EtOAc) and subsequently with 3 × 100 mL of methanol (MeOH) using an automatic solvent extractor (ASE 200). For each solvent, a maceration was carried out for 15 min at 40 °C and 34 bar. The solution was evaporated to dryness in vacuo yielding dried extract.

The latex samples were collected into EtOH after making cuts on stalks. A whitish precipitate was removed from the latex by cotton filtration. The solutions were evaporated to dryness in vacuo yielding crude extract. The laths were partitioned by liquid–liquid extraction with EtOAc and water. For some latex, an emulsion was observed during liquid–liquid partition and thus, the solution was evaporated to dryness using a rotary evaporator and solid–liquid extractions were performed using EtOAc. All extracts were stored at 4 °C until analysis. Solvents and others chemicals were purchased from VWR (France). The samples used for LC-MS<sup>2</sup> analysis were prepared by dissolving the extracts in MeOH at a concentration of 2.5 mg/mL, and then filtered on 0.2 µm PTFE filter.

### 2.3. MS<sup>2</sup> and LC-MS<sup>2</sup> analysis

#### 2.3.1. Chemicals and other chemicals

Solvents and reagents used for sample preparation and chromatography were LC-MS grade: acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), and ammonium acetate (NH<sub>4</sub>AcO) were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, FR). Deionized water was purified by Milli-Q water Millipore (Bedford, USA) purification system. All reference compounds **1–24** and **26–27** (98% purity by LC) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Heidelberg, Germany) except ingenol-3-angelate **25** (98% purity by LC), which was purchased from Coger SAS (Paris, France) (Fig. 1). Solutions of reference compounds were prepared by dissolving each component in MeOH at a concentration of 1 mg/mL and then filtered on 0.2 µm PTFE filter. Flow injection analysis (FIA) was performed with reference solutions at a concentration of 0.1 mg/mL in 8:2 ACN/H<sub>2</sub>O + 0.1% NH<sub>4</sub>AcO.

#### 2.3.2. Analysis by flow injection analysis MS (FIA)

Experiments were performed using a 3200 QTRAP AB Sciex (Framingham, MA, USA) linear triple quadrupole mass spectrometer fitted with ESI Turbo V<sup>TM</sup> ion source operating in positive mode. High purity nitrogen was used both as nebulizer and turbo gas. The ESI source parameters used for FIA were set as follow: CUR (curtain gas), 10 psi; CAD (collision gas), high; GS1 (nebulizer gas), 20 psi; GS2 (heater gas), 0 psi; IS (ion spray voltage), 5000 V; temperature (150 °C). The software used for data acquisition and data analysis was Analyst version 1.5.1 (Framingham, MA, USA).

For all reference compounds, a relevant transition of pseudo-molecular ion was selected using the automated component

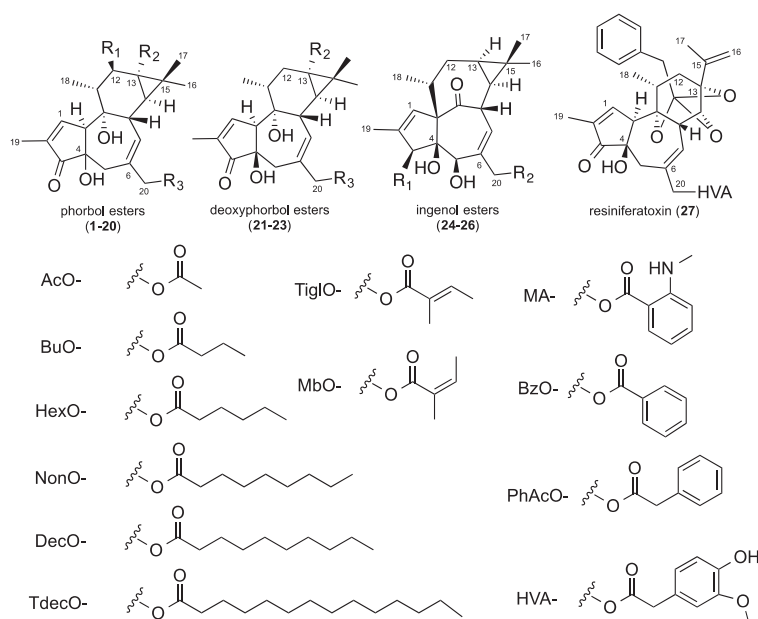
**Table 1**  
Taxonomic classification of 11 Euphorbiaceae species, and their place of harvesting in Corsica.

Subgenus	Section	Species <sup>a</sup>	Distribution area <sup>b</sup>	Altitude (location)	Voucher reference
<i>Chamaesyce</i>		<i>E. maculata</i> L.	Nat. America	70 m (Palasca)	LF-022
<i>Esula</i>	<i>Aphyllis</i>	<i>E. biumbellata</i> Poir.	W-Stenomed	240 m (Ota)	LF-014
<i>Esula</i>	<i>Aphyllis</i>	<i>E. dendroides</i> L.	W-Stenomed	30 m (Piana)	LF-018
<i>Esula</i>	<i>Coniocarpae</i>	<i>E. pithyusa</i> L. ssp. <i>pithyusa</i>	W-Stenomed	15 m (Rogliano)	LF-004
<i>Esula</i>	<i>Helioscopia</i>	<i>E. hyberna</i> L. ssp. <i>insularis</i> (Boiss.) Briq.	Corsica, Sardinia	1200 m (Albertacce)	LF-013
<i>Esula</i>	<i>Helioscopia</i>	<i>E. spinosa</i> L.	N-Eurymed	750 m (Sermano)	LF-019
<i>Esula</i>	<i>Paralias</i>	<i>E. segetalis</i> L. ssp. <i>pineae</i> (Hayek)	W-Stenomed	100 m (Rogliano)	LF-010
<i>Esula</i>	<i>Patellares</i>	<i>E. amygdaloides</i> L. ssp. <i>semiperfoliata</i> (Viv.)	Corsica, Sardinia	1300 m (Albertacce)	LF-015
<i>Esula</i>	<i>Patellares</i>	<i>E. characias</i> L. ssp. <i>characias</i>	Stenomed	500 m (Corte)	LF-001
<i>Esula</i>	<i>Peplus</i>	<i>E. peplus</i> L.	Eurosiberian	50 m (Rogliano)	LF-012
		<i>M. annua</i> L.	Eur. N-Africa	150 m (Rogliano)	LF-009

<sup>a</sup> *E.* = *Euphorbia*, *M.* = *Mercurialis*.

<sup>b</sup> Nat. America: Naturalized America. W-Stenomed: Stenomediterranean from Spain to Liguria and Tunisia. N-Stenomed: Stenomediterranean from Spain to Greece. N-Eurymed: Eurymediterranean from Spain to Greece. Stenomed: Mediterranean periphery. Eur. N-Africa: Eurasia and North Africa.





no.	compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Biological source <sup>a</sup>
1	phorbol	HO-	HO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
2	phorbol-12-acetate	AcO-	HO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
3	phorbol-12-decanoate	DecO-	HO-	HO-	None known
4	phorbol-13-acetate	HO-	AcO-	HO-	None known
5	phorbol-13-butyrate	HO-	BuO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
6	phorbol-13-decanoate	HO-	DecO-	HO-	None known
7	phorbol-13-tetradecanoate	HO-	TdecO-	HO-	None known
8	phorbol-12,13-diacetate	AcO-	AcO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
9	phorbol-12,13-dibutyrate	BuO-	BuO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
10	phorbol-12,13-dihexanoate	HexO-	HexO-	HO-	None known
11	phorbol-12,13-didecanoate (PDD)	DecO-	DecO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
12	4 $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate	DecO-	DecO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
13	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)	TdecO-	AcO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
14	12- <i>O</i> -tetradecanoyl-4 $\alpha$ -phorbol-13-acetate (4 $\alpha$ -TPA)	TdecO-	AcO-	HO-	None known
15	12- <i>O</i> -tiglylphorbol-13-decanoate	TiglO-	DecO-	HO-	<i>Croton tiglium</i>
16	12- <i>O</i> -( <i>N</i> -methylantranilate)phorbol-13-acetate	MA-	AcO-	HO-	<i>Sapium indicum</i>
17	phorbol-13,20-diacetate	HO-	AcO-	AcO-	<i>Croton tiglium</i>
18	phorbol-12,13,20-triacetate	AcO-	AcO-	HO-	<i>Sapium granti</i>
19	20-oxo-phorbol-12,13-dibutyrate	BuO-	BuO-	O=	None known
20	20-oxo-TPA	TdecO-	AcO-	O=	None known
21	12-deoxyphorbol-13-acetate (prostratin)		AcO-	HO-	<i>H. n.</i> , <i>E. f.</i> , <i>E. c.</i>
22	13- <i>O</i> -isobutyryl-12-deoxyphorbol-20-acetate		BuO-	AcO-	<i>Euphorbia</i> spp.
23	13- <i>O</i> -phenylacetyl-12-deoxyphorbol-20-acetate		PhAcO-	AcO-	<i>E. r.</i> , <i>E. p.</i>
24	ingenol	HO-	HO-		<i>E. lathyris</i>
25	ingenol-3-mebutate	MbO-	HO-		<i>E. ca.</i> , <i>E. p.</i> , <i>E.</i>
26	ingenol-3,20-dibenzoate	BzO-	BzO-		<i>E. esula</i>
27	resiniferatoxin				<i>E. r.</i> , <i>E. p.</i> , <i>E. u.</i>

<sup>a</sup> Abbreviation: *H. n.*: *Homolanthus nuntans*; *E. f.*: *Euphorbia fischeriani*, *E. c.*: *Euphorbia cornigera*; *E. r.*: *Euphorbia resinifera*; *E. p.*: *Euphorbia poissonii*; *E. a.*: *Euphorbia antiquorum*; *E. ca.*: *Euphorbia canariensis*; *E. pe.*: *Euphorbia peplus*; *E. antiquorum*; *E. u.*: *E. unispina*.

**Fig. 1.** Structures and biological source of diterpenoids used for the targeted LC-MS<sup>n</sup> method. See [51] for references concerning biological sources. Except for 4, 26, 27, see references [53–55] respectively.

optimization function of the Analyst software. The instrumental parameters were also optimized in direct infusion (flow rate: 10  $\mu$ L/min) to achieve maximum signal/noise (S/N).

### 2.3.3. LC-MS<sup>2</sup> analysis

The LC system consists of a Flexar LC PerkinElmer (Waltham, MA, USA) made up of two Flexar FX-10 LC pump, a Flexar solvent manager,



a 275-Flexar autosampler, and a Flexar LC PE200 column oven. LC separations were performed on a 100 × 2.1 mm i.d., RP 18, 3 μm, LUNA 3U column (Phenomenex) and the column temperature was set at 25 °C. The injected sample volume was 10 μL using an injection loop of 15 μL in partial loop mode. The mobile phase consisted in milliQ water (solvent A) and ACN (solvent B) each containing 0.1% (v/v) NH<sub>4</sub>AcO buffer. During LC analysis, the flow rate was set at 700 μL/min and equilibration of the column was performed by a 50% A–50% B elution (5 min); elution was carried out with the following steps: 50% A–50% B for 1 min, followed by a linear gradient of 50–75% B during 16 min; increased from 75% B to 100% in 4 min; and 100% B during 10 min. The ESI source parameters were optimized to achieve maximum detection of diterpene esters and the following parameters were used for LC-MS<sup>n</sup> analysis: CUR (25 psi); CAD (high); GS1 (45 psi); GS2 (40 psi); IS (5000 V); temperature (500 °C). MS<sup>2</sup> spectra were acquired by an MS<sup>2</sup> scan with the following parameters: Q1 resolution (unit), Q3 resolution (unit); DP (declustering potential) 70 V; EP (entrance potential) 10 V; CE (collision energy) 35 V and CES (± 15 V). To achieve maximum sensitivity, data acquisition was performed by scanning specific precursor-to-product transition of each standard compound in the multiple reaction monitoring (MRM), followed by automatic acquisition of MS<sup>2</sup> spectrum in EPI (Enhanced Product Ion) mode. MS<sup>2</sup>-EPI mass spectra were recorded in the range of *m/z* 50–1000 at 4000 Da/s. Retention times, MRM transitions and multiple MS<sup>2</sup> spectra of each standard compound were recorded into Analyst software spectral database. Several mixtures of standard compounds were analyzed by LC-MS<sup>2</sup>, detection and identification of reference solutions was allowed down to 0.1 ng/mL (i.e. 0.1 ng, injected). At lower concentration, MS<sup>2</sup> spectra did not permit unambiguous compounds annotation.

#### 2.3.4. Untargeted LC-MS<sup>2</sup>

Analyses were performed by using ion trap full scan MS through EMS (Enhanced Mass Spectrometry) followed by an MS<sup>2</sup> (Enhanced Product Ion) scan triggered by IDA (Information Dependent Acquisition). MS Range used for EMS and MS<sup>2</sup> experiments were *m/z* 100–1000. IDA properties were set to select 1 to 2 peaks above 30,000 counts, and with an exclusion rule after 10 occurrences for 30 s with dynamic background subtraction.

#### 2.3.5. Targeted LC-MS<sup>2</sup>

Detection of standard compounds were performed by using MRM mode followed by an MS<sup>2</sup> scan (MRM-MS<sup>2</sup>) triggered by IDA filter. For this purpose, compound-specific parameters of all reference compounds were optimized using the automated compound optimization function of Analyst software by flow injection analysis (FIA) into the

source: DP, EP, CE, CXP (collision cell exit potential) (Table 2). Retention time of reference compounds could be determined by untargeted LC-MS<sup>2</sup> analysis of reference sample in chromatographic conditions described above. MS<sup>2</sup> spectra observed by FIA and MRM-MS<sup>2</sup> were recorded in Analyst spectral library. MRM-MS<sup>2</sup> parameters were set as follow, for MRM experiment: detection window (180 s), Q1 resolution (unit), Q3 resolution (low), target scan time (2.3 s); MS<sup>2</sup> scans were acquired at *m/z* 100–1000. IDA properties were set to select 1 to 2 peaks above 300 counts with an exclusion filter after 10 occurrences for 30 s with dynamic background subtraction. All reference standards compounds could be detected in MRM-MS<sup>2</sup> by injection of 10 μL at 10.0 ng/mL with a S/N (signal/noise ratio) above 25. Compound identification was allowed by comparison of retention time, observation of characteristic transition (S/N > 10) and by matching MS<sup>2</sup> spectrum of the reference compounds using Analyst library.

#### 2.4. CHIKV virus-cell-based antiviral assay

Throughout the experiments, Vero (African green monkey kidney) cells were used. Chikungunya virus (Indian Ocean strain 899), kindly provided by C. Drosten (Institute of Virology, University of Bonn, Germany), was used. Serial dilutions of the test compounds, as well as the reference compounds, chloroquine, were prepared in 100 μL of assay medium [MEM Rega3 (cat. no. 19993013; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL of 200 mM L-glutamine, and 5 mL of 7.5% sodium bicarbonate], added to empty wells of a 96-well microtiter plate (Falcon, BD). Subsequently, 50 μL of a 4× virus dilution in assay medium was added, followed by 50 μL of a cell suspension. This suspension, with a cell density of 25,000 cells/50 μL, was prepared from a Vero cell line subcultured in cell growth medium (MEM Rega3, supplemented with 10% FCS, 5 mL of L-glutamine, and 5 mL of sodium bicarbonate) at a ratio of 1:4 and grown for seven days in 150 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Techno Plastic Products). The assay plates were returned to the incubator for 6–7 days (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95–99% relative humidity), a time at which maximal virus-induced cell death or cytopathic effect (CPE) is observed in untreated, infected controls.

Subsequently, the assay medium was aspirated, replaced with 75 μL of a 5% MTS (Promega) solution in phenol red-free medium, and incubated for 1.5 h. Absorbance was measured at a wavelength of 498 nm (Safire<sup>2</sup>, Tecan), with the optical densities (OD values) reaching 0.6–0.8 for the untreated, uninfected controls. Raw data were converted to percentages of controls, and the EC<sub>50</sub> (50% effective concentration, or concentration calculated to inhibit virus-induced cell death by 50%) and CC<sub>50</sub> (50% anti-metabolic concentration, or concentration that is calculated to inhibit the overall cell metabolism by 50%) values were

**Table 2**  
Anti-CHIKV activity of 15 extracts from 9 *Euphorbia* latex (EC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> in μg/mL)<sup>b</sup>.

Species	Extracts <sup>a</sup>	CHIKV (EC <sub>50</sub> )	Vero cells (CC <sub>50</sub> )	SI <sup>c</sup>
<i>E. maculata</i>	LLE EtOAc	<0.8	>100	>128
	LLE H <sub>2</sub> O	>100	n.d.	n.d.
<i>E. biumbellata</i>	SLE EtOAc	2.1 ± 1.4	>100	>47
	LLE EtOAc	<0.8	25.0 ± 5.2	>32
<i>E. dendroides</i>	LLE H <sub>2</sub> O	1.1	70.7 ± n.d.	59
	LLE EtOAc	<0.1	10.6 ± 2.9	>75
<i>E. pithyusa</i> ssp. <i>pithyusa</i>	LLE H <sub>2</sub> O	30.7	>100	>3.3
	LLE EtOAc	<0.8	23.8 ± 7.3	>31
<i>E. hyberna</i> ssp. <i>insularis</i>	LLE H <sub>2</sub> O	>100	n.d.	n.d.
	SLE EtOAc	<0.8	25.9 ± 4.8	>32
<i>E. spinosa</i>	SLE EtOAc	<0.8	34.3 ± 1.8	>44
	LLE EtOAc	0.4 ± 0.2	16.8 ± 5.0	>39
<i>E. amygdaloides</i> ssp. <i>semiperfoliata</i>	LLE H <sub>2</sub> O	>100	n.d.	n.d.
	LLE EtOAc	<0.8	50.3 ± 14.9	>65
<i>E. characias</i> ssp. <i>characias</i>	LLE H <sub>2</sub> O	>100	n.d.	n.d.
	LLE EtOAc	>100	n.d.	n.d.
<i>E. peplus</i>	LLE H <sub>2</sub> O	10 ± 5 μM	89 ± 28	9
Chloroquine				

<sup>a</sup> SLE: solid–liquid extraction, LLE: liquid–liquid extraction, ASE: automatic solvent extraction.

<sup>b</sup> EC<sub>50</sub>: 50% effective concentration, CC<sub>50</sub>: 50% anti-metabolic concentration. Values are the median ± median absolute deviation calculated from at least 3 independent assays.

<sup>c</sup> SI: selectivity index (SI calculated as CC<sub>50</sub>Vero/EC<sub>50</sub> CHIKV).

derived from the dose–response curves. 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). It was not deemed necessary to perform multiple, independent antiviral experiments on the extracts as they are complex mixtures of compounds for which the activity will only be used as an indication to guide the selection for further bio-assay-guided purification studies. The antiviral experiments have been performed in a bio-safety 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.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Evaluation of *Euphorbia* extracts against CHIKV replication

A total of 45 extracts were prepared from different parts of eleven Euphorbiaceae species growing wild on Corsica island (Table 1). These extracts were evaluated for selective anti-CHIKV activity in a virus-cell-based assay (Tables 2 and 3). Almost all EtOAc and MeOH extracts from *Euphorbia* species showed significant anti-CHIKV activities (Tables 2 and 3), whereas no aqueous extract exhibited anti-CHIKV activity ( $EC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ), except one, which was prepared from *Euphorbia dendroides* latex. In the latter case, an emulsion was observed during liquid/liquid partition, possibly explaining the anti-CHIKV activity of

this aqueous extract. The comparison of biological results obtained from various plant parts (whole plant, aerial parts, leaves, stems, roots) of *Euphorbia* species revealed that EtOAc extracts were systematically more active ( $EC_{50}s < 6.9 \mu\text{g/mL}$  and  $SI > 5$ ) than MeOH extracts. For instance, the EtOAc extract of *Euphorbia pithyusa* ssp. *pithyusa* leaves exhibited more potent anti-CHIKV activities ( $EC_{50} < 0.8 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI > 24$ ) than the corresponding MeOH extract ( $EC_{50} = 23 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI = 1$ ). In addition, EtOAc latex extracts were found to exhibit more potent anti-CHIKV activities than EtOAc extracts obtained from other plant parts ( $EC_{50}s < 2.1 \mu\text{g/mL}$  and  $SI > 31$ ). The EtOAc and MeOH extracts of *Mercurialis annua* showed weak or no anti-CHIKV activity ( $EC_{50} = 40 \pm 4$ , and  $> 100 \mu\text{g/mL}$ , respectively).

Based on selectivity indices (SI) and on systematic microscopic inspection of the antiviral assays, it was confirmed that the anti-CHIKV activities of the *Euphorbia* extracts were selective. Indeed, no significant alteration of cell or monolayer morphology was observed in comparison with the untreated uninfected controls.

From these results, it can be inferred that anti-CHIKV activities of *Euphorbia* extracts were probably due to specific secondary metabolites of this genus. In previous studies, it was shown that phorbol esters, such as the TPA (13) from *Croton tiglium* (Euphorbiaceae) and phorbol-12,13-didecanoate (11), were the most potent inhibitors of CHIKV replication to date [11]. *Euphorbia* species are characterized by their ability to produce lower diterpenoids belonging to the tigliane, ingenane, jatrophane along with other types of diterpene ester [28, 32]. Thus, in a dereplication perspective, an LC-MS<sup>2</sup>-based method was developed to search for the presence of these known inhibitors along with their related commercially available lower diterpenoids, in these *Euphorbia* extracts.

**Table 3**

Anti-CHIKV activities of 30 extracts (EtOAc and MeOH) of eight *Euphorbia* species and *Mercurialis annua* ( $EC_{50}$  and  $CC_{50}$  in  $\mu\text{g/mL}$ ).

Species	Plant parts	Extracts <sup>a</sup>	Yield (%) <sup>b</sup>	CHIKV ( $EC_{50}$ ) <sup>c</sup>	Vero cells ( $CC_{50}$ ) <sup>c</sup>	SI <sup>d</sup>
<i>E. biumbellata</i>	Whole plant	EtOAc	4.4	4.1	>100	>47
		MeOH	6.7	>100	n.d.	n.d.
<i>E. pithyusa</i> ssp. <i>pithyusa</i>	Leaves	EtOAc	6.0	<0.8	18.8 ± 1.2	>24
		MeOH	11.0	23.0	23.3 ± 2.8	1
	Stems	EtOAc	4.6	<0.8	15.2 ± 5.9	>20
		MeOH	9.0	4.5	8.5 ± 0.4	2
	Roots	EtOAc	4.0	<0.8	11.5 ± 1.6	>15
		MeOH	8.0	<0.8	21.0 ± 4.5	>27
<i>E. hyberna</i> ssp. <i>insularis</i>	Aerial parts	EtOAc	3.9	1.0	35.5 ± 3.1	36.0
		MeOH	1.0	4.8	30.9 ± 2.2	6.4
<i>E. spinosa</i>	Leaves	EtOAc	5.0	3.4	23.2 ± 8.2	6.8
		MeOH	8.7	20.3	33.0 ± 2.4	1.6
	Stems	EtOAc	7.0	<0.8	30.5 ± 2.4	>39.1
		MeOH	4.8	2.3	54.1 ± 18.0	23.5
	Roots	EtOAc	7.0	3.7	35.6 ± 1.6	9.6
		MeOH	9.0	35.9	89.1 ± 5.1	2.5
<i>E. segetalis</i> ssp. <i>pinea</i>	Aerial parts	EtOAc	3.6	3.5	25.8 ± 3.5	7.5
		MeOH	5.5	57.0	>100	>1.7
	Stems	EtOAc	4.3	1.8	30.6 ± 0.2	17.3
		MeOH	5.9	29.7	>100	>3.4
	Roots	EtOAc	5.2	<0.8	30.5 ± 2.4	>39.1
		MeOH	8.0	30.6	>100	>3.3
<i>E. amygdaloides</i> ssp. <i>semiperfoliata</i>	Whole plant	EtOAc	6.3	6.9	34.0 ± 0.8	5.0
		MeOH	8.3	8.3	70.3 ± 3.4	8.5
<i>E. characias</i> ssp. <i>characias</i>	Leaves	EtOAc	5.0	2.9	32.1 ± 0.3	11.2
		MeOH	3.4	8.3	70.7 ± 8.5	8.5
<i>E. peplus</i>	Whole plant	EtOAc	7.4	4.3	63.1 ± 7.0	14.7
		MeOH	7.3	30.0	>100	>3.3
<i>Mercurialis annua</i>	Whole plant	EtOAc	3.1	40 ± 4	89.1 ± 5.4	2
		MeOH	6.7	>100	n.d.	–
Chloroquine				10 ± 5 $\mu\text{M}$	89 ± 28	8

<sup>a</sup> SLE: solid–liquid extraction, LLE: liquid–liquid extraction, ASE: automatic solvent extraction.

<sup>b</sup> Based on the dry weight of vegetal material (%); n.d.: not determined.

<sup>c</sup>  $EC_{50}$ : 50% effective concentration,  $CC_{50}$ : 50% anti-metabolic concentration. Values are the median ± median absolute deviation calculated from at least 3 independent assays.

<sup>d</sup> SI: selectivity index (SI calculated as  $CC_{50}\text{Vero}/EC_{50}$  CHIKV).

### 3.2. Analysis of *Euphorbia* extracts using targeted LC-MS<sup>2</sup> method

To select extracts with the best potential in term of biological activity and structural diversity, an LC-MS<sup>2</sup>-based method was developed to detect the possible presence of 27 commercially available diterpenoids (**1–27**) belonging to tiglane- (phorbol and deoxyphorbol derivatives), ingenane- and daphnane-types (Fig. 1), which are characteristic of species from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae [32,51,52]. Their anti-CHIKV activities were established in advance [11]. For each standard, MS/MS optimized parameters (precursor-to-product transition monitored, declustering potential DP, entrance potential EP, collision cell entrance potential CEP, collision energy CE, collision cell exit potential CXP), and retention time in LC, were determined (Table 4). Main ions observed in MS<sup>2</sup> spectrum are also indicated in Table 4. The fragmentation behavior of diterpene esters were consistent with previous data reported [41,42,45,46]. Indeed, in ESI positive ion mode, diterpene esters form pseudo-molecular ions, which undergo neutral loss of their acyl chain(s) under collision-induced dissociation (CID), producing the corresponding high-abundance fragment ions.

The search for these diterpenoids in the plant extracts was carried out by monitoring specific precursor-to-product ion transition at the given retention time, and their identification by comparison of their MS<sup>2</sup> spectrum with each reference standards. In addition, to avoid artifactual detection, an untargeted LC-MS<sup>2</sup> (EMS-MS<sup>2</sup>) analysis was systematically carried out to confirm that the supposed targeted pseudo-molecular ion was not resulting from fragmentation of an analogue compound with a higher molecular weight.

LC-MS<sup>2</sup> analysis of the EtOAc *Euphorbia* extracts allowed the identification of three diterpenes (Table 5). The identification of ingenol-3-mebutate (**25**) in *Euphorbia peplus* extracts (latex and whole plant) was allowed by detection of a *m/z* 453 → 335 transition at *R<sub>t</sub>* 12.4 min, and by comparison with MS<sup>2</sup> spectra recorded in our spectral library (Fig. S1). Using the same methodology, ingenol-3,20-dibenzoate (**26**) was detected by observation of a *m/z* 579 → 457 transition at *R<sub>t</sub>* 18.35 min in *E. peplus* and *Euphorbia segetalis* ssp. *pineae* extracts (Fig. S2–S3). Compound **26** was detected in latex extracts as well as in other plant parts of the two species. Finally, 13-*O*-isobutyryl-12-

deoxyphorbol-20-acetate (**22**) was detected in latex and other plant parts extracts of *Euphorbia pithyusa* ssp. *pithyusa* (Fig. S4).

The present results are in agreement with the previously-reported isolation of ingenol-3-mebutate (**25**) in *E. peplus* extract [56], and also the isolation of other ingenane esters in *E. peplus* and in *E. segetalis* extracts [57,58]. The detection of 13-*O*-isobutyryl-12-deoxyphorbol-20-acetate (**22**) was also supported by the isolation of dideoxyphorbol esters in *E. pithyusa* ssp. *pithyusa* [59]. The comparison of MS<sup>2</sup> spectra and *R<sub>t</sub>* performed in same conditions is generally considered to be robust for the identification of a particular compound in an LC-MS<sup>2</sup> study [60], however it cannot be excluded that the detected ion could be an isomer.

Beside detection of these compounds, no other standard compounds, such as the potent anti-CHIKV phorbol esters **11**, **13**, and **21**, were detected in *Euphorbia* extracts. These results are consistent with previous phytochemical investigations conducted on these species [61–64] (see Table S1 in supporting informations). In addition, while deoxyphorbol or dideoxyphorbol esters were commonly isolated from *Euphorbia* spp. [28,32,51], phorbol derivatives were rarely found in this genus [14,51,65,66]. Indeed, most phorbol esters were reported from species of genus *Croton* and *Sapium* [51].

From a dereplication perspective, taking into account the IC<sub>50</sub> values for inhibition of CHIKV replication and SI of 13-*O*-isobutyryl-12-deoxyphorbol-20-acetate (**22**), and ingenol-3,20-dibenzoate (**26**), (EC<sub>50</sub> = 0.7 ± 0.1 μM, SI = 5.0, and EC<sub>50</sub> = 1.2 ± 0.1 μM, SI = 6.4, respectively), it can be assumed that the presence of compound **22** in *E. pithyusa* ssp. *pithyusa*, and compound **26** in *E. peplus* and *E. segetalis* ssp. *pineae* extracts might only partially explain their potent anti-CHIKV activity. Thus, it is likely that other type of diterpenoids contributed to the anti-CHIKV activities of these extracts. For example, two jatrophone diterpene ester isolated from *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* showed anti-CHIKV activities [50].

### 4. Conclusion

EtOAc and MeOH extracts of *Euphorbia* species were shown to exhibit potent and selective inhibitory activity on CHIKV replication. An

**Table 4**  
LC-MS<sup>2</sup> parameters for reference standards in ESI positive ion mode.<sup>a</sup>

Cpd	<i>R<sub>t</sub></i> (min)	Q1 mass ( <i>m/z</i> ) <sup>b</sup>	Q3 mass ( <i>m/z</i> ) <sup>c</sup>	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)	Most abundant ions ( <i>m/z</i> ) observed in MS <sup>2</sup> spectrum
<b>1</b>	1.4	387.2	369.3	156	11.5	18	21	6	369, 351, 333, 315, 311, 293
<b>2 and 4</b>	2.0	429.2	369.2	56	8.0	20	21	6	369, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>3</b>	13.9	541.3	369.2	86	4.5	30	25	6	369, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>5</b>	2.6	457.2	369.2	236	10	24	25	6	369, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>6</b>	12.9	541.3	369.2	86	4.5	20	27	6	369, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>7</b>	21.5	597.3	369.2	231	4.5	62	29	6	369, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>8</b>	3.1	471.2	411.2	266	9.5	24	23	6	411, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>9</b>	9.4	527.3	439.3	71	5.0	24	25	6	439, 421, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>10</b>	17.7	583.3	467.2	301	6.5	30	25	6	467, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>11</b>	28.5	695.5	523.3	91	9.0	50	29	8	523, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>12</b>	29.0	695.5	523.3	211	10.5	24	45	6	523, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>13</b>	23.5	639.4	411.2	71	8.5	44	29	6	579, 411, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>14</b>	24.4	639.4	411.2	71	8.5	44	29	6	579, 411, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>15</b>	22.2	623.4	523.3	206	9.0	30	27	6	523, 451, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>16</b>	9.3	562.2	411.2	301	5.0	24	25	6	411, 502, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>17</b>	2.8	471.2	411.2	266	9.5	24	23	6	411, 351, 333, 329, 315, 311, 293
<b>18</b>	5.8	513.2	453.2	66	4.5	20	25	6	453, 393, 365, 333, 315, 311, 293
<b>19</b>	3.5	525.2	437.2	71	6.0	20	27	8	437, 349, 331, 309, 291
<b>20</b>	24.0	637.3	409.2	71	8.0	27	27	6	577, 409, 349, 331, 309, 291
<b>21</b>	3.3	413.2	353.2	156	8.0	24	21	6	353, 335, 317, 313, 307, 295
<b>22</b>	11.3	483.2	395.2	71	7.0	22	25	6	335, 317, 313, 307, 295
<b>23</b>	11.7	531.2	395.2	116	8.0	26	27	6	335, 317, 313, 307, 295
<b>24</b>	3.0	371.1	353.2	261	10.0	28	23	6	353, 335, 317, 313, 307, 295, 285
<b>25</b>	12.4	453.2	353.2	126	7.5	20	23	6	353, 335, 317, 313, 307, 295, 285
<b>26</b>	18.2	579.4	457.2	96	9.0	28	27	6	457, 335, 317, 313, 307, 295, 285
<b>27</b>	16.3	651.3	515.2	266	10.5	30	33	6	515, 469, 441, 333

<sup>a</sup> DP (declustering potential); EP (entrance potential); CEP (collision energy potential); CES (collision energy spread); CE (collision energy); CXP (collision cell exit potential).

**Table 5**  
Reference standard diterpene esters detected by targeted LC-MS (MRM-MS<sup>2</sup>) (see Fig. S1–S4 for MS<sup>2</sup> spectra).

Extracts (EtOAc)	Plant parts <sup>a</sup>	Cpd	Transition (m/z)	R <sub>t</sub> (min)	[M + Na] <sup>+</sup> (m/z)	Ions observed in MS <sup>2</sup> spectrum (m/z)	S/N <sup>b</sup>
<i>E. peplus</i>	Lat, WP	<b>26</b>	579.4/457.2	18.3	579.21	457.2, 335.2	188
		<b>25</b>	453.2/353.2	12.4	453.22	335.2, 295.2	82
<i>E. pithyusa</i> ssp. <i>pithyusa</i>	Lat, OPP	<b>22</b>	483.2/395.2	11.2	483.24	423.4, 395.2, 335.2	85
<i>E. segetalis</i> ssp. <i>pinea</i>	R, AP	<b>26</b>	579.4/457.2	18.4	579.21	457.2, 335.2	145

<sup>a</sup> Lat: latex, WP: whole plant, OPP: other plant parts, R: roots, AP: aerial parts.

<sup>b</sup> S/N: signal-to-noise ratio on the extracted ion chromatogram of the monitored transition.

LC-MS<sup>2</sup>-based dereplication method was developed and used to investigate whether this antiviral activity may have been associated with the presence of known diterpene esters endowed with antiviral activities. The LC-MS<sup>2</sup> analysis revealed the presence of 13-O-isobutyryl-12-deoxyphorbol-20-acetate (**22**) in *E. pithyusa* ssp. *pithyusa* extracts, ingenol-3-mebutate (**25**) in *E. peplus* extracts, ingenol-3,20-dibenzoate (**26**) in *E. peplus* and *E. segetalis* ssp. *pinea* extracts. In contrast, potent known inhibitors of CHIKV replication such as phorbol-12,13-didecanoate (**11**), TPA (**13**) and prostratin (**21**) could not be detected in these extracts which make them attractive for further chemical and biological studies.

### Conflict of interest

Nothing to declare

### Acknowledgments

We are grateful to Dr. M-J Battesti (University of Corsica) for her precious advices during plant identification and to Laurène Peter and Naym Ben Amara for their help during collection of vegetal material. This work has also benefited from an “Investissement d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01). We would like to acknowledge Stijn Delmotte, Caroline Collard, Nick Verstraeten and Charlotte Vanderheydt for their excellent technical assistance in the acquisition of the antiviral data.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.06.021>.

### References

- [1] S.-D. Thiberville, N. Moyer, L. Dupuis-Maguiraga, A. Nougaiere, E.A. Gould, P. Roques, et al., Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy, *Antivir. Res.* 99 (2013) 345–370, <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>.
- [2] T.E. Morrison, Reemergence of Chikungunya virus, *J. Virol.* 88 (2014) 11644–11647, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01432-14>.
- [3] A. Powers, Chikungunya virus outbreak expansion and microevolutionary events affecting epidemiology and epidemic potential, *Res. Rep. Trop. Med.* 6 (2015) 11–19, <http://dx.doi.org/10.2147/RRMT.S53698>.
- [4] P. Singh, M. Chhabra, V. Mittal, P. Sharma, M.A. Rizvi, L. Chauhan, et al., Current research and clinical trials for a vaccine against Chikungunya virus, *Vaccin. Dev. Ther.* 35–46 (2013) <http://dx.doi.org/10.2147/VDT.S25513>.
- [5] P. Kaur, J.J.H. Chu, Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges, *Drug Discov. Today* 18 (2013) 969–983, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.002>.
- [6] A.A. Rashad, S. Mahalingam, P.A. Keller, Chikungunya virus: emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry, *J. Med. Chem.* 4 (2013) 1147–1166, <http://dx.doi.org/10.1021/jm400460d>.
- [7] P.-M. Allard, P. Leyssen, M.-T. Martin, M. Bourjot, V. Dumontet, C. Eydoux, et al., Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*, *Phytochemistry* 84 (2012) 160–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.07.023>.
- [8] N. Corlay, L. Delang, E. Girard-Valenciennes, J. Neyts, P. Clerc, J. Smadja, et al., Tigliane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of Chikungunya virus replication, *Fitoterapia* 97 (2014) 87–91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.05.015>.
- [9] F. Olivon, H. Palenzuela, E. Girard-Valenciennes, J. Neyts, C. Pannecouque, F. Roussi, et al., Antiviral activity of flexibilane and tigliane diterpenoids from *Stillingia lineata*, *J. Nat. Prod.* (2015) <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00116>.
- [10] M. Bourjot, L. Delang, V.H. Nguyen, J. Neyts, F. Guèrille, P. Leyssen, et al., Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of Chikungunya virus replication, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 2183–2187, <http://dx.doi.org/10.1021/np300637t>.
- [11] L.-F. Nothias-Scaglia, C. Pannecouque, F. Renucci, L. Delang, J. Neyts, F. Roussi, et al., Antiviral activity of diterpene esters on Chikungunya virus and HIV replication, *J. Nat. Prod.* (2015) <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00073> (in press).
- [12] F.J. Evans, R.J. Schmidt, An assay procedure for the comparative irritancy testing of esters in the tigliane and daphnane series, *Inflammation* 3 (1979) 215–223, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00914178>.
- [13] H.J. Opferkuch, E. Hecker, On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae), *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 103 (1982) 255–268, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00409701>.
- [14] F.J. Evans, S.E. Taylor, Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumour diterpenes of the plants of families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 44 (1983) 1–99.
- [15] G. Furstenberger, E. Hecker, On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XI.[1] The skin irritant and tumor promoting diterpene esters of *Euphorbia tirucalli* L. originating from South Africa, *Z. Naturforsch. C* 40 (1985) 631–646.
- [16] L. Saraiva, P. Fresco, E. Pinto, J. Gonçalves, Characterization of phorbol esters activity on individual mammalian protein kinase C isoforms, using the yeast phenotypic assay, *Eur. J. Pharmacol.* 491 (2004) 101–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.03.035>.
- [17] J. Das, G.M. Rahman, C1 domains: structure and ligand-binding properties, *Chem. Rev.* 114 (2014) 12108–12131, <http://dx.doi.org/10.1021/cr300481j>.
- [18] G.L. Webster, Classification of the Euphorbiaceae, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81 (1994) 33–144, <http://dx.doi.org/10.2307/2399908>.
- [19] A.R. Smith, T.G. Turin, N.A. Burges, D.H. Valentine, *Euphorbia* L. Flora Eur, vol. 2 Cambridge University Press, 1968. 213–226.
- [20] B. Frajman, P. Schönschetter, Giants and dwarfs: molecular phylogenies reveal multiple origins of annual spurges within *Euphorbia* subg. *Esula*, *Mol. Phylogenet. Evol.* 61 (2011) 413–424, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.011>.
- [21] D. Jeanmonod, J. Gamisans, Flora Corsica, vol. 1 Edisud, Aix-En-Provence, 2007. 921.
- [22] Pedanius Dioscorides, *De Materia Medica*, IBIDIS, Johannesburg, South Africa, 2000.
- [23] T. Eke, S. Al-Husainy, M.K. Raynor, The spectrum of ocular inflammation caused by *Euphorbia* plant sap, *Arch. Ophthalmol.* 118 (2000) 13–16.
- [24] G. Appendino, A. Szallasi, Euphorbium: modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine, *Life Sci.* 60 (1997) 681–696.
- [25] M. Conrad, Les plantes sauvages dans la vie quotidienne des Corses: essai d’ethnobotanique, Société des sciences historiques et naturelles de la Corse, Bastia, 1973.
- [26] A. Bruni, M. Ballero, F. Poli, Quantitative ethnopharmacological study of the Campidano Valley and Urzulei district, Sardinia, Italy, *J. Ethnopharmacol.* 57 (1997) 97–124, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00055-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00055-X).
- [27] C. Leto, T. Tuttolomondo, S. La Bella, M. Licata, Ethnobotanical study in the Madonie Regional Park (Central Sicily, Italy)—medicinal use of wild shrub and herbaceous plant species, *J. Ethnopharmacol.* 146 (2013) 90–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.042>.
- [28] Q.-W. Shi, X.-H. Su, H. Kiyota, Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4295–4327, <http://dx.doi.org/10.1021/cr078350s>.
- [29] C.M. Abreu, S.L. Price, E.N. Shirk, R.D. Cunha, L.F. Pianowski, J.E. Clements, et al., Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR, *PLoS ONE* 9 (2014) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097257>.
- [30] A.M.V.D. Ferreira, M.J.M. Carvalho, A.M.S. Silva, L.H.M. Carvalho, D.K. Majumdar, J.N. Govil, et al., Diterpenes of the family Euphorbiaceae, *Recent Prog. Med. Plants*, vol. 9, Studium Press LLC, Texas, 2005. 15–118.
- [31] J.T. Mwine, P. Van Damme, Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal, *J. Med. Plant Res.* 5 (2011) 652–662.
- [32] A. Vasas, J. Hohmann, Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008–2012), *Chem. Rev.* 114 (2014) 8579–8612, <http://dx.doi.org/10.1021/cr400541j>.
- [33] L.-L. Pan, P.-L. Fang, X.-J. Zhang, W. Ni, L. Li, L.-M. Yang, et al., Tigliane-type diterpenoid glycosides from *Euphorbia fischeriana*, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 1508–1512, <http://dx.doi.org/10.1021/np200058c>.
- [34] M. Fujiwara, K. Ijichi, K. Tokuhisa, K. Katsura, S. Shigetani, K. Konno, et al., Mechanism of selective inhibition of human immunodeficiency virus by ingenol triacetate, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 271.



- [35] K.-J. Hong, H.S. Lee, Y. Kim, S.S. Kim, Ingenol protects human T cells from HIV-1 infection, *Osong Public Health Res. Perspect.* 2 (2011) 109–114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrp.2011.07.001>.
- [36] L.M. Bedoya, N. Márquez, N. Martínez, S. Gutiérrez-Eisman, A. Álvarez, M.A. Calzado, et al., SJ23B, a jatrophone diterpene activates classical PKCs and displays strong activity against HIV in vitro, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 965–978, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.025>.
- [37] L. Avila, M. Perez, G. Sanchez-Duffhues, R. Hernández-Galán, E. Muñoz, F. Cabezas, et al., Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation, *Phytochemistry* 71 (2010) 243–248, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.005>.
- [38] Y. Tian, W. Xu, C. Zhu, S. Lin, Y. Guo, J. Shi, Diterpenoids with diverse skeletons from the roots of *Euphorbia micractina*, *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 1039–1046, <http://dx.doi.org/10.1021/np400029d>.
- [39] G. Corea, A. Di Pietro, C. Dumontet, E. Fattorusso, V. Lanzotti, Jatrophone diterpenes from *Euphorbia* spp. as modulators of multidrug resistance in cancer therapy, *Phytochem. Rev.* 8 (2009) 431–447, <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-009-9126-8>.
- [40] A. Vasas, D. Rédei, D. Csopor, J. Molnár, J. Hohmann, Diterpenes from European *Euphorbia* species serving as prototypes for natural-product-based drug discovery, *Eur. J. Org. Chem.* 27 (2012) 5115–5130, <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201200733>.
- [41] G. Vogg, E. Mattes, J. Rothenburger, N. Hertkorn, Stefan Achatz, H. Sandermann Jr., Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L., *Phytochemistry* 51 (1999) 289–295, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00016-3).
- [42] Q. Tang, Z. Su, Z. Han, X. Ma, D. Xu, Y. Liang, et al., LC–MS method for detecting prostratin in plant extracts and identification of a high-yielding population of *Euphorbia fischeriana*, *Phytochem. Lett.* 5 (2012) 214–218, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2011.12.011>.
- [43] J.-J. Hou, W.-Y. Wu, J. Liang, Z. Yang, H.-L. Long, L.-Y. Cai, et al., A single, multifaceted, enhanced strategy to quantify the chromatographically diverse constituents in the roots of *Euphorbia kansui*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 321–330, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.049>.
- [44] M. Jarret, J. Katsamas, K. Cawkill, L. Henderson, P. Welburn, A pharmacokinetic study using a highly sensitive and specific method to determine systemic exposure of ingenol mebutate and its two main metabolites, PEP015 and PEP025 in human whole blood after topical administration, *J. Am. Acad. Dermatol.* 68 (2013) AB156, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2012.12.646>.
- [45] C. Bicchi, G. Appendino, C. Cordero, P. Rubiolo, D. Ortelli, J.-L. Veuthey, HPLC–UV and HPLC–positive–ESI–MS analysis of the diterpenoid fraction from caper spurge (*Euphorbia lathyris*) seed oil, *Phytochem. Anal.* 12 (2001) 255–262, <http://dx.doi.org/10.1002/pca.592>.
- [46] X.-R. Hou, L.-L. Wan, Z.-J. Zhan, C.-P. Li, W.-G. Shan, Analysis and determination of diterpenoids in unprocessed and processed *Euphorbia lathyris* seeds by HPLC–ESI–MS, *J. Pharm. Anal.* 1 (2011) 197–202, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.06.003>.
- [47] X. Meng, X. Zhao, Z. Long, Y. Yuan, H. Zhuang, K. Bi, et al., A sensitive liquid chromatography–mass spectrometry method for simultaneous determination of three diterpenoid esters from *Euphorbia lathyris* L. in rat plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72 (2013) 299–305, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.09.005>.
- [48] S. Chow, M.T. Fletcher, R.A. McKenzie, Analysis of daphnane orthoesters in poisonous australian pimelea species by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2011) 7482–7487, <http://dx.doi.org/10.1021/jf101752r>.
- [49] S. Zhang, F. Zhang, X. Li, W. Dong, L. Wen, S. Wang, Evaluation of Daphne genkwa diterpenes: fingerprint and quantitative analysis by high performance liquid chromatography, *Phytochem. Anal.* 18 (2007) 91–97, <http://dx.doi.org/10.1002/pca.953>.
- [50] L.-F. Nothias-Scaglia, P. Retaillieu, J. Paolini, C. Pannecouque, J. Neyts, V. Dumontet, et al., Jatrophone diterpenes as inhibitors of Chikungunya virus replication: structure–activity relationship and discovery of a potent lead, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 1505–1512, <http://dx.doi.org/10.1021/np500271u>.
- [51] H.-B. Wang, X.-Y. Wang, L.-P. Liu, G.-W. Qin, T.-G. Kang, Tigliane diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae families, *Chem. Rev.* 115 (2015) 2975–3011, <http://dx.doi.org/10.1021/cr200397n>.
- [52] S.-G. Liao, H.-D. Chen, J.-M. Yue, Plant orthoesters, *Chem. Rev.* 109 (2009) 1092–1140, <http://dx.doi.org/10.1021/cr0782832>.
- [53] S. El-Mekkawy, M.R. Meselhy, N. Nakamura, M. Hattori, T. Kawahata, T. Otake, Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*, *Phytochemistry* 53 (2000) 457–464, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00556-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00556-7).
- [54] Y.-B. Wang, P. Ji, H.-B. Wang, G.-W. Qin, Diterpenoids from *Euphorbia esula*, *Chin. J. Nat. Med.* 8 (2010) [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(10\)60013-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(10)60013-1).
- [55] M. Hergenbahn, W. Adolf, E. Hecker, Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*, *Tetrahedron Lett.* 16 (1975) 1595–1598, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)72207-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)72207-6).
- [56] J. Hohmann, F. Evanics, L. Berta, T. Bartók, Diterpenoids from *Euphorbia peplus*, *Planta Med.* 66 (2000) 291–294, <http://dx.doi.org/10.1055/s-2000-8568>.
- [57] J. Jakupovic, F. Jeske, T. Morgenstern, F. Tschirritzis, J.A. Marco, W. Berendsohn, Diterpenes from *Euphorbia segetalis*, *Phytochemistry* 47 (1998) 1583–1600, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00830-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00830-3).
- [58] J. Jakupovic, T. Morgenstern, M. Bittner, M. Silva, Diterpenes from *Euphorbia peplus*, *Phytochemistry* 47 (1998) 1601–1609, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00831-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00831-5).
- [59] G. Appendino, E. Belloro, G.C. Tron, J. Jakupovic, M. Ballero, Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 1399–1404, <http://dx.doi.org/10.1021/np990209u>.
- [60] W.B. Dunn, A. Erban, R.J.M. Weber, D.J. Creek, M. Brown, R. Breitling, et al., Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics, *Metabolomics* 9 (2012) 44–66, <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>.
- [61] G. Appendino, S. Jakupovic, G.C. Tron, J. Jakupovic, V. Milon, M. Ballero, Macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia semiperfoliata*, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 749–756, <http://dx.doi.org/10.1021/np970507w>.
- [62] G. Appendino, P. Spagliardi, M. Ballero, G. Seu, Macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia hyberna* L. subsp. *insularis* and their reaction with oxyphilic reagents, *Fitoterapia* 73 (2002) 576–582, [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00213-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00213-7).
- [63] G. Corea, E. Fattorusso, V. Lanzotti, O. Tagliatalata-Scafati, G. Appendino, M. Ballero, et al., Modified jatrophone diterpenes as modulators of multidrug resistance from *Euphorbia dendroides* L., *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 5221–5227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2003.08.013>.
- [64] G. Appendino, E. Belloro, G. Cesare Tron, J. Jakupovic, M. Ballero, Polycyclic diterpenoids from *Euphorbia characias*, *Fitoterapia* 71 (2000) 134–142, [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00134-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00134-3).
- [65] F.J. Evans, A.D. Kinghorn, A comparative phytochemical study of the diterpenes of some species of the genera *Euphorbia* and *Elaeophoria* (Euphorbiaceae), *Bot. J. Linn. Soc.* 74 (1977) 23–35, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1977.tb01163.x>.
- [66] G. Fürstenberger, E. Hecker, New highly irritant *Euphorbia* factors from latex of *Euphorbia tirucalli* L., *Experientia* 33 (1977) 986–988, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01945920>.



## II. 2. Article n°2 : Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication

*Les informations complémentaires sont disponibles sur internet à l'adresse :*

*<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00073>*

*La dernière version du manuscrit est disponible sur <http://www.researchgate.net>.*



Figure 34. *Euphorbia biumbellata*. Ota. Photo : L.-F. N.-S.

## Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication

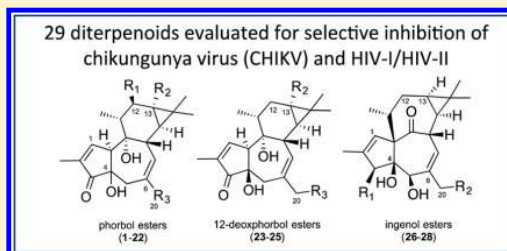
Louis-Félix Nothias-Scaglia,<sup>†,‡</sup> Christophe Pannecouque,<sup>§</sup> Franck Renucci,<sup>†</sup> Leen Delang,<sup>§</sup> Johan Neyts,<sup>§</sup> Fanny Roussi,<sup>‡</sup> Jean Costa,<sup>†</sup> Pieter Leyssen,<sup>§</sup> Marc Litaudon,<sup>\*,‡,||</sup> and Julien Paolini<sup>\*,†,||</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire de Chimie de Produits Naturels, UMR CNRS SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France

<sup>‡</sup>Institut de Chimie des Substances Naturelles CNRS-ICSN UPR 2301, University Paris-Sud, LabEx CEBA, 1 Avenue de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France

<sup>§</sup>Laboratory for Virology and Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, B-3000 Leuven, Belgium

**ABSTRACT:** Recently, new daphnane, tigliane, and jatropane diterpenoids have been isolated from various Euphorbiaceae species, of which some have been shown to be potent inhibitors of chikungunya virus (CHIKV) replication. To further explore this type of compound, the antiviral activity of a series of 29 commercially available natural diterpenoids was evaluated. Phorbol-12,13-didecanoate (11) proved to be the most potent inhibitor, with an EC<sub>50</sub> value of 6.0 ± 0.9 nM and a selectivity index (SI) of 686, which is in line with the previously reported anti-CHIKV potency for the structurally related 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (13). Most of the other compounds exhibited low to moderate activity, including an ingenane-type diterpene ester, compound 28, with an EC<sub>50</sub> value of 1.2 ± 0.1 μM and SI = 6.4. Diterpene compounds are known also to inhibit HIV replication, so the antiviral activities of compounds 1–29 were evaluated also against HIV-1 and HIV-2. Tigliane- (4β-hydroxyphorbol analogues 10, 11, 13, 15, 16, and 18) and ingenane-type (27 and 28) diterpene esters were shown to inhibit HIV replication in vitro at the nanomolar level. A Pearson analysis performed with the anti-CHIKV and anti-HIV data sets demonstrated a linear relationship, which supported the hypothesis made that PKC may be an important target in CHIKV replication.



Chikungunya fever is caused by an arthropod-borne virus that is known for causing major epidemics and because of its severe morbidity (inclusive of virus-induced arthralgia, fever, myalgia, and rashes).<sup>1</sup> Worldwide travel and introduction of the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *A. albopictus* are responsible for the spread of chikungunya virus (CHIKV) from Africa and the Indian subcontinent to Southeast Asia, around the Indian Ocean, and more recently to the Caribbean islands and Central and South America.<sup>2,3</sup> Currently, no antiviral drugs or vaccines are available for the treatment or prevention of CHIKV infection.<sup>4</sup> Recent scientific reviews have highlighted issues and the latest developments in the search for new therapeutic antiviral solutions.<sup>5,6</sup>

In an effort to identify novel inhibitors of CHIKV replication, Euphorbiaceae species have been selected and investigated by means of bioassay-guided purification, which resulted in the isolation of diterpene esters of daphnane, jatropane, and tigliane types with anti-CHIKV activity.<sup>7–10</sup>

Moreover, the structurally related diterpenoids prostratin and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) were also found to be potent and selective inhibitors of CHIKV replication in vitro.<sup>11</sup> TPA and other tigliane-, ingenane-, and daphnane-type diterpenes are known to possess anti-HIV properties, but also pro-inflammatory and tumor-promoting activities,<sup>12–16</sup> through the broad activation or other modulation of PKCs (protein

kinase C isoenzymes).<sup>17,18</sup> In particular, phorbol esters activate conventional and novel PKCs by interacting with their cysteine-rich C1 domain, triggering a series of interlinking signaling pathways.<sup>19</sup> The clinical launch of Picato (ingenol-3-mebutate, PEP005), a broad PKC modulator isolated from *E. pepplus* for the treatment of a precancerous skin condition (actinic keratosis),<sup>20</sup> along with recent results on EBC-46 (tigliane-type), which shows promise in curing various tumors by a single intralesional injection in a preclinical model for cancer,<sup>21</sup> highlight the therapeutic potential of diterpene esters endowed with PKC modulation abilities.

In the present investigation, the antiviral potential of 29 diterpene esters (1–29), belonging to tigliane (1–25), ingenane (26–28), and daphnane (29) types, was evaluated in cell culture against CHIKV, HIV-1, and HIV-2. The aim of this study was to enhance knowledge of the structure–activity relationships (SARs) for these chemical classes and to investigate a possible correlation between their anti-CHIKV and anti-HIV activities.

Received: January 26, 2015

Published: May 13, 2015



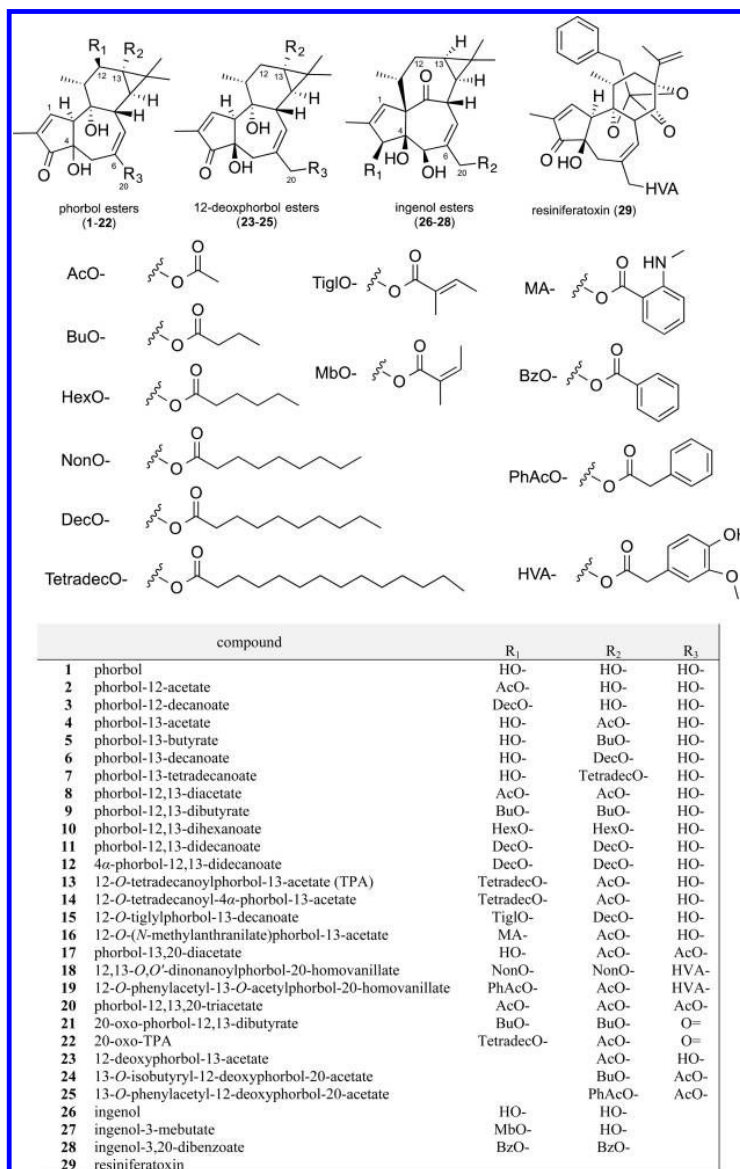


Figure 1. Structures of diterpene esters 1–29.

## RESULTS AND DISCUSSION

The antiviral evaluation of compounds 1–29 (Figure 1) was performed in viral cell-based assays for CHIKV (Indian Ocean strain 899), a member of the genus *Alphavirus*, and two members of the *Lentivirus* group, HIV type-1 (strain IIIB) and HIV type-2 (strain ROD) (Table 1). In a previous study,<sup>9</sup> using the same methodology, it was established that TPA (13) and prostratin (23) are strong inhibitors of CHIKV replication ( $EC_{50} = 2.9 \pm 0.3$  nM, SI = 1965, and  $EC_{50} = 2.7 \pm 1.2$   $\mu$ M, SI = 22.8, respectively).<sup>11</sup> The results of the present study revealed that phorbol-12,13-didecanoate (11) was the most potent inhibitor evaluated, with an  $EC_{50}$  value of  $6.0 \pm 0.9$  nM, SI = 686, corroborating the strong anti-CHIKV activity previously found for the structurally closely related TPA (13). In addition, phorbol monoesters 6 and 7 ( $EC_{50} = 2.2 \pm 0.1$   $\mu$ M, SI = 9.7 and  $EC_{50} = 0.99 \pm 0.03$   $\mu$ M, SI = 9.0, respectively), phorbol

triester 19 ( $EC_{50} = 1.7 \pm 0.3$   $\mu$ M, SI = 14.2), and to a lesser extent phorbol-13 butyrate (5) ( $EC_{50} = 20 \pm 10$   $\mu$ M, SI = 12.3) proved to be selective inhibitors of CHIKV replication (SI approximating 10 or above). Most of the other diterpenes (3, 9, 10, 12, 14, 15, 18, 22, 24, 28, and 29) reproducibly inhibited CHIKV-induced cell death, with  $EC_{50}$  values in the  $\mu$ M range, but also caused significant antimetabolic effects, resulting in SIs in the range 1.5 to 6.4. From these results, the following preliminary structure–activity relationship observations could be derived: the length and location of the acyl chain on the 4 $\beta$ -OH phorbol diterpene moiety appear to be important determinants for strong anti-CHIKV activity. Considering the phorbol-12 and phorbol-13-monoesters, it was noted that compounds 2 and 4, which possess only one acetyl group at C-12 or C-13, were not active, whereas the anti-CHIKV activity was significantly higher with a longer aliphatic side chain

Table 1. Antiviral Activities of Diterpene Esters 1–29 against CHIKV, HIV-1, and HIV-2

cpd	CHIKV <sup>a</sup>	SI <sup>b</sup>	HIV-1 (III <sub>B</sub> ) <sup>a</sup>	SI <sup>b</sup>	HIV-2 (ROD) <sup>a</sup>	SI <sup>b</sup>
1	>343 <sup>c</sup>	>1 <sup>c</sup>	>343	>1	>343	>1
2	>245	0.8	>307	>1	>307	>1
3	4.9 ± 1.7	1.5	4.9 ± 0.6	4	2.0 ± 0.3	9
4	>174		>217	1	101 ± 12	>2
5	20 ± 10	12.3	122 ± 18	>3	25 ± 3	>12
6	2.2 ± 0.1	9.7	0.9 ± 0.1	130	0.15 ± 0.02	1
7	0.99 ± 0.03	9.0	0.24 ± 0.02	107	78 ± 11 nM	1
8	9.4 ± 1.0	4.2	4.8 ± 0.8	>59	1.0 ± 0.2	>274
9	1.8 ± 0.2	2.1	79 ± 4 nM	>3155	14.0 ± 0.8 nM	>17 410
10	3.2 ± 0.2	1.8	7.0 ± 1.0 nM	>2886	1.2 ± 0.1 nM	19 162
11	6.0 ± 0.9 nM	686	1.2 ± 0.1 nM	13 754	0.2 ± 0.2 nM	120 274
12	1.5 ± 0.1	2.2	>16	n.d.	>16	n.d.
13	2.9 ± 0.3 nM <sup>c</sup>	1965 <sup>c</sup>	0.9 ± 0.1 nM	20 220	0.7 ± 0.3 nM	107 377
14	2.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.9 <sup>c</sup>	>18	n.d.	>17	n.d.
15	1.1 ± 0.3	3.3	1.5 ± 0.9 nM	12 600	0.2 ± 0.1 nM	97 145
16	15 ± 4	1.1	9.0 ± 1.0 nM	12 749	3 ± 2 nM	28 586
17	24.6 ± 7.1	1.7	>279	1	243 ± 55	>1
18	0.6 ± 0.1	3.7	36 ± 5 nM	483	4.0 ± 0.1 nM	6152
19	1.7 ± 0.3	14.2	0.75 ± 0.01	23	80.0 ± 1.3 nM	333
20	32.6 ± 4.0	2.2	27.4 ± 2.9	>9	6.6 ± 2.8	>38
21	13.1 ± 0.5	2.7	>20	n.d.	>35	n.d.
22	0.7 ± 0.1	5.9	3.3 ± 0.4	5	1.2 ± 0.1	13
23	2.7 ± 1.2 <sup>c</sup>	22.8 <sup>c</sup>	1.9 ± 0.1	>171	0.9 ± 0.1	>370
24	0.7 ± 0.1	5.0	0.6 ± 0.2	221	0.20 ± 0.02	958
25	50.8 ± 2.1	1.9	0.3 ± 0.4	>737	31 ± 2 nM	>7818
26	30.1 ± 19.2	4.8	209 ± 12	>2	131 ± 57	>3
27	22.9 ± 5.2	2.3	17 ± 2 nM	7847	9 ± 1 nM	13 451
28	1.2 ± 0.1	6.4	27 ± 7 nM	3396	9 ± 3 nM	6049
29	1.8 ± 0.2	2.3	26 ± 3	8	22.6 ± 4.2	3
chloroquine (positive control)	10 ± 5	8.9	n.d.		n.d.	
azidothymidine (positive control)	n.d.		7.1 ± 0.4 nM	>3516	6.0 ± 0.7 nM	>4176

<sup>a</sup>EC<sub>50</sub>'s (CHIKV, HIV-1, and HIV-2) are given in μM, unless otherwise stated. Values are the median ± median absolute deviation calculated from at least three independent assays. <sup>b</sup>SI, selectivity index, calculated as CC<sub>50</sub> Vero/(EC<sub>50</sub> CHIKV or HIV). n.d. = not determined. <sup>c</sup>Anti-CHIKV results obtained with the same methodology from Bourjot et al.<sup>8</sup>

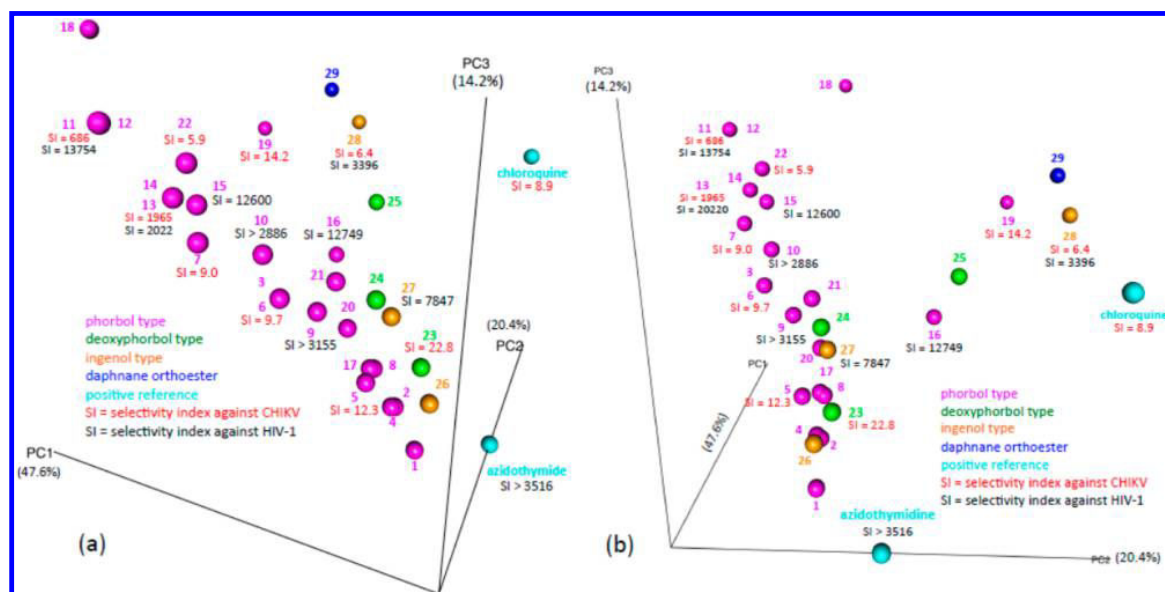
present (7 > 6 > 5 > 4). In addition, when comparing the anti-CHIKV activity of compounds 3 and 6, it can be inferred that the presence of a long-chain ester unit at C-13, rather than at C-12, led to a higher selectivity. As far as the 4β-OH-phorbol-12,13-diester are concerned, a moderate to strong anti-CHIKV activity was observed for compounds possessing long aliphatic side chains at C-12 and C-13 (i.e., 9–11, 13, and 15). Compounds 11 and 13, which possess at least a 10-carbon side chain at C-12, were approximately 1000 times more potent than the other members of the series, stressing the key role of the C-12 acyl side chain and its chain length.

As previously shown for TPA (13) and its epimer, 4α-TPA (14),<sup>11</sup> comparison of the anti-CHIKV activity of compounds 11 and 12 confirmed that 4β-phorbol derivatives are much more potent against CHIKV than their 4α-counterparts. In addition, since the 20-oxo-phorbol diesters 21 and 22 exhibited a weaker anti-CHIKV effect than their hydroxylated counterparts, 9 and 13, it can be deduced that the presence of a carbonyl group at C-20 has a detrimental effect. Among the 12-deoxyphorbol-13-mono- or 13,20-diester (23–25), prostratin (23) possessed the most favorable anti-CHIKV profile. Finally, the presence of an additional ester group at C-20 did not affect the resultant anti-CHIKV activity, with compounds 18–20 exhibiting moderate to strong activity. For the ingenane-type diterpenes 26–28, ingenol-3,20-dibenzoate 28 was found to

potently inhibit CHIKV replication, whereas the corresponding alcohol 26 and ingenol-3-mebutate (27) showed only moderate activities. Compounds 26–28 are the first examples of ingenane-type diterpenoids to have shown anti-CHIKV activity.

In the viral-cell-based assays for HIV (Table 1), phorbol diesters 7, 9–11, 13, 15, and 16, phorbol triesters 18 and 20, and ingenol diterpenes 27 and 28 exhibited strong anti-HIV-1 and anti-HIV-2 activity, with IC<sub>50</sub> values in the hundreds of nanomolar to nanomolar range. Moreover, IC<sub>50</sub> values were found to be systematically lower for HIV-2. The anti-HIV activities observed for compounds 9–11 and 13 are in good agreement with those reported in the literature.<sup>22–25</sup> The selective inhibitory activities against HIV-1 and HIV-2 that were observed for phorbol esters 15, 16, 18, and 19 are reported here for the first time. Compound 16 is a potent PKC activator,<sup>26</sup> but has weak tumor-promoting activity when compared to TPA (13).<sup>27</sup> Compounds 18 and 19 have been essentially studied for their interaction with the vanilloid receptor.<sup>28,29</sup>

Overall, the structure–activity relationships that were established for the anti-CHIKV activities of the phorbol, 12-deoxyphorbol, and ingenol esters investigated (1–28) were found to be similar to those observed for anti-HIV-1 and anti-HIV-2, in terms of the role of the length and the position of the acyl chains at C-12 and C-13, the requirement of a C-4β



**Figure 2.** 3D plot of chemical space of compounds 1–31 using ChemGPS-NP.<sup>39,40</sup> Principal component (PC) 1 is linked to size and shape (PC 1); PC 2 to aromatic- and conjugation-related properties; PC 3 to lipophilicity, polarity, and H-bond capacity. The values of selectivity indices (SI) of the most active compounds are specified. Different views are presented in (a) and (b).

configuration for a strong antiviral effect, and the deleterious effect of the 20-carbonyl group (9 vs 21 and 13 vs 22). Similar observations were made in previous studies.<sup>22,23,30</sup> However, in contrast with our previous results on CHIKV, it can be noted that the nature of the acyloxy chain at C-12 does not play such a vital role for the exhibition of a strong anti-HIV effect. Indeed, no loss of potency was observed when a decanoyl unit was replaced by a tigloyl-substituted side chain (11 vs 15) or when a tetradecanoyl moiety was replaced by an *N*-methylanthranoyl side chain (13 vs 16). When comparing the results of compounds 11 and 18, it is worth pointing out that the presence of a homovanillate ester at C-20 significantly decreased the resultant anti-HIV activities. For the deoxyphorbol derivatives, compounds 24 and 25 showed more potent anti-HIV activity than prostratin (23), which is undergoing human clinical trial development.<sup>31</sup> The presence of a 13-phenylacetyl group (25) instead of a 13-isobutyryl group (24) significantly increased the selectivity of the in vitro anti-HIV activity. A previous study has shown that the structurally closely related 12-deoxyphorbol-13-phenylacetate was 20–40-fold more potent than prostratin in inducing latent HIV-1 via PKC modulation.<sup>32</sup> Compound 24 was shown to be a broad PKC activator in vivo<sup>33,34</sup> but did not show any tumor-promoting activity.<sup>26</sup> Also the anti-HIV effects of ingenol esters 27 and 28 were consistent with data previously reported.<sup>35–38</sup> Finally, the daphnane orthoester 29 exhibited weak anti-HIV-1 and HIV-2 activity.

As a result of the apparent correlation that was observed between the antiviral activities against HIV-1, HIV-2, and CHIKV, a Pearson correlation coefficient was calculated between the  $EC_{50}$  values for each virus pair (Figure 2). The results of this study indicated a strong correlation between the anti-HIV-1 and HIV-2 activities ( $r = 0.95 \pm 0.03$ ) on one hand, but also between the anti-CHIKV and the anti-HIV activities (CHIKV/HIV-1,  $r = 0.81 \pm 0.09$ ; CHIKV/HIV-2,  $r = 0.84 \pm 0.07$ ) on the other hand. At a first glance, these results are

surprising given the fact that CHIKV and HIV belong to two different virus genera, the genus *Alphavirus* and *Lentivirus*, respectively, but most probably can be explained through a common PKC-based mechanism of action.

To expand the interpretation of SARs, the chemical space of diterpene esters 1–29 as well as reference compounds 30 and 31 for CHIKV and HIV replication, respectively, has been generated using ChemGPS-NP.<sup>39</sup> This tool performs a principal component analysis (PCA) based on the various physicochemical properties of the different compounds. The results are presented as a 3D plot (Figure 2) using three principal components (PCs) accounting for 82% of the data set variance. These PCs refer to size and shape (PC 1); aromatic- and conjugation-related properties (PC 2); and lipophilicity, polarity, and H-bond capacity (PC 3). The results of ChemGPS-NP supported the preliminary SAR observations formulated above. In particular, they illustrated that compounds 11 and 13, which exhibit the most selective anti-CHIKV activity (SI = 686 and 1935, respectively), possess a large molecular size and are relatively nonpolar. However, the results for 12, 14, 15, and 18 (SI < 5) showed that these physical properties are not sufficient to predict anti-CHIKV activity. Furthermore, 5 and 23, which are relatively smaller in size and more polar in comparison with the other diterpene esters evaluated, showed selective anti-CHIKV activities (SI = 12 and 22.8, respectively).

A large number of naturally occurring<sup>22,41</sup> and chemically modified phorbol and deoxyphorbol esters<sup>15,24,42</sup> have been investigated for their potential pro-inflammatory and tumor-promoting activities. In these studies, it has been shown that the C-4 configuration, hydrophobicity, and C-20 functional group are key parameters that modulate these biological activities. Indeed, most of the active compounds share a C-20 hydroxy group and a C-4 $\beta$  configuration and possess long-chain ester moieties at C-12 and C-13.<sup>43,44</sup> The mechanism of action by which these compounds act at the molecular level involves modulation of the activity of protein kinase C isozymes<sup>17,45</sup>

through interaction with their cysteine-rich C1 domain.<sup>19</sup> PKCs belong to the superfamily of serine threonine kinases that play a central role in intracellular signal transduction implicated in a wide variety of cellular functions.<sup>19</sup> It had been shown that an oxygenated functionality at C-20 and the *O*-acyl function at C-13 of tigliane-type diterpenes are essential for their interaction with PKC, as well as their skin-irritant and tumor-promoting bioactivities.<sup>16</sup> Nonetheless, the hydrophobicity of phorbol esters appears to be a critical factor that contributes to these biological properties, because it induces different translocation patterns of PKCs in the cell.<sup>46–49</sup> In particular, stimulation by the highly hydrophobic TPA (13) leads to translocation of the enzyme to the cell membrane.<sup>49</sup> Taking into account that the mechanism of inhibition of HIV replication by phorbol esters,<sup>22–24,30,50,51</sup> deoxyphorbol esters,<sup>32,52</sup> and ingenol esters<sup>35,36</sup> has been reported to be linked to PKC stimulation and that an apparent correlation was found between anti-CHIKV and anti-HIV activities, we also postulate that the anti-CHIKV activity of diterpene esters might also result from their ability to modulate PKCs. Furthermore, this assumption is supported by similar SARs in both cases. However, some results obtained herein could indicate a different role for PKCs in the anti-CHIKV and anti-HIV activities or different PKC isoforms involved in each virus life cycle. Indeed, 27, a broad potent PKC modulator,<sup>53</sup> showed no anti-CHIKV activity, while it exhibited extremely potent activity on HIV replication. In comparison to TPA (13), another potent PKC modulator, it has been shown that compound 27 stimulated a different pattern of PKC translocation, leading to different biological responses.<sup>53</sup> Keeping in mind that 27 elicited no anti-CHIKV activity and the fact that the hydrophobicity of phorbol esters played a preeminent role, the present results may suggest that the pattern of PKC translocation could be an important factor in the mechanism of action of diterpene esters against CHIKV replication.<sup>10,54</sup>

In conclusion, the current study has allowed the development of preliminary SAR observations among tigliane diterpene esters for CHIKV replication. It has also revealed that ingenane-type esters can exhibit anti-CHIKV activity. Evaluation of compounds 1–29 for selective inhibition of HIV-1 and HIV-2 replication indicated an apparent strong correlation between anti-CHIKV/HIV activities. Furthermore, similar SARs were implicated for inhibition activities of CHIKV and HIV replication, which strengthen the hypothesis of a PKC-dependent mechanism. Finally, potent and selective inhibition of HIV-1 and HIV-2 replication exhibited by phorbol esters 15, 16, 18, and 19 and 12-deoxyphorbol-13,20-diester 24 and 25 is described in this report for the first time.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**Reference Standards.** The purities of the reference compounds were >98%, as determined by HPLC analysis. The following compounds were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany): phorbol (1), phorbol-12-acetate (2), phorbol-12-decanoate (3), phorbol-13-acetate (4), phorbol-13-butyrate (5), phorbol-13-decanoate (6), phorbol-13-tetradecanoate (7), phorbol-12,13-diacetate (8), phorbol-12,13-dibutyrate (9), phorbol-12,13-dihexanoate (10), phorbol-12,13-didecanoate (11), 4 $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate (12), 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (13), 12-*O*-tetradecanoyl-4 $\alpha$ -phorbol-13-acetate (4 $\alpha$ -TPA) (14), 12-*O*-tiglylphorbol-13-decanoate (15), 12-*O*-(*N*-methylanthranilate) phorbol-13-acetate (sapintoxin D) (16), phorbol-13,20-diacetate (17), 12,13-*O*,*O'*-dionanoylphorbol-20-homovanillate (18), 12-*O*-phenylacetyl-13-*O*-acetylphorbol-20-homovanillate (19), phorbol-12,13,20-

triacetate (20), 20-oxo-20-deoxyphorbol-12,13-dibutyrate (21), 12-*O*-tetradecanoyl-20-oxo-20-deoxyphorbol-13-acetate (22), 12-deoxyphorbol-13-acetate (prostratin) (23), 13-*O*-isobutyryl-12-deoxyphorbol-20-acetate (24), 13-*O*-phenylacetyl-12-deoxyphorbol-20-acetate (25), ingenol (26), ingenol-3,20-dibenzoate (28), and resiniferatoxin (29). Ingenol-3-mebutate (ingenol-3-angelate) (27) was purchased from Coges SAS (Paris, France).

**CHIKV Virus-Cell-Based Antiviral Assay.** Throughout the experiments, Vero (African green monkey kidney) cells were used. Chikungunya virus (Indian Ocean strain 899), kindly provided by C. Drosten (Institute of Virology, University of Bonn, Germany), was used. Serial dilutions of the test compounds, as well as the reference compound, chloroquine, were prepared in 100  $\mu$ L of assay medium [MEM Rega3 (cat. no. 19993013; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL of 200 mM L-glutamine, and 5 mL of 7.5% sodium bicarbonate] and added to empty wells of a 96-well microtiter plate (Falcon, BD). Subsequently, 50  $\mu$ L of a 4 $\times$  virus dilution in assay medium was added, followed by 50  $\mu$ L of a cell suspension. This suspension, with a cell density of 25 000 cells/50  $\mu$ L, was prepared from a Vero cell line subcultured in cell growth medium (MEM Rega3, supplemented with 10% FCS, 5 mL of L-glutamine, and 5 mL of sodium bicarbonate) at a ratio of 1:4 and grown for 7 days in 150 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Techno Plastic Products). The assay plates were returned to the incubator for 6–7 days (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95–99% relative humidity), a time at which maximal virus-induced cell death or cytopathic effect (CPE) is observed in untreated, infected controls.

Subsequently, the assay medium was aspirated, replaced with 75  $\mu$ L of a 5% MTS (Promega) solution in phenol red-free medium, and incubated for 1.5 h. Absorbance was measured at a wavelength of 498 nm (Safire2, Tecan), with the optical densities (OD values) reaching 0.6–0.8 for the untreated, uninfected controls. Raw data were converted to percentages of controls, and the EC<sub>50</sub> (50% effective concentration, or concentration calculated to inhibit virus-induced cell death by 50%) and CC<sub>50</sub> (50% antimetabolic concentration, or concentration that is calculated to inhibit the overall cell metabolism by 50%) values were derived from the dose–response curves. All assay conditions producing an antiviral effect that exceeded 50% were checked microscopically for 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). Multiple, independent experiments were performed.

**HIV Virus-Cell-Based Antiviral Assay.** Evaluation of the antiviral activity of the test compounds against HIV-1 (strain IIIB) and HIV-2 strain (strain ROD) in MT-4 cells was performed using the MTT assay as previously described.<sup>55</sup> Azidothymidine was used as positive control. Stock solutions of the test compounds were added in 25  $\mu$ L volumes to two series of triplicate wells to allow simultaneous evaluation of their effects on mock- and HIV-infected cells at the beginning of each experiment. Serial 5-fold dilutions of test compounds were made directly in flat-bottomed 96-well microtiter trays using a Biomek 3000 robot (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Untreated control HIV- and mock-infected cell samples were included for each sample. HIV-1 (IIIB) or HIV-2 (ROD) stock (50  $\mu$ L) at 100–300 CC/IC<sub>50</sub> (50% cell culture infectious dose) or culture medium was added to microtiter tray wells. Mock-infected cells were used to evaluate the effect of test compound on uninfected cells in order to assess the cytotoxicity of the test compound. Exponentially growing MT-4 cells were centrifuged for 5 min at 1000 rpm, and the supernatant was discarded. The MT-4 cells were resuspended at 66  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL, and a 50  $\mu$ L volume was transferred to the microtiter tray wells. Five days after infection, the viability of mock- and HIV-infected cells was examined spectrophotometrically by the MTT assay. The MTT assay is based on the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Across Organics, Geel, Belgium) by mitochondrial dehydrogenase of metabolically active cells to a blue-purple formazan that can be measured spectrophotometrically. The absorbances were read in an



eight-channel computer-controlled photometer (Multiscan Ascent Reader, LabSystem, Helsinki, Finland) at two wavelengths (540 and 690 nm). All data have been calculated using the median OD value of three wells. The antiviral experiments were performed in a biosafety screening facility that has been validated for handling of virus as well as the manipulation of molecules of unknown chemical safety risk. All studies have been performed by trained staff.

**ChemGPS-NP.** Chemical space for all structures was calculated using ChemGPS-NP online Web service.<sup>40</sup> The 3D plot was generated using the Plot3D package (v. 1.0-2) in R software<sup>56</sup> via the Rcmdr graphical interface.<sup>57</sup>

**Statistical Analysis.** Pearson product-moment correlation coefficients ( $r$ ) of antiviral activities were computed with the R program<sup>56</sup> and using a Pearson product-moment correlation test from the R Commander package.<sup>57</sup> This correlation coefficient measures the strength and direction of the linear relationship between two variables, describing the direction and degree to which one variable is linearly related to another.<sup>58</sup> The Pearson correlation coefficient can take values ranging from  $-1$  to  $+1$ . A value of  $1$  shows that the variables are perfectly linear related by an increasing relationship, whereas a value of  $-1$  indicates that the variables are perfectly linear related by a decreasing relationship, and a value of  $0$  shows that no linear correlation exists between the variables. A strong correlation exists if  $|r| > 0.8$  and a weak correlation if  $0.5 > |r| > 0$ .

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*Tel: + 33 1 69 82 30 85. Fax: + 33 1 69 07 72 47. E-mail: marc.litaudon@cnrs.fr. (M. Litaudon).

\*Tel: + 33 4 95 45 01 97. Fax: + 33 4 95 45 02 57. E-mail: paolini@univ-corse.fr. (J. Paolini).

### Author Contributions

<sup>†</sup>Both senior investigators, M. Litaudon and J. Paolini, contributed equally to the work supervision.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work has benefited from an “Investissement d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref ANR-10-LABX-25-01). We would like to acknowledge K. Erven, S. Delmotte, C. Collard, N. Verstraeten, and C. Vanderheydt for their excellent technical assistance in the acquisition of the antiviral data. Also, we would like to thank Prof. A. Backlund (Uppsala University, Sweden) for his advice concerning the use of ChemGPS-NP.

## REFERENCES

- (1) Powers, A. *Res. Rep. Trop. Med.* **2015**, *6*, 11–19.
- (2) Charrel, R. N.; Leparç-Goffart, I.; Gallian, P.; de Lamballerie, X. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 662–663.
- (3) Thiberville, S.-D.; Moyen, N.; Dupuis-Maguiraga, L.; Nougairède, A.; Gould, E. A.; Roques, P.; de Lamballerie, X. *Antiviral Res.* **2013**, *99*, 345–370.
- (4) Singh, P.; Chhabra, M.; Mittal, V.; Sharma, P.; Rizvi, M. A.; Chauhan, L.; Rai, A. *Vaccine Dev. Ther.* **2013**, *35*–46.
- (5) Kaur, P.; Chu, J. H. *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 969–983.
- (6) Rashad, A. A.; Mahalingam, S.; Keller, P. A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1147–1166.
- (7) Allard, P.-M.; Leyssen, P.; Martin, M.-T.; Bourjot, M.; Dumontet, V.; Eydoux, C.; Guillemot, J.-C.; Canard, B.; Poullain, C.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *Phytochemistry* **2012**, *84*, 160–168.
- (8) Corlay, N.; Delang, L.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Clerc, P.; Smadja, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *Fitoterapia* **2014**, *97*, 87–91.
- (9) Bourjot, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Litaudon, M. *Molecules* **2014**, *19*, 3617–3627.
- (10) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retailleau, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Costa, J.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1505–1512.
- (11) Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2183–2187.
- (12) Evans, F. J.; Schmidt, R. J. *Inflammation* **1979**, *3*, 215–223.
- (13) Opferkuch, H. J.; Hecker, E. J. *Cancer Res. Clin. Oncol.* **1982**, *103*, 255–268.
- (14) Evans, F. J.; Taylor, S. E. *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **1983**, *44*, 1–99.
- (15) Furstenberger, G.; Hecker, E. Z. *Naturforsch. C* **1985**, *40*, 631–646.
- (16) Krauter, G.; Von Der Lieth, C.-W.; Schmidt, R.; Hecker, E. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242*, 417–427.
- (17) Saraiva, L.; Fresco, P.; Pinto, E.; Gonçalves, J. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *491*, 101–110.
- (18) Goel, G.; Makkar, H. P. S.; Francis, G.; Becker, K. *Int. J. Toxicol.* **2007**, *26*, 279–288.
- (19) Das, J.; Rahman, G. M. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 12108–12131.
- (20) Ogbourne, S. M.; Parsons, P. G. *Fitoterapia* **2014**, *98*, 36–44.
- (21) Boyle, G. M.; D’Souza, M. M. A.; Pierce, C. J.; Adams, R. A.; Cantor, A. S.; Johns, J. P.; Maslovskaya, L.; Gordon, V. A.; Reddell, P. W.; Parsons, P. G. *PLoS One* **2014**, *9*, e108887.
- (22) El-Mekkawy, S.; Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 457–464.
- (23) Márquez, N.; Calzado, M. A.; Sánchez-Duffhues, G.; Pérez, M.; Minassi, A.; Pagani, A.; Appendino, G.; Diaz, L.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Muñoz, E. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1370–1380.
- (24) Hossain Chowdhury, M. I.; Koyanagi, Y.; Kobayashi, S.; Hamamoto, Y.; Yoshiyama, H.; Yoshida, T.; Yamamoto, N. *Virology* **1990**, *176*, 126–132.
- (25) Hattori, M. U.S. Pat. 6,268,395 B1, 2001.
- (26) Davies, A. H.; Grand, R. J.; Evans, F. J.; Rickinson, A. B. *J. Virol.* **1991**, *65*, 6838–6844.
- (27) McLean, J. R.; Plant, M.; Lecuyer, D. W.; Davidson, C.; Truong, J. J. *Pharm. Pharmacol.* **1995**, *47*, 263–263.
- (28) Appendino, G.; Cravotto, G.; Palmisano, G.; Annunziata, R.; Szallasi, A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3123–3131.
- (29) Ralevic, V.; Jerman, J. C.; Brough, S. J.; Davis, J. B.; Egerton, J.; Smart, D. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 143–151.
- (30) El-Mekkawy, S.; Meselhy, M. R.; Abdel-Hafez, A. A.-M.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 523–529.
- (31) AIDS Research Alliance. Moving Ahead: Prostratin Experiments Requested by the FDA. <http://aidsresearch.org/news-events/news/moving-ahead-prostratin-experiments-requested-by-the-fda> (accessed Apr 3, 2015).
- (32) Bocklandt, S.; Blumberg, P. M.; Hamer, D. H. *Antiviral Res.* **2003**, *59*, 89–98.
- (33) Roivainen, R.; Messing, R. O. *FEBS Lett.* **1993**, *319*, 31–34.
- (34) Kiley, S. C.; Olivier, A. R.; Gordge, P. C.; Ryves, W. J.; Evans, F. J.; Ways, D. K.; Parker, P. J. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 319–324.
- (35) Fujiwara, M.; Okamoto, M.; Ijichi, K.; Tokuhisa, K.; Hanasaki, Y.; Katsura, K.; Uemura, D.; Shigeta, S.; Konno, K.; Yokota, T. *Arch. Virol.* **1998**, *143*, 2003–2010.
- (36) Warrilow, D.; Gardner, J.; Darnell, G. A.; Suhrbier, A.; Harrich, D. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2006**, *22*, 854–864.
- (37) Pandeló José, D.; Bartholomeussen, K.; da Cunha, R. D.; Abreu, C. M.; Gliniski, J.; da Costa, T. B. F.; Bacchi Rabay, A. F. M.; Pianowski Filho, L. F.; Dudycz, L. W.; Ranga, U.; Peterlin, B. M.; Pianowski, L. F.; Tanuri, A.; Aguiar, R. S. *Virology* **2014**, *462*–463, 328–339.
- (38) Jiang, G.; Mendes, E. A.; Kaiser, P.; Sankaran-Walters, S.; Tang, Y.; Weber, M. G.; Melcher, G. P.; Thompson, G. R.; Tanuri, A.; Pianowski, L. F.; Wong, J. K.; Dandekar, S. *AIDS* **2014**, *28*, 1555–1566.
- (39) Larsson, J.; Gottfries, J.; Muresan, S.; Backlund, A. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 789–794.

- (40) Rosén, J.; Lövgren, A.; Kogej, T.; Muresan, S.; Gottfries, J.; Backlund, A. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2008**, *23*, 253–259.
- (41) Hecker, E.; Schmidt, R. *Forstchr. Chem. Org. Naturstoffe* **1974**, *31*, 377–467.
- (42) Adolf, W.; Hecker, E. *Isr. J. Chem.* **1977**, *16*, 75–83.
- (43) Hecker, E. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94*, 197–219.
- (44) Rippmann, F. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1990**, *9*, 1–5.
- (45) Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U.; Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7847–7851.
- (46) Mochly-Rosen, D.; Henrich, C. J.; Cheever, L.; Khaner, H.; Simpson, P. C. *Cell Regul.* **1990**, *1*, 693–706.
- (47) Mochly-Rosen, D.; Gordon, A. S. *FASEB J.* **1998**, *12*, 35–42.
- (48) Wang, Q. J.; Bhattacharyya, D.; Garfield, S.; Nacro, K.; Marquez, V. E.; Blumberg, P. M. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37233–37239.
- (49) Wang, Q. J.; Fang, T.-W.; Fenick, D.; Garfield, S.; Bienfait, B.; Marquez, V. E.; Blumberg, P. M. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12136–12146.
- (50) Golding, H.; Manischewitz, J.; Vujcic, L.; Blumenthal, R.; Dimitrov, D. S. *J. Virol.* **1994**, *68*, 1962–1969.
- (51) Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Newman, D. J.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 769–772.
- (52) Gustafson, K. R.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Gulakowski, R. J.; Ishitoya, J.; Szallasi, Z.; Lewin, N. E.; Blumberg, P. M.; Weislow, O. S. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1978–1986.
- (53) Kedei, N.; Lundberg, D. J.; Toth, A.; Welburn, P.; Garfield, S. H.; Blumberg, P. M. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3243–3255.
- (54) Litaudon, M.; Nothias, L.; Allard, P.; Bourjot, M.; Dumontet, V.; Guéritte, F.; Delang, L.; Pannecouque, C.; Leyssen, P. *Planta Med.* **2013**, *79*, PN44.
- (55) Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309–321.
- (56) R. Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, 2014.
- (57) Fox, J. *J. Stat. Softw.* **2005**, *14* (i09).
- (58) Bolboaca, S.-D.; Jäntschi, L. *Leonardo J. Sci.* **2006**, *9*, 179–200.

## II. 3. Article n°3 : Insights on Profiling of Phorbol, Deoxyphorbol, Ingenol and Jatrophanone Diterpene Esters by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Multiple Stage Mass Spectrometry

*Les informations complémentaires sont disponibles sur internet à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.092>*



Figure 35. *Euphorbia hyberna* subsp. *insularis*. Bocca di Vergio. Photo : L.-F. N.-S.





# Insights on profiling of phorbol, deoxyphorbol, ingenol and jatrophane diterpene esters by high performance liquid chromatography coupled to multiple stage mass spectrometry

Louis-Félix Nothias-Scaglia<sup>a,b</sup>, Isabelle Schmitz-Afonso<sup>b,1</sup>, Franck Renucci<sup>a</sup>, Fanny Roussi<sup>b</sup>, David Touboul<sup>b</sup>, Jean Costa<sup>a</sup>, Marc Litaudon<sup>b,\*</sup>, Julien Paolini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie de Produits Naturels, UMR CNRS SPE 6134, University of Corsica, Corte 20250, France

<sup>b</sup> Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, UPR 2301, LabEx CEBA, University Paris-Saclay, 1 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 9 June 2015

Received in revised form 7 September 2015

Accepted 30 September 2015

Available online 13 October 2015

### Keywords:

Phorbol

Deoxyphorbol

Ingenol

Jatrophane

Diterpene esters

HPLC-MS<sup>n</sup>

## ABSTRACT

This paper reports our effort to develop a comprehensive HPLC-MS<sup>n</sup>-based dereplication strategy for phorbol ester (PE), deoxyphorbol ester (dPE) and ingenol ester (IE) profiling in plant extracts. This strategy is composed of two sequential analysis exploiting specific hybrid triple quadrupole/linear ion trap instrument modes. A first run was performed using a multiple reaction monitoring (MRM) mode targeting fragmentation of PE and dPE/IE coupled with the acquisition of MS<sup>2</sup> spectrum for the ions at *m/z* 311 and *m/z* 313, respectively. A second run was then completed based on precursor ion scan mode (PIS) and automatic MS<sup>2</sup> acquisition for each quasimolecular ion. The developed approach was used to investigate ten *Euphorbia* extracts showing bioactivity against chikungunya virus replication. Experiments allowed partial annotation of three dPE/IE but no PE was detected. Results suggested that other types of diterpene esters displayed PE- and dPE/IE-like fragmentations. The study of jatrophane ester (JE) standards by CID fragmentation using low and high resolution mass spectrometry confirmed this hypothesis, highlighting challenges and difficulties of diterpene esters profiling within plant extracts. Nonetheless, the present LC-MS<sup>n</sup> method can be easily adapted to profile other types of diterpene esters.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Within natural products chemistry, lower diterpenes from Euphorbiaceae and Thymelaeaceae species represent a unique group of structurally highly diverse compounds [1–4]. From *Euphorbia* species, over 550 isolated diterpene esters, incorporating more than 20 skeletal types, have been isolated up to date [5]. In an effort to identify novel inhibitors of CHIKV (chikungunya virus) replication, we recently found that *Euphorbia* extracts displayed potent anti-CHIKV activity [6]. Diterpene esters such as tiglane, ingenane, daphnane and jatrophane-types were found to be potent and selective inhibitors of CHIKV replication [7–11]. In particular, tiglane-type diterpenes, such as TPA (12-O-tetradecanoylphorbol

13-acetate) and phorbol 12,13-didecanoate were found to display potent anti-CHIKV activity [11], but are also known to display strong tumor-promoting and pro-inflammatory activities [12–14] by their ability to modulate PKC (protein kinases isoenzymes) [15].

In order to develop a dereplication method, a targeted high performance liquid chromatography coupled to multiple stage mass spectrometry (HPLC-MS<sup>n</sup>) method was developed and applied for the screening of twenty-nine reference standards of diterpene esters in *Euphorbia* extracts displaying anti-CHIKV activity [6,11]. By this mean, no known anti-CHIKV compound could be detected in antiviral *Euphorbia* extracts. However, taking into account that lower diterpene esters from Euphorbiaceae are known to exhibit a large diversity of acyl groups and that bioactivity-guided purification is a time-consuming task, a holistic profiling strategy was needed. A HPLC-UV method using basic hydrolysis of *Euphorbia* extracts was developed to release, identify and quantify the alcohol parent backbone of the corresponding diterpene ester [16]. Several HPLC-MS based methods targeting commercial and isolated compounds were developed in order to monitor diterpene esters of tiglane [17,18], ingenane [19–22], jatrophane [21,22], lathyrane [19,23,24] and daphnane-types [25,26]. Furthermore,

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [marc.litaudon@cnrs.fr](mailto:marc.litaudon@cnrs.fr) (M. Litaudon), [paolini@univ-corse.fr](mailto:paolini@univ-corse.fr) (J. Paolini).

<sup>1</sup> Present address: Normandie Univ, COBRA, UMR 6014 and FR 3038; Université de Rouen; INSA Rouen; CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.



CID (Collision-induced dissociation) fragmentation behavior of ingenane [27,28] and lathyran-type esters [29] were studied. Using a triple quadrupole apparatus (QqQ), Vogg and collaborators developed a HPLC-MS<sup>2</sup> strategy to profile phorbol esters (PE), deoxyphorbol esters (dPE) and ingenol esters (IE) within plant extracts [30]. This profiling strategy required the carrying-out of three consecutive steps (i) a first analysis in MRM (multiple reaction mode) to specifically detect PE ( $m/z$  311 → 293 and 293 → 265) and dPE/IE ( $m/z$  313 → 295 and 295 → 267), (ii) a second run to detect the precursor ions of PE ( $m/z$  311) or dPE/IE ( $m/z$  313) in PIS (precursor ion scan) and (iii) a final analysis by acquiring MS<sup>2</sup> spectra of the detected precursors. Method validation was performed using a mixture of commercial standards and two Euphorbiaceae extracts (*Euphorbia leuconeura* and *Croton tiglium*). Main advantage of this approach relies in its ability to detect any derivatives belonging to PE, dPE and IE regardless their acyl substituents, without requirement of reference standards. PE profiling of *Jatropha curcas* oil were also performed by single reaction monitoring (SRM) using the following transitions:  $m/z$  311 → 293 [31], or 293 → 265 [32], or 311 → 165 [33].

In this paper, a novel HPLC-MS<sup>n</sup> protocol exploiting specific hybrid QqQ/linear ion-trap instrument mode was developed to profile PE, dPE and IE in complex matrices. Composed of only two-steps, this protocol offers a robust annotation for this kind of secondary metabolites. It was used as a dereplication tool to investigate the putative presence of PE, dPE or IE in *Euphorbia* extracts with anti-CHIKV activity. The application of this analytical approach led to the detection of other type of diterpene esters in plant extracts such as jatrophone ester (JE). Thus, in order to explore this hypothesis, the CID fragmentation of jatrophone esters (JE) were studied using low and high resolution mass spectrometry.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material and extract preparation

The vegetal materials of ten *Euphorbia* species were collected on different locations in Corsica Island (France) during July and August 2011. A voucher specimen of each species has been deposited at the Herbarium of the CPN laboratory at the University of Corsica (Corte). *Euphorbia* vegetal materials were air-dried for a period of three weeks at ambient temperature: *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* (whole plant), *Euphorbia biumbellata* (whole plant), *Euphorbia characias* ssp. *characias* (leaves), *Euphorbia pithyusa* ssp. *pithyusa* (leaves and flowers), *Euphorbia segetalis* ssp. *pinia* (roots), *Euphorbia spinosa* (leaves). The harvested plants were powdered using a blade miller (PX-MCF 90D Kinematica). All samples were extracted with 3 × 100 mL of ethyl acetate (EtOAc) using an automatic solvent extractor (ASE 200). The maceration was carried out for 15 min at 40 °C and 34 bar. The solution was evaporated to dryness *in vacuo* yielding dried extract. The *Euphorbia* latex samples were collected into EtOH after making cuts on stalks: *Euphorbia dendroides* (latex), *Euphorbia hyberna* ssp. *insularis* (latex), *Euphorbia maculata* (latex), *Euphorbia peplus* (latex). A whitish precipitate was removed from the latex by cotton filtration. Filtrates were evaporated to dryness *in vacuo* yielding crude extracts. The latter filtrates were partitioned by liquid–liquid extraction with EtOAc and water. All extracts were stored at 4 °C until analysis. Solvents used for sample extraction were purchased from VWR (France).

### 2.2. Standards and sample preparation

Solvents used for sample preparation and chromatography were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France): LC-MS grade ACN (acetonitrile) and MeOH (methanol), FA (formic acid). Deionized

water was purified by Milli-Q water Millipore (Bedford, USA) purification system. Commercial reference standards of PE **1–6**, dPE **7, 8** and IE **9, 10** (Fig. 1) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany). Their purity was estimated over 98% by HPLC. Jatrophone esters (JE) **11–22** were isolated by the authors from *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* [8]. Their structures were fully characterized by NMR, MS and X-ray crystallography and purity over 95% were determined by NMR and LC-MS. Solutions of reference compounds were prepared by dissolving the compounds in MeOH at 1 mg/mL and then filtered on 0.2 μm PTFE filter. Flow injection analyzes (FIAs) by MS were performed with each reference solution at a concentration of 0.1 mg/mL in 8:2 ACN/H<sub>2</sub>O + 0.05% FA. Extract samples for HPLC-MS<sup>n</sup> analysis were prepared by dissolving extracts in MeOH at 2.5 mg/mL and then filtered on 0.2 μm PTFE filter.

### 2.3. HPLC-MS instrumentation

#### 2.3.1. Multiple stage mass spectrometry instrumentation

Multiple stage MS experiments were performed using a 3200 QTRAP AB Sciex (Framingham, MA, USA) hybrid QqQ/linear ion trap mass spectrometer fitted with an electrospray (ESI) Turbo V<sup>TM</sup> ion source operating in positive mode. High purity nitrogen N<sub>2</sub> was used both as nebulizer and turbo gas. The HPLC system consists of a Flexar HPLC PerkinElmer (Waltham, MA, USA) made up of two Flexar FX-10 HPLC pump, a Flexar solvent manager, a 275-Flexar autosampler and a Flexar LC PE200 column oven.

#### 2.3.2. FIA-MS

The ESI source parameters used for FIA-MS (flow injection analysis-mass spectrometry) were set as follow: CUR (curtain gas): 10 psi; CAD (collision gas): high; GS1 (nebulizer gas): 20 psi; GS2 (heater gas): 0 psi; IS (ion spray voltage): 5000 V; temperature: 150 °C. The software used for data acquisition and data analysis was Analyst version 1.5.1 (AB Sciex, Framingham, MA, USA).

#### 2.3.3. HPLC-MS<sup>n</sup> analysis of standards

HPLC separations were performed using a LUNA 3U C18 column (150 mm × 4.6 mm × 3 μm, Phenomenex) and the column compartment temperature was set at 25 °C. The injected sample volume was 10 μL using an injection loop of 15 μL in partial loop mode. The mobile phase consisted in milliQ water (solvent A) and ACN (solvent B) each containing 0.05% FA. Flow rate was set at 1200 μL/min in order to achieve optimum peak capacity [34]. The column was equilibrated in 50% B (4 min) and elution was carried out at 1200 μL/min flow rate with the following steps: 50% B for 0.5 min, followed by a linear gradient from 50 to 75% B during 9.5 min; increase from 75% B to 100% in 2 min; and 100% B during 5.5 min. The ESI source parameters were optimized to achieve best signal-to-noise ratio (S/N) of the quasimolecular ion intensity of diterpenoid standards, and the following parameters were used for each HPLC-MS<sup>n</sup> analysis: CUR: 25 psi; CAD: high; GS1: 50 psi; GS2: 50 psi; IS: 5000 V; temperature: 525 °C. MS<sup>2</sup> spectra were acquired using EPI (enhance product ion) scan, with the following parameters: Q1 resolution: unit, Q3 resolution: unit; DP (declustering potential): 70 V; EP (entrance potential): 10 V; CE (collision energy): 35 eV and CES (collision energy spread): ±15 eV; range scan rate: 4000 Da/s and with dynamic fill time.

#### 2.3.4. Untargeted HPLC-MS<sup>n</sup>

The experiments were performed by using ion trap full scan MS (EMS) experiment followed by a MS<sup>2</sup> scan triggered by IDA (information dependent acquisition). The  $m/z$  range used for EMS and MS<sup>2</sup> (EPI) experiments was from 100 to 1000. IDA properties were set to

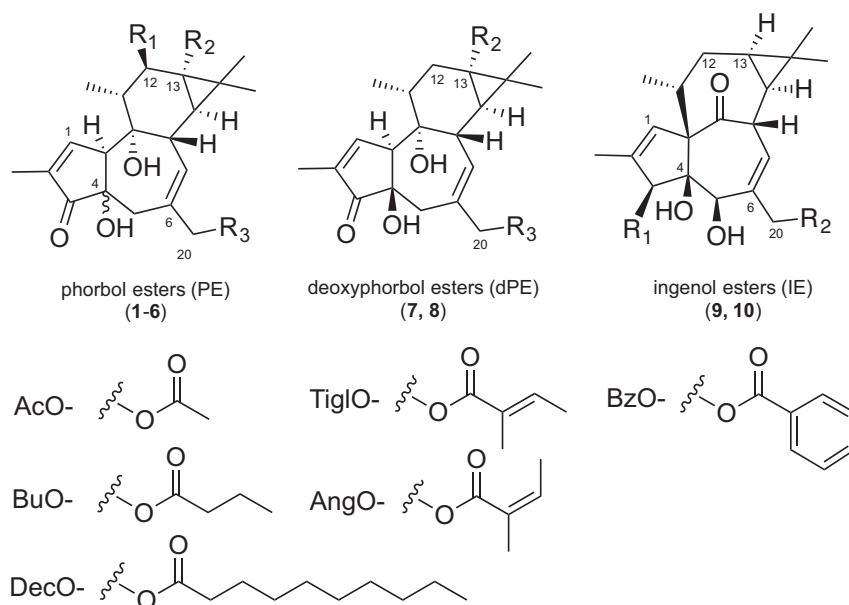


Fig. 1. Structure of PE (1–6), dPE (7, 8) and IE (9, 10) used in this study.

select 1–3 peaks above 30,000 counts, and with an exclusion rule after 5 occurrences for 25 s with dynamic background subtraction.

### 2.3.5. Two-steps HPLC-MS<sup>n</sup> method for PE, dPE and IE profiling

The method is composed of two separate injections with a first run consisting of a HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis and a second of a HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis. Under mild conditions in ESI positive ion mode, quasimolecular [M+Na]<sup>+</sup> ions were formed and underwent in-source fragmentation. MRM-MS<sup>2</sup> analysis allowed monitoring transitions induced by CID fragmentation of PE 1–6 ( $m/z$  311 → 293

and 311 → 283) and dPE/IE 7–10 ( $m/z$  313 → 295 and 313 → 285), and performed automatically an MS<sup>2</sup> (EPI: enhanced product ion scan) of the precursor ion ( $m/z$  311 or  $m/z$  313, respectively). CEP (collision cell entrance potential) and CXP (collision cell exit potential) parameters for these transitions were optimized by means of the automated compound optimization function of Analyst software via FIA of representative reference compound into the ESI source. Recording of MS<sup>2</sup> (EPI) fingerprint by FIA-MS and by HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> experiments were performed with a  $m/z$  range from 100 to 400 and a scan rate of 4000 Da/s. MRM parameters were

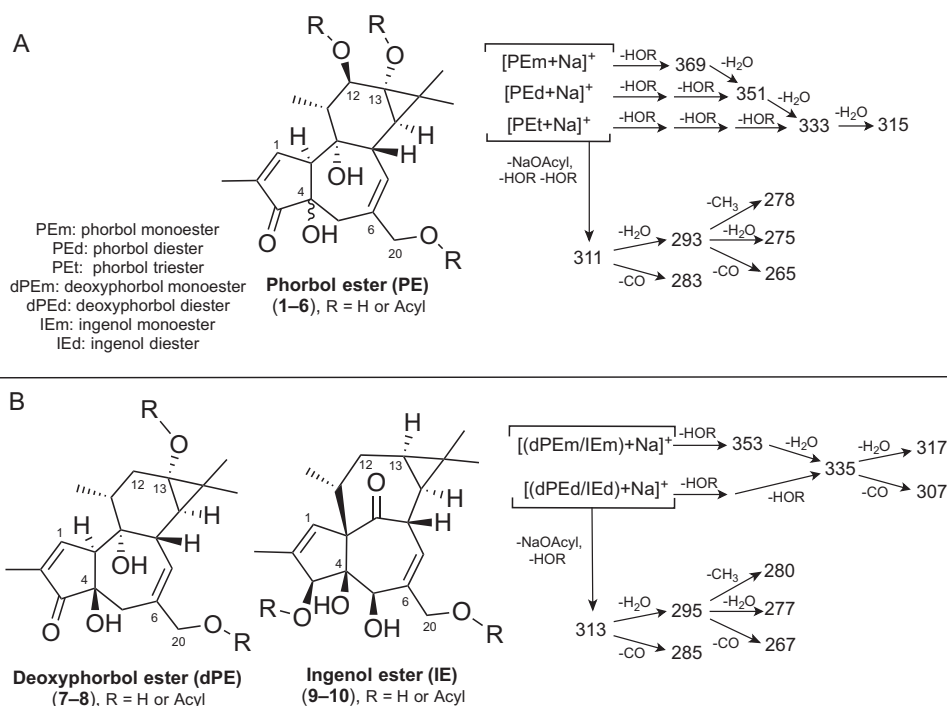


Fig. 2. Fragmentation behavior of PE (Fig. 2A) and dPE/IE (Fig. 2B) in ESI positive ion mode.

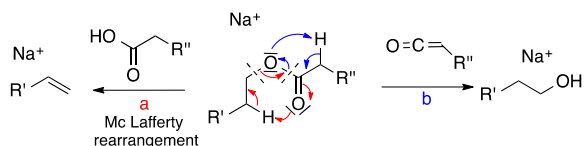


Fig. 3. Fragmentation pathways of acyloxy groups observed in ESI positive ion mode.

set as follow: Q1 resolution: unit, Q3 resolution: low, dwell time: 30 ms. IDA properties were set to select 1–3 peaks above 500 counts with an exclusion filter after 5 occurrences for 10 s with dynamic background subtraction. Second step is composed of a HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis allowing detection of ions that produced  $m/z$  311.17 (PE) or 313.17 (dPE/IE) and an IDA acquisition of MS<sup>2</sup> spectrum of detected ion. For PIS experiment, parameters were set as follow: detection of precursor ions of the fragment ion at  $m/z$  311.17 or  $m/z$  313.17: Q1 resolution: unit, Q3 resolution: unit;  $m/z$  scan range:  $m/z$  400–900 in 2 s, step size: 0.25 Da. MS<sup>2</sup> (EPI) experiments were acquired with a  $m/z$  range from 100 to 900. IDA properties were set to select 1–2 peaks above 1000 counts without exclusion filter and with dynamic background subtraction. Compound identification was allowed based (i) on detection of specific transitions in MRM and through comparison of MS<sup>2</sup> spectra fingerprint in a spectral library (ii) on peaks with S/N ratio > 3 for PIS experiments and by close scrutinization of the resulting MS<sup>2</sup> spectrum.

#### 2.4. HPLC-HRMS<sup>n</sup> analysis of JE

A hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer (LTQ-XL Orbitrap, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) equipped with an ESI source was used in positive ion mode for high resolution and mass accuracy measurements. The main advantage of the ESI-LTQ-XL Orbitrap is its high mass accuracy (standard deviation below 3 ppm), which permits the accurate determination of the fragment ion masses. Mass spectra were acquired between  $m/z$  150 and  $m/z$  1000. In the full scan mode, full width at half maximum mass resolution of the Orbitrap mass analyzer was fixed at 30,000 for MS spectra and at 15,000 for MS<sup>2</sup> spectra. Data-dependent MS<sup>n</sup> mode was used to monitor 1–3 most intense ions with an exclusion duration of 40 s after 8 repetitions. Instrumental parameters were set as follow: source voltage: 5 kV, lens 1 voltage: –15 V, capillary temperature: 275 °C, gate lens voltage: –35 V, capillary voltage: 25 V, tube lens voltage: 65 V. The CID parameters were set as follow: CE at 30% of the maximum and an activation time of 30 ms. HPLC was performed with an HPLC Ultimate 3000 system (Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France) consisting of a degasser, a quaternary pump, an autosampler, a column oven and a photodiode array detector. Separation was achieved using an octadecyl column (Sunfire, 150 × 2.1 mm × 3.5 μm; Waters, Guyancourt, France), equipped with a guard column. Column oven temperature was set at 25 °C. Elution was conducted with a mobile phase consisting of water + 0.1% FA (A) and acetonitrile + 0.1% FA (B), following the gradient 5–95% B in 40 min, then maintaining

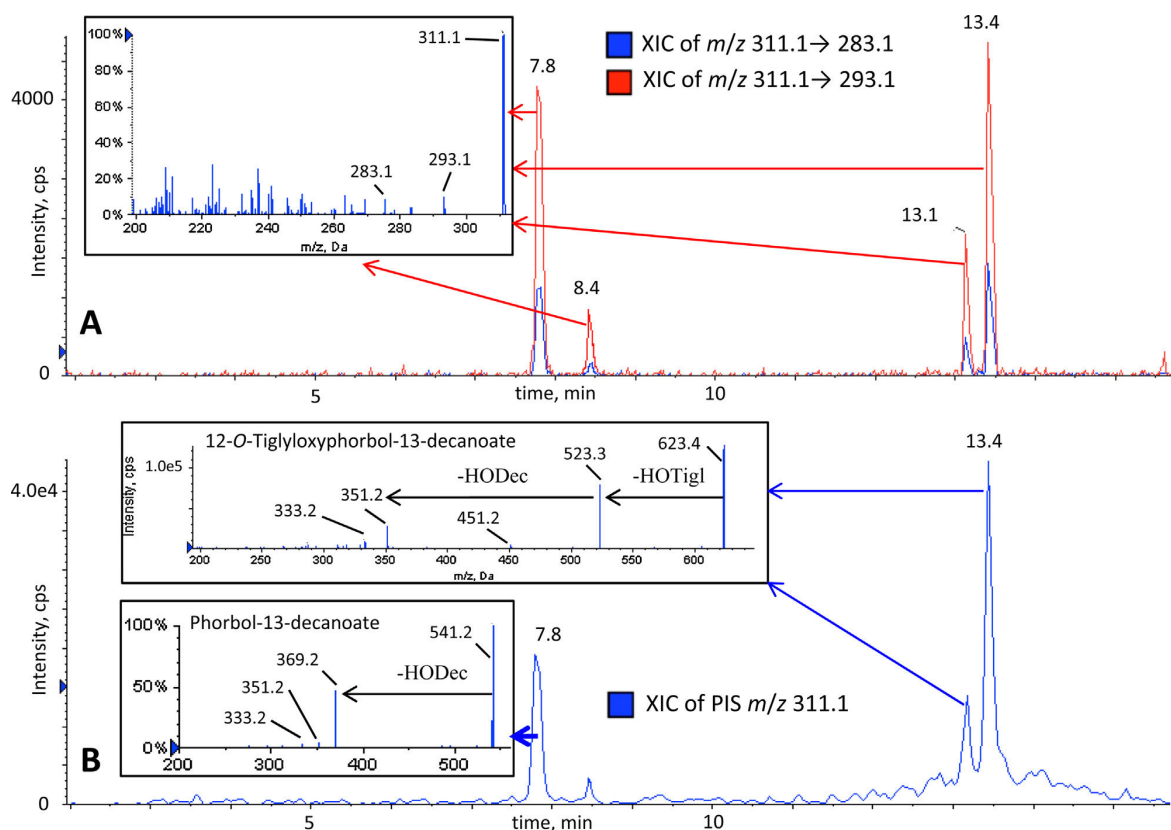
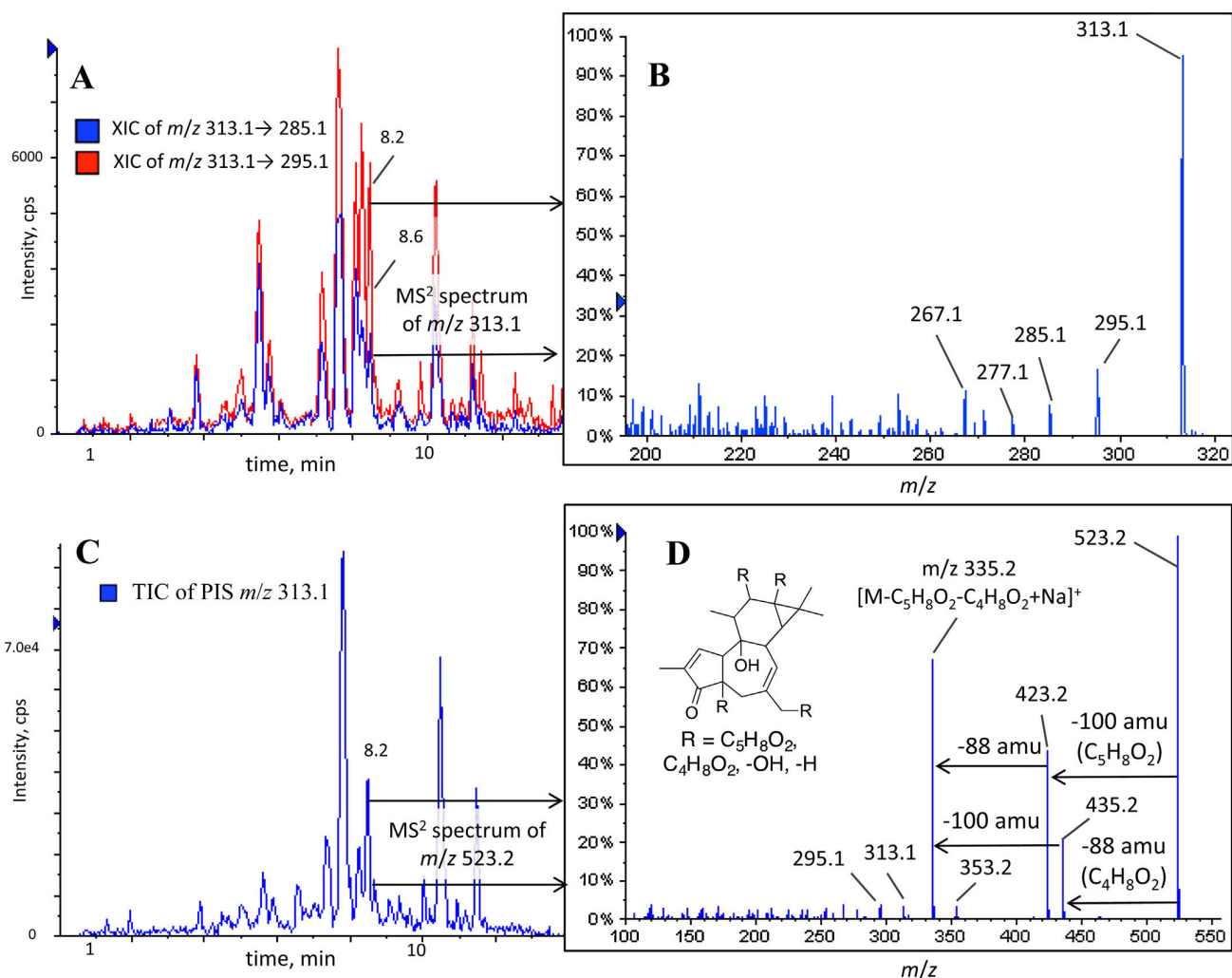


Fig. 4. Validation of the two-step method for PE profiling using a mixture of four reference standards [phorbol 13-decanoate (1), 12-O-tiglyloxyphorbol 13-decanoate (3), 13-isobutyryl-12-deoxyphorbol 20-acetate (7), ingenol 3,20-dibenzoate (10)]. (A) XIC of HPLC-MRM-EPI of  $m/z$  311.1 → 293.1 (red) and  $m/z$  311.1 → 283.1 (blue) and MS<sup>2</sup> spectra of  $m/z$  311.1 at  $R_t$  = 7.8, 8.4, 12.1 and 13.4 min. (B) TIC of PIS  $m/z$  311 from HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> and MS<sup>2</sup> spectra at  $R_t$  = 7.8 and 13.4 min. Adjacent peaks at 8.4 min and 13.4 min are isomers of phorbol 13-decanoate (1) and 12-O-tiglyloxyphorbol 13-decanoate (3), respectively found in reference standards.



**Fig. 5.** Partial annotation of a dPE/IE with HPLC-MS<sup>n</sup> two-steps methodology. (A) XIC of dPE/IE transitions of HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* EtOAc whole plant extract. (B) MS<sup>2</sup> spectrum of *m/z* 313.1 (*R*<sub>t</sub> = 8.2 and 8.6 min) from HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis is matching MS<sup>2</sup> fingerprint of dPE/IE. (C) TIC of PIS *m/z* 313.1 from HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis of the same extract. (D) MS<sup>2</sup> spectrum of *m/z* 523.1 (*R*<sub>t</sub> = 8.2 and 8.6 min) from the HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis. Inspection of MS<sup>2</sup> spectra suggested that these compounds were isomers of dPE/IE bearing a tiglyloxy or an angelylloxy (–100 amu for tiglic acid or angelic acid) and an isobutyryl (–88 amu for isobutyric acid). Based on chemotaxonomic considerations, these compounds were annotated as dPE.

100% B for 10 min at a flow rate of 250  $\mu$ L/min. Injection volume was fixed at 10  $\mu$ L.

High resolution MS data of JE **11–22** obtained with the LTQ-XL Orbitrap mass spectrometer have been deposited on Global Natural Products Social Molecular Networking public spectral library (nos. GNPS CCMSLIB00000418018, CCMSLIB00000424718, CCM-SLIB00000424728, <http://gnps.uscd.edu/>).

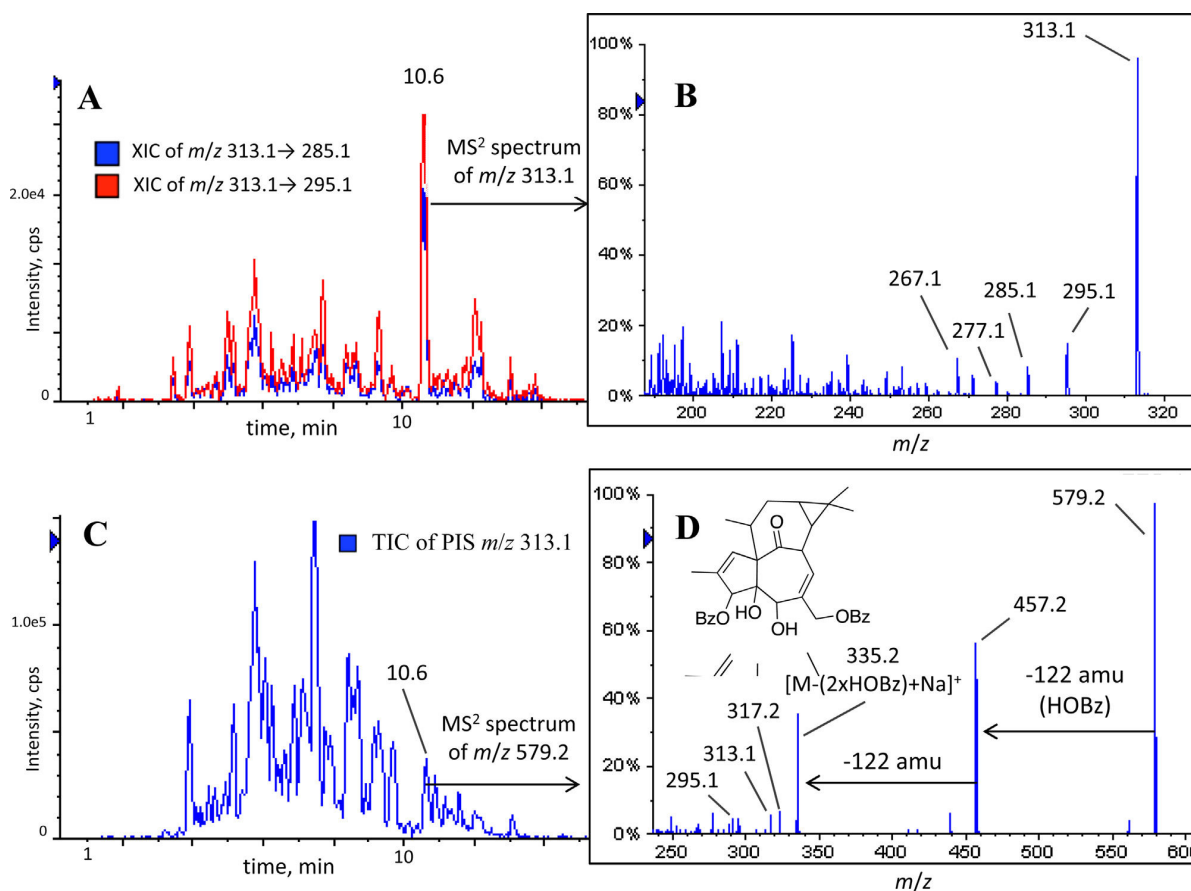
### 3. Results and discussion

#### 3.1. An HPLC-MS<sup>n</sup> two-steps method for PE, dPE and IE profiling

Fragmentation behaviors of PE **1–6**, dPE **7,8** and IE **9,10** standards were firstly studied by ESI-MS<sup>2</sup> in positive ion mode. Results (Fig. 2 and Table S1 in supporting information) indicated similar backbone fragment ions as those previously described. Although, the most abundant quasimolecular ion observed in-source was systematically [M+Na]<sup>+</sup> (Fig. S2) instead of [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> [17,30] and [M+H]<sup>+</sup> adducts in previous studies [18]. Observation of [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> was due to the addition of ammonium acetate buffer (100 mM) in

the analyzed sample [17,30]. Under CID in positive ion mode, ESI-MS<sup>2</sup> spectra of sodium-cationized PE, dPE and IE undergo neutral loss of their acyl chain(s) via a McLafferty rearrangement (Fig. 3) producing high-abundance fragment ions corresponding to the loss of 60 amu for HOAc (acetic acid), 88 amu for HOiBu (isobutyric acid), 100 amu for HOAng/HOTigl (angelic and/or tiglic acid), and 122 amu for HOBz (benzoic acid), along with ions at *m/z* 333, 311, 293, 283 for PE (Fig. S3) and ions at *m/z* 335, 313, 295, 285 for dPE (Fig. S4) and IE (Fig. S5).

The two-steps approach developed hereby is composed of only two consecutive injections: an HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> (multiple reaction monitoring followed by MS<sup>2</sup>) analysis and then a HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> (precursor ion scan followed by MS<sup>2</sup>) analysis. HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> experiment allowed not only detection of specific transitions for PE, dPE and IE, but also gave access to MS<sup>2</sup> spectra of the diagnostic ions at *m/z* 311 and *m/z* 313 allowing comparison to MS<sup>2</sup> spectra recorded in our spectral library. The second step of the method is a HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis providing detection of precursor ions related to the fragment ions at *m/z* 311 (PE) or *m/z* 313 (dPE/IE) associated with an automatic MS<sup>2</sup> acquisition of the most abundant



**Fig. 6.** Annotation of ingenol 3,20-dibenzoate (**10**) by HPLC-MS<sup>n</sup> two-steps methodology. (A) XIC of dPE/IE transitions of HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis of *E. peplus* EtOAc latex extract. (B) MS<sup>2</sup> spectrum of  $m/z$  313.1 ( $R_t$  = 10.6 min) from MRM-MS<sup>2</sup> analysis is matching MS<sup>2</sup> fingerprint of dPE/IE. (C) TIC of PIS  $m/z$  313.1 from HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis of the same extract. (D) MS<sup>2</sup> spectrum of  $m/z$  579.2 ( $R_t$  = 10.6 min) from the PIS-MS<sup>2</sup> analysis. Inspection of MS<sup>2</sup> spectra suggested that this compound was a dPE/IE bearing two benzoxyloxy (-122 amu for benzoic acid). Comparison with MS<sup>2</sup> spectrum and retention time of the reference standard, this compound was annotated as ingenol 3,20-dibenzoate (**10**).

**Table 1**  
dPE/IE putatively identified by the HPLC-MS<sup>n</sup> two-steps method.

Extract (EtOAc)	Plant parts	Annotation	SIM ( $m/z$ )	Finger-print	$R_t$ (min)	$m/z$ PIS [M+Na] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup>	S/N
<i>E. amygdaloides</i> ssp. <i>semiperfoliata</i>	Whole plant	O-C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>1</sub> -O-C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>1</sub> -dPE <sup>b</sup>	313/295	Match	8.2/8.6	523.2	435, 423, 353, 335, 317, 313, 295	12/6
<i>E. peplus</i>	Latex	Ingenol 3,20-dibenzoate ( <b>10</b> )	313/295	Match	10.6	579.2	561, 457, 439, 335, 317, 313, 295	8
<i>E. segetalis</i> ssp. <i>pinexa</i>	Roots	O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>1</sub> -O-C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>1</sub> -IE <sup>b</sup>	313/295	Match	10.6	495.2	435, 417, 395, 335, 317, 313, 295	11

Annotation of the diterpene ester-types between dPE/IE was based on chemotaxonomic considerations.

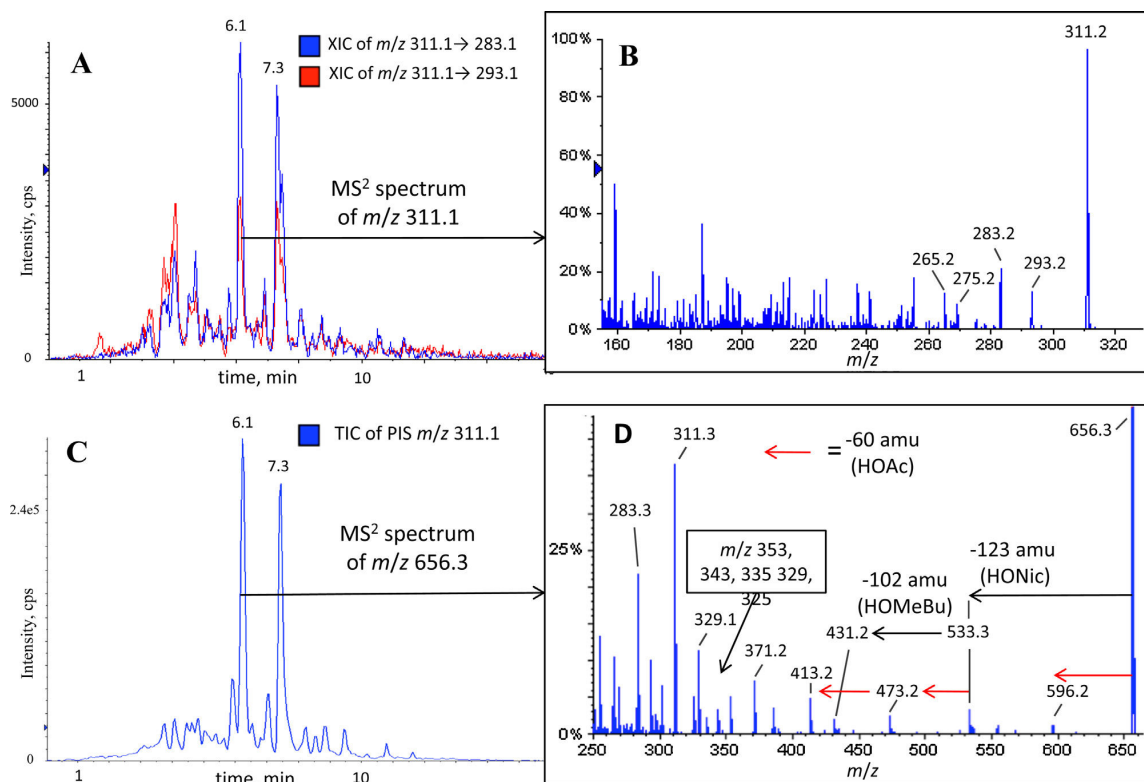
$R_t$ : retention time; SIM: Selected ion monitoring; PIS: precursor ion scan; MS: mass spectra; S/N: signal/noise.

precursor ion. Detection and partial annotation of PE, dPE, and IE by the two-steps methodology was achieved through the following workflow (i) observation of specific transitions in MRM mode and comparison of MS<sup>2</sup> spectra fingerprint (ii) inspection of the MS<sup>2</sup> spectra acquired in PIS-MS<sup>2</sup> analysis, allowing partial deduction of the esterification pattern by interpretation of the neutral loss and by inspection of backbone diagnostic ions in the  $m/z$  range 200–350.

Using reference standards in FIA-MS, instrumental parameters of specific transitions  $m/z$  311 → 293 and 311 → 283 for PE and transitions  $m/z$  313 → 295 and 313 → 285 for dPE/IE were optimized to achieve maximum S/N in MRM mode (Table S6). MS<sup>2</sup> spectra of in-source fragment ion at  $m/z$  311 for PE (Fig. S7) and  $m/z$  313 for dPE/IE (Figs. S8 and S9) were recorded in the spectral

library to be used as fingerprint spectra. As reported previously dPE and IE could not be distinguished by MS as their diterpene backbones are isomeric and their respective MS<sup>2</sup> spectra were similar [30]. Analysis in PIS mode of ions  $m/z$  311 and 313 from reference compounds showed that  $[M+Na]^+$  adduct was systematically the most abundant precursor ion (Fig. S10). Validation of the two-steps method was performed using a mixture of four reference standards [phorbol 13-decanoate (**1**), 12-O-tiglylphorbol 13-decanoate, 13-O-isobutyryl-12-deoxyphorbol 20-acetate (**7**) ingenol 3,20-dibenzoate (**10**)] allowing their efficient detection and identification down to 1  $\mu$ g/mL, i.e. 10 ng, injected (Fig. 4 and Fig. S11). Compounds displaying the same MS<sup>2</sup> spectra and with different retention time could be detected through PE profiling





**Fig. 7.** HPLC-MS<sup>n</sup> two-steps methodology for PE profiling. (A) XIC of PE transitions of HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis of *E. characias* ssp. *characias* EtOAc leaves extract. (B) MS<sup>2</sup> spectrum of *m/z* 311.1 (*R*<sub>t</sub> = 6.1 min) from HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis is matching MS<sup>2</sup> fingerprint of phorbol esters. (C) TIC of PIS *m/z* 311.1 from the HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis of the same extract. (D) MS<sup>2</sup> spectrum of *m/z* 656.3 (*R*<sub>t</sub> = 6.2 min) from the HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis. MS<sup>2</sup> spectrum indicated that this compound is not a phorbol ester. Indeed, four neutral loss of acyls are detected and non specific ions are observed in the range *m/z* 300–350. HONic (nicotinic acid), HOMebu (methylbutyric acid).

(Fig. 4). They are probably C-4 epimers of compounds **1** and **3**, since 4β-phorbols are easily prone to epimerization in solution [35]. At lower concentration, MRM-MS<sup>2</sup> successfully detected compounds based on precursor-to-product transitions during the first step, but the second step (PIS-MS<sup>2</sup>) failed to procure MS<sup>2</sup> spectra allowing confident compounds annotation.

### 3.2. Application of the HPLC-MS<sup>n</sup> two-steps method on *Euphorbia* extracts

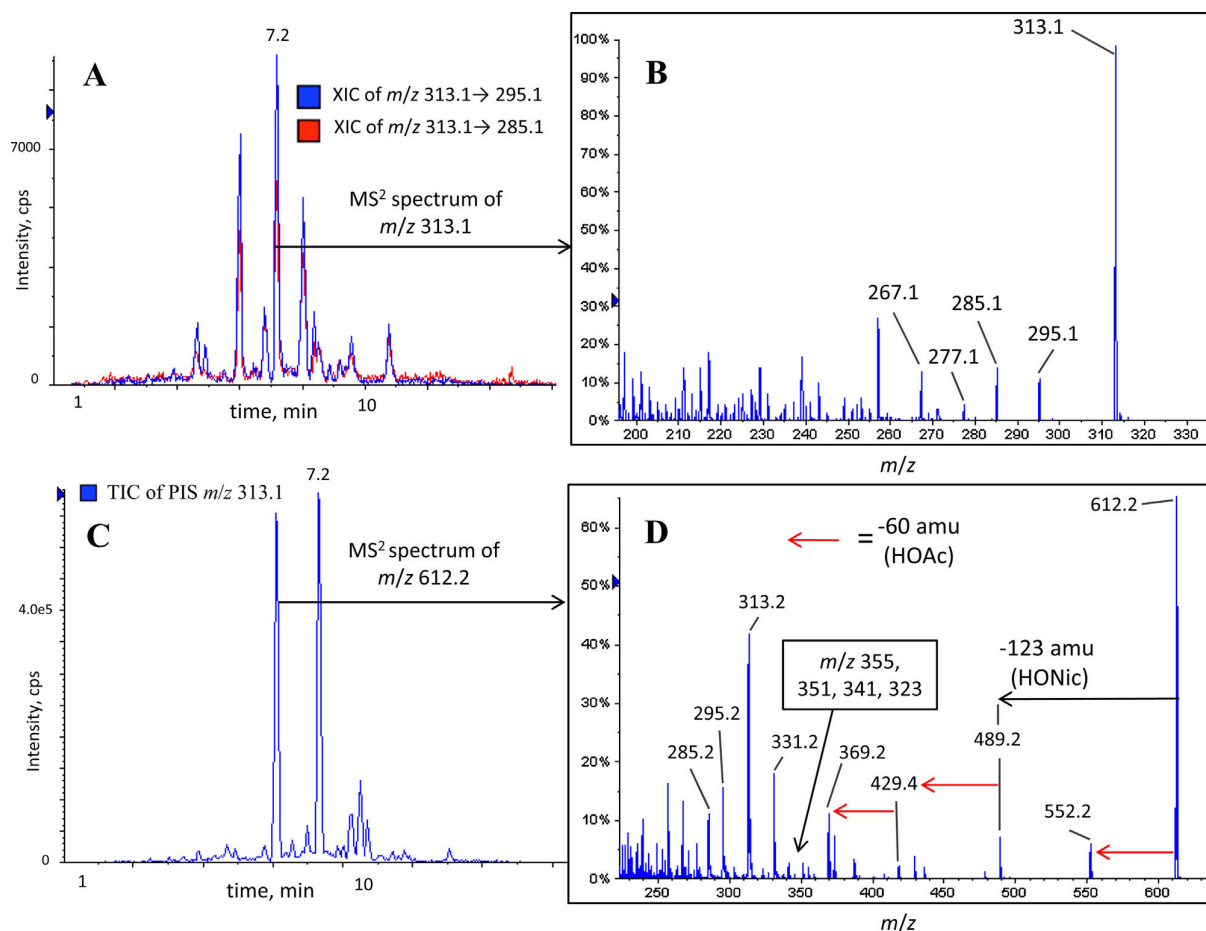
Ten EtOAc *Euphorbia* extracts were analyzed using the two-steps method (MRM-MS<sup>2</sup> followed by PIS-MS<sup>2</sup>). Firstly, from HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* extract, numerous peaks exhibited *m/z* 313 → 295 and 313 → 285 transitions and characteristic MS<sup>2</sup> spectra of the in-source fragment ion at *m/z* 313 from dPE/IE standards (Fig. 5A and B). However, results of *m/z* 313 HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> suggested that only two major peaks at retention times of 8.2 and 8.6 min (Fig. S12) showed MS<sup>2</sup> spectra compatible with dPE/IE fragmentation behavior (Fig. 5C). MS<sup>2</sup> spectra were similar for both peaks suggesting isomers, with precursor ions at *m/z* 523 and prominent fragment ions at *m/z* 435 and *m/z* 423 indicating neutral loss of 88 and 100 amu, respectively (Fig. 5D). Neutral loss of 88 amu could be attributed to tiglyloxy or angelyloxy functional group, and neutral loss of 100 amu to isobutyryloxy, methylbutyryloxy or butanoyloxy, respectively. Presence of dPE/IE typical fragment ions at *m/z* 353, 335, 317, 313 supported our structural hypothesis. Previous phytochemical investigation on *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* led to the isolation of 12-*O*-tiglyl-4β-deoxyphorbol 13-isobutyrate [36]. Expected

fragmentation pattern of this dPE would fit nicely the MS<sup>2</sup> spectra for the precursor ion at *m/z* 523 recorded at 8.2 and 8.6 min. Taking into account that no IE had been isolated from this species [16,37], these two compounds were annotated as *O*-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>1</sub>-*O*-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>1</sub>-dPE. These two components could be either isomers bearing same elemental composition of acyl chains, or positional isomers (esters at C-12, C-13 and C-20) or even having a different configuration in C-4, since dPE are easily prone to epimerization [38].

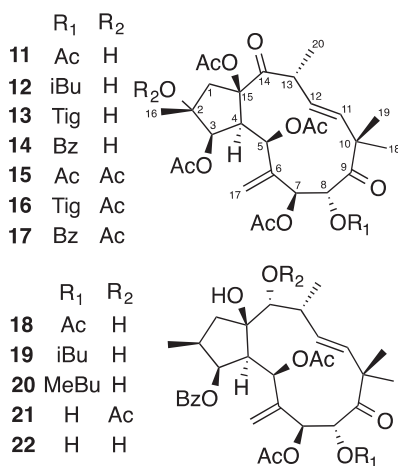
Analysis of *E. peplus* extract by the two-steps methodology allowed putative annotation of ingenol 3,20-dibenzoate (**10**). MRM-MS<sup>2</sup> chromatogram displayed a peak at 10.6 min compatible with a dPE/IE MS<sup>2</sup> fingerprint (Fig. 6A and B). PIS-MS<sup>2</sup> analysis indicated a precursor ion at *m/z* 579 and major fragment ions at *m/z* 457 and *m/z* 335 suggesting neutral losses of two benzoyloxy (–122 amu) along with typical dPE/IE backbone ions at *m/z* 317 and *m/z* 307 (Fig. 6C and D). MS<sup>2</sup> spectra and were similar to compound **10** (*R*<sub>t</sub> = 10.8 min for reference standard in our experimental conditions). Furthermore, compound **10** along with other IE have been previously identified from *E. peplus* [39,40]. Thus, this compound was annotated as ingenol 3,20-dibenzoate.

Results of *E. segetalis* ssp. *pinex* analysis led to the partial identification of a *O*-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>1</sub>-*O*-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>1</sub>-dPE/IE (Fig. S13). Taking into account previous isolation of ingenane-type esters in *E. segetalis* [41], the compound was annotated as IE. Table 1 summarized data of the three diterpene esters detected in *Euphorbia* extracts.

PE content of *E. characias* ssp. *characias* extract was profiled according to this method (Fig. 7). Closed inspection of the total ion chromatogram (TIC) for transitions *m/z* 311 → 293 and 311 → 283 scrutinized by HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> showed more than 20 peaks



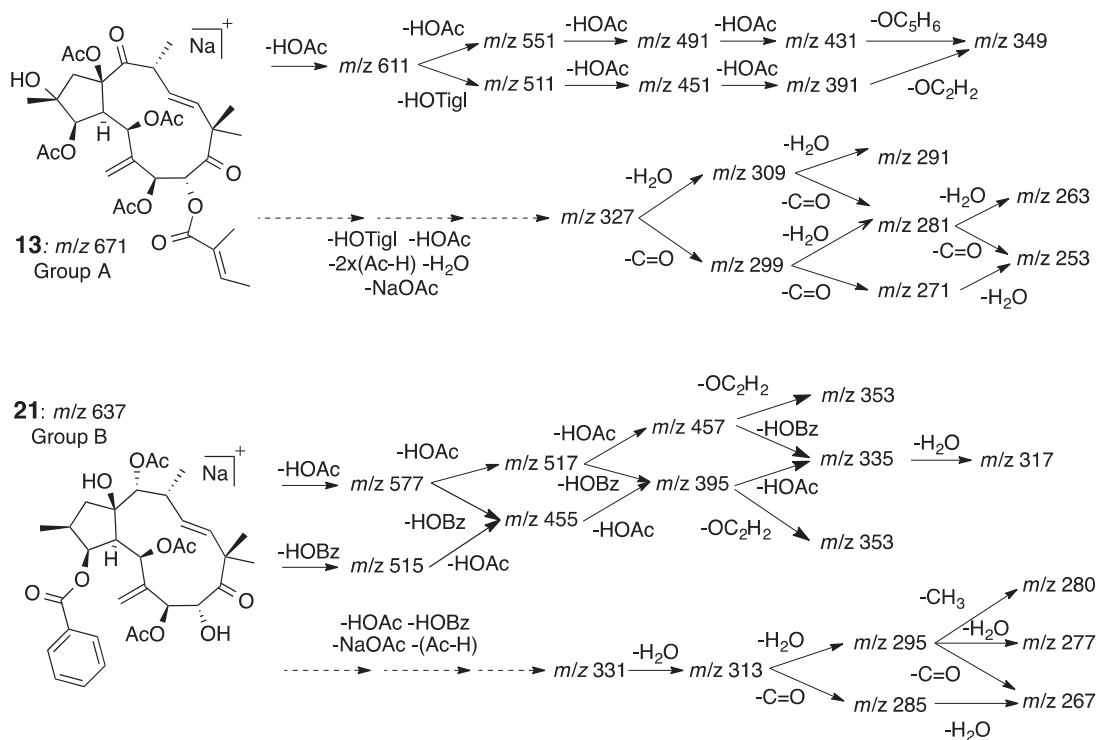
**Fig. 8.** HPLC-MS<sup>2</sup> two-steps methodology for dPE/IE profiling. (A) XIC of dPE/IE transitions of HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis of *E. characias* ssp. *characias* EtOAc leaves extract. (B) MS<sup>2</sup> spectrum of *m/z* 313.1 (*R*<sub>t</sub> = 7.2 min) from HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis is matching MS<sup>2</sup> fingerprint of dPE/IE. (C) TIC of PIS *m/z* 313.1 of the same extract from HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis. (D) MS<sup>2</sup> spectrum of *m/z* 612.2 (*R*<sub>t</sub> = 7.2 min) from the HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis. MS<sup>2</sup> spectrum indicated that this compound is not a dPE/IE. Indeed, four neutral loss of acyls are detected and non specific ions are observed in the range *m/z* 300–350. HONic (nicotinic acid).



**Fig. 9.** Structures of jatrophone esters JE 11–17 (group A) and 18–22 (group B). MeBu = (2'-methylbutyl).

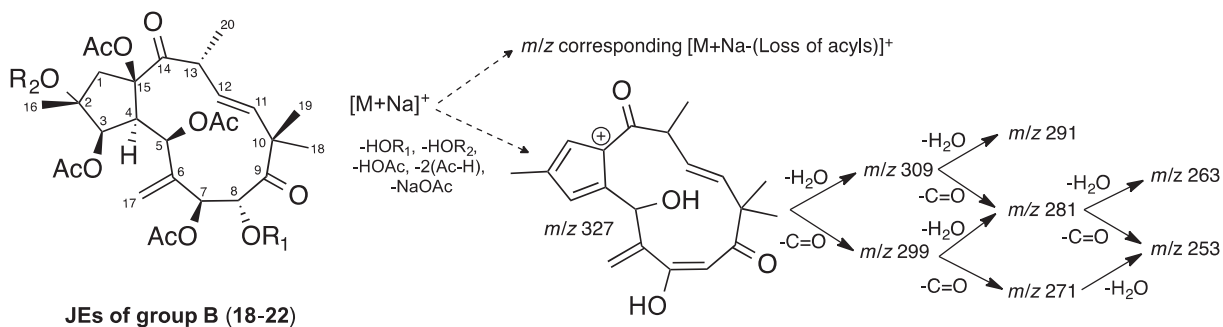
suggesting presence of PE (Fig. 7A). MS<sup>2</sup> spectra for the in-source fragment ion at *m/z* 311 were similar to MS<sup>2</sup> fingerprint of PE standards (Fig. 7B). However, results for HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> analysis of *m/z* 311 showed a peak at 6.2 min displaying a precursor ion at *m/z* 656 (Fig. 7C) suggesting neutral loss of four acyl chains

along with non-specific ions at *m/z* 371 and *m/z* 329 (Fig. 7D) Finding that every peak displayed the same features, no phorbol esters could thus be annotated with confidence. These results led us to postulate that other types of diterpene esters produced PE like CID-fragmentation. In the same manner, dPE/IE profiling exhibited similar phenomenon (Fig. 8). Indeed, TIC of transition *m/z* 313 → 295 and 313 → 285 for HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis of *E. characias* ssp. *characias* (Fig. 8A) showed numerous peaks. The corresponding MS<sup>2</sup> spectra of *m/z* 313 matched the reference MS<sup>2</sup> spectrum of the in-source fragment ion at *m/z* 313 from dPE/IE registered in the database (Fig. 8B). MS<sup>2</sup> spectrum (*t*<sub>r</sub> = 7.2 min) in HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> (Fig. 8C) revealed that this *m/z* 313 ion was produced by CID of a precursor ion at *m/z* 612 displaying neutral loss of four acyl chains (including a nicotinoyl and three acetyls) along with non-specific ion at *m/z* 331 (Fig. 8D). Like seen for PE, these results suggested that other types of diterpene esters showed dPE/IE-like CID-fragmentation. By applying the same procedure on the six others *Euphorbia* extracts, the same phenomenon was systematically observed. For each studied *Euphorbia* extracts HPLC-MRM-MS<sup>2</sup> analysis suggested presence of numerous peaks for PE (*m/z* 311 → 293 and 311 → 283) and dPE/IE (*m/z* 313 → 295 and 313 → 285). Close inspection of the TIC of PIS *m/z* 311 and 313 showed that for most of detected ions, MS<sup>2</sup> spectra were not compatible with PE or dPE/IE. Indeed, examination of MS<sup>2</sup> spectra in HPLC-PIS-MS<sup>2</sup> experiments revealed that in most cases: (i) non-specific ions were observable in the range *m/z* 300–400; (ii) *m/z* 311

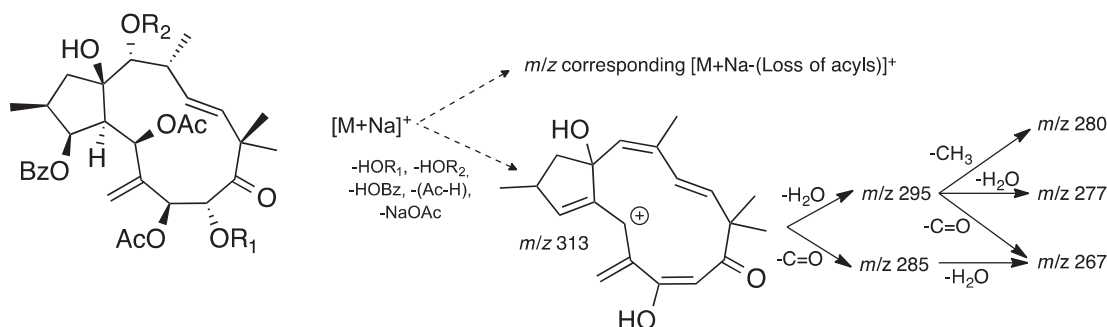


**Fig. 10.** ESI-MS<sup>2</sup> fragmentation behavior of JE **13** (group A) and JE **21** (group B) in ESI positive ion mode observed using hybrid QqQ/linear ion trap and hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometers.

#### JEs of group A (11–17)



#### JEs of group B (18–22)



**Fig. 11.** ESI-MS<sup>2</sup> fragmentation behavior of JE from group A (**11–17**) and group B (**18–22**) in ESI positive ion mode observed using hybrid QqQ/linear ion trap and hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometers.

or 313 ions were produced by ions in the range  $m/z$  600–900; (iii) more than three esters could be detected by inspection of neutral loss. As a matter of fact, every PE and IE isolated from Euphorbiaceae [13,42,43] were found to possess a maximum of three esters

[1,5]. In the same manner, dPE from *Euphorbia* had always shown to bear a maximum of two acyl substituents. These results indicated that other diterpene esters were detected through this analytical approach.



**Table 2**  
Mass spectra of JE from group A (11–17) and group B (18–22) obtained from ESI-MS<sup>2</sup> and ESI-HRMS<sup>2</sup>.

	3200 QTRAP – Hybrid triple quadrupole/linear ion trap MS			LTQ-Orbitrap – Hybrid linear ion trap/Orbitrap		
	[M+Na] <sup>+</sup> m/z(%)	ESI-MS <sup>2</sup> m/z (%)		[M+Na] <sup>+</sup> m/z (%)	Calculated m/z	ESI-MS <sup>2</sup> m/z (%)
Group A	11	631.2	MS <sup>2</sup> [631.2]: 589(4), 571(40), 529(3), 511(9), 483(1), 469(2), 451(3), 409(1), 387(1), 369(2), 341(2), 327(5), 323(1), 309(4), 299(5), 291(1), 281(3), 253(1.5)	631.2344	631.2361	MS <sup>2</sup> [631.23]: 589.2242(3.5), 571.2141(100), 529.2032(2), 511.1993(5), 469.1833(0.5), 451.1723(1), 429.1910(1), 387.1799(0.5), 369.1700(1.5), 341.1726(0.5), 327.1590(2.5), 309.1485(1.5), 299.1640(2.5), 281.1535(2), 253.1585(1)
	12	659.2	MS <sup>2</sup> [659.3]: 617(3), 599(40), 571(2), 557(3), 539(10), 511(1), 479(2), 469(2), 451(1), 369(2), 351(1), 327(5), 309(4), 299(6), 281(3), 253(3), 293(4), 175(4), 147(1)	659.2657	659.2674	MS <sup>2</sup> [659.27]: 617.2560(3), 599.2452(100), 571.2523(1), 557.2330(1), 539.2244(6), 529.2037(1), 511.1943(1), 479.2029(1), 397.2005(1), 369.1697(1), 351.1437(1), 327.1589(2), 309.1484(2), 299.1637(2), 281.1532(2), 263.1428(1)
	13	671.3	MS <sup>2</sup> [671.3]: 629(2.5), 611.3(25), 569(2.5), 551(7), 529(1.5), 491(1.6), 469(1.4), 409(1.2), 327(1.8), 309(1.7), 299(2.6), 281(2.2), 253(1.2), 203(1.7), 175(1.8)	671.2658	671.2674	MS <sup>2</sup> [671.27]: 629.2558(2.5), 611.2452(100), 583.2510(1), 569.2349(1), 551.2242(6), 529.2037(1), 491.2036(1), 469.1822(1), 409.2006(0.5), 369.1693(0.5), 327.1588(1.8), 309.1480(1.5), 299.1639(1), 281.1534(1.5), 263.1426(0.5), 253.1586(0.5)
	14	693.2	MS <sup>2</sup> [693.2]: 651(5.5), 633(47), 591(4.5), 573(10), 513(3), 469(2), 327(5), 309(4.5), 299(5.5), 281(6), 253(6), 203(9), 175(9), 105(33)	693.2501	693.2518	MS <sup>2</sup> [693.25]: 651.2407(3.5), 633.2298(100), 591.2195(1), 573.2089(5), 529.2031(1), 513.1886(0.5), 469.1807(0.5), 431.1857(0.5), 385.1277(1), 369.1694(0.5), 327.1590(1), 309.1482(1.5), 299.1642(1), 281.1533(2), 253(0.5)
	15	673.2	MS <sup>2</sup> [673.2]: 613(60), 591(2), 571(2), 553(40), 511(3), 493(14), 471(2), 451(7), 447(2), 433(5), 429(2), 391(3), 387(2), 369(4), 341(5), 327(14), 309(9), 299(12), 291(2), 281(5), 271(4), 263(3)	673.2452	673.2467	MS <sup>2</sup> [673.25]: 613.2550(100), 591.2437(2), 553.2041(18), 493.1831(1.5), 471.2015(1), 451.1726(1), 429.1907(2.5), 411.1800(0.5), 387.1806(0.5), 369.1697(2), 341.1746(0.5), 327.1593(1.5), 309.1484(1.5), 299(12), 291.13281.1534(1), 245.0809(0.5)
	16	713.4	MS <sup>2</sup> [713.3]: 653(60), 631(1), 611(2), 593(45), 551(3), 533(9), 511(2), 491(7), 473(3), 469(2), 451(1), 431(2), 409(2), 391(1.5), 381(2), 369(1.8), 341(1.6), 327(5), 309(5), 299(5), 281(4.2), 253(3), 203(4)	713.2761	713.278	MS <sup>2</sup> [713.28]: 653.2565(100), 631.2740(1), 593.2353(17), 571.2534(0.5), 533.2139(1), 511.2320(1), 491.2034(1), 469.2217(2), 409.2009(2), 369.1695(0.5), 341.1745(0.5), 327.1590(1), 309.1484(1), 299.1643(0.5), 281.1536(0.5)
	17	735.3	MS <sup>2</sup> [735.3]: 675(40), 615(30), 573(2), 555(5), 513(3), 453(1), 431(2), 403(2), 373(1), 327(2.5), 309(2), 307(1), 299(3), 281(1.8), 263(1), 105(2)	735.2604	735.2623	MS <sup>2</sup> [735.26]: 675.2470(100), 653.2598(1.5), 615.2198(18), 593.2379(0.5), 555.1981(1.5), 533.2165(1.2), 513(1), 491.2065(1.8), 431.1852(1.2), 403.1906(0.5), 369.1697(0.5), 327.1591(0.5), 309.1486(1), 307.0964(0.4), 299.1639(0.3), 281.1534(0.7), 263.1437(0.2)
Group B	18	637.3	MS <sup>2</sup> [637.3]: 595(7), 577(26), 549(4), 535(8), 517(4), 515(3), 473(2), 455(14), 413(5.5), 395(9), 367(1.5), 353(1.5), 335(1.5), 331(1.5), 313(3), 295(2.5), 285(2.5), 267(3.5), 189(5.5), 161(6), 105(4.5)	637.2602	637.2619	MS <sup>2</sup> [637.26]: 595.2509(14), 577.2404(100), 549.2455(4), 535.2299(8), 517.2194(7), 515.2251(6), 455.2038(24), 453.1518(1.5), 413.1931(1.5), 395.1827(7.5), 353(0.6), 335.1618(1), 331.1905(0.5), 313.1798(1.5), 295.1692(1.2), 285.1848(0.8), 267.1741(1)
	19	665.3	MS <sup>2</sup> [665.3]: 623(5), 605(17), 577(2.2), 563(2.3), 545(3.5), 535(2.3), 483(13), 441(3), 423(5), 395(2.5), 353(1.3), 335(1.7), 313(2.2), 295(1.6), 285(1.3), 267(2.2), 189(2.6), 161(2.4), 105(2)	665.2917	665.2932	MS <sup>2</sup> [665.29]: 623.2820(16), 605.2713(100), 583.2540(2), 577.2762(4), 563.2614(3), 545(7), 543.2557(8), 535.2298(6.5), 519.2532(2), 517.2195(1.8), 483.2348(30), 441.2245(2), 423.2139(10), 395.1829(1), 353.1724(1), 335.1619(1), 313.1798(2.2), 295.1691(1.5), 285.1849(1), 267.1745(1.5)
	20	679.3	MS <sup>2</sup> [679.3]: 637(7), 619(36), 577(7), 559(10), 557(8), 531(2), 497(13), 455(4), 437(12), 395(3), 377(5), 355(1), 317(1), 314(2), 313(2), 295(3), 285(3), 277(3), 267(4)	679.3069	679.3089	MS <sup>2</sup> [679.27]: 637.2609(13), 619.2507(100), 591.2556(3.5), 577.2400(7), 559.2297(15), 557.2532(11), 497.2141(14), 455.2034(3), 437.1928(13), 395.1820(1.5), 377.1720(5), 355.1908(0.5), 317.1510(1.3), 313.1798(1.2), 295.1689(2), 285.1848(0.6), 277.1586(0.5), 267.1741(1.2)
	21	637.3	MS <sup>2</sup> [637.3]: 595(2), 577(30), 549(4), 535(2), 517(5), 515(5), 489(2), 473(2), 455(14), 413(3), 395(11), 367(2.2), 353(0.5), 335(2.5), 313(1), 295(1), 285(0.8), 267(1), 225(1.2), 161(1.5), 105(1.9)	637.2603	637.2619	MS <sup>2</sup> [637.26]: 595.2505(14), 577.2399(100), 549.2454(4), 535.2296(8), 517.2191(7), 515.2246(6), 455.2034(24), 413.1931(1.5), 395.1824(7), 377.1721(0.3), 353.1720(0.6), 335.1615(0.9), 313.1797(1.4), 295.1692(1.3), 285.1847(0.7), 267.1742(1)
	22	595.2	MS <sup>2</sup> [595.2]: 535(30), 473(15), 435(8), 431(4), 413(40), 395(4), 353(3.5), 313(4), 285(2), 249(3), 217(3.5), 189(3.5)	595.2502	595.2514	MS <sup>2</sup> [595.23]: 553.2402(2.5), 535.2292(100), 507.2346(10), 475.2080(9), 473.2139(15), 447.2134(2), 413.1928(13), 353.1719(4.5), 313.1787(0.5), 295.1687(0.3), 267.1743(0.4)

### 3.3. Jatrophane esters CID-fragmentation study using multiple stage mass spectrometry

In order to explore the hypothesis that other type of diterpene esters could produce similar fragmentation as PE and dPE/IE, CID behavior of twelve JE (**11–22**) isolated from *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* (Fig. 9) [8] were studied using low and high mass resolution and accuracy mass spectrometers. JE **13** was selected as a representative compound for hexahydroxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11E-diene esters (group A) and JE **21** a representative of hexahydroxy-9-oxojatropha-6(17),11E-diene esters (group B).

Using ESI-MS<sup>2</sup>, CID behavior of **13** (Fig. 10) was comparable to PE and dPE/IE standard compounds behaviors: prominent [M+Na]<sup>+</sup> ion at *m/z* 671 was formed in-source and MS<sup>2</sup> spectrum of the sodium-cationized molecule (Figs. S14 and S15) showed fragment ions corresponding to neutral loss of acyloxy as acids via cleavage of the C(sp<sup>3</sup>)-O bond (Fig. 3, mechanism a) [28]. Furthermore, the fragmentation pattern was different in the low-mass range (*m/z* 250–350) compared to PE and dPE/IE. From ESI-MS<sup>2</sup> results (Fig. S16), a molecular formula of C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub> was deduced for the ion at *m/z* 327.1588 (calc. for *m/z* 327.1596, Δ = 2.5 ppm) and thus was interpreted as [M-HOAc-NaOAc-(HOTigl)-2x(Ac-H)-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Elimination of Ac-H illustrated that acetyloxy functions of JE can be eliminated via a cleavage of b type (Fig. 3). In ESI-MS<sup>2</sup>, PIS of *m/z* 327 indicated that this ion was produced by the precursor ion [M+Na]<sup>+</sup> at *m/z* 671 and by other fragment ions issued from the quasi-molecular species (Fig. S17). Thus, ion at *m/z* 327 resulted from the elimination of five acyloxy groups. ESI-MS<sup>2</sup> analysis showed that CID of the in-source fragment at *m/z* 327 produced *m/z* 309 and *m/z* 299 ions (Fig. S18). These latter ions generated *m/z* 309 → 291 (Fig. S19) and *m/z* 299 → 281 transitions, respectively (Fig. S20). Similar ions were found to be produced by ingenane-type esters [28].

Regarding JE **21** from the group B, the fragmentation behavior observed was comparable to the other diterpene esters (Fig. 10). Compound **21** led to the formation of a prominent [M+Na]<sup>+</sup> ion at *m/z* 637 (Fig. S21). ESI-MS<sup>2</sup> spectrum of *m/z* 637 (Fig. S22) showed abundant ions resulting from consecutive neutral loss of acyloxy groups along with ions at *m/z* 353, 335, 331, 313, 295, 285 in the low-mass range. In ESI-HRMS<sup>2</sup> spectrum, the ion at *m/z* 313.1798 indicated a molecular formula of C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub> ([M]<sup>+</sup>, calc. *m/z* 313.1803, Δ = 1.5 ppm) (Fig. S23) and was interpreted as [M-HOAc-HOBz-NaOAc-(Ac-H)-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. In ESI-MS<sup>2</sup>, PIS of *m/z* 313 indicated that this ion was indeed produced by [M+Na]<sup>+</sup> along with other fragments of the quasimolecular adduct (Fig. S24). ESI-MS<sup>2</sup> analysis showed that CID of *m/z* 313 produced dPE/IE-like fragmentation (*m/z* 313 → 295 and 313 → 285). Moreover, the fingerprint MS<sup>2</sup> spectra of the in-source product ion *m/z* 313 was similar for JE **21** and dPE/IE (Figs. S24–S25 and S8–S9, respectively). Furthermore, identical molecular formula (C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>) was deduced from the ion at *m/z* 313.1798 ([M]<sup>+</sup> calc. for 313.1803, Δ = 1.8 ppm) for the JE **11** (Fig. S23) and for dPE/IE [18].

Regarding other JE from groups A (**11, 12, 14–17**) and B (**18–22**), their characteristic fragmentation behaviors were similar to the representative compounds studied, **13** and **21**, respectively (Fig. 11 and Table 2).

### 3.4. Discussion about MS of diterpene esters from Euphorbiaceae and their LC-MS profiling

Fragmentation study of JE indicated that hexahydroxy-9-oxojatropha-6(17),11E-diene esters (group B) produced dPE/IE-like fragmentation (*m/z* 313 → 295 and 313 → 285). Furthermore, the molecular formula deduced from ESI-HRMS<sup>2</sup> is identical. Nonetheless, none of these JE produced PE-like fragmentation. However, previous study reported that

ingenane-type ester can produce PE-like fragmentation (*m/z* 311 → 293) [28], proving that PE are not the only diterpene esters to produce these fragmentations. It is likely that other types of diterpene esters, such as lathyrane- or jatrophane-type, can also produce PE- or dPE/IE- or JE-like fragmentations. However, this matter of fact cannot be clarified because most of the papers dealing with identification of lower diterpenoids from Euphorbiaceae described only the quasimolecular ion from ESI-HRMS spectra and are not reporting MS or MS<sup>2</sup> spectra besides few exceptions [44,45]. Under ESI-MS<sup>2</sup> in positive ion mode, diterpene esters produce abundant fragment ions resulting from neutral loss of acyl chains but they are not informative on the diterpene skeleton. In this perspective, we recommend to the concerned scientific community to describe ESI-MS<sup>2</sup>, or ESI-MS, spectra of diterpene esters in more comprehensive manner. Special emphasis should be given to the range *m/z* 250–400. Several public repositories of MS spectra database have been created such as Metlin [46], MassBank [47] and more recently GNPS (<http://gnps.uscd.edu/>). In order to build a comprehensive knowledge regarding Euphorbiaceae diterpenoids CID fragmentation behaviors, MS<sup>2</sup> spectra should be systematically deposited into a public repository. Yet, the presence of two or more isomeric skeletal-types from *Euphorbia* extracts limits HPLC-MS<sup>2</sup> based annotation. UV spectra of diterpene esters depend on the acylation pattern. Thus, on-line HPLC-DAD detectors cannot facilitate determination of the skeletal-type. The approach relying on basic hydrolysis of the extract to release the diterpene esters as their parent alcohol can give a complementary in-sight on the skeletal-type [16,17,21]. However, it requires available references of diterpene esters and/or the isolation and identification of the compound. In complement to MS data, on-line acquisition of <sup>1</sup>H NMR would discriminate isomeric diterpene-types allowing a deepest in-sight toward their annotation. However, this strategy cannot reveal ester localization on the diterpene backbone. Thus, at-line acquisitions of 1D and 2D NMR experiments probably represent the next stage of diterpene esters profiling.

## 4. Conclusion

A new HPLC-MS<sup>n</sup> protocol for PE, dPE and IE profiling was successfully developed in only two steps. Application of this protocol as a dereplication tool to investigate ten *Euphorbia* extracts with anti-CHIKV activity led to partial annotation of three dPE/IE but no PE. Furthermore, results suggested that other types of diterpene esters produced PE- or dPE/IE-like fragmentations. To explore this hypothesis, JE were investigated by multiple stage mass spectrometry using a hybrid QqQ/linear ion trap MS and a hybrid linear ion trap/Orbitrap. ESI-CID experiments on hexahydroxy-9-oxojatropha-6(17),11E-diene esters (group B) proved that this type of JE produced dPE/IE-like fragmentation and displayed similar *m/z* 313 MS<sup>2</sup> fingerprint. Results on hexahydroxy-9-dioxojatropha-6(17),11E-diene esters (group A) showed that this type of diterpene esters exhibited *m/z* 327 MS<sup>2</sup> fingerprint.

The present analytical survey brings a new insight to the LC-MS profiling of diterpene esters in *Euphorbia* extracts. In particular, it points out the limit of their MS-based annotation, because various types of diterpenes possess isomeric skeleton producing identical MS<sup>2</sup> spectra (such as dPE/IE and JE of group B). Nonetheless, our two-steps HPLC-MS<sup>n</sup> protocol is an efficient and versatile tool to profile diterpene ester in Euphorbiaceae and Thymelaeaceae species, especially, for those wherein the main diterpene skeletal-types and their CID fragmentation are known (such as PE from *C. tiglium* or JE from *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata*). Regarding the anti-CHIKV activity of the studied *Euphorbia* extracts, application of this LC-MS<sup>n</sup> method as a dereplication tool indicated that their antiviral activity is not due to the presence of PE, and thus that

these matrices constitute good candidates for bioactivity-guided purification procedure.

### Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

### Acknowledgements

The CEBA Labex program is acknowledged for his support (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.092>.

### References

- [1] Q.-W. Shi, X.-H. Su, H. Kiyota, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4295–4327.
- [2] A. Vasas, D. Rédei, D. Csupor, J. Molnár, J. Hohmann, *Eur. J. Org. Chem.* 2012 (2012) 5115–5130.
- [3] C.W. Sabandar, N. Ahmat, F.M. Jaafar, I. Sahidin, *Phytochemistry* 85 (2013) 7–29.
- [4] J.-B. Xu, J.-M. Yue, *Org. Chem.* 1 (2014) 1225–1252.
- [5] A. Vasas, J. Hohmann, *Chem. Rev.* 114 (2014) 8579–8612.
- [6] L.-F. Nothias-Scaglia, V. Dumontet, J. Neyts, F. Roussi, J. Costa, P. Leyssen, M. Litaudon, J. Paolini, *Fitoterapia* 105 (2015) 202–209.
- [7] P.-M. Allard, P. Leyssen, M.-T. Martin, M. Bourjot, V. Dumontet, C. Eydoux, J.-C. Guillemot, B. Canard, C. Poullain, F. Guéritte, M. Litaudon, *Phytochemistry* 84 (2012) 160–168.
- [8] L.-F. Nothias-Scaglia, P. Retailleau, J. Paolini, C. Pannecouque, J. Neyts, V. Dumontet, F. Roussi, P. Leyssen, J. Costa, M. Litaudon, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 1505–1512.
- [9] N. Corlay, L. Delang, E. Girard-Valenciennes, J. Neyts, P. Clerc, J. Smadja, F. Guéritte, P. Leyssen, M. Litaudon, *Fitoterapia* 97 (2014) 87–91.
- [10] M. Bourjot, P. Leyssen, J. Neyts, V. Dumontet, M. Litaudon, *Molecules* 19 (2014) 3617–3627.
- [11] L.-F. Nothias-Scaglia, C. Pannecouque, F. Renucci, L. Delang, J. Neyts, F. Roussi, J. Costa, P. Leyssen, M. Litaudon, J. Paolini, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1277–1283.
- [12] F.J. Evans, S.E. Taylor, *Pro-Inflammatory, Tumor-Promoting and Anti-Tumour Diterpenes of the Plant Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae*, Springer Vienna, Vienna, 1983.
- [13] G. Goel, H.P.S. Makkar, G. Francis, K. Becker, *Int. J. Toxicol.* 26 (2007) 279–288.
- [14] M. Blanco-Molina, G.C. Tron, A. Macho, C. Lucena, M.A. Calzado, E. Muñoz, G. Appendino, *Chem. Biol.* 8 (2001) 767–778.
- [15] L. Saraiva, P. Fresco, E. Pinto, J. Gonçalves, *Eur. J. Pharmacol.* 491 (2004) 101–110.
- [16] M.A. Girin, S. Paphassarang, C. David-Eteve, A. Chaboud, J. Raynaud, *J. Chromatogr.* 637 (1993) 206–208.
- [17] G. Vogg, E. Mattes, J. Rothenburger, N. Hertkorn, S. Achatz, H. Sandermann Jr., *Phytochemistry* 51 (1999) 289–295.
- [18] Q. Tang, Z. Su, Z. Han, X. Ma, D. Xu, Y. Liang, H. Cao, X. Wang, X. Qu, A. Hoffman, H. Liu, D. Gu, D. Qiu, *Phytochem. Lett.* 5 (2012) 214–218.
- [19] C. Bicchi, G. Appendino, C. Cordero, P. Rubiolo, D. Ortelli, J.-L. Veuthey, *Phytochem. Anal.* 12 (2001) 255–262.
- [20] L. Zhang, X. Shu, A. Ding, L. Yu, Y. Tang, J. Duan, E. Shang, X. Shen, *Chromatographia* 70 (2009) 805–810.
- [21] M. Jarret, J. Katsamas, K. Cawkill, L. Henderson, P. Welburn, *J. Am. Acad. Dermatol.* 68 (2013) AB156.
- [22] J.-J. Hou, W.-Y. Wu, J. Liang, Z. Yang, H.-L. Long, L.-Y. Cai, L. Fang, D.-D. Wang, S. Yao, X. Liu, B.-H. Jiang, D.-A. Guo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 321–330.
- [23] X.-R. Hou, L.-L. Wan, Z.-J. Zhan, C.-P. Li, W.-G. Shan, *J. Pharm. Anal.* 1 (2011) 197–202.
- [24] X. Meng, X. Zhao, Z. Long, Y. Yuan, H. Zhuang, K. Bi, X. Chen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72 (2013) 299–305.
- [25] S. Chow, M.T. Fletcher, R.A. Mckenzie, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2011) 7482–7487.
- [26] S. Zhang, F. Zhang, X. Li, W. Dong, L. Wen, S. Wang, *Phytochem. Anal.* 18 (2007) 91–97.
- [27] B. Xia, K. Xu, X. Liu, Y. Chai, C. Sun, Y. Gu, L. Ding, Y. Zhou, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 2502–2508.
- [28] M. Yang, Z. Lu, K. Yu, Q. Wang, X. Chen, Y. Li, X. Liu, W. Wu, D. Guo, *Int. J. Mass Spectrom.* 323–324 (2012) 55–62.
- [29] W. Jiao, D.-M. Fang, Z.-J. Wu, J.-Z. Chen, H.-W. Shao, G.-L. Zhang, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 27 (2013) 276–280.
- [30] G. Vogg, S. Achatz, A. Ketrup, H. Sandermann Jr., *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 563–573.
- [31] V. Punsuvon, R. Nokkaew, S. Karnasuta, *ScienceAsia* 38 (2012) 223–225.
- [32] M. Baldini, C. Ferfua, R. Bortolomeazzi, G. Verardo, J. Pascali, E. Piasentier, L. Franceschi, *Ind. Crops Prod.* 59 (2014) 268–276.
- [33] K. Ichihashi, D. Yuki, H. Kurokawa, A. Igarashi, T. Yajima, M. Fujiwara, K. Maeno, S. Sekiguchi, M. Iwata, H. Nishino, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (2011) 851–861.
- [34] Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, *Chromatographia* 70 (2009) 1045–1054.
- [35] R. Schmidt, E. Hecker, *Cancer Res.* 35 (1975) 1375–1377.
- [36] G. Appendino, S. Jakupovic, G.C. Tron, J. Jakupovic, V. Milon, M. Ballero, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 749–756.
- [37] G. Corea, C. Fattorusso, E. Fattorusso, V. Lanzotti, *Tetrahedron* 61 (2005) 4485–4494.
- [38] G. Fürstenberger, *Tetrahedron Lett.* 18 (1977) 925–928.
- [39] J. Jakupovic, T. Morgenstern, M. Bittner, M. Silva, *Phytochemistry* 47 (1998) 1601–1609.
- [40] J. Hohmann, F. Evanics, L. Berta, T. Bartók, *Planta Med.* 66 (2000) 291–294.
- [41] J. Jakupovic, F. Jeske, T. Morgenstern, F. Tschritzis, J.A. Marco, W. Berendsohn, *Phytochemistry* 47 (1998) 1583–1600.
- [42] S. El-Mekkawy, M.R. Meselhy, N. Nakamura, M. Hattori, T. Kawahata, T. Otake, *Phytochemistry* 53 (2000) 457–464.
- [43] X.-L. Zhang, L. Wang, F. Li, K. Yu, M.-K. Wang, *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 858–864.
- [44] A. Vasas, E. Sulyok, D. Rédei, P. Forgo, P. Szabó, I. Zupkó, A. Berényi, J. Molnár, J. Hohmann, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 1453–1461.
- [45] A.M. Madureira, N. Gyémánt, J.R. Ascenso, P.M. Abreu, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 950–953.
- [46] C.A. Smith, G. O'Maille, E.J. Want, C. Qin, S.A. Trauger, T.R. Brandon, D.E. Custodio, R. Abagyan, G. Siuzdak, *Ther. Drug Monit.* 27 (2005) 747–751.
- [47] H. Horai, M. Arita, S. Kanaya, Y. Nihei, T. Ikeda, K. Suwa, Y. Ojima, K. Tanaka, S. Tanaka, K. Aoshima, Y. Oda, Y. Kakazu, M. Kusano, T. Tohge, F. Matsuda, Y. Sawada, M.Y. Hirai, H. Nakanishi, K. Ikeda, N. Akimoto, T. Maoka, H. Takahashi, T. Ara, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, S. Neumann, T. Iida, K. Tanaka, K. Funatsu, F. Matsuura, T. Soga, R. Taguchi, K. Saito, T. Nishioka, *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 703–714.



## II. 4. Article n°4 : Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead

*Les informations complémentaires sont disponibles sur internet à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1021/np500271u>*



Figure 36. *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*. Photo : Pr. Guilhan Paradis



## Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead

Louis-Félix Nothias-Scaglia,<sup>†,‡</sup> Pascal Retailleau,<sup>‡</sup> Julien Paolini,<sup>†</sup> Christophe Pannecouque,<sup>§</sup> Johan Neyts,<sup>§</sup> Vincent Dumontet,<sup>‡</sup> Fanny Roussi,<sup>‡</sup> Pieter Leyssen,<sup>§</sup> Jean Costa,<sup>†</sup> and Marc Litaudon<sup>\*,‡</sup>

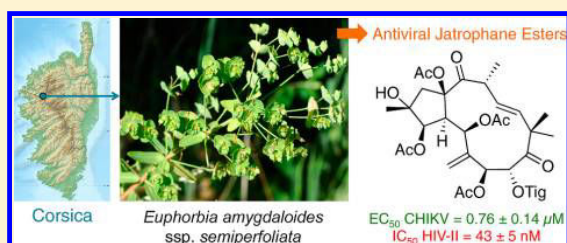
<sup>†</sup>Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France

<sup>‡</sup>Centre de Recherche de Gif, LabEx CEBA, Institut de Chimie des Substances Naturelles ICSN, CNRS UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France

<sup>§</sup>Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

### S Supporting Information

**ABSTRACT:** Bioassay-guided purification of an EtOAc extract of the whole plant of *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* using a chikungunya virus-cell-based assay led to the isolation of six new (1–4, 9, and 10) and six known (5–7, 8, 11, and 12) jatrophone esters. Their planar structures and relative configurations were determined by extensive spectroscopic analysis, and their absolute configurations by X-ray analysis. These compounds were investigated for selective antiviral activity against chikungunya virus (CHIKV), Semliki Forest virus, Sindbis virus, and HIV-1 and HIV-2 viruses. Compound 3 was found to be the most potent and selective inhibitor of the replication of CHIKV and of HIV-1 and HIV-2 ( $EC_{50} = 0.76$ ,  $IC_{50} = 0.34$  and  $0.043 \mu\text{M}$ , respectively). A preliminary structure–activity relationship study demonstrated that potency and selectivity are very sensitive to the substitution pattern on the jatrophone skeleton. Although replication strategies of CHIK and HIV viruses are quite different, the mechanism of action by which these compounds act may involve a similar target for both viruses. The present results provide additional support for a previous hypothesis that the anti-CHIKV activity could involve a PKC-dependent mechanism.



Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging arthropod-borne virus that causes massive epidemics and that is associated with severe morbidity (virus-induced arthralgia, fever, myalgia, and rashes). The recent resurgence of this disease in Africa, the Indian subcontinent, southeast Asia, and lately also South and Central America is linked to worldwide proliferation of the mosquito vectors that transmit this disease, in particular *Aedes albopictus* and *A. aegypti*. Currently, there is no specific antiviral therapy or vaccine available for the treatment or prevention of CHIKV infection.<sup>1,2</sup> Comprehensive scientific reviews have recently highlighted the challenges and latest developments in the quest for new therapeutic solutions.<sup>3,4</sup>

In an effort to identify novel inhibitors of CHIKV replication, our group selected two Euphorbiaceae species that belong to the genus *Trigonostemon* for thorough chemical investigation, i.e., *T. cherrieri* and *T. howii*, which, respectively, originate from New Caledonia and Vietnam. From these species, several daphnane-type and tiglane-type diterpenoids were isolated, of which some exhibited selective anti-CHIKV activities.<sup>5–7</sup> Moreover, the structurally related tiglane diterpenoids, prostratin and 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), were also found to be potent and selective inhibitors of CHIKV replication.<sup>8</sup> Diterpenoids isolated from Euphorbiaceae species

represent a large group of highly structurally diverse compounds that possess remarkable biological potential.<sup>9–12</sup> Phorbol esters are well known for their anti-HIV properties,<sup>13–15</sup> but also exert a strong tumor-promoting effect.<sup>16</sup> Ingenols are potent biologically active compounds, as exemplified by the recent launch of Picato (ingenol mebutate) in treating actinic keratosis. This compound originated from *Euphorbia peplus* and is an activator of protein kinase C (PKC).<sup>12</sup> Jatrophone esters can induce HIV receptor down-regulation and HIV transcription through activation of the Ras-MEK pathway and classical PKCs.<sup>15</sup> They are also powerful P-glycoprotein inhibitors and thus may be promising adjuvants for the modulation of cancer multidrug resistance.<sup>17,18</sup>

In the present study, the anti-CHIKV potential of Mediterranean *Euphorbia* species was assessed using a CHIKV cell-based assay. *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* (Viv.) A. R. Sm. exhibited the most potent anti-CHIK activity and was selected for further chemical and antiviral studies. *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* is an endemic plant of Corsica and Sardinia, usually growing in riverbanks as a perennial, annual, or biannual plant.<sup>19</sup> The genus *Euphorbia* is

Received: April 2, 2014

Published: June 13, 2014

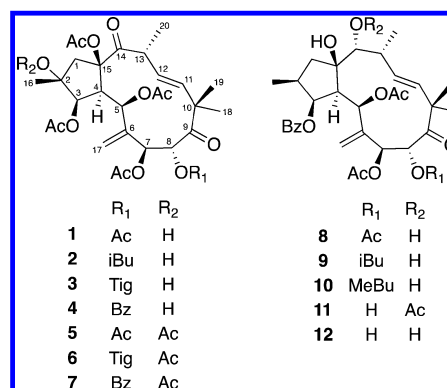
the largest of the family Euphorbiaceae, consisting of approximately 2000 species ranging from prostrate annual, cactus-like succulents to tall trees.<sup>20</sup> On the European continent, the genus *Euphorbia* is well represented with more than 100 species mainly belonging to the subgenus *Esula*.<sup>21,22</sup> The spurges (*Euphorbia* spp.) produce a white irritant milky sap named latex, and according to Greek and Roman literature, they were used in traditional medicine to treat cancerous conditions, to relieve chronic pain, and as purgatives.<sup>23</sup> In Corsica, the latex of *E. characias* was used traditionally as a vesicant agent to remove warts and to accelerate necrosis of unhealthy teeth.<sup>24</sup> Only two prior studies have been reported on the chemical composition of *E. amygdaloides*.<sup>25,26</sup> C-13-Hydroxylated jatrophane esters adopting a rare endo-type conformation were isolated from the whole plant of *E. amygdaloides*, whereas the aerial parts of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* afforded abietanolides, esters of 4-deoxyphorbol, jatrophanes, and euphoperfolianes. Jatrophane esters isolated from *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* were found to stimulate tubulin assembly in vitro and to inhibit the growth of human cancer cell lines.<sup>27</sup>

This paper reports the bioassay-guided isolation and characterization of six new (1–4, 9, and 10) and six known (5–8, 11, and 12) jatrophane ester derivatives and their anti-CHIKV properties. The panel of viruses against which the antiviral activity of this compound class was studied was expanded with two additional members of the genus *Alphavirus* (Sindbis virus, SINV, and Semliki Forest virus, SFV) and two members of the genus *Lentivirus*, i.e., HIV-1 and HIV-2 viruses.

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 52 EtOAc and MeOH extracts were prepared from nine *Euphorbia* and one *Mercurialis* (Euphorbiaceae) species and were evaluated for selective antiviral activity in a CHIKV cell-based assay (data to be published elsewhere). The EtOAc extract obtained from the whole plant (450 g) of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* exhibited a potent anti-CHIKV activity ( $EC_{50} < 0.8 \mu\text{g/mL}$ ) and was selected for subsequent bioassay-guided purification. This extract (30.4 g) was first subjected to normal-phase flash chromatography, and fraction F9 ( $EC_{50} < 0.8 \mu\text{g/mL}$ ) was then sequentially purified by preparative, semipreparative, and analytical RP-HPLC to yield jatrophane esters 1–12. These were classified into groups A and B, with group A (1–7) being esters of 9,14-dioxajatropha-6(17),11E-diene and group B (8–12) being esters of 9-oxojatropha-6(17),11E-diene. The structure elucidation of compounds 5–8, 11, and 12 and the new compounds 1–4, 9, and 10 was performed using extensive NMR spectroscopy and mass spectrometry, and their absolute configurations were obtained by X-ray analysis and through comparison of specific rotation values.

The IR spectra of compounds 1–12 displayed similar absorption bands for carbonyl (ca.  $1740 \text{ cm}^{-1}$ ) and carbonyl ester ( $1720 \text{ cm}^{-1}$ ) groups and for compounds 1–4 and 8–12 free hydroxy group(s) (ca.  $3480 \text{ cm}^{-1}$ ). The  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of compounds 1–12 (Tables 1–3) were similar to each other and showed several signals for structural elements characteristic of jatrophane diterpene esters such as two double bonds (one *trans*-disubstituted and one exomethylene) and several ester groups. A close inspection of their NMR spectra indicated that compounds in group A differed from those of group B by the presence of an additional carbonyl instead of an oxymethine. Since the structures of the new compounds 1–4



**Table 1.**  $^1\text{H}$  NMR Data of Jatrophane Esters 1 (600 MHz), 2 and 3 (500 MHz), and 4 (300 MHz) in  $\text{CDCl}_3$

pos.	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) and multiplicity <sup>a</sup>			
	1	2	3	4
1 $\alpha$	2.88	2.87	2.88	2.89 dd
1 $\beta$	2.09	2.07	2.07	2.08 d
3	5.31	5.30	5.31	5.33 dd
4	2.98	2.93	2.96	2.98 dd
5	5.61	5.59	5.68	5.72 d
7	5.35	5.35	5.38	5.48 br s
8	5.62	5.58	5.61	5.84 br s
11	6.25	6.22	6.26	6.31 d
12	5.57	5.56	5.58	5.62 dd
13	3.62	3.61	3.63	3.65 dq
16	1.23	1.22	1.22	1.23 s
17a	5.20	5.19	5.20	5.32 br s
17b	5.16	5.20	5.18	5.21 br s
18	1.15	1.14	1.16	1.19 s
19	1.24	1.23	1.25	1.30 s
20	1.19	1.18	1.19	1.21 d
HO-2	3.83	3.80	3.78	3.79 br s

<sup>a</sup>The same multiplicity for compounds 1–4 was observed.  $J_{\text{H-H}}$  (Hz). For 1–4: 1 $\alpha$ ,1 $\beta$  = 15.0. For 1–3: 1 $\alpha$ ,3 = 1.4. For 4: 1 $\alpha$ ,3 = 1.1. For 1, 2, and 4: 11,12 = 15.8; 12,13 = 9.6; 13, 20 = 6.6. For 3: 11,12 = 15.6; 12,13 = 9.7; 13,20 = 6.5. For 1 and 4: 3,4 = 3.8; 4,5 = 1.1. For 2: 3,4 = 3.7; 4,5 = 1.3. For 3: 3,4 = 3.3; 4,5 = 1.4. Other signals (ppm). For 1: AcO-3 2.12 (s); AcO-3 2.09 (s); AcO-7 2.04 (s); AcO-8 2.08 (s); AcO-15 2.14 (s). For 2: AcO-3 2.1 (s); AcO-5 2.05 (s); AcO-7 2.01 (s); AcO-15 2.2 (s); iBuO-8 2.61 (h), 1.13 (d,  $J = 7.0$ ), 1.08 (d,  $J = 7.0$ ). For 3: AcO-3 2.06 (s); AcO-5 2.11 (s); AcO-7 2.03 (s); AcO-15 2.12 (s); TigO-8 6.86 (br q,  $J = 7.2$ ), 1.79 (br s), 1.76 (br d,  $J = 7.2$ ). For 4: AcO-3 2.02 (s); AcO-5 2.08 (s); AcO-7 2.13 (s); AcO-15 2.10 (s); BzO-8 8.2 (AA'), 7.41 (BB'), 7.54 (C).

(group A) and 9 and 10 (group B) were very similar to one another, only the structure elucidation of compound 1 is detailed below.

Compound 1 was obtained as a white, amorphous powder, and HRESIMS showed a pseudomolecular ion at  $m/z$  609.2566  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , corresponding to the formula  $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{O}_{13}$  (calcd for 609.2542). Analysis of the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 1 ( $\text{CDCl}_3$ , Table 2) revealed the presence of two ketone ( $\delta_{\text{C}}$  205.6 and 215.8) and five ester ( $\delta_{\text{C}}$  169.4, 169.6, 170.0, 170.1, 170.8) carbonyls, which were assigned to five acetyls based on methyl group resonances in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum ( $\delta_{\text{H}}$  at 2.04, 2.08, 2.09, 2.12, and 2.14). By removing the acetyl groups from the molecular formula, it could be deduced that the parent diterpenoid has the empirical formula  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_8$  and thus

**Table 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR Data for Jatrophone Esters **1** (150 MHz), **2** and **3** (125 MHz), and **4** (75 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}}$  in ppm)

carbon	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	type <sup>b</sup>
1	51.3	51.5	51.1	51.4	CH <sub>2</sub>
2	77.9	77.9	77.8	78.0	C
3	80.1	80.2	80.0	80.2	CH
4	50.2	50.4	50.1	50.4	CH
5	68.5	68.6	68.2	68.4	CH
6	142.5	142.8	142.7	142.8	C
7	68.0	68.2	68.1	68.3	CH
8	74.6	74.1	74.3	75.0	CH
9	205.6	205.4	205.2	205.0	C
10	48.8	48.8	48.6	48.9	C
11	137.0	137.3	137.0	137.2	CH
12	132.9	132.7	132.6	133.0	CH
13	45.3	45.4	45.1	45.3	CH
14	215.8	215.8	215.5	215.3	C
15	91.4	91.5	91.3	91.5	C
16	21.2	21.1	21.0	21.0	CH <sub>3</sub>
17	113.3	113.3	113.2	113.6	CH <sub>2</sub>
18	22.9	22.8	22.8	22.9	CH <sub>3</sub>
19	28.0	28.1	28.0	28.2	CH <sub>3</sub>
20	20.2	20.2	20.0	20.2	CH <sub>3</sub>

<sup>a</sup>Other signals. For **1**: AcO-3 169.4 (s), 21.7 (q); AcO-5 169.6 (s), 21.1 (q); AcO-7 170.0 (s), 20.7 (q); AcO-8 170.1 (s), 20.5 (q); AcO-15 170.8 (s), 21.2 (q). For **2**: AcO-3 169.4 (s), 21.6 (q); AcO-5 169.4 (s), 21.0 (q); AcO-7 169.9 (s), 20.6 (q); AcO-15 170.7 (s), 21.1 (q); *i*BuO-8 175.9 (s), 33.7 (d), 19.3 (s), 18.7 (s). For **3**: AcO-3 169.2 (s), 21.0 (q); AcO-5 169.2 (s), 21.4 (q); AcO-7 169.7 (s), 20.5 (q); AcO-15 170.5 (s), 20.8 (q); TigO-8 166.5 (s), 138.5 (s), 127.7 (d), 14.4 (q), 11.96 (q). For **4**: AcO-3 169.5 (s), 21.6 (q); AcO-5 169.9 (s), 21.2 (q); AcO-7 170.7 (s), 21.2 (q); AcO-15 169.4 (s), 20.8 (q); BzO-8 165.4 (s), 130.1 (s), 129.5 (d), 128.5 (d), 133.5 (d). <sup>b</sup>Identical for all compounds.

possesses five degrees of unsaturation. Furthermore, the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra indicated four olefinic signals attributable to a *trans*-disubstituted double bond,  $\delta_{\text{C}}$  137.0 (C-11) and 132.9 (C-12) and  $\delta_{\text{H}}$  6.25 (d,  $J = 15.8$  Hz, H-11) and 5.57 (dd,  $J = 15.8$  and 9.6 Hz, H-12), and a vicinal-disubstituted double bond,  $\delta_{\text{C}}$  142.5 (C-6) and 113.3 (C-17) and  $\delta_{\text{H}}$  5.20 and 5.16 (H-17a and H-17b, respectively). A broad singlet at  $\delta_{\text{H}}$  3.83 without HSQC correlation could be assigned to a hydroxy group. In addition, four methyls, one methylene, four acyloxymethines, two methines, two oxygenated quaternary carbons, and a quaternary carbon accounted for the remaining atoms. From 11 degrees of unsaturation, nine were attributed to five acetyls, two carbonyls, and two double bonds, and thus, two rings had to be assumed. Taking into account previous observations, it can be deduced that this compound is a hydroxylated pentaesterified macrocyclic dioxojatrophone diterpenoid.

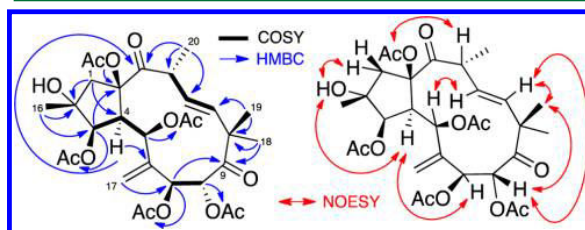
Examination of the COSY spectrum of compound **1** revealed three spin systems (H-3 to H-5, H-7 to H-8, and H-11 to H<sub>3</sub>-20). The first one consisted of two oxymethines [ $\delta_{\text{H}}$  5.31 (br d,  $J = 3.8$  Hz, H-3), 5.61 (br d,  $J = 1.4$  Hz, H-5)] connected through a methine at  $\delta_{\text{H}}$  2.98 (dd,  $J = 3.8$  and 1.4 Hz, H-4). Two adjacent oxymethine protons, of which one was allylic [ $\delta_{\text{H}}$  5.35 (br s, H-7) and 5.62 (br s, H-8)], composed the second one. The third spin system could be built from a *trans*-disubstituted double bond (C11–C12) connected to a methyl group at  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (d,  $J = 6.6$  Hz, H<sub>3</sub>-20) via a deshielded allylic methine at  $\delta_{\text{H}}$  3.62 (dq,  $J = 9.6$  and 6.6 Hz, H-13). From the HMBC spectrum, correlations allowed the connection of these

**Table 3.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Data for Jatrophanes Esters **9** (75 and 300 MHz) and **10** (125 and 500 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  in ppm and multiplicity,  $J$  in Hz)

pos.	9 <sup>a</sup>			10 <sup>a</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$		$\delta_{\text{H}}^b$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}^b$ (J)
1 $\alpha$	51.9	CH <sub>2</sub>	2.37	51.9	CH <sub>2</sub> 2.38 dd (13.3, 7.0)
1 $\beta$			1.90		1.91 dd (13.3, 12.8)
2	35.6	C	2.15	35.6	C 2.14 m
3	80.0	CH	5.67	80.0	CH 5.68 br t (3.2)
4	45.4	CH	2.82	45.4	CH 2.81 br d (3.2)
5	71.7	CH	5.44	71.7	CH 5.49 br s
6	144.0	C		144.0	C
7	68.5	CH	5.61	68.5	CH 5.61 br s
8	74.7	CH	5.68	74.7	CH 5.70 br s
9	206.9	C		206.9	C
10	48.6	C		48.6	C
11	135.4	CH	6.04	135.4	CH 6.06 d (16.3)
12	133.3	CH	6.17	133.3	CH 6.13 dd (16.3, 8.8)
13	36.9	CH	3.03	36.9	CH 3.0 dq (8.8, 7.2)
14	81.4	C	3.68	81.4	C 3.68 br s
15	82.8	C		82.8	C
16	14.0		0.89	14.0	0.90 d (6.5)
17a	110.9	CH <sub>2</sub>	5.09	110.9	CH <sub>2</sub> 5.10 s
17b			4.89		4.90 s
18	23.4	CH <sub>3</sub>	1.19	23.4	CH <sub>3</sub> 1.20 s
19	28.1	CH <sub>3</sub>	1.21	28.1	CH <sub>3</sub> 1.22 s
20	25.6	CH <sub>3</sub>	1.16	25.6	CH <sub>3</sub> 1.17 d (7.2)
HO <sup>c</sup>			2.51		2.52 br s
HO <sup>c</sup>			2.03		2.03 br s

<sup>a</sup>Other signals in  $^1\text{H}$  NMR. For **9**: BzO-3 8.08 (AA'), 7.45 (BB'), 7.57 (C); AcO-5 1.60 (s); AcO-7 2.08 (s); *i*BuO-8 2.59 (h,  $J = 7.2$  Hz), 1.11 (d,  $J = 7.2$  Hz), 1.05 (d,  $J = 7.2$  Hz). For **10**: BzO-3 8.08 (AA'), 7.46 (BB'), 7.57 (C); AcO-5 1.59 (s); AcO-7 2.08 (s); MeBuO-8 2.44 (m), 1.58 (d,  $J = 7.5$ ), 1.40 (m), 1.09 (d,  $J = 7.0$ ), 0.76 (t,  $J = 7.5$ ). Other signals in  $^{13}\text{C}$  NMR. For **9**: 3-BzO 165.6 (s), 133.4 (d), 130.7 (s), 129.7 (d), 128.7 (d); AcO-5 169.6 (s), 20.9 (q); AcO-7 170.4 (s); 20.9 (q); *i*BuO-8 175.9 (s), 33.7 (d), 19.3 (q), 18.7 (q). For **10**: BzO-3 165.6 (s), 133.3 (d), 130.6 (s), 129.8 (d), 128.8 (d); AcO-5 169.6 (s), 20.8 (q); AcO-7 170.4 (s), 20.9 (q); MeBuO-8 175.4 (s), 40.7 (d), 26.9 (t), 11.3 (q), 16.5 (q). <sup>b</sup>Same multiplicity and coupling constant for compounds **9** and **10**. <sup>c</sup>Signals could not be assigned.

spin systems as shown in Figure 1. HMBC correlations of H<sub>3</sub>-18 and H<sub>3</sub>-19 ( $\delta_{\text{H}}$  1.15, s and 1.24, s) to C-9, C-10, and C-11

**Figure 1.** Key COSY (bold, left), HMBC (blue arrows, left), and NOESY (red arrows, right) correlations for the structure elucidation of **1**.

suggested the presence of a *gem*-dimethyl group adjacent to the ketone C-9 and the *trans*-disubstituted double bond C-11 to C-12. The second fragment, C-7/C-8, was connected to C-9 on the basis of HMBC correlations from H-7/H-8 to ketone C-9. From HMBC correlations between exomethylene protons H<sub>2</sub>-



17 with C-5 ( $\delta_C$  68.5) and C-7 ( $\delta_C$  68.0), it could be deduced that the spin systems H-3/H-5 and H-7/H-8 are connected via this exomethylene (C-6–C-17). Finally, HMBC correlations from H<sub>3</sub>-16 to C-1 and C-3 and H-1 to C-2/C-3/C-4/C-14 and C-15 allowed the planar structure of the jatrophae skeleton to be established. Elucidation of the acylation pattern was partially solved from the examination of diagnostic long-range ( $^3J_{C-H}$ ) HMBC couplings between several oxymethine protons (H-3, H-5, H-7, and H-8) and carbonyl ester carbons, indicating the presence of acetyloxy groups at C-3, C-5, C-7, and C-8. The locations of the remaining tertiary alcohol and acetyl group at C-2 and C-15, respectively, were established on the basis of the observation of NOE effects between OAc-15 and the allylic methine H-13 and between OH-2 and the protons H-1 $\alpha$  and H-4, in the NOESY spectrum.

The relative configuration of **1** was deduced from analysis of the coupling constant pattern and the results of NOESY experiments and by comparison with data reported in the literature. Previous studies on the stereochemistry of jatrophae esters have indicated that they can adopt one of the two possible conformations depending on the esterification pattern: the endo-type conformation with an exomethylene perpendicular to the main plane of the molecule, and the exo-type conformation, with the exomethylene in the plane.<sup>26,28</sup> Assuming an  $\alpha$ -orientation of H-4 and a *trans*-bicyclo[10.3.0]-pentadecane scaffold characteristic of all jatrophanes, the stereochemistry and conformational state of compound **1** were determined from the coupling constants between alicyclic protons ( $J = 0$ –2 Hz), suggesting an orthogonal relationship, and from NOE effects observed between protons of the macrocyclic core and methyl groups, as depicted in Figure 1. Thus, compound **1** was assigned as (2*R*\*,3*R*\*,4*S*\*,5*R*\*,7*S*\*,8*R*\*,13*R*\*,15*R*\*)-3,5,7,8,15-pentaacetoxy-2-hydroxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11*E*-diene and preferentially adopts the exo-type conformation. Jatrophae esters isolated previously from this species displayed a similar stereochemistry and conformational state.<sup>25</sup>

The same general approach was used to elucidate the structures of jatrophae esters **2**–**4**. Their spectrometric and spectroscopic data are indicated in the Experimental Section and in Tables 1 and 2. The structures of **2**–**4** differ from the structure of compound **1** only by the presence of an isobutyryloxy, a tiglyloxy, or a benzoyloxy group at C-8, respectively, instead of an acetoxy group for **1**. All <sup>1</sup>H NMR coupling constants and correlations observed in 1D and 2D NMR experiments were similar for compounds **1**–**4**.

Compounds **5**–**7** are previously known C-2-acetylated derivatives of compounds **1**, **3**, and **4**, respectively. Their identification was based on comparison with reported NMR data.<sup>25</sup>

Crystals of compounds **1**–**7** were obtained from concentrated Et<sub>2</sub>O solution in tubes saturated with hexane vapors. The absolute configuration of compounds **2**–**4**, **6**, and **7** and the relative configuration of compounds **1** and **5** were determined by X-ray crystallographic analysis, which confirmed that they all adopt preferentially the exo-type conformation. The details of this study are presented in the Supporting Information, and an ORTEP view of molecule **1** is shown Figure 2.

The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of compounds **9** and **10** (Table 3) were closely comparable to those of compounds **1**–**7**. Compared to the latter, they all were found to possess an oxymethine proton at position C-14 ( $\delta_H$  ca. 3.68) instead of a ketone, a methine proton at C-2 coupled to the adjacent methyl

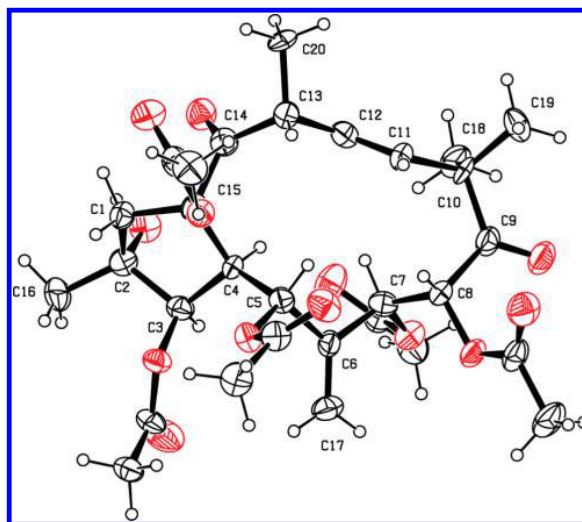


Figure 2. ORTEP<sup>29</sup> view of the X-ray analysis of compound **1**.

group, a benzoyloxy instead of an acetyloxy at C-3 (in **1**–**7**), an extra hydroxy group, and modification of ester residue at position C-8. Compounds **8**, **11**, and **12** were identified by comparison of their NMR spectra and specific rotation values with those reported in the literature.<sup>25</sup> Compounds **9** and **10** differ from compound **8**, respectively, only by an isobutyryloxy and a methylbutyryloxy instead of an acetyloxy at C-8. The esterification patterns were solved from the HMBC spectra since all carbonyl esters could be correlated with their respective oxymethines ( $^3J_{C-H}$ ). The relative configurations of **9** and **10** were solved by inspection of coupling constants between alicyclic protons and of NOESY correlations, indicating that these esters possess the same configuration as for **8**, **11**, and **12**. Thus, they adopt the same exo-type conformational state as that of compounds **1**–**7**.

The relative configuration of compound **12**, (2*S*\*,3*S*\*,4*R*\*,5*R*\*,7*S*\*,8*R*\*,13*R*\*,14*R*\*,15*R*\*)-5,7-diacetoxy-3-benzoyloxy-8,14,15-trihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11*E*-diene, was confirmed by X-ray diffraction analysis. Taking into account that compounds **8**–**12** possess specific rotations of the same sign as that of compounds **1**–**7** ( $[\alpha]_D^{25}$  (*c* 0.10, MeOH) = –450, –100, –80, –100, and –100 for compounds **8**–**12**, respectively, and –70, –90, –90, –110, –210, –150, and –110 for compounds **1**–**7**, respectively) and that absolute configurations of **2**–**4**, **6**, and **7** have been established by X-ray crystal analysis, it was considered that jatrophae esters **1**–**12** all have the same absolute configuration.

The antiviral evaluation of compounds **1**–**11** was performed in virus-cell-based assays for three members of the genus *Alphavirus* (CHIKV, SINV, and SFV) and against the replication of HIV virus type-1 (III<sub>B</sub>) and type-2 (ROD) replication. The results of this study are reported in Tables 4 and 5.

Concerning the antiviral activity against alphaviruses, compound **3** and, to a lesser extent, compound **4** were found to be the most potent and selective inhibitors of CHIKV replication ( $EC_{50} = 0.76 \pm 0.14 \mu\text{M}$ , SI = 208, and  $EC_{50} = 4.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , SI = 29, respectively), whereas the other compounds showed no or only moderate inhibitory activity on CHIKV replication. Compound **3** also exhibited moderate anti-SINV activity, while compounds **8**–**10** exhibited a significant, albeit

Table 4. Antimetabolic and Antiviral Activities of Compounds 1–11 in Vero Cells against CHIKV, SINV, and SFV<sup>a</sup>

compound	CC <sub>50</sub> Vero	EC <sub>50</sub> CHIKV	SI <sup>b</sup>	EC <sub>50</sub> SINV	SI <sup>b</sup>	EC <sub>50</sub> SFV	SI <sup>b</sup>
1	n.d. <sup>c</sup>	>164		n.d. <sup>c</sup>		n.d. <sup>c</sup>	
2	>196	>196		>157		>157	
3	159	0.76 ± 0.14	208	44	3.6	>116	
4	125	4.3 ± 0.2	29	>165		>165	
5	>154	60 ± 14	>2.6	>154		>115	
6	145	17.4 ± 0.7	8.3	>145		>145	
7	>50	17.1	>2.9	>140		>140	
8	151	19.5 ± 3.6	7.8	30.1 ± 7.5	5.0	62.0 ± 2.9	2.4
9	60	21.0 ± 3.4	2.8	28.8 ± 11.2	2.1	20.5 ± 0.5	2.9
10	>190	111 ± 14	>1.7	51.0 ± n.d.	>3.7	76 ± n.d.	>2.5
11	150	80 ± 6	1.9	>163		>163	
chloroquine	89 ± 28	10 ± 5	8.9	11.0 ± 2.1	8.1	13.8 ± 2.3	6.4

<sup>a</sup>Data in  $\mu\text{M}$ . Values are the median  $\pm$  median absolute deviation calculated from at least 3 independent assays. <sup>b</sup>SI or window for antiviral selectivity calculated as  $\text{CC}_{50} \text{ Vero}/\text{EC}_{50} \text{ CHIKV}$  (or SINV or SFV). <sup>c</sup>n.d. not determined.

Table 5. Antimetabolic and Antiviral Activities of Compounds 1–11 in Vero Cells against HIV-I (IIIa) and HIV-II (ROD) (Data in  $\mu\text{M}$ )<sup>a</sup>

compound	CC <sub>50</sub> MT-4	IC <sub>50</sub> HIV-I (IIIa)	SI <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> HIV-II (ROD)	SI <sup>b</sup>
1	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>		n.d. <sup>b</sup>	
2	>32	>79		>79	
3	>32	0.34 ± 0.05	>96	0.043 ± 0.005	>751
4	>30	>59		10.9 ± 1.2	>2.8
5	>33	37.1 ± 1.5		5.9 ± 0.8	>5.5
6	>35	21.5 ± 1.5	>1.6	2.0 ± 0.2	>18
7	>36	>70		34.7 ± 0.3	>1
8	>31	>38		5.2 ± 0.7	>6
9	>16	>39		>39	
10	>33	>76		>76	
11	>31	>81		32.5 ± 3.5	<0.9
nevirapine	>15	0.010 ± 0.008	>148	>15	
lamivudine	>87	3.9 ± 2.9	>22	15.5 ± 11.2	>5.6
azidothymidine	>25	0.0071 ± 0.0004	>3516	0.0060 ± 0.0007	>4176
dideoxyinosine	>50	10.8 ± 3.3	>4.6	9.6 ± 2.1	>5.2

<sup>a</sup>Values are the median  $\pm$  median absolute deviation calculated from at least 3 independent assays. <sup>b</sup>SI or window for antiviral selectivity calculated as  $\text{CC}_{50} \text{ MT-4}/\text{IC}_{50} \text{ HIV (IIIa or ROD)}$ . <sup>c</sup>n.d. not determined.

weak, antiviral activity on the replication of SINV and SFV. From these anti-CHIKV results, a preliminary structure–activity relationship could be established. Within the compounds of group A (1–7), since compounds 6 and 7 are weakly active, it can be deduced that an acetyl group at position 2 proved to be deleterious for anti-CHIKV activity (cf., 3 and 6, and 4 and 7). Another key point is the influence of the C-8 substitution as shown by comparison of anti-CHIKV activities of 1–4 and also 5–7. Thus, the following sequence in efficiency at C-8 may be proposed: tiglyloxy > benzoyloxy > acetyloxy  $\approx$  isobutyryloxy. Only compounds 8 and 9 of group B showed significant anti-CHIKV activities ( $\text{EC}_{50} = 19.5 \pm 3.6 \mu\text{M}$ ,  $\text{SI} = 7.8$ ;  $\text{EC}_{50} = 21.0 \pm 3.4 \mu\text{M}$ ,  $\text{SI} = 2.8$ , respectively). These results indicate that an acetyl and isobutyryl substituent at C-8 play an equivalent role in the anti-CHIKV activity. In contrast, since compound 10 is much less active, it can be deduced that the 2-methylbutyryl group proved to be deleterious for this activity.

In the virus-cell-based assay for HIV (Table 5), only compound 3 showed a strong and selective antiviral effect on HIV-1 and HIV-2 virus replication, with  $\text{IC}_{50} = 0.34 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ,  $\text{SI} > 96$  and  $\text{IC}_{50} = 0.043 \pm 0.005 \mu\text{M}$ ,  $\text{SI} > 751$ , respectively. Compounds 4–6 and 8 displayed moderate antiviral activity against HIV-2. Compound 5, previously

named *SJ-23b*, has been evaluated against HIV-1 in vitro.<sup>15</sup> In this study, it was shown that 5 exhibited a strong inhibitory activity on HIV-1 replication ( $\text{IC}_{50} = 2 \text{ nM}$  and  $\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) in an MT-2 cell-based assay using a recombinant virus (NL4.3-Renilla).<sup>15</sup> It interfered with viral entry by inducing internalization and downregulation of HIV receptors (CD4, CXCR4, and CCR5). Moreover, *SJ-23b*, devoid of pro-tumoral activity, was found to be a potent antagonist of HIV-1 latency, being at least 10 times more potent than prostratin. The ability of HIV-I reactivation by *SJ-23b* was due to the stimulation of classical PKCs, which stimulate the NF- $\kappa\text{B}$  pathway and SP-1 transcription factor in primary T cells in a similar way to prostratin. The observation of differences in  $\text{IC}_{50}$  values reported herein and by Bedoya and associates<sup>14</sup> for compound 5 is possibly due to the use of various HIV strains or T-lymphocyte cell lines for the bioassay (MT-4 vs MT-2).

The anti-HIV-I (IIIb) and anti-HIV-II (ROD) activities of compound 3 might be associated with a similar mechanism of action to the one described for *SJ-23b*.<sup>15</sup> The present results showed that compound 3 is much more potent than *SJ-23b* (5) on the CHIKV and HIV strains that were used in the assays. Taking into account that the anti-HIV effects of *SJ-23b* and several other diterpenoid esters were associated with activation

of PKC<sup>30–33</sup> and that other well-known PKC activators, such as TPA and prostratin, proved to be potent and selective CHIKV inhibitors, the present results support the hypothesis that the antiviral activity against chikungunya virus of jatropha esters most likely involves a PKC-dependent mechanism, although there is no apparent similarity between the replication of CHIKV and HIV. This is reinforced in this study by some aspects of the structure–activity relationships, which were comparable in both cases.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Optical rotations were measured on a JASCO P1010 polarimeter at 25 °C. Melting points were determined in open-end capillary tubes on a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. The UV spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 5 spectrophotometer. IR spectra were recorded with a Nicolet FTIR 205 spectrophotometer. The NMR spectra were recorded on a Bruker 600 MHz instrument (Avance 600) using a 1.7 mm microprobe for compound **1**, on a Bruker 500 MHz instrument (Avance 500) for compounds **2**, **3**, and **10**, and on a Bruker 300 MHz instrument (Avance 300) for compounds **4** and **9**. CDCl<sub>3</sub> was used as solvent. Sunfire C<sub>18</sub> analytical and preparative columns (250 × 4.6 mm and 250 × 19 mm; 10 μm Waters) were used for analytical and preparative HPLC separations using a Waters autopurification system equipped with a binary pump (Waters 2525), a UV–vis diode array detector (190–600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. Silica gel 60 (6–35 and 20–45 μm) and analytical TLC plates (Si gel 60 F<sub>254</sub>) were purchased from SDS (France). The sulfuric molybdate was used as the staining reagent for TLC. The reagent is prepared by dissolving ammonium dimolybdate (50 g) in water (450 mL) and slowly adding concentrated sulfuric acid (50 mL). Prepacked C<sub>18</sub> Versapak cartridges (80 × 150 mm, 20–45 μm, 385 g) were used for flash chromatography using a Combiflash Companion apparatus (Serlabo). HRESIMS data were acquired using an Acquity Waters UPLC coupled to a Waters LCT Premier XE mass spectrometer. The UPLC system was equipped with a Waters Acquity PDA detector. Separation was achieved on a BEH C<sub>18</sub> column (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm) at a flow rate of 0.6 mL/min. Elution was conducted with a H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN + 0.1% formic acid gradient as follows: 95:5 to 0:100 in 5.5 min. The ionization was carried out using an electrospray ionization source in positive mode (range 1500–80 *m/z*). All other chemicals and solvents were purchased from SDS (Peypin, France).

**Plant Material.** The whole plant of *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was collected by one of the authors (L.-F.N.-S.) in July 2011 near Bocca di Vergio, at an altitude of 1300 m, in the Niolu region of Corsica (GPS coordinates: 42°17'26.999" N, 8°54'2.894" E) and identified by L.-F.N.-S. and Marie-José Battesti. A voucher specimen (LF-015) was deposited at the Herbarium of the University of Corsica (Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Corte).

**Extraction and Isolation.** The whole plant of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was air-dried, ground to a coarse powder (dry weight, 450 g), and extracted three times (each 10 L) with ethyl acetate at 40 °C and 100 bar using a Zippertex static high-pressure, high-temperature extractor developed at the ICSN pilot unit. The ethyl acetate extract was concentrated in vacuo at 40 °C to yield 30.4 g of residue ( $\rho = 6.8\%$  w/w). The EtOAc residue was mixed with Celite (53 g) and subjected to flash chromatography on a silica column (Versapak, 80 × 150 mm, 20–45 μm, 385 g, eluted with a gradient of acetone–*n*-heptanes 0 to 100%, 100 mL/min), leading to nine fractions. Fractions F7–F9 were shown to inhibit CHIKV replication ( $EC_{50} = 1.4, 2.0,$  and  $<0.8$  μg/mL, respectively). Fraction F9 (5.1 g) was further purified by silica gel column chromatography (20–45 μm, gradient of *n*-heptanes–EtOAc–MeOH, 8:2:0 to 0:8:2), leading to nine fractions, which were pooled on the basis of TLC (F9-1 to F9-9). Fractions F9-4 (0.9 g) and F9-5 (0.8 g) were subjected to silica gel column chromatography (6–35 μm) using a gradient of *n*-heptanes–acetone (7:3 to 0:1) to give eight fractions (F9-4-1 to F9-4-8) and six

additional fractions (F9-5-1 to F9-5-6), respectively. The purification of fraction F9-4-5 (70 mg) by preparative HPLC (Sunfire C<sub>18</sub>, H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN + 0.1% formic acid, 4:6 to 2:8 in 20 min, 21 mL/min) afforded compound **6** (8.5 mg). The purification of fraction F9-4-6 (170 mg) by preparative HPLC (Sunfire C<sub>18</sub>, H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN + 0.1% formic acid, 5:5 to 38:62 in 22 min, 21 mL/min) afforded compounds **2** (7.5 mg), **3** (3 mg), **7** (22 mg), and **11** (35 mg) and an impure mixture (42.5 mg). The latter was separated by semipreparative HPLC (Kromasil C<sub>18</sub>, H<sub>2</sub>O–MeOH + 0.1% formic acid, 25:75 in 20 min, 4.7 mL/min), leading to the purification of compounds **9** (30 mg), **10** (3.5 mg), and **6** (6.0 mg). The separation of fraction F9-5-3 (470 mg) by preparative HPLC (Sunfire C<sub>18</sub>, H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN + 0.1% formic acid, 5:5 to 35:65 in 20 min, 21 mL/min) led to the purification of compounds **3** (20 mg), **5** (32 mg), **8** (15 mg), **11** (4.5 mg), and **12** (1.5 mg) and an impure mixture (75 mg). The latter was further purified by semipreparative HPLC (Kromasil C<sub>18</sub>, H<sub>2</sub>O–MeOH + 0.1% formic acid, 70:85 in 30 min, 4.7 mL/min) to give compounds **1** (1 mg) and **4** (18 mg).

(*2R,3R,4S,5R,7S,8R,13R,15R*)-3,5,7,8,15-Pentaacetoxy-2-hydroxy-9,14-dioxajatropha-6(17),11E-diene (**1**): colorless tablet;  $[\alpha]_D^{25} -70$  (c 0.10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 214 (4.83) nm; IR  $\nu_{max}$  3482, 2923, 2852, 2327, 1745, 1456, 1374, 1237, 1221, 1135, 1034 cm<sup>-1</sup>; for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 3; HRESIMS *m/z* 609.2566 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>O<sub>13</sub>, 609.2542).

(*2R,3R,4S,5R,7S,8R,13R,15R*)-3,5,7,15-Tetraacetoxy-2-hydroxy-8-isobutyryloxy-9,14-dioxajatropha-6(17),11E-diene (**2**): colorless crystals; mp 95–100 °C;  $[\alpha]_D^{25} -90$  (c 0.10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 214 (4.81) nm; IR  $\nu_{max}$  3499, 2957, 2924, 2853, 1741, 1717, 1452, 1372, 1277, 1228, 1113, 1031, 799, 713 cm<sup>-1</sup>; for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 3; HRESIMS *m/z* 637.2882 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>O<sub>13</sub>, 637.2855).

(*2R,3R,4S,5R,7S,8R,13R,15R*)-3,5,7,15-Tetraacetoxy-2-hydroxy-8-tigloyloxy-9,14-dioxajatropha-6(17),11E-diene (**3**): colorless tablet; mp 215–220 °C;  $[\alpha]_D^{25} -90$  (c 0.10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 216 (4.86) nm; IR  $\nu_{max}$  3489, 2934, 2342, 1740, 1717, 1373, 1256, 1227, 1136, 1032, 732 cm<sup>-1</sup>; for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 3; HRESIMS *m/z* 671.2722 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>13</sub>, 671.2674).

(*2R,3R,4S,5R,7S,8R,13R,15R*)-3,5,7,15-Tetraacetoxy-8-benzoyloxy-2-hydroxy-9,14-dioxajatropha-6(17),11E-diene (**4**): colorless stick; mp 270–275 °C;  $[\alpha]_D^{25} -110$  (c 0.10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 216 (4.85), 278 (0.64) nm; IR  $\nu_{max}$  3480, 2986, 2938, 1740, 1373, 1255, 1227, 1135, 1029, 713 cm<sup>-1</sup>; for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 3; HRESIMS *m/z* 671.2711 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>O<sub>13</sub>, 671.2698).

(*2S,3S,4R,5R,7S,8R,13R,14R,15R*)-5,7-Diacetoxy-3-benzoyloxy-14,15-dihydroxy-8-isobutyryloxy-9-oxojatropha-6(17),11E-diene (**9**): amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} -100$  (c 0.10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 216 (4.83) nm; IR  $\nu_{max}$  3527, 2963, 2932, 1748, 1720, 1452, 1382, 1265, 1240, 1190, 1115, 1073, 1029, 715 cm<sup>-1</sup>; for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Tables 2 and 4; HRESIMS *m/z* 660.3421 [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>11</sub>, 660.3380).

(*2S,3S,4R,5R,7S,8R,13R,14R,15R*)-5,7-Diacetoxy-3-benzoyloxy-14,15-dihydroxy-8-(2-methylbutyryloxy)-9-oxojatropha-6(17),11E-diene (**10**): amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} -80$  (c 0.10, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 216 (4.83) nm; IR  $\nu_{max}$  3509, 2961, 2927, 1747, 1721, 1452, 1379, 1276, 1229, 1178, 1150, 1114, 1073, 1029, 715 cm<sup>-1</sup>; for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Tables 2 and 4; HRESIMS *m/z* 657.3291 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>36</sub>H<sub>49</sub>O<sub>11</sub>, 657.3269).

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

**Crystal data of 1:** C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>13</sub>, *M* = 608.62, colorless tablet, size 0.52 mm × 0.48 mm × 0.20 mm, orthorhombic, space group P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, *a* = 12.868(2) Å, *b* = 14.089(3) Å, *c* = 17.366(3) Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ , *V* = 3148.4(10) Å<sup>3</sup>, *T* = 193(2) K, *Z* = 4, *d* = 1.284 g/cm<sup>3</sup>,  $\lambda(\text{Cu K}\alpha) = 1.54178$  Å, *F*(000) = 1296, reflections collected/unique 12 772/5394 [*R*<sub>int</sub>] = 0.0912], *h* (–7/14), *k* (–16/15), *l* (–20/17), theta range 4.04 to 68.22°, completeness 98.2%, data/restraints/parameters 5394/0/397, final *R* indices *R*<sub>1</sub> = 0.0998 and *wR*<sub>2</sub> = 0.1929 (*I* > 2σ(*I*)),



$R_1 = 0.1468$  and  $wR_2 = 0.2318$  (all data), GOF = 1.047, largest diff peak and hole 0.329 and  $-0.302 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ ; absolute structure parameter  $-0.3(3)$  using 684 quotients.<sup>34</sup> CCDC number: 991845.

**Crystal data of 2:**  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{13}$ ,  $M = 636.67$ , colorless prism, size  $0.35 \text{ mm} \times 0.29 \text{ mm} \times 0.26 \text{ mm}$ , monoclinic, space group  $P2_1$ ,  $a = 11.3186(3) \text{ \AA}$ ,  $b = 15.8687(4) \text{ \AA}$ ,  $c = 20.1536(14) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 101.153(7)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 3551.5(3) \text{ \AA}^3$ ,  $T = 193(2) \text{ K}$ ,  $Z = 4$ ,  $d = 1.191 \text{ g/cm}^3$ ,  $\lambda(\text{Cu K}\alpha) = 1.54178 \text{ \AA}$ ,  $F(000) = 1360$ , reflections collected/unique 18 543/9522 [ $R_{\text{int}} = 0.034$ ],  $h (-7/14)$ ,  $k (-16/15)$ ,  $l (-20/17)$ , theta range 3.57 to  $65.09^\circ$ , completeness 98.6%, data/restraints/parameters 9522/1/834, final  $R$  indices  $R_1 = 0.0640$  and  $wR_2 = 0.1477$  ( $I > 2\sigma(I)$ ),  $R_1 = 0.1623$  and  $wR_2 = 0.2267$  (all data), GOF = 1.142, largest diff peak and hole 0.272 and  $-0.297 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ ; absolute structure parameter 0.10(9) using 1344 quotients.<sup>34</sup> CCDC number: 991846.

**Crystal data of 3:**  $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_{13}$ ,  $M = 648.68$ , colorless tablet, size  $0.38 \text{ mm} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.14 \text{ mm}$ , orthorhombic, space group  $P2_12_12_1$ ,  $a = 13.3730(2) \text{ \AA}$ ,  $b = 14.2814(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 17.7940(12) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 3398.4(2) \text{ \AA}^3$ ,  $T = 193(2) \text{ K}$ ,  $Z = 4$ ,  $d = 1.268 \text{ g/cm}^3$ ,  $\lambda(\text{Cu K}\alpha) = 1.54178 \text{ \AA}$ ,  $F(000) = 1384$ , reflections collected/unique 23 253/6137 [ $R_{\text{int}} = 0.0280$ ],  $h (-16/12)$ ,  $k (-16/16)$ ,  $l (-15/21)$ , theta range 3.97 to  $68.23^\circ$ , completeness 99.3%, data/restraints/parameters 6129/0/428, final  $R$  indices  $R_1 = 0.033$  and  $wR_2 = 0.0779$  ( $I > 2\sigma(I)$ ),  $R_1 = 0.0393$  and  $wR_2 = 0.0893$  (all data), GOF = 1.091, largest diff peak and hole 0.197 and  $-0.178 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ , absolute structure parameter  $-0.06(3)$ , using 2279 quotients.<sup>34</sup> CCDC number: 991847.

**Crystal data of 4:**  $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{O}_{13} \cdot 0.2(\text{H}_2\text{O})$ ,  $M = 674.29$ , colorless stick, size  $0.53 \text{ mm} \times 0.13 \text{ mm} \times 0.09 \text{ mm}$ , orthorhombic, space group  $P2_12_12_1$ ,  $a = 11.2634(3) \text{ \AA}$ ,  $b = 15.8807(5) \text{ \AA}$ ,  $c = 21.1556(14) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 3784.1(3) \text{ \AA}^3$ ,  $T = 193(2) \text{ K}$ ,  $Z = 4$ ,  $d = 1.182 \text{ g/cm}^3$ ,  $\lambda(\text{Cu K}\alpha) = 1.54178 \text{ \AA}$ ,  $F(000) = 1432$ , reflections collected/unique 35 387/6870 [ $R_{\text{int}} = 0.0485$ ],  $h (-13/10)$ ,  $k (-19/19)$ ,  $l (-20/25)$ , theta range 3.48 to  $68.13^\circ$ , completeness 99.6%, data/restraints/parameters 6866/5/451, final  $R$  indices  $R_1 = 0.0447$  and  $wR_2 = 0.0897$  ( $I > 2\sigma(I)$ ),  $R_1 = 0.0674$  and  $wR_2 = 0.1055$  (all data), GOF = 0.965, largest diff peak and hole 0.213 and  $-0.188 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ , absolute structure parameter  $-0.02(7)$ , using 1521 quotients.<sup>34</sup> CCDC number: 991848.

Crystallographic data for 1–4 have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (deposit nos. CCDC 991845–991848). Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44 (0)223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

**Virus-Cell-Based Anti-alphavirus Assay.** Throughout the experiments, Vero (African green monkey kidney) cells were used. The following viruses were used: Chikungunya virus strain 899, Sindbis virus strain HRsp, and Semliki Forest virus strain Vietnam. Serial dilutions of the initial plant extracts, fractions, or compounds, as well as the reference compound chloroquine, were prepared in assay medium [MEM Reg3 (cat. no. 19993013; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL of 200 mM L-glutamine, and 5 mL of 7.5% sodium bicarbonate] and were added to empty wells of a 96-well microtiter plate (Falcon, BD). Subsequently, 50  $\mu\text{L}$  of a 4 $\times$  virus dilution in assay medium was added, followed by 50  $\mu\text{L}$  of a cell suspension. This suspension, with a cell density of 25 000 cells/50  $\mu\text{L}$ , was prepared from a Vero cell line subcultured in cell growth medium (MEM Reg3 supplemented with 10% FCS, 5 mL of L-glutamine, and 5 mL of sodium bicarbonate) at a ratio of 1:4 and grown for 7 days in 150  $\text{cm}^2$  tissue culture flasks (Techno Plastic Products). The assay plates were returned to the incubator for 6–7 days ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95–99% relative humidity), a time at which maximal virus-induced cell death or cytopathic effect (CPE) is observed in untreated, infected controls.

Subsequently, the assay medium was aspirated, replaced with 75  $\mu\text{L}$  of a 5% MTS (Promega) solution in phenol red-free medium, and incubated for 1.5 h. Absorbance was measured at a wavelength of 498 nm (Safire2, Tecan); optical densities (OD values) reached 0.6–0.8 for the untreated, uninfected controls). Raw data were converted to percentage of controls, and the  $\text{EC}_{50}$  (50% effective concentration, or concentration that is calculated to inhibit virus-induced cell death by

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

**Virus Cell-Based Anti-HIV Assay.** Evaluation of the antiviral activity of the test compounds against HIV-1 strain (III<sub>B</sub>) and HIV-2 strain (ROD) in MT-4 cells was performed using the MTT assay as previously described.<sup>35</sup> Stock solutions (109 final concentration) of the test compounds were added in 25  $\mu\text{L}$  volumes to two series of triplicate wells to allow simultaneous evaluation of their effects on mock- and HIV-infected cells at the beginning of each experiment. Serial 5-fold dilutions of test compounds were made directly in flat-bottomed 96-well microtiter trays using a Biomek 3000 robot (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Untreated control HIV- and mock-infected cell samples were included for each sample. HIV-1 (III<sub>B</sub>) or HIV-2 (ROD) stock (50  $\mu\text{L}$ ) at 100–300  $\text{CCIC}_{50}$  (50% cell culture infectious dose) or culture medium was added to microtiter tray wells. Mock-infected cells were used to evaluate the effect of test compound on uninfected cells in order to assess the cytotoxicity of the test compound. Exponentially growing MT-4 cells were centrifuged for 5 min at 1000 rpm, and the supernatant was discarded. The MT-4 cells were resuspended at  $66 \times 10^5$  cells/mL, and an amount of 50  $\mu\text{L}$  volume was transferred to the microtiter tray wells. Five days after infection, the viability of mock- and HIV-infected cells was examined spectrophotometrically by the MTT assay. The MTT assay is based on the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Across Organics, Geel, Belgium) by mitochondrial dehydrogenase of metabolically active cells to a blue-purple formazan that can be measured spectrophotometrically. The absorbances were read in an eight-channel computer-controlled photometer (Multiscan Ascent Reader, Labsystem, Helsinki, Finland) at two wavelengths (540 and 690 nm). All data have been calculated using the median OD value of three wells.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra and HRESIMS data for compounds 1–4, 9, and 10, ORTEP views and a detailed discussion on X-ray structure determination for 1–7 and 12, and crystallographic information files (CIF) for compounds 1–4. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: + 33 1 69 82 30 85. Fax: + 33 1 69 07 72 47. E-mail: [marc.litaudon@cnrs.fr](mailto:marc.litaudon@cnrs.fr).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Territorial Collectivity of Corsica (CTC) for a Ph.D. grant (L.-F.N.-S.). This work has benefited from an “Investissement d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref ANR-10-LABX-25-01). We are also grateful to Dr. F. Guéritte (ICSN-CNRS) for her constant support during the early part of this research and to Dr. M.-J. Battesti (University of Corsica) for her

contribution to the botanical identification of the species. The photograph of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* (Fuirena, Corsica) was kindly provided by Dr. G. Paradis (University of Corsica). We also would like to acknowledge S. Delmotte, C. Collard, and K. Erven for their excellent technical assistance in the acquisition of the antiviral data.

## REFERENCES

- (1) Singh, P.; Chhabra, M.; Mittal, V.; Sharma, P.; Rizvi, M. A.; Chauhan, L.; Rai, A. *Vaccine Dev. Ther.* **2013**, 35–46.
- (2) Thiberville, S.-D.; Moyen, N.; Dupuis-Maguiraga, L.; Nougairede, A.; Gould, E. A.; Roques, P.; de Lamballerie, X. *Antiviral Res.* **2013**, 99, 345–370.
- (3) Kaur, P.; Chu, J. J. H. *Drug Discovery Today* **2013**, 18, 969–983.
- (4) Rashad, A. A.; Mahalingam, S.; Keller, P. A. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 1147–1166.
- (5) Allard, P.-M.; Leyssen, P.; Martin, M.-T.; Bourjot, M.; Dumontet, V.; Eydoux, C.; Guillemot, J.-C.; Canard, B.; Poullain, C.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *Phytochemistry* **2012**, 84, 160–168.
- (6) Allard, P.-M.; Martin, M.-T.; Tran Huu Dau, M.-E.; Leyssen, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *Org. Lett.* **2012**, 14, 342–345.
- (7) Bourjot, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Litaudon, M. *Molecules* **2014**, 19, 3617–3627.
- (8) Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 2183–2187.
- (9) Ferreira, A. M. V. D.; Carvalho, M. J. M.; Silva, A. M. S.; Carvalho, L. H. M. In *Recent Progress in Medicinal Plants*; Majumdar, D. K.; Govil, J. N.; Singh, V. K.; Sharma, R. K., Eds.; Studium Press LLC: Houston, TX, 2005; Vol. 9, pp 15–118.
- (10) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4295–4327.
- (11) Mwine, J. T.; Van Damme, P. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5, 652–662.
- (12) Ersvaer, E.; Kittang, A. O.; Hampson, P.; Sand, K.; Gjertsen, B. T.; Lord, J. M.; Bruserud, Ø. *Toxins* **2010**, 2, 174–194.
- (13) Gustafson, K. R.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Gulakowski, R. J.; Ishitoya, J.; Szallasi, Z.; Lewin, N. E.; Blumberg, P. M.; Weislow, O. S. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1978–1986.
- (14) Márquez, N.; Calzado, M. A.; Sánchez-Duffhues, G.; Pérez, M.; Minassi, A.; Pagani, A.; Appendino, G.; Diaz, L.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Muñoz, E. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 75, 1370–1380.
- (15) Bedoya, L. M.; Márquez, N.; Martínez, N.; Gutiérrez-Eisman, S.; Álvarez, A.; Calzado, M. A.; Rojas, J. M.; Appendino, G.; Muñoz, E.; Alcamí, J. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, 77, 965–978.
- (16) Goel, G.; Makkar, H. P. S.; Francis, G.; Becker, K. *Int. J. Toxicol.* **2007**, 26, 279–288.
- (17) Corea, G.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. *Phytochem. Rev.* **2009**, 8, 431–447.
- (18) Vasas, A.; Rédei, D.; Csopor, D.; Molnár, J.; Hohmann, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 27, 5115–5130.
- (19) Jeanmonod, D.; Gamisans, J. *Flora Corsica*; Edisud 921: Aix-en-Provence, 2007; Vol. 1, p 433.
- (20) Webster, G. L. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1994**, 81, 33–144.
- (21) Smith, A. R.; Tutin, T. G. *Flora Europaea*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1968.
- (22) Frajman, B.; Schönswetter, P. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2011**, 61, 413–424.
- (23) Appendino, G.; Szallasi, A. *Life Sci.* **1997**, 60, 681–696.
- (24) Conrad, M. *Les Plantes Sauvages dans la Vie Quotidienne des Corses: Essai d'Ethnobotanique*; Société des Sciences Historiques et Naturelles de la Corse: Bastia, France, 1973; Bull. 607, pp 61–75.
- (25) Appendino, G.; Jakupovic, S.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Milon, V.; Ballero, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 749–756.
- (26) Corea, G.; Fattorusso, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 4485–4494.
- (27) Miglietta, A.; Gabriel, L.; Appendino, G.; Bocca, C. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, 51, 67–74.
- (28) Jeske, F. *Naturstoffe aus Euphorbiaceen: Studien zum Konformativen Verhalten von Jatrophanen*. Ph.D. Thesis, Technical University of Berlin, Berlin, 1996, p 330.
- (29) Burnett, M. N.; Johnson, C. K. Report; ORNL-6895 Oak Ridge National Laboratory: Oak Ridge, TN, 1996.
- (30) Avila, L.; Perez, M.; Sanchez-Duffhues, G.; Hernández-Galán, R.; Muñoz, E.; Cabezas, F.; Quiñones, W.; Torres, F.; Echeverri, F. *Phytochemistry* **2010**, 71, 243–248.
- (31) Bocklandt, S.; Blumberg, P. M.; Hamer, D. H. *Antiviral Res.* **2003**, 59, 89–98.
- (32) Golding, H.; Manischewitz, J.; Vujcic, L.; Blumenthal, R.; Dimitrov, D. S. *J. Virol.* **1994**, 68, 1962–1969.
- (33) Huang, L.; Ho, P.; Yu, J.; Zhu, L.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H. *PLoS One* **2011**, 6, e26677.
- (34) Parsons, S.; Flack, H. *Acta Crystallogr.* **2004**, A60, s61.
- (35) Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, 20, 309–321.



## II. 5. Article n°5 : Advanced Structural Determination of Diterpene Esters Using Molecular Modeling and NMR Spectroscopy

*Nota bene* : La version du manuscrit, présentée ci-dessous, est la première version publiée en ligne (*J. Nat. Prod.* **2015**, 78 (10), 2423-2431). La Table 4 de cette version est erronée. Une version corrigée de la Table 4 est incluse dans un *Corrigendum* actuellement sous-pressé dans *Journal of Natural Products*. Une version actualisée du manuscrit est disponible à l'adresse <http://www.researchgate.net>.

Les informations complémentaires sont disponibles sur internet à l'adresse : <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jnatprod.5b00511>



Figure 37. *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*. Photo : Pr. Guilhan Paradis



## Advanced Structural Determination of Diterpene Esters Using Molecular Modeling and NMR Spectroscopy

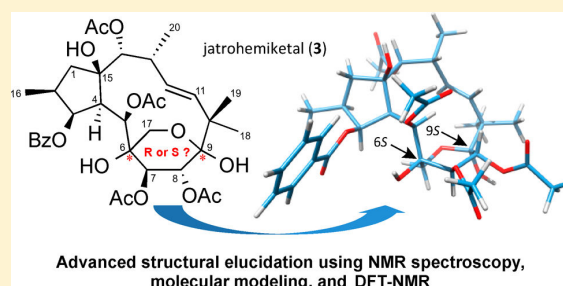
Louis-Félix Nothias-Scaglia,<sup>†,‡</sup> Jean-François Gallard,<sup>†</sup> Vincent Dumontet,<sup>†</sup> Fanny Roussi,<sup>†</sup> Jean Costa,<sup>‡</sup> Bogdan I. Iorga,<sup>\*,†</sup> Julien Paolini,<sup>‡</sup> and Marc Litaudon<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, UPR 2301, University Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette, France

<sup>‡</sup>Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France

### S Supporting Information

**ABSTRACT:** Three new jatrophane esters (1–3) were isolated from *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata*, including an unprecedented macrocyclic jatrophane ester bearing a hemiketal substructure, named jatrohemiketal (3). The chemical structures of compounds 1–3 and their relative configurations were determined by spectroscopic analysis. The absolute configuration of compound 3 was determined unambiguously through an original strategy combining NMR spectroscopy and molecular modeling. Conformational search calculations were performed for the four possible diastereomers 3a–3d differing in their C-6 and C-9 stereocenters, and the lowest energy conformer was used as input structure for geometry optimization. The prediction of NMR parameters (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts and <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H coupling constants) by density functional theory (DFT) calculations allowed identifying the most plausible diastereomer. Finally, the stereostructure of 3 was solved by comparison of the structural features obtained by molecular modeling for 3a–3d with NMR-derived data (the values of dihedral angles deduced from the vicinal proton–proton coupling constants (<sup>3</sup>J<sub>HH</sub>) and interproton distances determined by ROESY). The methodology described herein provides an efficient way to solve or confirm structural elucidation of new macrocyclic diterpene esters, in particular when no crystal structure is available.



Lower diterpenoids isolated from *Euphorbia* species represent a unique group of highly structurally diverse compounds endowed with potent biological activity such as antiviral activities<sup>1</sup> and modulation of PKC and P-glycoprotein activities.<sup>2,3</sup> More than 650 diterpenoids based on 20 types of carbon skeletons have been characterized from this genus so far.<sup>3</sup> The planar structures and the relative configurations of these skeletons have been usually solved by interpretation of NMR spectroscopic data<sup>4–11</sup> or obtained by X-ray crystallographic analysis.<sup>12–18</sup> Conformational search and geometry optimization have also been used to support their structural elucidation based on NMR spectroscopy.<sup>19–30</sup> The absolute configurations of these skeletons have been established using X-ray diffraction analysis<sup>6,17,31,32</sup> or electronic circular dichroism (ECD) data analysis<sup>27–29</sup> or deduced from the NMR data of Mosher esters.<sup>6</sup> Moreover, taking into account that all macrocyclic diterpene esters of the lathyranes<sup>5,16,33</sup> and jatrophane types,<sup>16,17,33</sup> and most of their biogenetically related skeletons,<sup>2,3</sup> possess a constant *trans*-ring junction with a 4 $\alpha$ -proton and 15 $\beta$ -oxygenated functionality, the relative configuration of these diterpenoids can be confidently upgraded to the absolute one.<sup>23,30,34</sup>

When no crystal structure is available, the three-dimensional structures of these natural products can be established through the interpretation of NOESY or ROESY experiments along

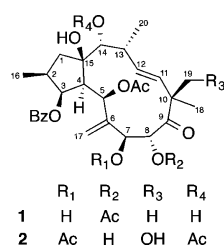
with the analysis of vicinal proton–proton coupling constants <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>, observed in their <sup>1</sup>H NMR spectra.<sup>35</sup> However, based on NMR spectroscopic analysis, the determination of the relative configuration of some new diterpene scaffolds can be challenging. For example, the stereostructure of the tetracyclic pepluane isolated by Jakupovic et al. was misassigned.<sup>21</sup> Despite the authors having performed a molecular modeling analysis, the full stereochemistry of the compound could not be determined. The 3D structure of pepluane was established finally via single-crystal X-ray diffraction study.<sup>36</sup> A conformational study showed that pepluane possesses a relatively rare ring D conformation, which probably led to the misinterpretation of the NMR data.<sup>36</sup> The challenging 3D determination of some jatrophane esters may also be exemplified by a study by Hohmann and associates, in which the relative configuration of esulatin C could not be assigned.<sup>34</sup> The high flexibility of the macrocyclic part of this compound was one of the explanations made. Several studies have shown that jatrophane esters can adopt different conformations depending on their esterification pattern.<sup>37–40</sup>

The full structural determination of natural products can be strengthened confidently by molecular modeling and density

Received: June 8, 2015

functional theory (DFT) calculations to predict NMR parameters (DFT-NMR) and compare results with the experimental NMR values.<sup>41,42</sup> Furthermore, interproton distances can be deduced from NOE or ROE correlation intensities and correlate with the interproton distances measured on the calculated structure.<sup>35,43</sup> This last approach was used efficiently for rigid or flexible molecules.<sup>44,45</sup> These pluridisciplinary approaches have never been undertaken for the structural elucidation of macrocyclic diterpene esters, despite the complex stereostructure of the latter compounds.

In this paper are reported the isolation and structure elucidation of three new jatrophane esters (1–3), of which jatrophemiketal (3) was found to possess an unprecedented tricyclic ring system bearing a hemiketal substructure. The stereostructure of 3 was solved by an original strategy combining the results of both NMR spectroscopy and molecular modeling.



## RESULTS AND DISCUSSION

The EtOAc extract obtained from the whole plant (450 g) of *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was first subjected to normal-phase flash chromatography, and fraction F9 was further purified by preparative HPLC to afford jatrophane esters 1–3. Their structures were solved by means of mass spectrometry, NMR spectroscopy, and molecular modeling.

Compound 1 was obtained in a trace quantity (0.1 mg) as an amorphous powder. It showed a pseudomolecular ion at  $m/z$  595.2527  $[M + Na]^+$  in the HRESIMS, corresponding to the molecular formula  $C_{31}H_{40}O_{10}Na$  (calcd for 595.2519,  $\Delta = 1.3$  ppm), the same as for compounds 8 and 11 identified in our previous study.<sup>33</sup> From this formula and its spectroscopic data (Table 1), which were closely comparable to those of the previously isolated jatrophane ester 11,<sup>33</sup> it was apparent that 1 has a similar structure but with a hydroxy and an acetyl group located at C-7 and C-8, respectively, instead of C-8 and C-7 in compound 11. Key 2D NMR correlations observed for compound 1 are shown in the Supporting Information (Figure S10). It should be noted that, contrary to almost all jatrophane esters, where the *E*-configured  $\Delta^{11,12}$  double bond appeared as an AB system with coupling constant values of approximately 16 Hz, the olefinic signals attributable to protons H-11 and H-12 appeared as two broad singlets at  $\delta_H$  6.045 and 6.065, respectively, in the  $^1H$  NMR spectrum of 1. An *E*-configuration assignment of the  $\Delta^{11,12}$  double bond could be confirmed by a careful examination of the HMBC spectrum of 1. Indeed, the HMBC experiment may lead in some cases to observation of artifactual short-range cross-peak patterns allowing the measurement of heteronuclear short-range  $^1J_{CH}$  and homonuclear long-range  $^3J_{HH}$  coupling constants.<sup>46,47</sup> In the HMBC spectrum of 1 (Figure S7, Supporting Information), typical coupling constant values could be observed for short-range cross-peaks H-11/C-11 and H-12/C-12 ( $^1J_{CH}$ ,  $J = 152.2$  and

**Table 1.**  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR Data for Jatrophane Esters 1 (150 MHz for  $^{13}C$  NMR and 600 MHz for  $^1H$  NMR) and 2 (75 MHz for  $^{13}C$  NMR, 500 MHz for  $^1H$  NMR, and 125 MHz for  $^{13}C$  NMR for 2D Heteronuclear Experiments) in  $CDCl_3$  ( $\delta$  in ppm)

position	1		2	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)
1 $\alpha$	52.0, CH <sub>2</sub>	2.32 dd (13.5, 7.2)	50.6, CH <sub>2</sub>	2.17 dd (13.0, 5.0)
1 $\beta$		1.92 br d (13.5)		1.88 br d (13.0)
2	37.1, CH	2.08 m	37.3, CH	1.90 m
3	79.9, CH	5.76 dd (3.3, 3.0)	79.1, CH	5.69 dd (3.2, 3.0)
4	45.8, CH	2.49 dd (3.3, 1.9)	46.8, CH	2.84 dd (3.2, 1.8)
5	71.7, CH	5.44 br s	71.3, CH	5.57 br s
6	146.9, C		144.1, C	
7	68.1, CH	4.50 br s	69.2, CH	5.44 br s
8	76.4, CH	5.73 br s	75.1, CH	4.93 br s
9	207.9, <sup>a</sup> C		213.3, C	
10	48.5, C		53.2, C	
11	135.6, CH	6.05 br s	131.1, CH	6.22 d (16.2)
12	132.9, CH	6.06 br s	135.8, CH	6.01 dd (16.2, 9.2)
13	36.9, CH	3.04 m	36.7, CH	3.23 br dd (9.2, 7.3)
14	81.7, CH	3.68 br s	81.1, CH	5.12 br s
15	82.7, C		81.8, C	
16	14.0, CH <sub>3</sub>	0.91 d (6.6)	14.0, CH <sub>3</sub>	0.89 br d (5.9)
17a	110.7 CH <sub>2</sub>	5.00 br s	111.2, CH <sub>2</sub>	4.96 br s
17b		5.16 br s		5.12 br s
18	23.7, CH <sub>3</sub>	1.33 s	18.2, CH <sub>3</sub>	1.18 s
19a	27.7, CH <sub>3</sub>	1.23 s	70.2, CH <sub>2</sub>	3.77 d (10.7)
19b				3.45 d (10.7)
20	25.6, CH <sub>3</sub>	1.15 d (7.2)	25.2, CH <sub>3</sub>	1.13 d (7.3)
OBz-3				
C=O	165.6, <sup>a</sup> C		165.6, C	
1'	130.7, <sup>a</sup> C		130.6, C	
2', 6'	129.8, CH	8.1 dd (8.0, 1.0)	129.7, CH	8.1 dd (7.7, 1.5)
3', 5'	128.8, CH	7.5 br t (7.5)	128.8, CH	7.47 t (7.7)
4'	133.4, CH	7.58 tt (7.5, 1.0)	133.5, CH	7.58 tt (7.4, 1.2)
OAc-5	169.8, <sup>a</sup> 21.0	1.64 s	170.2, 21.1	1.65 s
OAc-7			170.3, 20.9	2.07
OAc-8	169.2, <sup>a</sup> 20.4	2.03 s		
OAc-14			170.7, 21.0	2.19
OH		2.58 br s		
OH		2.05 br s		
OH		1.67 br s		

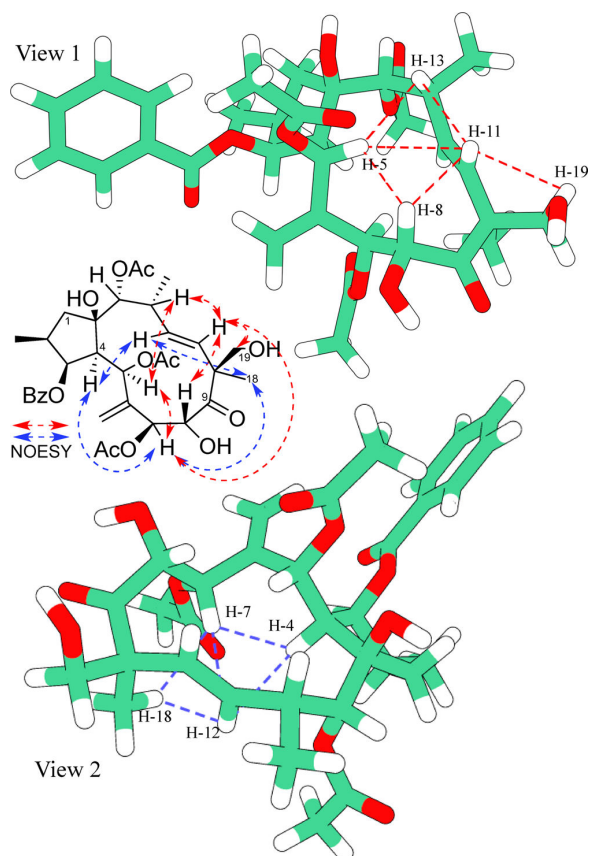
<sup>a</sup>Chemical shifts based on HMBC correlations.

155.1 Hz, respectively) and for homonuclear vicinal correlations H-11/H-12 and H-12/H-13 ( $^3J_{HH}$ ,  $J = 16.5$  and  $J \approx 8.5$  Hz, respectively). Since the coupling constant  $J_{H-11/H-12}$  was on the same order as the difference between  $^1H$  NMR frequencies of H-11 and H-12, their multiplicity patterns are second-order. From these observations, it could be stated that the HMBC spectrum exhibited an ABX system for H-11, H-12, and H-13. Taking into account the known absolute configuration of related jatrophane esters previously isolated in this plant,<sup>33</sup> it can be proposed that they have the same absolute

configuration. The structure of **1** was established therefore as (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,7*S*,8*R*,13*R*,14*R*,15*R*)-5,8-diacetoxy-3-benzoyloxy-7,14,15-trihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11*E*-diene.

The HRESIMS of compound **2**, isolated as a white, amorphous powder, showed a pseudomolecular  $[M + Na]^+$  ion peak at  $m/z$  713.2793 (calcd 713.2785) corresponding to the molecular formula  $C_{35}H_{46}O_{14}$ . The NMR spectroscopic data of compound **2** were found to be similar to those of jatrophane esters belonging to “group B”, i.e., esters of 9-oxojatropha-6(17),11*E*-diene that have been isolated previously,<sup>23,33</sup> but with an oxygenated methylene group located at C-10 ( $\delta_H$  3.77 and 3.45, each d,  $J = 10.7$  Hz, H-19a and H-19b, respectively) instead of the usual  $CH_2$ -19 group (Table 1). In the HMBC spectrum, correlations from H-19 to C-10, C-11, and C-18 and from H-18 to C-9, C-10, and C-19 were used to confirm the attachment of the oxymethylene group at C-10. The locations of one benzoyl and three acetyl ester groups at C-3, C-5, C-7, and C-14, respectively, were confirmed by HMBC correlations from the carbonyl carbons to their respective oxymethine proton, as depicted in Figure S18, Supporting Information. The relative configuration of **2** was deduced from interpretation of the coupling constant pattern and of ROESY correlations (Table S17, Supporting Information) and by comparison with data reported in the literature.<sup>23,33</sup> However, no ROESY correlation was observed between H-8 and  $CH_2$ -19. Thus, to confirm the  $\beta$ -orientation of the C-19 oxymethylene group along with the overall stereostructure, a molecular modeling study of **2** was carried out. Conformational search calculations provided the lowest energy conformer, for which the geometry was optimized using the DFT method. The resulting structure was in excellent agreement with ROESY data and confirmed previous attributions (Figure 1 and Figure S21, Supporting Information). In particular, the fact that no ROESY correlation was observed between H-8 and  $CH_2$ -19 could be explained by the preferential position of the OH-19 group. The theoretical model of **2** confirmed that this compound adopts preferentially an *exo*-type conformation. Furthermore, it can be proposed that **2** has the same absolute configuration as other jatrophane derivatives isolated from the same plant. Its structure was established therefore as (2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,7*S*,8*R*,13*R*,14*R*,15*R*)-5,7,14-triacetoxy-3-benzoyloxy-8,15,19-trihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11*E*-diene.

Compound **3** was obtained in a trace quantity (0.25 mg) as a white, amorphous powder. Its HRESIMS showed a pseudomolecular ion  $[M + H]^+$  at  $m/z$  631.2776 (calcd 631.2755), corresponding to the molecular formula  $C_{33}H_{43}O_{12}$ . The  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR spectra of compound **3** (Table 2) exhibited several signals for structural elements characteristic of jatrophane diterpene esters such as a substituted cyclopentane ring, a *trans*-disubstituted double bond [ $\delta_C$  at 135.4 and 135.8 (C-11 and C-12) and  $\delta_H$  5.79 (d,  $J = 15.7$  Hz, H-11) and 5.86 (dd,  $J = 15.7$  and 8.5 Hz, H-12)], and several ester groups, but differed from other members of this chemical series by the absence of signals for exomethylene and carbonyl groups. Analysis of the  $^1H$  NMR spectrum revealed the presence of four deshielded methyl groups at  $\delta_H$  2.18, 1.97, 1.84, and 1.78 and resonances for five aromatic protons at  $\delta_H$  8.09, 7.57, and 7.44, which were assigned to four acetyl groups and one benzoyl ester group, based on correlations observed with their respective carbonyl carbons in the HMBC spectrum ( $\delta_C$  171.1, 170.7, 170.5, 168.6, and 166.3, respectively). By removing the acyl groups from the molecular formula of **3**, it could be



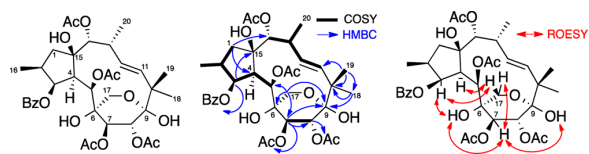
**Figure 1.** Key ROESY correlations for the macrocyclic stereochemistry (dashed line) of compound **2**. The correlations of the protons above (red, structure and view 1) and beneath (blue, structure and view 2) the macrocyclic mean plane are represented on the structure (middle) and on the model (view 1 and view 2). The corresponding interproton distances measured are  $<3$  Å.

deduced that the diterpene parent alcohol possesses the empirical formula  $C_{20}H_{34}O_9$ , indicating four degrees of unsaturation. From these observations, it could be deduced that compound **3** possesses a tricyclic ring system. Three broad singlets at  $\delta_H$  3.45, 3.21, and 2.17, exchangeable with  $H_2O$ , could be assigned to hydroxy groups. In addition, four methyls, an oxymethylene resonating as an AB system, five oxymethines, three methines, two oxygenated quaternary carbons, a dioxygenated quaternary carbon, and a quaternary carbon were accounted for by the remaining atoms (Table 2 and Figures S23–S24, Supporting Information). Examination of the COSY spectrum of compound **3** revealed four spin systems ( $H_2$ -1 to H-5, H-7 to H-8, H-11 to H-14, and H-17a to H-17b). The first one consisted of a chain of five  $sp^3$ -hybridized carbons identical to jatrophane esters **1** and **2**. The second spin system was composed of two adjacent oxymethine protons at  $\delta_H$  5.07 and 5.41 (each d,  $J = 9.5$  Hz, H-7 and H-8, respectively). The third fragment was constituted by a pair of diastereotopic methine protons at  $\delta_H$  3.75 and 3.81 (each d,  $J = 12.2$  Hz, H-17a and H-17b, respectively). The last spin system, also observed in the  $^1H$  NMR spectrum of compounds **1** and **2**, was built from the *trans*-disubstituted double bond (C-11–C-12) to an oxymethine at  $\delta_H$  5.08 (br s, H-14) via an allylic methyl

**Table 2.** NMR Spectroscopic Data for Jatrohemiketal (3) (150 MHz for  $^{13}\text{C}$  NMR and 600 MHz for  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

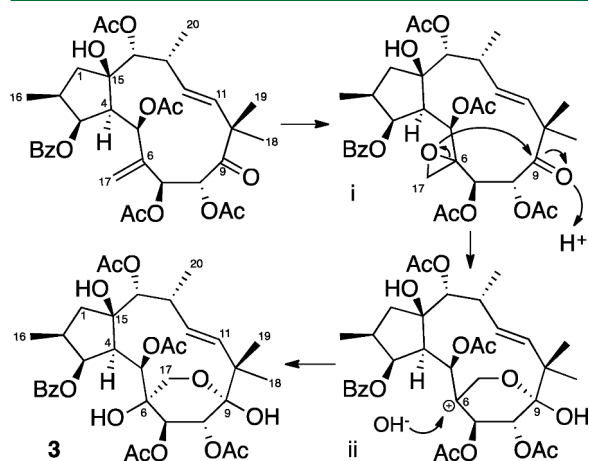
position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	COSY	HMBC (H to C)	ROESY
1 $\alpha$	49.3, CH <sub>2</sub>	2.03 dd (15.3, 6.2)	1 $\beta$ , 2	3, 15	H-1 $\beta$ , 2, 14
1 $\beta$		1.79 m	1 $\alpha$ , 2	14	H-1 $\alpha$
2	38.3, CH	1.91 m	3, 16		H-1 $\beta$ , 3, 4, 16
3	80.9, CH	5.88 br dd (3.0, 2.6)	2, 4	4, 15, OBz-3	2, 4, 16, 17a, OH-6
4	44.4, CH	2.49 dd (3.0, 2.2)	3, 5		2, 3, 5, 17a
5	70.2, CH	6.0 br d (2.2)	4	3, 4, OAc-5	4, 8, 11, 13, OH-15
6	73.7, C				
7	79.8, CH	5.07 d (9.5)	8	6, 8, OAc-7	17a, OH-6, OH-9
8	71.2, CH	5.41 d (9.5)	7	7, OAc-8	5, 11, 19
9	99.5, C				
10	44.7, C				
11	135.4, CH	5.79 d (15.7)	12, 13	10, 12, 13, 18, 19	5, 8, 13, 19
12	135.8, CH	5.86 dd (15.7, 8.5)	11, 13		18, 20
13	36.3, CH	3.01 dt (8.5, 7.0)	12, 20		11, 14, 20, OH-15
14	82.7, CH	5.08 br s		4, 12, 20, OAc-14	H-1 $\alpha$ , 13, 20, OH-15
15	83.5, C				
16	14.3, CH <sub>3</sub>	0.90 d (6.6)	2	1, 2, 3	H-1 $\beta$ , 2, 3
17 $\alpha$	65.9, CH <sub>2</sub>	3.81 d (12.2)	1 $\alpha$	5, 6, 7, 9	3, 4, 7
17 $\beta$		3.75 d (12.2)	1 $\beta$	5, 6, 7, 9	3, 4, 7
18	20.6, CH <sub>3</sub>	1.11 s		9, 10, 11, 19	12, 19
19	23.2, CH <sub>3</sub>	0.88 s		9, 10, 11, 18	8, 11
20	23.8, CH <sub>3</sub>	1.03 d (7.0)	13	12, 13, 14	13, 14
OH-6		3.45 br s			3, 7
OH-9		3.21 br s			7
OH-15		2.17 br s			13, 14
OBz-3					
C=O	166.3, C				
1'	130.4, C				
2', 6'	130.0, CH	8.09 dd (8.1, 1.1)			AcO-5
3', 5'	128.7, CH	7.44 t (7.7)			
4'	133.5, CH	7.57 t (7.5)			
OAc-5	171.1, 21.7	1.78 s			BzO-3
OAc-7	170.5, 21.2	1.84 s			
OAc-8	168.8, 21.1	1.97 s			
OAc-14	170.7, 21.0	2.18 s			

group connected to the methine proton at  $\delta_{\text{H}}$  3.62 (dq,  $J = 9.6$  and 6.6 Hz, H-13). The connectivities of these four spin systems were established on the basis of analysis of the HMBC spectrum, as depicted in Figure 2. HMBC cross-peaks from H<sub>3</sub>-18 and H<sub>3</sub>-19 to C-9, C-10, and C-11 suggested the presence of a *gem*-dimethyl group adjacent to a dioxxygenated quaternary carbon C-9 at  $\delta_{\text{C}}$  99.5. In turn, cross-peaks H-1 $\beta$ /C-14, H-3/C-15, H-7/C-5, C-6, and C-9, and H<sub>2</sub>-17/C-5, C-6, C-7, and C-9 suggested that a tetrahydropyran ring is fused to the usual C<sub>12</sub>-

**Figure 2.** Structure of jatrohemiketal (3) and key COSY (bold), HMBC (blue arrows), and ROESY (red arrows) correlations.

macrocyclic ring through carbons C-6 and C-9. The acylation pattern was solved from the examination of diagnostic long-range  $^3J_{\text{C-H}}$  couplings between oxymethine protons H-3, H-5, H-7, H-8, and H-14 and their respective carbonyl ester carbons, confirming the location of a benzoyloxy group at C-3 and acetoxy groups at C-5, C-7, C-8, and C-14. Finally, it was concluded that hydroxy groups must be located at C-6, C-9, and C-15.

The relative configurations of the stereocenters C-2, C-3, C-4, C-5, C-13, C-14, and C-15 of compound 3, the same as jatropha esters 1 and 2, were deduced from analysis of vicinal coupling constant values and ROESY correlations and by comparison of NMR data with those of other jatropha esters isolated from this species.<sup>23,33</sup> Indeed, compounds 3 and jatropha esters 1 and 2 share the same stereochemistry as suggested by similar coupling constants ( $J = 2-3$  Hz) between alicyclic protons H-2, H-3, H-4, H-5, H-13, and H-14, indicating an orthogonal relationship between them. The relative configurations at C-7 and C-8 were deduced from the coupling constant value between H-7 and H-8 ( $J = 9.5$  Hz), indicating an *anti*-arrangement, and from ROESY correlations between H-8 and H-11/H-19. Furthermore, the hypothetical biogenetic precursor of 3, 5,6,8,14-tetracetoxy-3-benzoyloxy-15-hydroxy-9-oxojatropha-6(17),11E-diene ester, has been isolated previously from the same species<sup>23</sup> and possesses an identical relative configuration of these carbons. A possible biogenetic pathway for jatrohemiketal 3 is presented in Figure 3. The

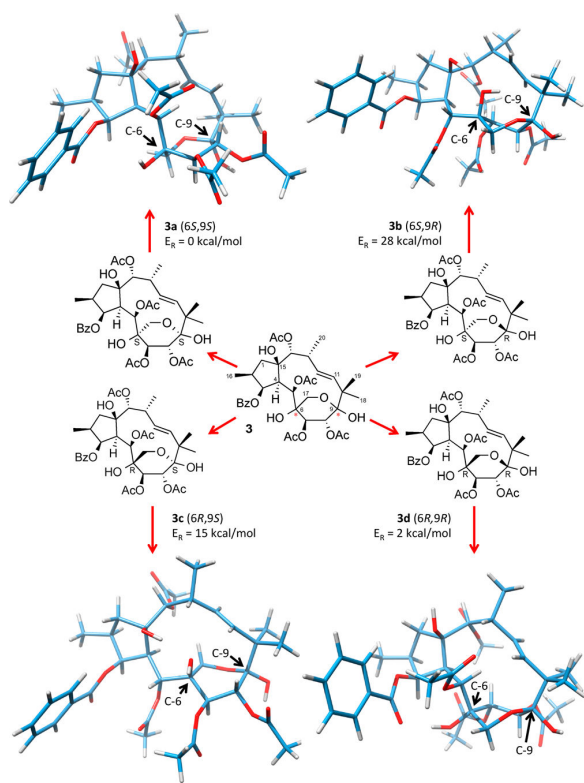
**Figure 3.** Plausible biogenetic pathway for jatrohemiketal (3).

sequence could involve an epoxidation of the  $\Delta^{6,17}$  *exo*-methylene to form intermediate i, followed by an epoxide opening to form intermediate ii with the hemiketal-bearing moiety, and a nucleophilic attack by a hydroxide ion at C-6 to give 3. To fully characterize this compound, it remained to determine the configurations of the stereocenters C-6 and C-9,



a task that proved to be challenging. Indeed, due to hygroscopic behavior leading to proton exchanges, no correlation could be observed for hydroxy groups at C-6 and C-9 in the NOESY spectrum. In contrast, low-intensity cross-peaks could be observed between the hydroxy group protons and other protons when a ROESY acquisition was performed, allowing the location of the OH-6, OH-9, and OH-15 groups.

The relative configurations at C-6 and C-9 were investigated by a strategy based on comparison of NMR data with the results derived from the theoretical models of the four possible diastereomers of compound 3 (**3a**: 6*S*,9*S*; **3b**: 6*S*,9*R*; **3c**: 6*R*,9*S*; **3d**: 6*R*,9*R*). Conformational search calculations were performed on these four diastereomers, and, in each case, the lowest energy conformer was used as input structure for geometry optimization. The most stable diastereomer was found to be **3a**. The relative energy of the diastereomer **3d** was slightly higher (2 kcal/mol), whereas **3b** and **3c** were less stable ( $E_R = 28$  and 15 kcal/mol, respectively) (Figure 4 and Figures S30–S33, Supporting Information).



**Figure 4.** Diastereomers **3a–3d** of jatrohemiketal (**3**) and their lowest energy conformer calculated by molecular modeling ( $E_R$  = relative energy).

Quantum chemical calculations based on DFT can be used to provide reliable prediction of NMR parameters ( $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts, along with  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  coupling constants).<sup>48,42</sup> In this study, the NMR parameters have been calculated for the lowest energy conformations of diastereomers **3a–3d** using the protocol described by Tantillo and colleagues.<sup>49,50</sup> The results of DFT-NMR calculations are presented in Tables 3 and 4 and Figures S34–S36 in the Supporting Information. It can be observed that the  $^{13}\text{C}$  NMR

**Table 3.** Comparison of  $^{13}\text{C}$  NMR Data from Experimental Chemical Shifts ( $\delta_{\text{exp}}$ ) for **3** vs Calculated Chemical Shifts by DFT-NMR ( $\delta_{\text{calcd}}$ ) for **3a–3d** ( $\delta_{\text{C}}$  in ppm)<sup>a,b</sup>

position	$\delta_{\text{exp}}$ ( <b>3</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3a</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3b</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3c</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3d</b> )
1 $\alpha$	49.3, CH <sub>2</sub>	47.8	54.8	53.0	48.1
2	38.3, CH	42.5	40.2	41.1	40.8
3	80.9, CH	82.5	82.7	82.5	86.7
4	44.4, CH	49.4	56.1	54.0	48.1
5	70.2, CH	74.0	77.3	73.5	74.8
6	73.7, C	79.0	81.7	83.4	81.3
7	79.8, CH	83.2	81.5	76.1	76.5
8	71.2, CH	76.3	76.8	75.8	77.2
9	99.5, CH	106.8	108.0	109.1	107.2
10	44.7, C	53.7	56.7	53.0	52.1
11	135.4, CH	132.4	132.7	137.9	137.9
12	135.8, CH	133.1	134.8	130.2	127.3
13	36.3, CH	40.5	40.0	42.7	41.2
14	82.7, CH	85.4	94.8	89.5	84.4
15	83.5, C	90.0	93.3	90.6	90.5
16	14.3, CH <sub>3</sub>	13.1	12.7	12.8	13.2
17 $\alpha$	65.9, CH <sub>2</sub>	65.2	73.2	65.4	62.7
18	20.6, CH <sub>3</sub>	19.1	27.3	19.3	20.4
19	23.2, CH <sub>3</sub>	21.8	18.9	23.4	23.6
20	23.8, CH <sub>3</sub>	22.1	20.4	23.1	22.4
OBz-3					
C=O	166.3, C	162.5	162.8	163.2	165.6
1'	130.4, C	129.0	128.4	128.6	129.5
2', 6'	130.0, CH	127.5	127.2	127.5	127.4
3', 5'	128.7, CH	124.8	125.0	124.9	125.1
4'	133.5, CH	129.6	129.7	130.0	130.1
OAc-5	171.1, 21.7	168.1, 20.0	169.4, 18.3	168.3, 18.8	167.1, 18.6
OAc-7	170.5, 21.2	168.3,	169.7,	167.3,	170.0,
OAc-8	168.8, 21.1	166.4,	167.9,	170.0,	166.3,
OAc-14	170.7, 21.0	168.5, 18.6	168.3, 18.3	167.7, 18.7	169.0, 18.3
<i>r</i>		<b>0.871</b>	0.870	0.869	0.866
<i>r</i> <sup>2</sup>		<b>0.9954</b>	0.9903	0.9929	0.9943
MAE		3.22	4.47	3.82	3.36
MaxErr		9.03	12.14	9.65	8.48
CMAE		3.12	3.48	4.04	3.43
CMaxErr		<b>8.08</b>	11.31	10.89	8.62

<sup>a</sup>The best agreements are highlighted in bold type. <sup>b</sup>*r* = Pearson product–moment correlation coefficient; *r*<sup>2</sup> = correlation coefficient; MAE = mean average error; MaxErr = maximum error; CMAE = corrected mean average error; CMaxErr = corrected maximum error.

spectra cannot discriminate between the four diastereomers (*r*<sup>2</sup> > 0.99 in all cases). In contrast, calculated  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts ( $\delta_{\text{calcd}}$ ) for diastereomer **3a** are in excellent agreement with the corresponding experimental chemical shifts ( $\delta_{\text{exp}}$ ) of **3** (*r*<sup>2</sup> = 0.9954). The calculated  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts ( $\delta_{\text{calcd}}$ ) of diastereomers **3b**, **3c**, and **3d** show several notable outliers (H-5 and H-17 $\alpha$  in **3b** and **3c** and H-4 in **3d**) that lead to inferior values of correlation coefficients (*r*<sup>2</sup> = 0.96631, 0.97511, and 0.97808, respectively). In addition, the comparison of  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  coupling constant values (Figure S36, Supporting Information) calculated for protons H-2 to H-14 of diastereomers **3a–3d** with experimental values found for compound **3** indicated a strong positive correlation in the case of **3a** and **3d** (*r*<sup>2</sup> = 0.974 and 0.978, respectively), whereas **3b** and **3c** were divergent (*r*<sup>2</sup> = 0.528 and 0.468, respectively).

**Table 4.** Comparison of  $^1\text{H}$  NMR Data from Experimental Chemical Shifts ( $\delta_{\text{exp}}$ ) for **3** vs Calculated Chemical Shifts by DFT-NMR ( $\delta_{\text{calcd}}$ ) for **3a–3d** ( $\delta_{\text{H}}$  in ppm)<sup>a,b</sup>

position	$\delta_{\text{exp}}$ ( <b>3</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3a</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3b</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3c</b> )	$\delta_{\text{calcd}}$ ( <b>3d</b> )
1 $\alpha$	2.03 dd (15.3, 6.2)	1.82	2.32	2.21	2.17
1 $\beta$	1.79 m	1.82	2.35	2.31	1.77
2	1.91 m	1.88	1.87	1.64	2.12
3	5.88 br dd (3.0, 2.6)	5.63	5.61	5.46	5.39
4	2.49 dd (3.0, 2.2)	2.6	3.06	2.41	3.61
5	6.0 br d (2.2)	5.87	4.92	5.16	6.03
6		4.89	5.95	5.11	4.85
7	5.07 d (9.5)	5.29	5.73	5.41	5.56
8	5.41 d (9.5)	5.78	6.02	5.74	6.39
9		5.94	5.65	5.63	5.55
10		3.04	2.96	2.85	3.14
11	5.79 d (15.7)	4.82	5.37	5.32	4.95
12	5.86 dd (15.7, 8.5)	0.92	0.91	0.86	1.01
13	3.01 dt (8.5, 7.0)	1.88	1.87	1.64	2.12
14	5.08 br s	5.63	5.61	5.46	5.39
15		2.6	3.06	2.41	3.61
16	0.90 d (6.6)	5.87	4.92	5.16	6.03
17 $\alpha$	3.81 d (12.2)	3.62	4.96	5.08	3.59
17 $\beta$	3.75 d (12.2)	3.74	3.72	3.82	3.22
18	1.11 s	1.20	1.33	1.40	1.40
19	0.88 s	0.88	1.13	1.03	1.04
20	1.03 d (7.0)	0.99	1.13	1.09	1.05
OH-6	3.45 br s	2.11	4.27	2.27	4.77
OH-9	3.21 br s	3.32	1.76	2.62	1.79
OH-15	2.17 br s	0.67	4.77	3.9	0.65
OBz-3					
2', 6'	8.09 dd (8.1, 1.1)	8	7.89	7.90	7.97
3', 5'	7.44 t (7.7)	7.19	7.18	7.22	7.22
4'	7.57 t (7.5)	7.36	7.32	7.35	7.39
OAc-5	1.78 s	2.08	1.83	1.94	1.39
OAc-7	1.84 s	1.74	1.99	1.82	2.05
OAc-8	1.97 s	2.11	2.10	1.96	2.01
OAc-14	2.18 s	2.11	2.2	2.13	2.15
$r^a$		<b>0.983</b>	0.941	0.964	0.962
$r^2$		<b>0.9973</b>	0.9663	0.9751	0.9878
MAE		<b>0.12</b>	0.31	0.24	0.25
MaxErr		<b>0.30</b>	1.15	1.27	1.12
CMAE		<b>0.09</b>	0.39	0.37	0.28
CMaxErr		<b>0.32</b>	1.22	1.16	1.13

<sup>a</sup>The best agreements are highlighted in bold type. <sup>b</sup> $r$  = Pearson product–moment correlation coefficient;  $r^2$  = correlation coefficient; MAE = mean average error; MaxErr = maximum error; CMAE = corrected mean average error; CMaxErr = corrected maximum error.

Overall, results of DFT-NMR strongly suggest that the diastereomer **3a** is the most plausible candidate for **3**.

To confirm these results, a complementary approach, based on the comparison of vicinal dihedral angles and interproton distances obtained from the theoretical models of diastereomers **3a–3d** and the experimental NMR-derived data of **3**, was used. Indeed, vicinal dihedral angles can be deduced from  $^3J_{\text{HH}}$  coupling constant values from a  $^1\text{H}$  NMR experiment using the Karplus equation, while interproton distances can be determined in a semiquantitative manner through integration of cross-peak intensities in a ROESY experiment.<sup>44,45</sup> The best match for the dihedral angle values derived from NMR spectra (Figure S38, Supporting Information) and theoretical models was found for diastereomer **3a** ( $r^2 = 0.99$ ), followed by **3d** ( $r^2 = 0.93$ ), whereas **3c** and **3b** showed low or no correlation ( $r^2 = 0.45$  and  $5 \times 10^{-6}$ , respectively). The interproton distances derived from ROESY relative integration and those measured

on the theoretical models of diastereomers **3a–3d** are presented in Table 5. Again, the diastereomer **3a** (6*S*,9*S*) was found to be in excellent agreement with ROE-derived distances ( $r^2 = 0.65$ ), whereas diastereomers **3b–3d** were clearly divergent ( $r^2 = 0.038$ , 0.014, and 0.0064, respectively) (Table 5 and Figures S37–39, Supporting Information). Overall, these results indicate unambiguously that jatrohemicetal (**3**) possesses an *S* configuration at both C-6 and C-9, adopting a conformation where the heteroatom of the tetrahydropyran ring moiety is intramacrocyclic and beneath the mean plane. From these data and the close similarity of compound **3** with the previously isolated compound **11**, the absolute configuration of **3** was assigned as 2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*,7*R*,8*S*,9*S*,13*R*,14*R*,15*R*.

The methodology described in the present paper can be used to solve or confirm the structure elucidation of new macrocyclic diterpene ester derivatives. In complement with the classical

**Table 5.** Interproton Distances (Å) Deduced from Semiquantitative ROESY NMR Spectra and from Theoretical Models of Diastereomers 3a–3d of Jatrohemiketal (3)<sup>a</sup>

protons	abs int ROESY (F1, ×10 <sup>8</sup> )	abs int ROESY (F2, ×10 <sup>8</sup> )	abs int ROESY (F1, F2 ×10 <sup>8</sup> )	ROESY	calcd d for 3a (6S,9S)	calcd d for 3b (6S,9R)	calcd d for 3c (6R,9S)	calcd d for 3d (6R,9R)
H-3 to OH-6	0.66	0.48	0.57	3.0	3.2	5.8	5.4	2.1
H-3 to H-17β	3.98	3.54	3.76	2.2	2.3	5.7	3.8	4.6
H-4 to H-5	3.25	3.19	3.22	2.3	2.4	3.1	3.1	2.5
H-4 to H-17β	3.92	n.c.	3.92	2.2	2.2	4.9	2.2	4.6
H-5 to H-8	12.7	12.5	12.6	1.8	2.3	5.0	4.4	4.2
H-5 to H-11	1.38	2.09	1.73	2.5	2.6	5.6	4.9	2.0
H-5 to H-13	2.36	2.59	2.48	2.4	2.6	5.0	4.5	2.4
H-5 to OH-15	0.19	0.26	0.23	3.5	3.8	2.5	2.6	3.7
OH-6 to H-7	0.37	0.58	0.47	3.1	3.0	2.9	3.4	5.0
H-7 to OH-9	0.29	0.37	0.33	3.3	3.0	4.9	3.1	3.8
H-7 to H-17α	n.c.	4.43	4.43	2.1	2.2	3.7	2.7	4.8
H-8 to H-11	6.99	n.c.	6.99	2.0	2.2	4.0	2.5	4.8
H-8 to H-19	1.09	1.08	1.09	2.7	2.5	4.8	2.3	4.9
H-11 to H-13	n.c.	3.95	3.95	2.2	2.4	3.8	2.4	2.3
H-11 to H-19	1.05	0.92	0.98	2.7	2.4	3.7	2.5	2.4
H-12 to H-18	n.c.	2.01	2.01	2.4	2.2	4.0	2.2	2.3
H-12 to H-20	0.31	0.26	0.28	3.4	2.9	3.3	2.7	2.7
H-13 to H-14	4.67	4.12	4.39	2.1	2.6	2.4	2.6	2.8
H-13 to OH-15	1.75	1.58	1.67	2.5	2.8	2.7	2.1	2.5
H-13 to H-20	4.00	3.95	3.97	2.2	2.5	2.5	2.2	2.5
H-14 to H-20	2.53	2.79	2.66	2.3	2.3	2.3	2.5	2.4
H-18 to H-19	1.70	1.78	1.74	2.5	2.5	2.4	2.6	2.5
BzO-3 (H-2' and H-6') to AcO-5	0.35	0.48	0.41	3.2	2.9	4.1	4.2	2.7
				<i>r</i>	<b>0.82</b>	0.06	0.12	−0.08
				<i>r</i> <sup>2</sup>	<b>0.65</b>	0.038	0.014	0.064 <sup>3</sup>
				MAE	<b>0.23</b>	1.45	0.80	0.95
				MaxErr	<b>0.54</b>	3.54	2.59	2.81
				CMAE	<b>0.30</b>	4.73	2.71	3.98
				CMaxErr	<b>0.70</b>	10.99	9.15	6.74

<sup>a</sup>Abs int: absolute intensities, calcd d = calculated distance, n.c. = not calculated. The distance between H<sub>3</sub>-18 and H<sub>3</sub>-19 was used as reference and set to 2.5 Å for calculation of ROE-derived distances. The best agreements are highlighted in bold type. *r* = Pearson product–moment correlation coefficient; *r*<sup>2</sup> = correlation coefficient; MAE = mean average error; MaxErr = maximum error; CMAE = corrected mean average error; CMaxErr = corrected maximum error.

approaches (NMR), the combination of typical NMR experiments (<sup>1</sup>H NMR and ROESY or NOESY) with different molecular modeling techniques (conformational search, DFT for geometry optimization, and DFT-NMR for calculation of chemical shifts and coupling constants) was needed for the correct assignment of the structure and the stereochemistry of compound 3. It is also noteworthy that determination of interproton distances by semiquantitative ROE analysis can be facilitated using a 1D-ROESY sequence (GROESY).<sup>51</sup>

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Optical rotations were measured on a JASCO P1010 polarimeter at 25 °C. The UV spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 5 spectrophotometer. IR spectra were recorded with a Nicolet FTIR 205 spectrophotometer. Sunfire C<sub>18</sub> analytical and preparative columns (250 × 4.6 mm and 250 × 19 mm; 10 μm Waters) were used for analytical and preparative HPLC separations using a Waters autopurification system equipped with a binary pump (Waters 2525), a UV–vis diode array detector (190–600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. HRESIMS data were acquired using an Acquity Waters UPLC coupled to a Waters LCT Premier XE mass spectrometer. The UPLC system was equipped with a Waters Acquity PDA detector. Separation was achieved on a BEH C<sub>18</sub> column (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm) at a flow rate of 0.6 mL/min. Elution was

conducted with a H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN + 0.1% formic acid gradient as follows: 95:5 to 0:100 in 5.5 min. The ionization was carried out using an electrospray ionization source in positive mode (range *m/z* 80–1500). All other chemicals and solvents were purchased from SDS (Peypin, France).

**Plant Material.** See ref 33.

**Extraction and Isolation.** For extraction and preliminary fractionation of the extract, see ref 33. The purification of fraction F9-5-4 (77 mg) by preparative HPLC (Sunfire C<sub>18</sub>, H<sub>2</sub>O–MeCN + 0.1% formic acid, 60:40 to 50:50 in 15 min, 21 mL/min) led to the purification of compounds 1 (0.1 mg, *t*<sub>R</sub> = 10.9 min) and 3 (0.25 mg, *t*<sub>R</sub> 13.9 min). Compound 2 (12.5 mg, *t*<sub>R</sub> 11.8 min) has been isolated from F9-6 (0.4 g) under the same conditions.

(2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,7*S*,8*R*,13*R*,15*R*)-5,9-Diacetoxy-3-benzoyloxy-7,14,15-trihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11*E*-diene (1): grayish, amorphous powder (0.1 mg); [*α*]<sub>D</sub><sup>25</sup> −160 (c 0.10, MeOH); for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 595.2542 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub>Na, 595.2519).

(2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,7*S*,8*R*,10*R*,13*R*,14*R*,15*R*)-5,7,14-Triacetoxy-3-benzoyloxy-8,15,19-trihydroxy-9-oxojatropha-6(17),11*E*-diene (2): white, amorphous powder (12.5 mg); [*α*]<sub>D</sub><sup>25</sup> −110 (c 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log *ε*) 213 (4.81) nm, 279 (0.59); IR ν<sub>max</sub> 3479, 2985, 2940, 1741, 1375, 1255, 1228, 1135, 1030, 713 cm<sup>−1</sup>; for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 635.2579 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>12</sub>Na, 635.2574).

Jatrohemiketal (3): white, amorphous powder (0.25 mg); [*α*]<sub>D</sub><sup>25</sup> −240 (c 0.10, MeOH); for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data, see



**Table 2;** HRESIMS  $m/z$  637.2882  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{32}H_{45}O_{13}$ , 637.2855).

**NMR Experiments.** The NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 600 instrument (at 600 MHz for  $^1H$  NMR and 150 Hz for  $^{13}C$  NMR) using a 1.7 mm microprobe for compounds **1** and **3**, on a Bruker Avance 500 instrument (at 500 MHz for  $^1H$  NMR and 125 MHz for  $^{13}C$  NMR) for 2D heteronuclear experiments, and on a Bruker Avance 300 instrument (300 MHz for  $^1H$  NMR and 75 MHz for  $^{13}C$  NMR) for compound **2**.  $CDCl_3$  was used as solvent and was taken fresh from a single-dose bottle and controlled by  $^1H$  NMR analysis. ROESY (ROESYPH) experiments used a single spin lock of 600 ms.

**Molecular Modeling.** The conformational analysis was carried out using the OPLS\_2005 force field in MacroModel v9.8, as implemented in the Schrödinger suite.<sup>52</sup> Default values were used except the allowed energy window (42 kJ/mol) and the number of evaluations per rotatable bond (500). The resulting conformers were clustered using a 2.0 Å cutoff. The gap between the lowest energy conformer and the one of immediately higher energy was about 1 kcal/mol, and these conformers differ only slightly by the conformation of the macrocycle's esters. The flexibility of the macrocyclic ring was considered throughout these calculations, but only one conformation of the macrocycle was obtained within the 42 kJ/mol allowed energy window.

The geometries of the lowest energy conformer for each diastereomer were optimized in the gas phase using the Gaussian 09 package<sup>53</sup> with Becke's three-parameter hybrid exchange functional (B3LYP)<sup>54,55</sup> and the 6-311+G(d,p) basis set. Subsequent vibrational frequency calculations confirmed that these conformations were local minima.

NMR chemical shifts and coupling constants were calculated following the protocol described by Tantillo and co-workers<sup>49,50</sup> using the Gaussian09 package.<sup>53</sup> The analysis of results was performed using an in-house-developed script.

PDF3D files were generated using CACTVS Chemoinformatics Toolkit ([www.xemistry.com](http://www.xemistry.com)).

**Analysis of NMR and Molecular Modeling Derived Data.** Interproton dihedral angles ( $\varphi$ ) were deduced from  $^1H$  NMR vicinal coupling constants ( $^3J_{HH}$ ) using *J* Sweet (Vers 2.3) software,<sup>56</sup> a desktop calculator for the Karplus equation:

$$J_{HH}(\varphi) = A \cos^2 \varphi + B \cos \varphi + C \quad (1)$$

NMR-derived interproton distances were calculated using ROESY relative integration. ROESY cross-peak volume is related to the distance  $d$  (Å) between two interacting protons and could be calculated using the following approximation:<sup>57</sup>

$$d_{\text{unknown}} = d_{\text{reference}} (\text{ROE}_{\text{reference}} / \text{ROE}_{\text{unknown}})^{1/6} \quad (2)$$

Integration of the ROESY cross-peak was performed using the Bruker TOPSPIN 3.1 software (MacOS X) automatic integration tool (int2d) on both sides of the diagonal with a relative minimum threshold of 0.0005. Average values were calculated to obtain more reliable estimations. The distance between  $H_3$ -18 and  $H_3$ -19 was used as reference and set to 2.5 Å for calculation of ROE-derived distances.

Interproton dihedral angle and interproton distance were measured using the structure analysis tools of the UCSF Chimera program<sup>58</sup> on the lowest energy conformer obtained by molecular modeling for each diastereomer (**3a**–**3d**) of **3**. Values were compared to experimental dihedral angles calculated from  $^1H$  NMR and to ROE-derived distances.

**Statistical Analysis.** Statistical analysis were performed with Microsoft Excel 2011 (French, MacOS X), using = CORREL for Pearson product–moment calculation ( $r$ ) and using = LINEAR.REGRESSION for linear regression analysis and coefficient of determination ( $r^2$ ). The results of DFT-NMR had been statistically compared to NMR data by linear regression analysis of the calculated chemical shifts ( $\delta_{\text{calcd}}$ ) versus the experimental ones ( $\delta_{\text{expt}}$ ).<sup>47,56</sup> The results were then evaluated in terms of the mean absolute error (MAE), the maximum absolute error (MaxErr), the corrected mean

absolute error (CMAE), and the corrected maximum absolute error (CMaxErr).  $\delta_{\text{fit}}$  is the chemical shift calculated from the linear fit.  $MAE = (\sum_i |\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{expt}}| / n)$  and  $MaxErr = \max(|\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{expt}}|)$ .  $CMAE = (\sum_i |\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{fit}}| / n)$  and  $CMaxErr = \max(|\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{fit}}|)$ .  $\delta_{\text{fit}} = (\delta_{\text{expt}} - a) / b$  where  $a$  and  $b$  are the intercept and the slope of the fitting line comprising  $n$  data points, respectively.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.jnatprod.5b00511](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00511).

HRESIMS,  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR and 2D spectra for compounds **1**–**3**, 2D views and exhaustive molecular modeling data for compound **2** and for the lowest energy conformers of the four diastereomers (**3a**–**3d**) of jatrohemiketal (**3**) (PDF)

DF3D views of compound **2** and of the four diastereomers (**3a**–**3d**) of jatrohemiketal (**3**) (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*Tel: + 33 1 69 82 30 94. Fax: + 33 1 69 07 72 47. E-mail: [bogdan.iorga@cnrs.fr](mailto:bogdan.iorga@cnrs.fr).

\*Tel: + 33 1 69 82 30 85. Fax: + 33 1 69 07 72 47. E-mail: [marc.litaudon@cnrs.fr](mailto:marc.litaudon@cnrs.fr).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank M.-T. Martin (ICSN-CNRS) for her insightful advice during the manuscript preparation and the anonymous reviewers for providing constructive comments on the manuscript. The CEBA and LERMIT Labex programs are acknowledged for their support (CEBA, ref ANR-10-LABX-25-01, and LERMIT, ref ANR-10-LABX-33).

## ■ REFERENCES

- (1) Nothias-Scaglia, L.-F.; Pannecouque, C.; Renucci, F.; Delang, L.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1277–1283.
- (2) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4295–4327.
- (3) Vasas, A.; Hohmann, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8579–8612.
- (4) Shi, Y.-P.; Jia, Z.-J.; Jamil, L.; Sadiq, S. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1219–1221.
- (5) Hohmann, J.; Evanics, F.; Dombi, G.; Szabó, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6581–6584.
- (6) Jassbi, A. R.; Fukushi, Y.; Tahara, S. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 1706–1713.
- (7) Ahmad, V. U.; Hussain, H.; Jassbi, A. R.; Hussain, J.; Bukhari, I. A.; Yasin, A.; Aziz, N.; Choudhary, M. I. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1221–1224.
- (8) Duarte, N.; Ferreira, M.-J. U. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 489–492.
- (9) Hohmann, J.; Evanics, F.; Dombi, G.; Molnár, J.; Szabó, P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 211–215.
- (10) Hohmann, J.; Evanics, F.; Dombi, G.; Szabó, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6581–6584.
- (11) Barile, E.; Lanzotti, V. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3603–3606.
- (12) Shi, J.-G.; Jia, Z.-J.; Yang, L. *Phytochemistry* **1992**, *32*, 208–210.
- (13) Wu, D.; Sorg, B.; Hecker, E. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 408–413.
- (14) Uddin Ahmad, V.; Reza Jassbi, A.; Parvez, M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1573–1584.

- (15) Zechmeister, K.; Röhrli, M.; Brandl, F.; Hechtischer, S.; Hoppe, W.; Hecker, E.; Adolf, W.; Kubinyi, H. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 3071–3073.
- (16) Kupchan, S. M.; Sigel, C. W.; Matz, M. J.; Saenz Renault, J. A.; Haltiwanger, R. C.; Bryan, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 4476–4477.
- (17) Yamamura, S.; Kosemura, S.; Ohba, S.; Ito, M.; Saito, Y. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 5315–5318.
- (18) Manners, G. D.; Wong, R. Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 2075–2081.
- (19) Jakupovic, J.; Morgenstern, T.; Marco, J. A.; Berendsohn, W. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1611–1619.
- (20) Jeske, F.; Jakupovic, J.; Berendsohn, W. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1743–1750.
- (21) Jakupovic, J.; Morgenstern, T.; Bittner, M.; Silva, M. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1601–1609.
- (22) Jakupovic, J.; Jeske, F.; Morgenstern, T.; Tschritizis, F.; Marco, J. A.; Berendsohn, W. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1583–1600.
- (23) Appendino, G.; Jakupovic, S.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Milon, V.; Ballero, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 749–756.
- (24) Vasas, A.; Hohmann, J.; Forgo, P.; Szabó, P. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5025–5030.
- (25) Lu, Z.-Q.; Guan, S.-H.; Li, X.-N.; Chen, G.-T.; Zhang, J.-Q.; Huang, H.-L.; Liu, X.; Guo, D.-A. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 873–876.
- (26) Gao, S.; Liu, H.-Y.; Wang, Y.-H.; He, H.-P.; Wang, J.-S.; Di, Y.-T.; Li, C.-S.; Fang, X.; Hao, X.-J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3453–3455.
- (27) Yang, D.-S.; Zhang, Y.-L.; Peng, W.-B.; Wang, L.-Y.; Li, Z.-L.; Wang, X.; Liu, K.-C.; Yang, Y.-P.; Li, H.-L.; Li, X.-L. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 265–269.
- (28) Xu, W.-D.; Tian, Y.; Guo, Q.-L.; Yang, Y.-C.; Shi, J.-G. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 1531–1534.
- (29) Tian, Y.; Guo, Q.; Xu, W.; Zhu, C.; Yang, Y.; Shi, J. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3950–3953.
- (30) Marco, J. A.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J.; Lex, J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1707–1709.
- (31) Hohmann, J.; Günther, G.; Vasas, A.; Kálmán, A.; Argay, G. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 107–109.
- (32) Tian, Y.; Xu, W.; Zhu, C.; Lin, S.; Li, Y.; Xiong, L.; Wang, S.; Wang, L.; Yang, Y.; Guo, Y.; Sun, H.; Wang, X.; Shi, J. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1221–1229.
- (33) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retailleau, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leysen, P.; Costa, J.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1505–1512.
- (34) Hohmann, J.; Vasas, A.; Günther, G.; Máthé, I.; Evanics, F.; Dombi, G.; Jerkovich, G. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 331–335.
- (35) Breton, R. C.; Reynolds, W. F. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 501–524.
- (36) Hohmann, J.; Günther, G.; Vasas, A.; Kálmán, A.; Argay, G. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 107–109.
- (37) Jeske, F. *Naturstoffe aus Euphorbiaceen: Studien zum konformativen Verhalten von Jatrophanen*. Ph.D. thesis, Technical University of Berlin, 1996.
- (38) Alberto Marco, J.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J.; Jeske, F. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1621–1630.
- (39) Günther, G.; Martinek, T.; Dombi, G.; Hohmann, J.; Vasas, A. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 365–370.
- (40) Corea, G.; Fattorusso, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4485–4494.
- (41) Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4597–4607.
- (42) Bagno, A.; Saielli, G. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2015**, *5*, 228–240.
- (43) Albadry, M. A.; Elokely, K. M.; Wang, B.; Bowling, J. J.; Abdelwahab, M. F.; Hossein, M. H.; Doerksen, R. J.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 178–185.
- (44) Butts, C. P.; Jones, C. R.; Towers, E. C.; Flynn, J. L.; Appleby, L.; Barron, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 177–184.
- (45) Jones, C. R.; Butts, C. P.; Harvey, J. N. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 145–150.
- (46) Jacobsen, N. E. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2007.
- (47) Powder-George, Y.; Frank, J.; Ramsewak, R. S.; Reynolds, W. F. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 274–277.
- (48) Saielli, G.; Nicolaou, K. C.; Ortiz, A.; Zhang, H.; Bagno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6072–6077.
- (49) Lodewyk, M. W.; Siebert, M. R.; Tantillo, D. J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1839–1862.
- (50) CHESHIRE Chemical Shift Repository <http://cheshirenmr.info/> (accessed Sep 21, 2015).
- (51) Furrer, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1437–1441.
- (52) *Macromodel; version 9.8*; Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2010.
- (53) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
- (54) Lee, Y. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 785–789.
- (55) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (56) Balacco, G. *J. Chem. Inf. Model.* **1996**, *36*, 885–887.
- (57) Ämmälähti, E.; Bardet, M.; Molko, D.; Cadet, J. *J. Magn. Reson., Ser. A* **1996**, *122*, 230–232.
- (58) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.

**II. 6. Manuscrit : Search and isolation of antiviral deoxyphorbol esters from *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* using an SFC-based targeted purification workflow and MS/MS molecular networking**

*Les informations complémentaires sont en annexes du présent manuscrit (cf. annexes p.198)*



Figure 38. *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*. Photo : Pr. Guilhan Paradis



# Search and isolation of antiviral deoxyphorbol esters from *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* using an SFC-based targeted purification workflow and MS/MS molecular networking

## **Foreword**

*The following document is written as a preliminary manuscript in english, in order to prepare its further submission to a peer-reviewed international journal. The antiviral experiments against HIV replication describe in this manuscript has been performed by Erick de la Torre under the supervision of Dr. Luis Miguel Bedoya and Prof. José Alcamí from the AIDS Immunopathogenesis Department, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. The anti-CHIKV evaluation has been performed by Dr. Pieter Leyssen (KU Leuven). Furthermore, SFC-UV-MS/MS and semipreparative-SFC experiments were preceded by a methodological development for the analysis by SFC-UV-MS/MS of diterpene esters by Stéphanie Boutey-Mercier (CNRS-ICSN) under the supervision of Dr. David Touboul (CNRS-ICSN). This development is not detailed and not discussed in the present manuscript.*

## **Abstract**

Investigation of the antiviral activity of SJ23B indicated that this jatrophone ester (JE) is not an inhibitor of HIV-1 replication, in contrast with a previous report. Taking into account that phorboids (4-deoxyphorbol esters) were isolated from the same plant (*E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata*), a search for these 4-deoxyphorbol esters (4-dPE) was undertaken. An original SFC-based targeted purification workflow using MS/MS molecular networking (MS<sup>2</sup>MN) was developed to detect, isolate, and evaluate the antiviral activity of 4-dPE. Analysis by SFC-UV-MS/MS of bioactive fractions from the plant extract and interpretation of MS/MS data by MS<sup>2</sup>MN indicated that unknown diterpene esters, including jatrophone esters (JE) and 4-dPE, were present in the samples. The MS<sup>2</sup>MN-targeted purification procedure by semipreparative-SFC led to isolation of two new JE (**13** and **14**) along with one 4-dPE (**15**) and three new 4-dPE (**16**, **17**, and **18**). The structural elucidations of these six compounds were solved by extensive NMR spectroscopy, ESI-HRMS, and X-ray crystallographic analysis. The compound 4-dPE A (**15**) was found to be a potent and selective inhibitor of HIV-1 replication in a recombinant virus assay (IC<sub>50</sub> = 8 nM, NL4.3-Ren, MT-4 cells). The investigation of the mechanism of action indicated that **15** acts like phorboids, by reactivating HIV-1 latency, and down-regulating CD4 and CXCR4, probably through a PKCs dependent pathway. Furthermore, compound **15** was found to possess an antiviral activity on CHIKV replication (EC<sub>50</sub> = 1.0 ± 0.4 μM and SI = 25). The 4-dPE B (**18**) is the third most potent antiviral diterpene ester against CHIKV replication evaluated up to date (EC<sub>50</sub> = 0.45 ± 0.03 μM and SI = 328). Overall, similar structure-activity relationships were observed for both

anti-CHIKV and anti-HIV activities, which supported the hypothesis of PKC-dependent mechanism of diterpene esters against CHIKV replication.

## I. Materials and methods

### *1.1. Antiviral assays*

**Material.** Cells: MT-2 is a T-cell line transformed by HTLV-I (Human T-cell Lymphotropic Virus I). PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) were isolated from healthy blood donors by standard procedures. TZM-Luc is a human cervical epithelial line cell line stably transfected with an LTR-Luciferase gene.

**Reagents.** Luciferase Assay System (Promega), CellTiter Glo viability assay (Promega), Cell culture standard reagents. DMSO (Sigma).

**Virus.** HIV-1 (NL4.3) wild-type and recombinant HIV-1 clone (NL4.3-Ren) were used. NL4.3-Ren is a vector containing the full length of the NL4.3 viral clone carrying the luciferase reporter gene in the position of *nef*.

**Recombinant virus assay.** The initial screening of compounds was performed with the recombinant HIV-1 clone NL4.3-Ren. Briefly, the assay was performed in MT-2 cells (T lymphocyte cells), infected with supernatants obtained previously from 293-T cells by transfection of pNL4.3-Ren DNA, obtained from AIDS reagents program (NIH). Viral supernatants from 293-T cells were collected at 72 hours and titrated in MT-2 cells or activated PBMCs (IL-2 and PHA) in order to obtain 100.000 RLU (Relative light units)/well at 48 hours of infection (approximately 3 ng. of p24 protein/well). The assay was then performed in 96 well microplate seeded with 100.000 cells/well in a volume of 100  $\mu$ l. The compounds to evaluate were added to the culture at doses ranging from 100  $\mu$ M to 0.16  $\mu$ M. Cell cultures were infected with viral supernatants and after 48 hours cell pellets were collected and treated with lysis buffer (Luciferase or Renilla assay system, Promega). Renilla-Luciferase activity (RLUs) was then measured in a luminometre (Berthold Detection systems). All the experiments were controlled with cells treated with the same DMSO concentration. HIV-1 replication inhibition was evaluated by measuring the reduction of luciferase activity or RLUs in a luminometre, being the 100% the infection of non-treated cells (DMSO added).

**TZM-Luc assay.** The assay was performed in 96 well microplate seeded with 10.000 cells/well in a volume of 100  $\mu$ l. The compounds to evaluate were added to the culture at doses ranging from 100  $\mu$ M to 0.16  $\mu$ M. Cell cultures were infected with viral supernatants (NL4.3 wild type) and after 48 hours cell pellets were collected and treated with lysis buffer (Luciferase assay system, Promega). Luciferase activity (RLUs) was then measured in a luminometre (Berthold Detection systems). All the experiments were controlled with cells

treated with the same DMSO concentration. HIV-1 inhibition was evaluated by measuring the reduction of luciferase activity or RLUs in a luminometre, being the 100% the infection of non-treated cells (DMSO added).

**Toxicity evaluation.** Cell toxicity was measured by treating non-infected MT-2 cells or activated PBMCs with similar concentrations of compounds used in antiviral assays. After 48 hours in culture CellTiter Glo (Promega) reagent was added and cell viability measured by RLUs quantification in a luminometre. Cell viability is expressed as percentage of living cells as compared to a non-treated (DMSO) control. IC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> were calculated with a non-linear regression formula using GraphPad prism software.

**Transcriptional activity.** Resting PBMCs (PBLs) were obtained by standard procedures from healthy donors and leave in culture for 20 hours to allow receptor expression. Afterwards, PBCMs were transfected by electroporation with an Equibio electroporator (BioRad) with a plasmid encoding the whole genome of HIV-1 expressing the luciferase reporter gene. Transfected cells were seeded in 24 well microplates and treated with different concentrations of compounds and TPA (0.1  $\mu$ M) as a reference control of HIV-1 transactivation. 48 hours later, cultures were lysed with luciferase buffer and RLUs obtained in a luminometre (Berthold Detection Systems).

**Receptor expression.** Single-, double- or three-color immunophenotyping was performed with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Background staining was assessed with the appropriate isotype- and fluorochrome-matched control mAb and subtracted. Results are shown as percentage of cells expressing the receptor or by receptor fluorescence mean intensity (MI). PBMCs resting or MT-2 were analysed using forward-versus-side scatter dot plots. After treatment with different concentrations for 48, 24 and 2 hours; cells were collected and CD4 and CXCR4/CCR5 receptors expression were evaluated. TPA (0.1  $\mu$ M) was used as a reference control

**Anti-Chikungunya virus (CHIKV) bioassay.** See Nothias-Scaglia 2014 and 2015 for material and methods.<sup>1,2</sup>

## ***1.2. SFC-based targeted purification workflow using MS/MS molecular networking (MS<sup>2</sup>MN)***

**Plant material.** The whole plant of *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was collected by L.-F. N.-S. in November 2011 near Bocca di Vergio, at an altitude of 1200 m, in the Niolu region of Corsica (GPS coordinates: 42°17'26.999" N, 8°54'2.894' E) and identified by L.-F.N.-S. and Marie-José Battesti. A voucher specimen (LF-023) was deposited at the Herbarium of the University of Corsica (Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Corte).

**Extraction and fractionation.** The whole plant of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was air-dried, ground to a coarse powder (dry weight, 370 g), and extracted three times (each 5 L) with ethyl acetate (EtOAc) at 40 °C and 100 bar using a Zippertex static high-pressure, high-

temperature extractor developed at the CNRS-ICSN pilot unit. The EtOAc extract was concentrated in vacuo at 40 °C to yield 24.7 g of residue ( $\rho = 6.7\%$  w/w). The EtOAc residue was mixed with Celite (45 g) and subjected to flash chromatography on a silica column (Versapak, 80 × 150 mm, 20–45  $\mu\text{m}$ , 385 g, eluted with a gradient of acetone–n-heptanes 0 to 100%, 100 mL/min), leading to ten fractions (F1-F10).

**SFC–UV–MS/MS.** Supercritical fluid chromatography (SFC) analyses were performed using a 1260 Infinity Analytical SFC system from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). This system is equipped with a modified SFC 1260 Infinity Binary LC and an additional module B1260 SFC, generating supercritical CO<sub>2</sub> from gaseous CO<sub>2</sub>. Outlet pressure was regulated to 150 bar by a back-pressure regulator (BPR). An autosampler with a 1.2 or 5  $\mu\text{L}$  injection loops was used, and the temperature was kept at 5 °C to avoid fast degradation of the analytes. A porous graphitic carbon column (Hypercarb, Thermo Scientific, 100 mm x 2.1 mm (i.d.), 3  $\mu\text{m}$  particules) was used. The column oven was maintained at 30° C. The SFC system was coupled to a diode-array detector (DAD–UV–visible) with a 6 mm path length high-pressure flow cell. The elution gradient separation was performed using CO<sub>2</sub> (solvent A) and ethanol with 0.1 % formic acid (solvent B). The gradient was: 0–3 min at 3 % solvent B, 3–13 min linear gradient from 3 to 10 % solvent B, 13–17 min from 10 to 20 % solvent B, 17–20 min isocratic plateau at 20 % solvent B, 21–23 min equilibration at 3%. The flow rate was fixed at 1.5 mL/min. Analyses were achieved by coupling the SFC–UV system to a tandem mass spectrometer (MS/MS) Agilent 6540 Q-TOF (quadrupole time-of-flight) (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with an ESI source operating in positive ion mode. Experimental settings were optimized: capillary voltage = 3500 V, nebulizer pressure = 30 psi, vaporizer temperature = 350°C, drying-gas flow rate 10 L/min, drying-gas temperature = 350°C, stealth-gas flow rate = 7.5 L/min, stealth-gas temperature = 350° C, skimmer voltage = 45 V, fragmentor tension = 150 V, nozzle voltage = 500 V, and fragmentor voltage = 150 V). Mass spectra were recorded from  $m/z$  100 to  $m/z$  1000 at 2 GHz leading to a mass resolution of 20,000 at  $m/z$  922. Calibration solution, containing two internal reference masses (purine, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>,  $m/z$  121.0509, and HP-921,  $m/z$  922.0098), led to mass accuracy below 2 ppm. A make-up solvent (100 % MeOH, 0.2 mL/min) was added between the UV detector and the BPR by a 1260 Infinity isocratic pump (Agilent Technologies, Massy, France). Finally a Caloratherm (Sandra Selerity Technologies, Kortrijk, Belgium) at a fixed temperature of 60°C was added just before the ion source to avoid freezing of the transfer line. Data acquisition and processing were performed using MassHunter Workstation software (Agilent Technologies, Massy, France).

**MS/MS method:** The untargeted MS/MS analyses were performed using an optimized data-dependent method consisting of a full scan from  $m/z$  100 to 1000 (0.1 s scan time), followed by data dependent acquisition of MS/MS spectra (auto-MS/MS) of the four most intense ions (Top-4) over  $m/z$  300 and with a minimum of 2000 cps intensity using an acquisition time of



0.25 sec for each parent ion and without exclusion rules. The MS/MS spectra were recorded in the  $m/z$  range 50-800 and collision energy was fixed at 30 eV.

**Molecular networking.** A molecular network (MN) was created using the online workflow from GNPS web-platform (<http://gnps.ucsd.edu>). The data was filtered by removing all MS/MS peaks within  $\pm 17$  Da of the precursor  $m/z$ . MS/MS spectra were window filtered by choosing only the top six peaks in the  $\pm 50$  Da window throughout the spectrum. The data was then clustered with MS-Cluster with a parent mass tolerance of 0.7 Da and a MS/MS fragment ion tolerance of 0.5 Da to create consensus spectra. Further, consensus spectra that contained less than two spectra were discarded. Then, 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 then 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 0.7 and at least six matched peaks. Data were visualized using Cytoscape 3.2.1 software.<sup>3</sup> Allegro Layout was used to organize the molecular networks (weak clustering by cosine score factor). Precursor ion intensity value was used to modulate the nodes size, and the edge thickness was proportional to the cosine score. Data of SFC-UV-MS/MS analysis had been deposit to MassIVE Public GNPS dataset (<http://gnps.ucsd.edu>)

**Semipreparative-SFC.** An analytical and semipreparative SFC (semiprep-SFC) system from Waters<sup>®</sup> (Milford, Massachusetts, USA), consisting of a Thar<sup>®</sup> SFC fluid delivery module (a liquid CO<sub>2</sub> pump and a modifier pump (co-solvent)), a cooling bath of Thermo Scientific<sup>®</sup> type Neslab RTE7 controlled by a Digital One thermoregulator to cool pumpheads and CO<sub>2</sub> delivery tubings, a Thar<sup>®</sup> autosampler with a 48-vial plate, a Thar<sup>®</sup> SFC analytical-2-prep oven with a 10-column selection valve, a Thar<sup>®</sup> SFC automated backpressure regulator SuperPure Discovery Series, a TharSFC tunable splitter (5/100), a Waters<sup>®</sup> 2998 photodiode array detector, and a Waters<sup>®</sup> DEDL 2424 detector. The autosampler was equipped with a 100  $\mu$ L injection loop. A porous graphitic carbon column (Hypercarb, Thermo Scientific, 150 mm x 10 mm (i.d.), 5  $\mu$ m particules) was used. An automated TharSFC six-vessels collection module was used with a static solvent flow set to 3 mL/min. The flow rate was fixed at 8 mL/min and additional chromatographic conditions used in the preparative purification included a back pressure of 150 bar, a column temperature of 40° C, and ethanol as co-solvent. The instrument was controlled by Superchrom<sup>®</sup> software (TharSFC<sup>®</sup>, 2003–2009) and data were processed using Chromscope<sup>®</sup> software (TharSFC<sup>®</sup>, 2009) both programs from Thar Technologies<sup>®</sup> (Pittsburgh, PA, USA).

**SFC-based purification procedure.** Fractions F7–F9 were shown to inhibit CHIKV replication ( $EC_{50}$  = 1.2, 3.4, and  $<0.8$   $\mu$ g/mL, respectively) and were analyzed by SFC-UV-MS/MS. Based on molecular networking interpretation, F9 (1.2 g) was selected to undertake a MS/MS-targeted-SFC-purification procedure. Fraction 9 was diluted at 50 mg/mL in ethanol

and filtered on a 0.45  $\mu\text{m}$  disc filter (PTFE). The MS/MS-targeted-SFC-purification was prepared by injecting 2-3  $\mu\text{L}$  in semiprep-SFC to achieve a satisfying profile. The UV trace at 230 nm was used to monitor and compare the evolution of semiprep-SFC in regard to the MS/MS-targeted compounds from SFC-UV-MS/MS data. Fraction 9 (200 mg) was fractionated by semiprep-SFC with the following method: 0–10 min at 20 % solvent B, 10–15 min linear gradient from 20 to 40 % solvent B, 15–20 min isocratic plateau at 40 % solvent B, 20-24 min reequilibration time at 20%. Using this procedure, six pure components were collected: two JE previously identified **4** (21 mg) and **8** (9 mg), and three other diterpene esters **15** (11 mg), **17** (13 mg), **18** (22.5 mg). A sub-fraction F9-1 (9 mg) was also obtained, This sub-fraction F9-1 was diluted at 35 mg/mL in ethanol and subjected to a second purification procedure, affording two compounds, **13** (2.7 mg) and **14** (1.3 mg). The method used was 0–1 min at 10 % solvent B, 2–12 min linear gradient from 10 to 15 % solvent B, 12-16 min isocratic plateau at 15 % solvent B, 16-20 min reequilibration time at 10 %. Compounds (**13-18**) were then further purified on silica gel ( $\text{SiO}_2$ , in pasteur pipette) with dichloromethane as eluent.

### ***1.4. Structural elucidation***

**General Experimental Procedures.** Optical rotations were measured using a JASCO P1010 polarimeter at 25 °C. The UV spectra were recorded using a Perkin-Elmer Lambda 5 spectrophotometer. For compounds **12-18**, the 2D NMR spectra were recorded using a Bruker 500 MHz instrument (Avance 500), and using a Bruker 300 MHz instrument (Avance 300) for  $^{13}\text{C}$  NMR spectra.  $\text{CDCl}_3$  was used as solvent. All other chemicals and solvents were HPLC-MS grade purchased from SDS (Peypin, France).

**Crystallography.** All crystallographic data were collected using a Rigaku diffractometer constituted by a MM007 HF copper rotating-anode generator, equipped with Osmic confocal optics, and a Rapid II curved Image Plate. Crystallographic data for **16** have not been deposited yet to the Cambridge Crystallographic.

#### **Compound properties**

Jatropha esters **1-12**: see ref.<sup>14</sup>

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*S*,8*R*,9*S*,13*R*,15*R*)-3,5,7,9,14,15-Hexaacetoxy-8-hydroxy-14-oxojatropha-6(17),11*E*-diene (**13**, JE-C1): Amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -95 (*c* 0.1, MeOH). For  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data, see Table 2; ESI-HRMS  $m/z$  675.2613  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{14}$ ,  $\Delta_{\text{theoretical}} = + 1.4$  ppm); (ESI-HRMS/MS deposit to GNPS spectral library, ref: CCMSLIB00000531511); See S1-S8 in Supporting Information.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*S*,8*R*,9*S*,13*R*,15*R*)-3,5,7,8,9,14,15-Heptaacetoxy-14-oxojatropha-6(17),11*E*-diene (**14**, JE-C2): Amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -130 (*c* 0.5, MeOH). For  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data, see Table 2; ESI-HRMS  $m/z$  717.2733  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{O}_{13}$ ,  $\Delta_{\text{theoretical}} = + 0.1$  ppm); (ESI-HRMS/MS deposit to GNPS spectral library, ref:

CCMSLIB00000531512); See S9-S18 in Supporting Information.

*4 β-deoxyphorbol 12-tiglate-13-isobutyrate (15, 4-dPE A)*: Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} + 15$  (c 0.1, MeOH). For  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data, see Table 3; ESI-HRMS  $m/z$  523.2674  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_7$ ,  $\Delta_{\text{theoretical}} = - 0.9$  ppm); (ESI-HRMS/MS deposit to GNPS spectral library, ref: CCMSLIB00000531515); See S19-S26 in Supporting Information.

*4 α-deoxyphorbol 12-tiglate-13-isobutyrate (16, 4 α-dPE A)*: Colorless crystal;  $[\alpha]_D^{25} + 30$  (c 0.1, MeOH). For  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data, see Table 3; ESI-HRMS  $m/z$  523.2675  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_7$ ,  $\Delta_{\text{theoretical}} = - 0.7$  ppm); (ESI-HRMS/MS deposit to GNPS spectral library, ref: CCMSLIB00000531518); See S27-S34 in Supporting Information.

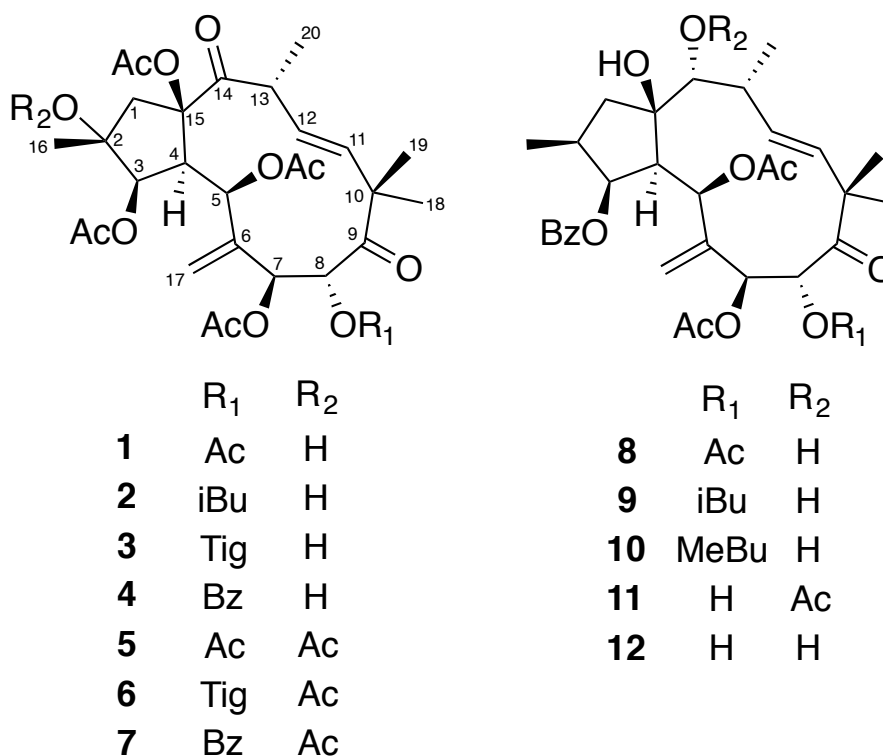
*4 β,20-dideoxyphorbol 12-tiglate-13-isobutyrate (17, 4,20-ddPE A)*: Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} + 20$  (c 0.1, MeOH). For  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data, see Table 4; ESI-HRMS  $m/z$  521.2517  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_7$ ,  $\Delta_{\text{theoretical}} = - 1.2$  ppm); (ESI-HRMS/MS deposit to GNPS spectral library, ref: CCMSLIB00000531514); See S35-S42 in Supporting Information.

*4 β-deoxyphorbol 12-acetate-13-isobutyrate (18, 4-dPE B)*:  $[\alpha]_D^{25} + 40$  (c 0.1, MeOH). For  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data, see Table 4; ESI-HRMS  $m/z$  483.2348  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_7$ ,  $\Delta_{\text{theoretical}} = + 1.3$  ppm); (ESI-HRMS/MS deposit to GNPS spectral library, ref: CCMSLIB00000531516); See S43-S50 in Supporting Information.

## II. Results and discussion

### ***II. 1. Evaluation of the antiviral activity of jatrophone esters from *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* against HIV-1 replication***

SJ23B (**5**) is a jatrophone ester (JE) isolated from *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* collected in Sardinia. It showed promising antiviral activity against HIV-1 replication as apparent from its  $\text{EC}_{50}$  value within 2-20 nM range, and high selectivity index.<sup>5,6</sup> However, the interesting anti-HIV properties of SJ23B sample described by Bedoya *et al.*,<sup>6</sup> could not be studied further due to the lack of available material.<sup>7</sup> Recently, compound **5** and eleven other jatrophone esters (**1-4**, **6-12**) were isolated through a bioassay-guided purification procedure from an *Euphorbia amygdaloides* ssp *semiperfoliata* extract.<sup>1</sup>



Their antiviral activities were evaluated using infection of recombinants HIV-1 (NL4.3-Ren) in MT-2 cells with different concentrations of compounds. Inhibiting and cytotoxic concentrations (IC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub>, respectively) of each compound isolated (**1-12**), as well as of the initial SJ23B sample, the crude extract, and the positive reference (prostratin) are presented in Figure 1.

The results were consistent with data obtained previously using wild-types strains of HIV-1 and HIV-2.<sup>1</sup> For instance, JE **3** showed a selective inhibiting activity of HIV-1 replication (NL4.3-Ren, IC<sub>50</sub> = 77 nM, and SI = 649) and showed previously (HIV-1, IIIa, IC<sub>50</sub> = 340 nM, and SI > 96). Furthermore, JE **5**, which correspond to the compound named SJ23B, did not display any anti-HIV-1 activity. In contrast, initial SJ23B sample showed high anti-HIV activity (IC<sub>50</sub> = 3.5 nM).<sup>6</sup> The lack of anti-HIV-1 activity of compound **5** was confirmed by using a second cell-based assay on NL4.3 wild type infection of TZM-Luc cells (IC<sub>50</sub> > 10 < 50 μM). The sample SJ23B showed 22 fold the antiviral activity of the most active JE evaluated (**3**).

Taking into account these results, we proposed that some compound(s), present in trace quantity(ies) in SJ23B sample, such as 4-deoxyphorbol diester(s) isolated at the same time from of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata*,<sup>5</sup> could be responsible of its potent anti-HIV activity. To validate this hypothesis, the detection and isolation of such compound(s) within fractions of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* was carried out.

**Table 1. Anti-HIV-1 evaluation of the extract EtOAc of *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* and JE in MT-2 cells. Recombinant virus assay. IC<sub>50</sub>: Inhibiting concentration 50 %, CC<sub>50</sub>: Cytotoxic concentration 50 %. References are the same as in the paper of Nothias-Scaglia *et al.* (*J. Nat. Prod.*, 2014).<sup>1</sup>**

Cpd	NL4.3-Ren			Viability
	IC <sub>50</sub> $\mu$ M <sup>a</sup>	Confidence Interval 95%	R <sup>2</sup>	CC <sub>50</sub> $\mu$ M
<b>1</b>	>50	-	-	>50
<b>2</b>	>10, <50	-	-	>50
<b>3</b>	<b>0.077</b>	0.04 to 0.15	0.88	>50
<b>4</b>	>50	-	-	>50
<b>5</b>	>10, <50	-	-	>50
<b>6</b>	16.69	1.682 to 165.7	0.62	>50
<b>7</b>	27.9	7.4 to 104.6	0.87	>50
<b>8</b>	> 50	-	-	>50
<b>9</b>	>10, <50	-	-	>50
<b>11</b>	16.46	8.973 to 30.21	0.82	>50
EtOAc extract	0.081 <sup>a</sup>	0.067 to 0.098	0.99	>50
prostratin	0.226	0.0734 to 0.6988	0.91	>50
SJ23B	0.0035	0.0011 to 0.0108	0.89	>50

## ***II. 2. SFC-based targeted purification workflow using MS/MS molecular networking (MS<sup>2</sup>MN) of diterpenoids from E. amygdaloides ssp. semiperfoliata***

Jatrophone esters (JE) and 4-deoxyphorbol esters (4-dPE) have been previously isolated from the the Sardinian of *Euphorbia* ssp. *semiperfoliata*.<sup>1,5</sup> In order to target and isolate 4-dPE in fractions of the Corsican *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata*, an innovative SFC-based targeted purification workflow using MS/MS molecular networking (MS<sup>2</sup>MN) was designed. As a starting point, three fractions (F7-F9) obtained from a flash chromatography of the EtOAc extract of *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* were selected, based on their high antiviral activities. Analysis by SFC-UV-MS/MS of these samples was used to generate MS/MS molecular networks with GNPS workflow. MS/MS spectra of reference compounds JE (**1-12**) previously isolated,<sup>1,4</sup> were included in the dataset. Visualization was performed through Cytoscape software. Figures 1 and 2 showed the SFC-UV-MS/MS molecular networks with an *m/z* gradient layout and a fraction layout, respectively. Results indicated that fractions F7-F9 were all composed of two different molecular networks: a main network (MN1) related of MS/MS spectra in the range *m/z* 600-

800 and a second smaller network (MN2) including MS/MS spectra in the range  $m/z$  480-550 (Figure 3).

Interpretation of the molecular networks was allowed by: (i) highlighting the MS/MS spectra of JE reference compounds (**1-12**), (ii) inspection of MS/MS spectra, and (iii) through dereplication from the literature data.<sup>5</sup> As shown in Figure 4, the molecular network MN1 contained two clusters that were annotated as JE-A (blue color) and JE-B (violet color). MS/MS spectra of each cluster showed similar backbone ions:  $m/z$  327, 309, 299 for JE-A and  $m/z$  313, 295, 285 for JE-B. A third cluster (in red) showed MS/MS spectra evoking phorbol esters MS/MS fingerprint ( $m/z$  311, 293, 283), but was annotated as unknown diterpene esters, because more than three neutral losses of ester groups were observed (maximum number of ester groups for phorbol ester is three).<sup>4</sup> The fourth molecular network MN2 (in green) contained MS/MS spectra consistent with fragment ions of deoxyphorbol esters ( $m/z$  313, 295, 285). In the latter case, no more than two neutral losses of ester groups were present. Moreover, two ESI-HRMS/MS spectra were matching nicely with two 4-deoxyphorbol diesters previously isolated by Appendino *et al* (one is presented in Figure 3).<sup>5</sup> Thus, this molecular network (MN2) was putatively annotated as 4-dPE in Figure 4.

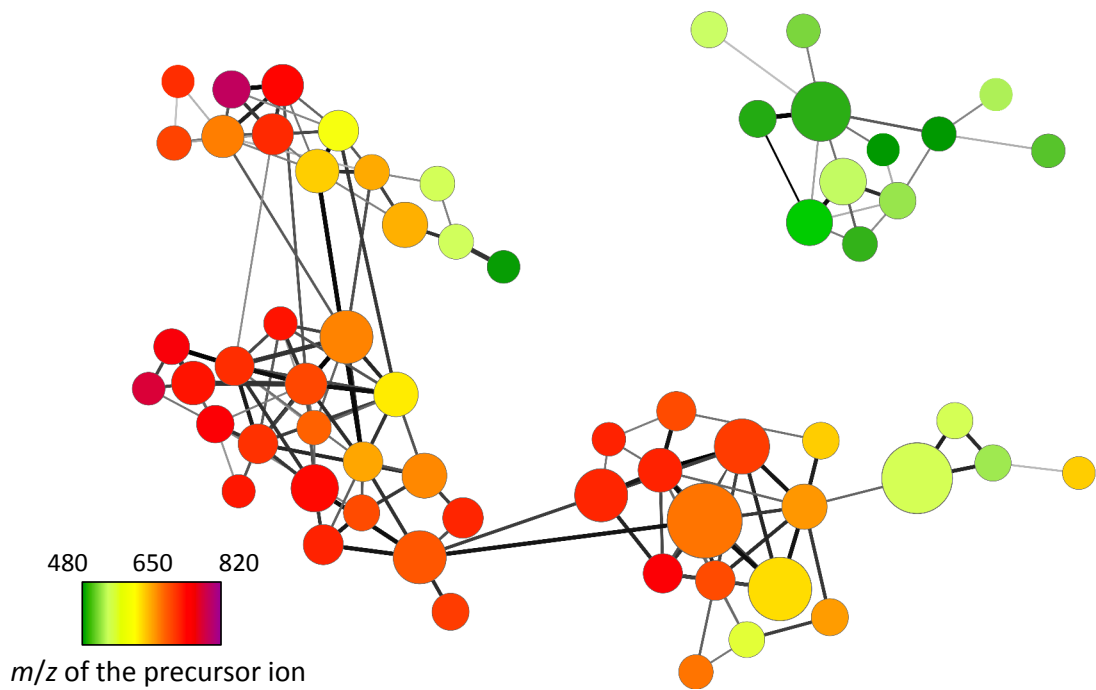


Figure 1. MS/MS molecular networks from SFC-UV-MS/MS analysis of fractions F7-F9, represented with a *m/z* gradient layout.

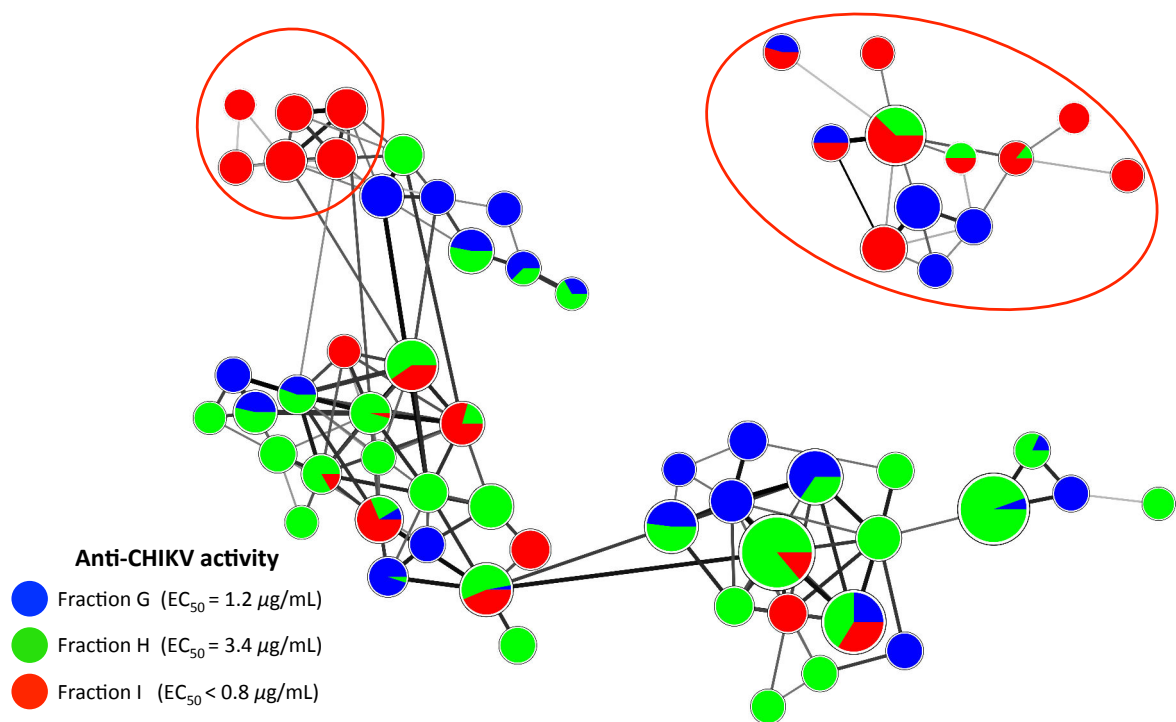


Figure 2. MS/MS molecular networks from SFC-UV-MS/MS analysis of fractions F7-F9, represented with a fraction layout.



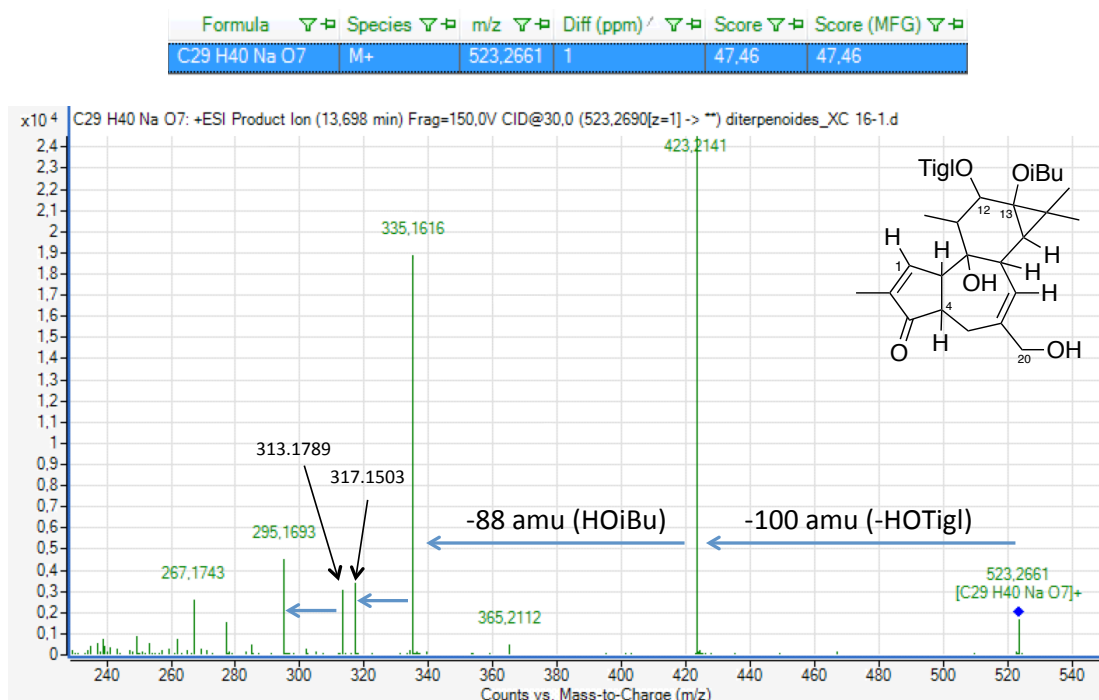


Figure 3. ESI-HRMS/MS spectrum of  $m/z$  523.2661 at 13.7 min was annotated as 4-deoxyphorbol 12-tiglyloxy-13-isobutyrate based on its previous isolation in this species.<sup>5</sup> (HOTigl = tigloic acid ; HOiBu = isobutyric acid).

Fraction F9 was selected to undertake an MS<sup>2</sup>MN-targeted-SFC-purification procedure by semiprep-SFC, because it is supposed to contain 4-dPE and unknown diterpene esters (Figure 2). The UV chromatogram was used as a referencial between semiprep-SFC-UV chromatogram and SFC-UV-MS/MS analysis (Figure 5). This up scaling procedure led to the isolation of: compound (**4**) from MN1 cluster JE-A; compound (**8**) from MN1 cluster JE-B; three 4-dPE (**15-17**) from network MN2; and a mixture of compounds (sub-fraction F9-1). This sub-fraction F9-1 was further fractionated using a semiprep-SFC leading to the purification of two compounds, members of MN1 cluster JE-C (**13** and **14**) and one compound member of molecular network MN2 (**18**). Compound **15** was identified through comparison of its <sup>1</sup>H NMR and ESI-HRMS data with those previously reported by Appendino *et al.*<sup>5</sup> However, the <sup>13</sup>C data of **15** has never been reported yet, and is shown herein (Table 3). The structural elucidations of six compounds (**13-18**) were solved by extensive NMR spectroscopy (Tables 2-4), ESI-HRMS, and X-ray crystallographic analysis. The final annotation of the MS/MS molecular networks updated after isolation and identification of **13-18**, is shown in Figure 6.

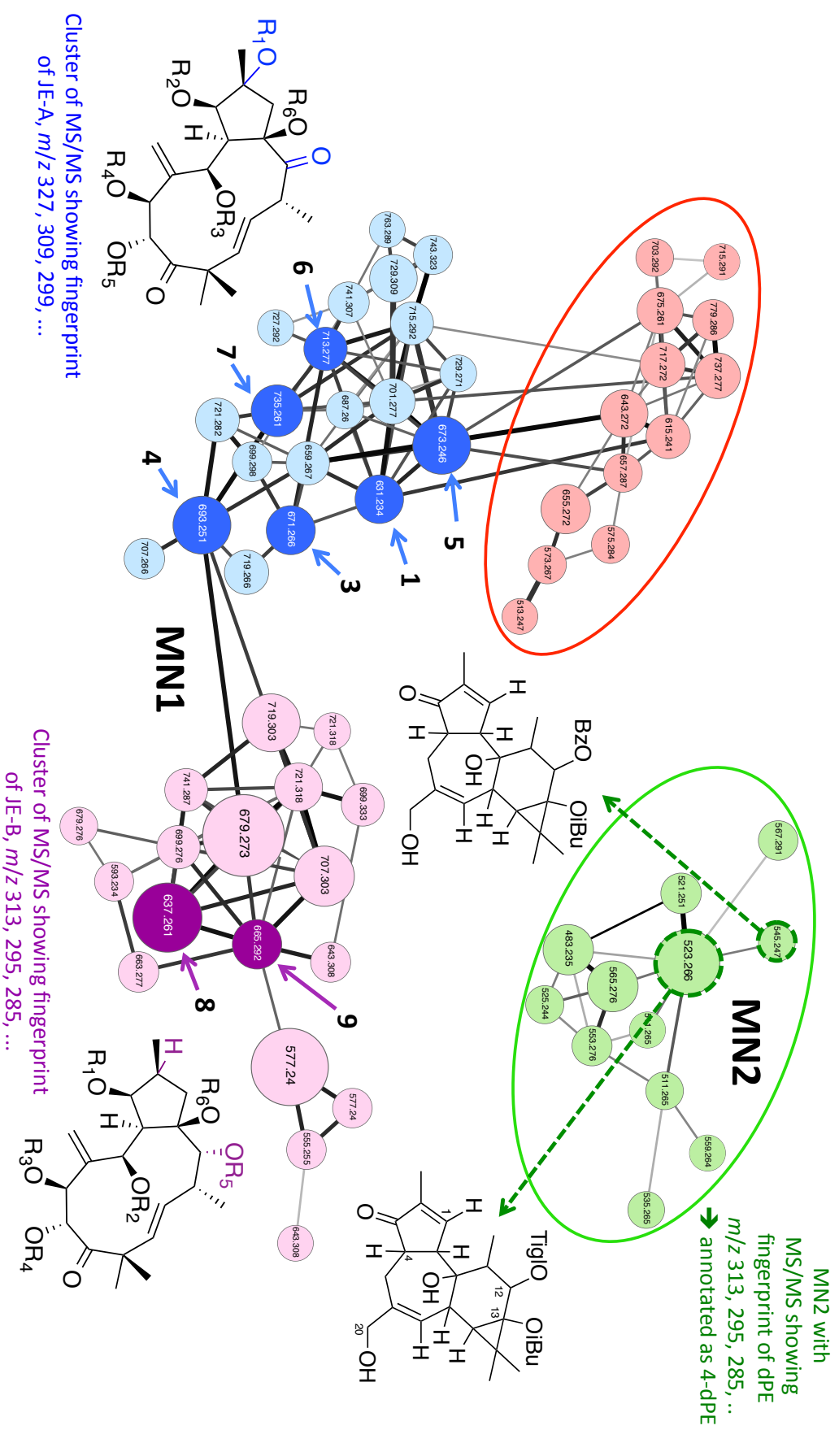


Figure 4. MS/MS molecular networks from SFC-UV-MS/MS analysis of fractions F7-F9. The main molecular network (MN1) contains two clusters attributed to JE-A and JE-B, based on (1) the implementation of MS/MS spectra of reference compounds (darker color and corresponding reference), and (2) inspection of the ion fingerprint of the diterpene backbone in MS/MS spectra. The third cluster of MN1 was annotated as unknown diene esters. A smaller network (MN2) contained two MS/MS spectra which were annotated as 4-dPE derivatives previously isolated by Appendino *et al.*

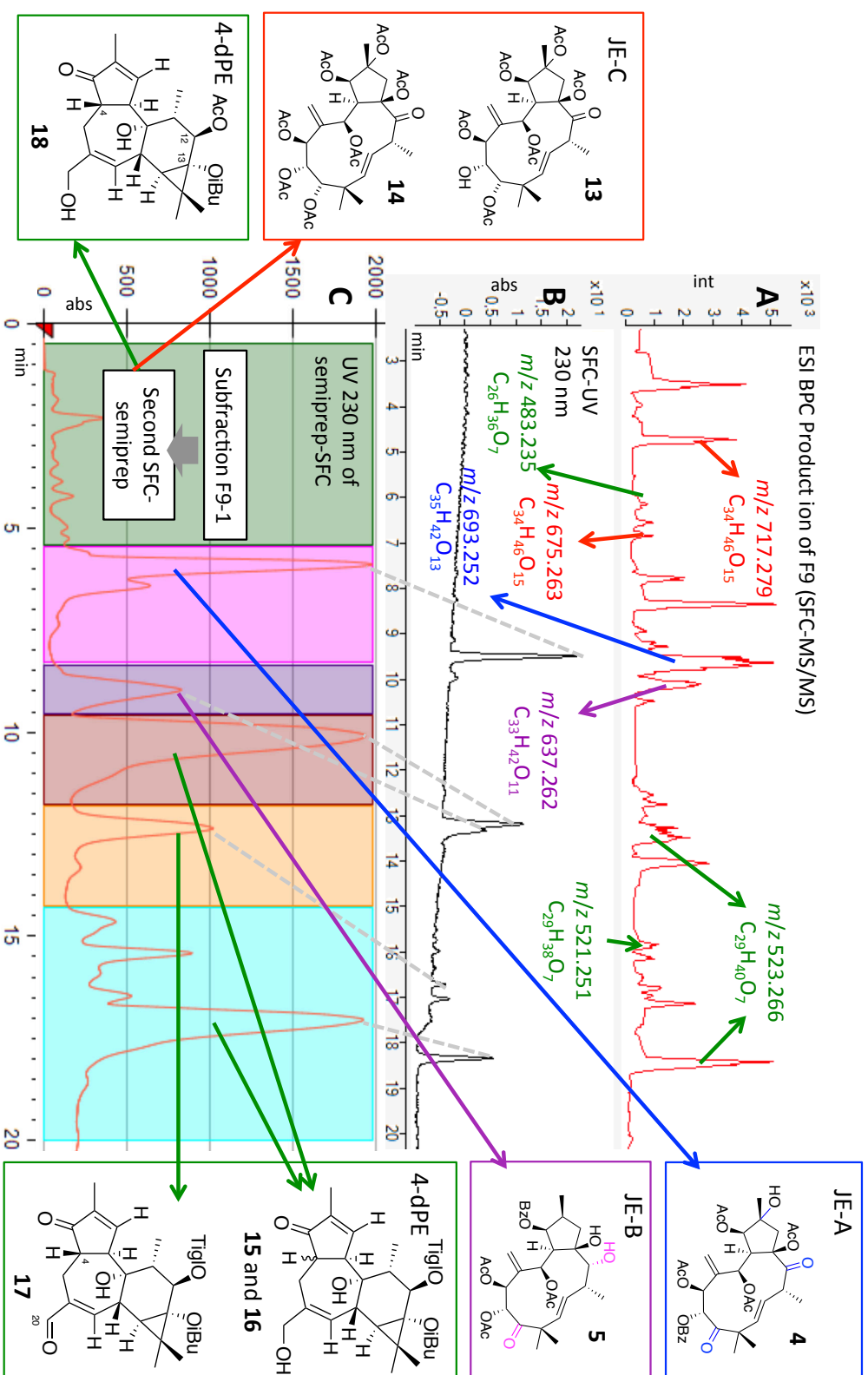


Figure 5. MS<sup>2</sup>/MN-targeted-SFC-purification procedure of fraction F9. (A) Base peak chromatogram of MS/MS product ion, the  $m/z$  value and the deduced molecular formula of the compounds of interest are indicated. (B) UV chromatogram of the same analysis (230 nm). (C) Upscaling to semiprep-SFC; UV chromatogram (230 nm). Three 4-dPE were isolated (**15-17**), and two jatrophone esters (**4** and **8**) previously isolated. The structure of the isolated compounds are shown. Subfraction F9-1 was subjected to another semiprep-SFC separation to afford **18** and two new JE of group C (**13** and **14**).

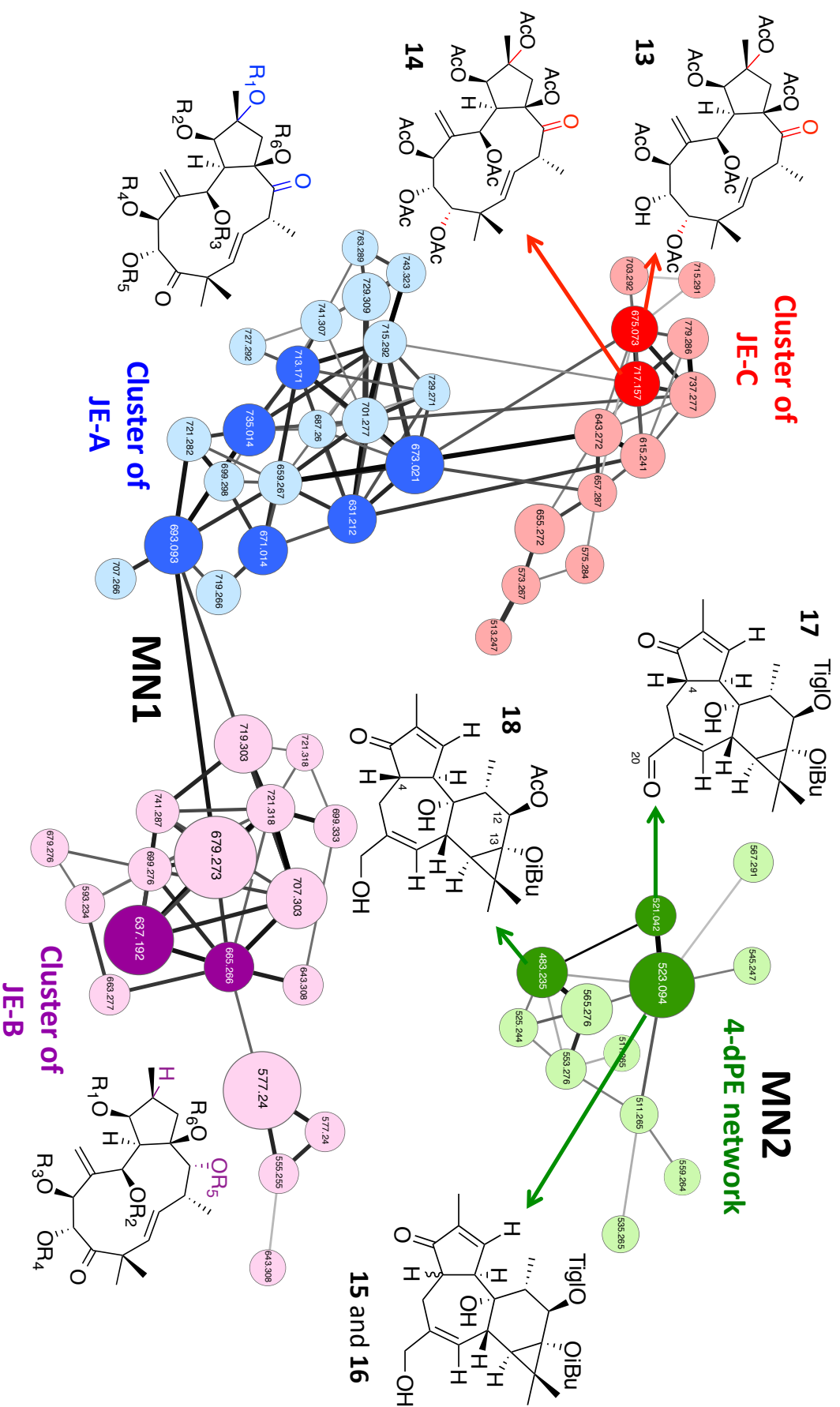
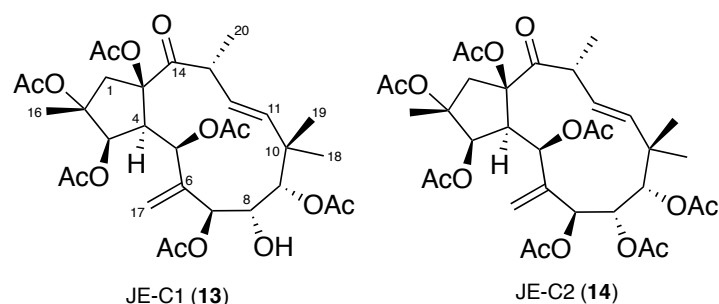


Figure 6. Final annotation of the MS/MS molecular networks from SFC-UV-MS/MS analysis of fractions F9, after the MS<sup>2</sup>MS-targeted-SFC-purification procedure on F9 and F9-1. The MN1 was annotated as MN of jatrophane esters composed of three clusters (JE-A, JE-B, and JE-C). The MN2 was annotated as 4-dPE. Structure of the compounds isolated are shown.

### II. 3. Structural elucidation of new diterpene esters 13-18

The comparison of ESI-HRMS and NMR data of compounds **13** and **14** (Table 2 and Figures S1-S18 in Supporting Information) with the corresponding data of JE **1-12**, suggested that these compounds were heptahydroxylated-oxojatropha-6(17),11*E*-diene. Compounds **13** and **14** showed the presence of only one ketone group instead of two for JE **1-7**. The stereostructure of **13** was solved by the interpretation of 1D and 2D NMR spectroscopy following the same elucidation methodology as described in Nothias-Scaglia *et al.*<sup>1</sup> Compound **13** is an hexaester and its molecular formula was established as C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>O<sub>14</sub> ( $\Delta_{\text{theoretical}} = + 1.4$  ppm) from the quasi-molecular ion observed in ESI-HRMS spectrum ( $m/z$  675.2613). Jatrophane ester **13** differs from JE-A (**1-7**) and JE-B (**8-12**) and was included in a new group of jatrophane ester (JE-C). In particular, the relative configuration was established through comparison, of the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H coupling constants pattern and ROESY correlations, with those of JE **1-7**,<sup>1</sup> and with literature data.<sup>8,9</sup> Its absolute configuration was deduced from biogenetic consideration, assuming a systematic  $\alpha$ -orientation of H-4.<sup>10</sup> JE-C1 (**13**) adopts preferentially an exo-type conformation, as indicated by the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H coupling constant between H-4 and H-5 ( $J < 2$  Hz). The configuration at C-9 was secured by the observation of ROESY correlations between H-4 and H-7, H-8 and H-12, and OH-8 and H-9 (for **13**). Furthermore, the configuration at C-13 was confirmed by observation of ROESY correlation between H-13 and H-5.

The ESI-HRMS of JE-C2 (**14**) showed a sodiated cation [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  717.2733 corresponding to [M+Na]<sup>+</sup> i formula C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>15</sub> ( $\Delta_{\text{theoretical}} = + 0.04$  ppm). In the <sup>1</sup>H NMR spectrum of **14**, signals were broad at 300 K and only few correlations were observed in 2D-NMR experiments. Thus, JE-C2 (**14**) was dissolved in pyridine-*d*<sub>5</sub> and analysed at 300 K, 313 K, 323 K, and 333 K. A temperature of 325 K was selected because it resulted in a significantly better resolved spectrum. Based on the interpretation of the 1D and 2D NMR spectra, JE-C2 (**14**) was identified as 2,3,5,7,8,9,14,15-heptaacetyloxy-14-oxojatropha-6(17),11*E*-diene. Compound **14** adopted preferentially an exo-type conformation and possessed the same absolute configuration as JE-C1 (**14**). The broadness of NMR signals of this type of JE has already been observed,<sup>11</sup> and was interpreted as a result of slower exchange rate of conformational exchange between exo- and endo-type, which is probably due to hindering effects of some of the seven ester groups. Compounds **13** and **14**, which are 2,3,5,7,8,9,15-heptahydroxylated-oxojatropha-6(17),11*E*-diene, are diastereoisomers of euphodendroin and amygdaloidin.<sup>12,13</sup> They differ from the latter by the configuration of the carbon C-13.



**Table 2.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Data of JE-C1 (**13**) and JE-C2 (**14**) (500 MHz and 75 MHz, respectively)

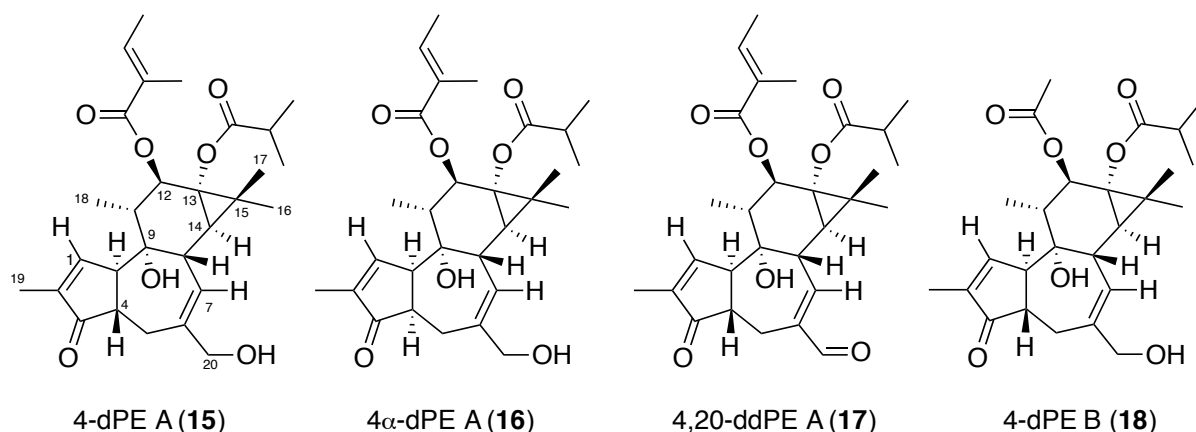
position	JE-C1 ( <b>13</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ )		JE-C2 ( <b>14</b> ) (pyridine- $d_5$ )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ in Hz)
1 $\alpha$	47.7, $\text{CH}_2$	3.72 dd (16.3) H-5 $\alpha$	48.1 $\text{CH}_2$	4.24 dd (16.0, 1.2)
1 $\beta$		1.99 br d (16.3) H-5 $\beta$		2.32 d (16.0)
2	86.3, C		87.3, C	
3	78.2, CH	5.52 br d (3.6)	78.9 CH	5.93 br s
4	50.3, CH	3.10 br d (3.6)	50.7, CH	3.41 br s
5	68.5, CH	5.68 br s	68.8, CH	6.32 br s
6	145.2, C		146.0, C	
7	69.5, CH CHECK	4.60 br s	69.2 CH	5.51 br s
8	71.6, CH CHECK	3.85 br d (9.7)	72.7, CH	5.70 br s
9	85.0 CH	4.67 br s	78.9, CH	5.33 br s
10	39.2, C		40.6, C	
11	137.0, CH	5.74 d (16.1)	138.7, CH	6.16 d (16.1)
12	131.9, CH	5.69 dd (16.1, 7.8)	132.2, CH	5.93 br d (16.1, 9.0)
13	43.1, CH	3.41 m	44.2 CH	3.93 br dd (9.0, 6.6)
14	211.7 C		211.9, C	
15	93.2, C		93.5, C	
16	18.2, $\text{CH}_3$	1.48 s	18.3, $\text{CH}_3$	1.66 s
17a	111.5 $\text{CH}_2$	5.10 br s	113.5, $\text{CH}_2$	5.52 br s
17b		5.15 br s		5.59 br s
18	26.0, $\text{CH}_3$	0.99 s	23.8, $\text{CH}_3$	1.13 s
19	26.3, $\text{CH}_3$	1.19 s	28.0, $\text{CH}_3$	1.25 s
20	20.2, $\text{CH}_3$	1.11 d (6.3)	20.7, $\text{CH}_3$	1.33 d (6.6)
OAc-2	170.8, 22.4	2.15 s	170.8, 22.7	2.36 s
OAc-3	169.1, 21.6	2.12 s	169.8, 21.3*	2.22 s*
OAc-5	169.6, 21.4	2.08 s	169.7, 21.3*	2.22 s*
OAc-7	168.6, 21.0	2.02 s	170.3, 20.8	2.04 s
RO-8		2.76 d (9.7) (OH-8)	170.2, 20.9	2.08 s (OAc-8)
OAc-9	171.5, 20.8	2.00 s	170.2, 21.0	2.11
OAc-15	170.8, 21.3	2.09 s	171.5, 21.6	2.26 s

From the ESI-HRMS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data analysis (Tables 3 and 4, and Figures S1-S50 in Supporting Information), it can be suggested that compounds **15-18** were 4-deoxyphorbol diesters. In ESI-HRMS, compound **16** showed a sodiated cation at  $m/z$  523.2675 corresponding to the same molecular formula  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_7$  ( $\Delta_{\text{theoretical}} = -0.7$  ppm) as compound **15**. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum indicated a significant shift in signal values of H-1 ( $\delta_{\text{H}}$

7.04 br s) and H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  2.77 m) in comparison with compound **15** ( $\delta_{\text{H}}$  7.55 br s and 2.48 m for H-1 and H-4, respectively). These spectral features are characteristics of 4-dPE with a H-4  $\alpha$ .<sup>14</sup> Examination of 2D NMR data (Figures S27-S34 in Supporting Information) allowed to determine the planar and stereostructure of 4- $\alpha$ -dPE A (**16**). X-ray crystallographic analysis of **16** confirmed the previous interpretation (Figure 7).

In ESI-HRMS, compound **17** showed a quasi-molecular ion  $[M+\text{Na}]^+$  at  $m/z$  521.2517 corresponding to molecular formula,  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_7$  ( $\Delta_{\text{theoretical}} = -1.2$  ppm). The examination of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **17** indicated that this compound was sharing spectral features of **15**, but with the presence of an aldehyde group ( $\delta_{\text{H}}$  9.42 s, and  $\delta_{\text{C}}$  193.3) instead of a hydroxy group for **15** [ $\delta_{\text{H}}$  4.01 d and 3.97 d ( $J = 13.1$  Hz), and  $\delta_{\text{C}}$  67.4]. The interpretation of 2D NMR data (Figures S35-S42 in Supporting Information) confirmed that 4,20-ddPE A (**17**) possessed a C-20 aldehyde group. The tendency of phorbol esters to easily oxidize and produce an  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl was previously reported by Schmidt and Hecker.<sup>15</sup> Thus, **17** could be an artefactual oxidation product of **15**.

In ESI-HRMS, compound **18** showed a quasi-molecular ion at  $m/z$  483.2348 corresponding to molecular formula  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_7$  ( $\Delta_{\text{theoretical}} = +1.3$  ppm). The examination of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra indicated that this compound shared the same spectral features as compound **15**, but with the presence of acetyloxy group ( $\delta_{\text{H}}$  2.06 s, 3H, and  $\delta_{\text{C}}$  170.7 and 21.1) instead of a tiglyloxy group. The interpretation of 1D and 2D NMR spectroscopy (Figures S43-S50) in Supporting Informations) allowed establishing the structure of 4-dPE B (**18**). In particular, the position of the acetyl group at C-12 was deduced from the examination of HMBC correlation between H-12 and 12-OAc carbonyl.



**Table 3.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Data of 4-dPE A (**15**) and 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (500 MHz and 75 MHz, respectively) in  $\text{CDCl}_3$ .

position	4-dPE A ( <b>15</b> )		4 $\alpha$ -dPE A ( <b>16</b> )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ in Hz)
1	159.8	7.53 br s	156.4	7.04 br s



2	136.4		143.5	
3	209.8		213.4	
4	44.2	2.46 ddd (10.2, 9.5, 5.0) H-4 $\beta$	49.9	2.77 m H-4 $\alpha$
5	29.6	2.13 br dd (18.2, 10.2) H-5 $\alpha$ 2.82 br dd (18.2, 9.5) H-5 $\beta$	25.4	2.46 br m H-5 $\alpha$ 3.46 br m H-5 $\beta$
6	142.0		137.2	
7	126.5	5.52 br dd (5.5, 2.0)	126.7	5.11 br s
8	42.1	2.36 br dd (5.5, 5.3)	41.0	1.95 br s
9	77.8		78.3	
10	54.3	3.23 m	47.6	3.49 m
11	42.7	1.58 m	43.8	1.70 m
12	76.8	5.43 br d (9.6)	75.7	5.49 br d (10.4)
13	65.0		65.1	
14	35.8	1.02 d (5.3)	37.5	0.74 (5.0)
15	25.9		25.7	
16	23.8	1.18 s	24.4	1.16 s
17	16.9	1.21 s	16.8	1.22 s
18	15.1	0.84 d (6.5)	12.1	1.06 d (6.4)
19	10.2	1.79 dd (2.5, 1.3)	10.7	1.77 br s
20	67.4	4.02 br d (13.1) H-20a 3.98 br d (13.1) H-20b	69.5	4.01 br d (12.3) H-20a 3.88 br d (12.3) H-20b
TigIO-12				
1'	167.5		167.7	
2'	128.4		128.8	
2'-Me	12.2	1.81 br s	12.5	1.86 br s
3'	137.7	6.80 br q (7.0, 1.0)	137.8	6.85 br q (7.1, 1.0)
4'	14.4	1.78 dd (7.0, 1.0)	14.7	1.82 dd (7.1, 1.0)
iBuO-13				
	179.4		179.4	
1'	34.4	2.55 m	34.4	2.52 m
2'	18.6	1.13 d (7.0)	18.9	1.14 d (7.0)
3'	18.6	1.16 d (7.0)	18.7	1.14 d (7.0)
9-OH		5.82 br s		5.29 br s
20-OH		?		?

**Table 4. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Data of 4,20-ddPE A (17) and 4-dPE B (18) (500 MHz and 75 MHz, respectively) in CDCl<sub>3</sub>.**

position	4,20-ddPE A (17)		4-dPE B (18)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	158.9	7.48 br t (1.8 Hz)	159.9	7.53 br s
2	137.1		136.6	
3	208.8		209.9	
4	43.4	2.47 ddd (9.8, 9.7, 4.0) H-4 $\alpha$	44.4	2.45 m H-4 $\alpha$
5	25.1	2.73 m H-5 $\alpha$ 2.72 m H-5 $\beta$		2.13 m H-5 $\alpha$ 2.93 m H-5 $\beta$
6	144.8		142.2	
7	154.6	6.56 br dd (6.0, 1.5)	126.6	5.56 br s
8	44.0	2.63 br dd (6.0, 5.8)	42.1	2.34 br s
9	78.5		77.9	
10	54.1	3.06 m	54.3	3.23 m
11	43.1	1.64 m	42.2	1.54 m
12	76.4	5.47 br d (9.6)	77.3	5.35 br d (9.5)

13	64.9		65.1	
14	35.2	1.18 m	34.4	1.01 m
15	26.2		26.1	
16	23.8	1.24 s	23.9	1.20 s
17	17.0	1.23 s	16.9	1.17 s
18	15.3	0.91 d (6.5)	15.2	0.9 d (6.4)
19	10.4	1.71 dd (2.5, 1.2)	10.4	1.71 br s
20	193.3	9.42 s	67.6	4.02 br d (13.4) H-20a 3.98 br d (13.4) H-20b
RO-12	R = OTigl		R = OAc	
1'	167.5		170.7	
2'	128.5		21.1	2.06 s
2'-Me	12.5	1.82 br s		
3'	138.3	6.82 br q (7.0, 1.4)		
4'	14.7	1.81 d (7.0)		
iBuO-13				
	179.8		179.5	
1'	34.4	2.59 m	34.4	2.55 m
2'	18.9	1.19 d (7.0)	18.8	1.14 d (7.0)
3'	18.8	1.17 d (7.0)	18.7	1.17 d (7.0)
9-OH		6.01 br s		5.75 s
20-OH		?		?

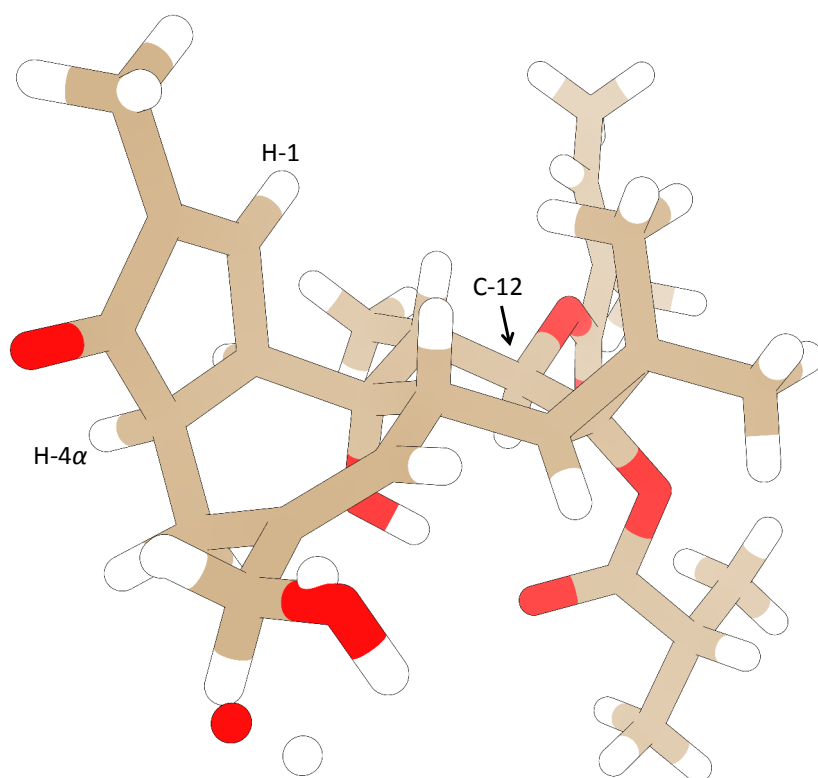


Figure 7. View of the X-ray analysis of 4  $\alpha$ -dPE A (**16**)

## II. 4. Evaluation of antiviral activity of 4-deoxyphorbol esters and jatrophone esters of group C.

Three 4-dPE (**15-17**) isolated from *E. amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* were evaluated for antiviral activity using recombinants HIV-1 (NL4.3-Ren) in MT-2 cells (Table 5). The compound 4-dPE A (**15**) displayed a potent inhibition of HIV-1 (NL4.3-Ren) with an IC<sub>50</sub> around 8 nM and a selectivity index above 6250. The other 4-dPE derivatives showed less potency. Among the structure-activity relationships that could be drawn, the C-4  $\beta$ -configuration appeared to be crucial (**15** vs **16**) for a potent antiviral activity, while an oxidation at C-20 (**15** vs **17**) proved to be deleterious. The evaluation of the antiviral activities of **13**, **14**, and **18** are currently under way.

**Table 5. Evaluation of the anti-HIV-1 Activity of the 4-dPE and JE-C Isolated from *Euphorbia amygdaloides* ssp *semiperfoliata*.** Recombinant virus assay. IC<sub>50</sub>: Inhibiting concentration 50 %, CC<sub>50</sub>: Cytotoxic concentration 50 %.<sup>a</sup>not det. yet: not determined yet.

Compound	NL4.3-Ren			Viability
	IC <sub>50</sub> $\mu$ M	Confidence Interval 95%	R <sup>2</sup>	CC <sub>50</sub> $\mu$ M
JE-C1 ( <b>13</b> )	n. d. yet			
JE-C2 ( <b>14</b> )	n. d. yet			
4-dPE A ( <b>15</b> )	0.008	0.003 to 0.019	0.91	>50
4- $\alpha$ -dPE A ( <b>16</b> )	4.187	2.895 to 6.056	0.98	>50
4,20-ddPE A ( <b>17</b> )	2.568	1.262 to 5.225	0.92	>50
4-dPE B ( <b>18</b> )	n. d. yet			

The capacity of 4-dPE A (**15**) to reactivate latent HIV-1 virus in MT-2 cells and PBLs was evaluated. Cells were transfected with the plasmid pNL4.3-Luc and treated with the **15**. As shown in Figure 8, **15** activates transcription in MT-2 cells; a dose related effect was found since 1 nM was almost ineffective and the highest level of luminescence was achieved at 100 nM with a percentage of RLUs of 176% (Mean of 2 different experiments). Compound **15** activated transcription in PBLs, showing also a dose related effect (Figure 9). The highest levels of luminescence was achieved at 40 nM for TPA (= PMA, phorbol 12-myristate-13-acetate) and at 100 nM for **15**, increased by 251 and 298% respectively (Mean of 2 experiments). TPA was not active in MT-2 cells due probably to the hyperactivation state displayed by this cell line (in other experiments, 4-5 fold activation for TPA).

Figure 8. Transcriptional activity in MT-2 cells with 4-dPE A (**15**). Results are shown as percentage of RLUs as compared to a non-treated control (100%). PMA = TPA

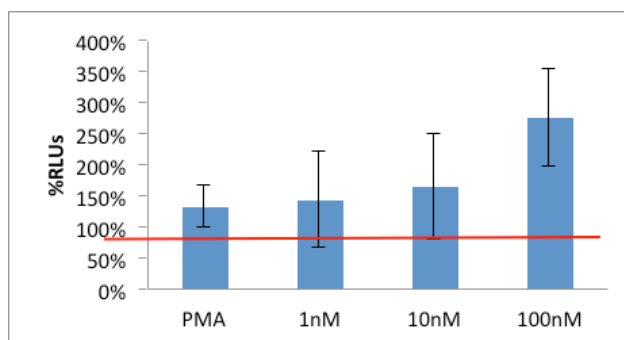
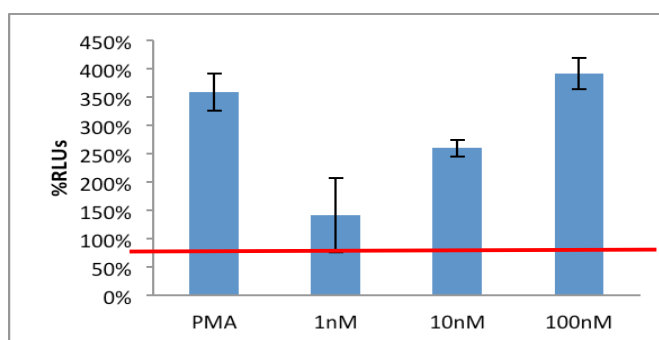
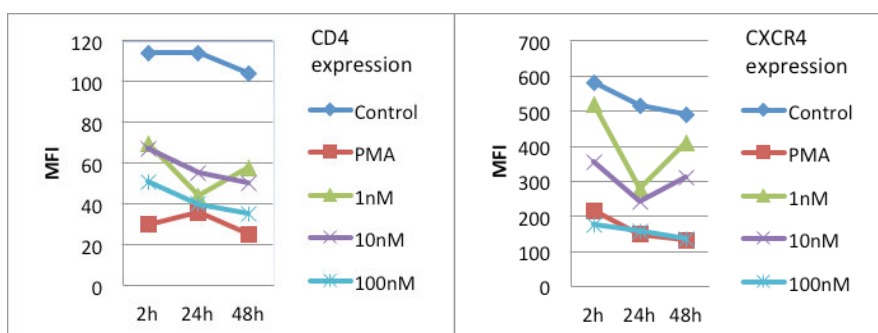


Figure 9. Transcriptional activity in PBLs treated with 4-dPE A (**15**). Results are shown as percentage of RLUs as compared to a non-treated control (100%). PMA = TPA



The expressions of CD4 and CXCR4 with 4-dPE A (**15**) were also investigated. Results showed that the application of **15** at 100 nM was inducing the same level of expression of CD4 and CXCR4 as TPA at 40 nM (Figure 10).

Figure 10. Kinetics of receptors expression (CD4 and CXCR4, left and right, respectively) in MT-2 cells treated with the 4-dPE A (**15**). Cells were treated for 48, 24 or 2 hours with **15** at 3 different concentrations (1, 10 and 100 nM). Results are shown as mean fluorescence intensity (MFI). A non-treated control (DMSO) and a positive control (TPA at 40 nM) were used.



The four 4-dPE (**15-18**) were also evaluated for a selective and inhibiting activity of CHIKV replication in vero cells (Table 6). Results showed that 4-dPE B (**18**) was the most potent and selective inhibitor of CHIKV replication ( $EC_{50} = 0.34 \pm 0.12 \mu\text{M}$  and  $SI = 638$ ). Thus, compound **18** is, after the TPA and the phorbol 12,13-didecanoate, the third most potent antiviral diterpene ester against CHIKV replication isolated up to date. Compound 4-dPE A (**15**) was found to be also a selective inhibitor of CHIKV replication ( $EC_{50} = 1.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$  and  $SI = 25$ ). The structure-activity relationships (SARs) were similar to those observed for the anti-CHIKV activity found for phorbol esters.<sup>2</sup> For example, it could be underlined the role of a  $\alpha$ -configured H-4 (**15** vs **16**) for a potent antiviral activity, and the deleterious effect of the presence of a carbonyl at C-20 (**15** vs **17**). Furthermore, from the comparison of **15** with **18**, it could be deduced that the replacement of a tiglyl group by an acetyl group at C-12 is beneficial for the selectivity of the anti-CHIKV activity. These anti-CHIKV SARs were similar to the anti-HIV SARs, supporting the potential implication of PKC-dependent mechanism in anti-CHIKV activity of diterpene esters. The antiviral activities of JE-C1 (**13**) and JE-C2 (**14**) are currently under investigation.

**Table 6. Anti-CHIKV ( $EC_{50}$ ) and Anti-metabolic Activities ( $CC_{50}$ ) JE-C (**13-15**) and 4-dPE (**15-18**) isolated from *E. amygdaloides* ssp *semiperfoliata*.<sup>a</sup>**

Cpd	Anti-CHIKV activity		
	$EC_{50} \mu\text{M}$	$CC_{50} \mu\text{M}$ (vero cells)	SI
JE-C1 ( <b>13</b> )	not. det. yet	not. det. yet	
JE-C2 ( <b>14</b> )	not. det. yet	not. det. yet	
4-dPE A ( <b>15</b> )	$1.0 \pm 0.4$	$20 \pm 15$	25
4- $\alpha$ dPE A ( <b>16</b> )	$17.0 \pm 1.0$	$116 \pm 22$	7
4,20-ddPE A ( <b>17</b> )	$51.1 \pm 4.1$	$154 \pm 13$	3
4-dPE B ( <b>18</b> )	$0.34 \pm 0.12$	> 217	> 638
TPA (PMA)	$2.9 \pm 0.3 \text{ nM}$	$5.7 \pm 1.7$	1965
prostratin	$2.6 \pm 1.5$	$79 \pm 17$	30

<sup>a</sup>not det. yet: not determined yet

Compounds **15** and **18** differ from TPA and PDD by the presence of short-chain acyl substituents at C-12 and C-13, and by the absence of a hydroxy group at C-4. Previous evaluation of tigliane-type diterpenoids for tumor-promoting activity indicated that long-chain acyl substituents at C-12 and C-13 were key features for tumor-promoting activity.<sup>16,17</sup> Thus, **15** and **18** could be devoid of any tumor-promoting activity, as the case of prostratin, and could be of particular interest for their antiviral properties. Compound 4-dPE A (**15**) showed a more potent inhibiting activity against HIV-1 ( $IC_{50} = 8 \text{ nM}$ ,  $SI > 6250$ ) than prostratin ( $IC_{50} = 226 \text{ nM}$ ,  $SI > 221$ ), which is currently under clinical trial evaluation in the USA for the treatment of HIV. Nonetheless, the evaluation of inhibiting activity of 4-dPE B (**18**) is currently under way. Based on its excellent inhibiting activity against CHIKV replication, and

on the existence of a correlation between anti-CHIKV/HIV activities,<sup>2</sup> compound **18** could even outperform the anti-HIV activity of **15**.

### III. Conclusion

The SFC-based targeted purification workflow using MS<sup>2</sup>MN proved to be an efficient approach to annotate and isolate compounds of biological or chemical interest. Four 4-dPE along with two JE-C were identified. Compounds 4-dPE A (**15**) and 4-dPE B (**18**) were found to possess strong antiviral activities. In particular, the phorboïds 4-dPE (**15**) showed a promising activity against HIV-1 replication, more than 28-fold the activity of the prostratin. Further experiments are required to precise the therapeutical potential (**15**), in particular to establish if it is a non-tumor-promoting phorboïds

#### Supporting Informations

ESI-HRMS/MS spectra are available on GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) and 1D and 2D NMR spectra are available in Supporting Information.

### Bibliography

- (1) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retailleau, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Costa, J.; Litaudon, M. Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (6), 1505–1512.
- (2) Nothias-Scaglia, L.-F.; Pannecouque, C.; Renucci, F.; Delang, L.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (6), 1277–1283.
- (3) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13* (11), 2498–2504.
- (4) Nothias-Scaglia, L.-F.; Schmitz-Afonso, I.; Renucci, F.; Roussi, F.; Touboul, D.; Costa, J.; Litaudon, M.; Paolini, J. 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* **2015**, *1422*, 128–139
- (5) Appendino, G.; Jakupovic, S.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Milon, V.; Ballero, M. Macrocyclic Diterpenoids from *Euphorbia Semiperfoliata*. *J Nat Prod* **1998**, *61* (6), 749–756.
- (6) Bedoya, L. M.; Márquez, N.; Martínez, N.; Gutiérrez-Eisman, S.; Álvarez, A.; Calzado, M. A.; Rojas, J. M.; Appendino, G.; Muñoz, E.; Alcamí, J. SJ23B, a Jatrophone Diterpene Activates Classical PKCs and Displays Strong Activity against HIV in Vitro.

*Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77* (6), 965–978.

(7) Pr. Giovanni Appendino. Communication Personelle à L'auteur, 2012.

(8) Vasas, A.; Hohmann, J. Euphorbia Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (17), 8579–8612.

(9) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus Euphorbia. *Chem Rev* **2008**, *108* (10), 4295–4327.

(10) Nothias-Scaglia, L.-F.; Gallard, J.-F.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Costa, J.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; Litaudon, M. Advanced Structural Determination of Diterpene Esters Using Molecular Modeling and NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (10), 2423–2431.

(11) Günther, G.; Martinek, T.; Dombi, G.; Hohmann, J.; Vasas, A. Structural Characterization and Dynamic NMR Studies of a New Peracylated Macrocyclic Diterpene. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37* (5), 365–370.

(12) Corea, G.; Fattorusso, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. Amygdaloidins A–L, Twelve New 13  $\alpha$ -OH Jatrophone Diterpenes from Euphorbia Amygdaloides L. *Tetrahedron* **2005**, *61* (18), 4485–4494.

(13) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Motti, R.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Jatrophone Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance. Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of the Potent Lead Pepluanin A. *J Med Chem* **2004**, *47* (4), 988–992.

(14) Wang, H.-B.; Wang, X.-Y.; Liu, L.-P.; Qin, G.-W.; Kang, T.-G. Tigliane Diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae Families. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (9), 2975–3011.

(15) Schmidt, R.; Hecker, E. Autoxidation of Phorbol Esters under Normal Storage Conditions. *Cancer Res.* **1975**, *35* (5), 1375–1377.

(16) Furstenberger, G.; Hecker, E. On the Active Principles of the Spurge Family (Euphorbiaceae). XI.[1] The Skin Irritant and Tumor Promoting Diterpene Esters of Euphorbia Tirucalli L. Originating from South Africa. *Z Naturforsch C* **1985**, *40*, 631–646.

(17) Hecker, E. Cocarcinogenic Principles from the Seed Oil of Croton Tiglium and from Other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* **1968**, *28* (11), 2338–2348.



# **III. ANALYSE TRANSVERSALE DES RESULTATS**

Dans la partie suivante, une synthèse de l'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat sera présentée selon une séquence qui cherchera à mettre en lumière le cheminement scientifique global. Pour plus d'informations sur les résultats évoqués, veuillez vous référer aux chapitres et articles concernés.

### III. 1. Évaluation de l'activité anti-CHIKV des *Euphorbia* de Corse

Dans la continuité des résultats obtenus à l'ICSN, il a été décidé, dans le cadre de la présente thèse, de mener une campagne d'évaluation de l'activité antivirale d'Euphorbiaceae de Corse. Ces résultats sont décrits dans l'article publié dans *Fitoterapia* (cf. partie, II.1, p. 84).<sup>1</sup> Les récoltes de dix espèces d'*Euphorbia* et de *Mercurialis annua*, ainsi que leur identification taxonomique ont été réalisées au cours de l'été 2011.<sup>1</sup> La matière végétale a été préparée (séchage, séparation des différentes parties, pulvérisation), puis extraite à l'acétate d'éthyle (AcOEt) et au méthanol (MeOH) à l'aide d'un extracteur automatique à haute pression. Quant aux échantillons de latex d'*Euphorbia*, ils ont été préparés par extraction liquide-liquide ou solide-liquide. Ainsi, 45 extraits différents ont été obtenus.

L'évaluation de l'activité anti-CHIKV de ces derniers a été menée par le Dr. Pieter Leyssen du laboratoire de virologie de l'Université de Leuven (KU Leuven). Les résultats obtenus fin octobre 2011 ont été particulièrement encourageants, puisque tous les extraits AcOEt d'*Euphorbia*, quelle que soit la partie de plante concernée, ont montré une activité inhibitrice de la réplication du virus du CHIKV avec une bonne sélectivité ( $CE_{50} < 6.9 \mu\text{g/ml}$  et  $IS > 24$ ). Parmi ces extraits, ceux réalisés à partir du latex d'*Euphorbia* possédaient la plus forte activité. Les extraits MeOH d'*Euphorbia* ont montré une plus faible activité. Enfin, les extraits AcOEt et MeOH obtenus à partir des parties aériennes de *Mercurialis annua* n'ont pas démontré d'activité antivirale.<sup>2</sup>

Ces résultats ont donc permis de faire deux observations principales :

- (i) des métabolites, inhibant la réplication du CHIKV, sont produits par les plantes du genre *Euphorbia* ;
- (ii) ces métabolites peuvent être extraits efficacement de la matière végétale à l'aide d'AcOEt.

Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse que le latex était certainement la matrice contenant les métabolites antiviraux, puisque chez les *Euphorbia*, le latex est présent dans toutes les parties de la plante et que les extraits préparés à partir de cette matrice sont les plus actifs.

Alors que ce travail était en cours, la puissante activité anti-CHIKV d'autres phorboides -le 12-*O*-tetradécanoylphorbol 13-acétate (TPA), et la prostratine (12-

déoxyphorbol 13 acétate)- a été mise en évidence à l'ICSN au cours de la thèse de Mélanie Bourjot (sous la direction de Françoise Guéritte et Marc Litaudon, 2009-2012).<sup>118</sup> L'évaluation du 4 $\alpha$ -TPA a montré que la configuration de l'hydroxy en 4 était importante vis-à-vis de l'activité anti-CHIKV. Par ailleurs, le TPA et la prostratine sont connus pour avoir un effet antiviral sur le VIH via l'activation de protéines kinase C (PKCs) (cf. partie I.3.3, p. 60). En partant de l'observation de RSA similaires entre l'activité antivirale vis-à-vis du virus de du VIH et du CHIKV d'une part, et sur celle décrite sur la modulation des PKCs d'autre part, il a été suggéré que le mécanisme d'action anti-CHIKV de ces phorboïdes pouvait impliquer des PKCs.

### **III. 2. Évaluation de l'activité anti-CHIKV de phorboïdes commerciaux**

De nombreux phorboïdes sont connus pour leur pouvoir modulateur de PKCs. Certains de ces dérivés sont disponibles commercialement. Nous avons donc entrepris d'évaluer l'activité anti-CHIKV et anti-VIH de ces phorboïdes dans le but, non seulement, d'investiguer l'hypothèse d'un mécanisme anti-CHIKV via la modulation des PKCs, mais aussi de réaliser des RSA complémentaires. Ces résultats sont décrits dans un article publié dans *Journal of Natural Products* en 2015 (cf. partie II.2, p. 94).<sup>3</sup> Les essais antiviraux contre la réplication du CHIKV et du VIH, inclus dans cet article, ont été réalisés par le Dr. Pieter Leyssen et le Dr. Christophe Pannecouque (KU Leuven).

Une série de 29 esters de diterpènes commerciaux a été testée pour évaluer leur potentiel d'inhibition de la réplication du CHIKV et du VIH. Parmi ces phorboïdes figurent des esters de phorbol (PE) et de déoxyphorbol (dPE) appartenant au type tiglane, des esters d'ingénol (IE) de type ingénane, ainsi que la résinifératoxine de type daphnane.

Les résultats ont indiqué que plusieurs dérivés à squelette tiglane et ingénane possédaient une activité inhibitrice et sélective contre le CHIKV. Les esters de diterpène ayant une activité anti-CHIKV sont le phorbol 12,13-didécanoate ( $IC_{50} = 6,0 \pm 0,9$  nM, SI = 686), le phorbol 13-butyrate ( $IC_{50} = 20 \pm 10$   $\mu$ M, SI = 12,3), le phorbol 13-décanoate ( $IC_{50} = 2,2 \pm 0,1$   $\mu$ M, SI = 9,7), le phorbol 13-tétradécanoate ( $IC_{50} = 0,99 \pm 0,03$   $\mu$ M, SI = 9), l'ingénol 3,20-dibenzoate ( $IC_{50} = 1,2 \pm 0,1$   $\mu$ M, SI = 6,4) et l'ingénol ( $IC_{50} = 30 \pm 19$   $\mu$ M, SI = 6,4).

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité anti-VIH de ces 29 phorboïdes a montré que certains dérivés avaient une puissante activité inhibitrice sur la réplication du VIH-1 et du VIH-2 ; ces observations sont en accord avec les résultats précédemment décrits dans la

littérature. Néanmoins, la puissance de l'effet antiviral de certains composés (se traduisant par des  $IC_{50}$  de l'ordre du nanomolaire) est décrite pour la première fois dans notre étude. A titre d'exemple, nous pouvons citer le 12-*O*-tiglylphorbol 13-décanoate ( $IC_{50} = 0,2 \pm 0,1$  nM, SI = 97 145), le 12-*O*-(*N*-méthylantranilate)phorbol 13-acétate ( $IC_{50} = 3 \pm 2$  nM, SI > 28 586), le 12,13-*O,O'*-dinonanoylphorbol 20-homovanillate ( $IC_{50} = 4,0 \pm 0,1$  nM, SI > 6152), le 13-*O*-isobutyryl-12-déoxyphorbol 20-acétate ( $IC_{50} = 0,20 \pm 0,02$   $\mu$ M, SI = 958) et le 13-*O*-phénylacétyl-12-déoxyphorbol 20-acétate ( $IC_{50} = 31 \pm 2$  nM, SI = 958).

L'interprétation de ces résultats a permis d'apporter de nouveaux éléments de RSA sur l'activité anti-CHIKV. Ceux-ci indiquent que la longueur de la chaîne hydrocarbonée des acyles en C-12 et C-13 influence grandement l'activité antivirale. De plus, il a été établi que la présence d'un carbonyle en C-20 était défavorable à l'activité antivirale.

En outre, ces résultats ont conforté l'hypothèse d'un mécanisme anti-CHIKV via les PKCs du fait : (i) de l'existence d'une forte corrélation entre l'activité anti-CHIKV et anti-VIH ; (ii) de l'observation de RSA similaires entre les deux virus ; (iii) de la connaissance des propriétés anti-VIH des phorboïdes par le biais d'une activation des PKCs (cf. partie I.3.3, p. 60).

Le mécanisme anti-VIH des phorboïdes est lié à l'activation des PKCs, qui stimulent la voie du *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B). Les protéines NF- $\kappa$ B sont des facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire de la cellule. Ainsi, l'activation de cette voie pourrait avoir un rôle prépondérant dans le mécanisme d'action anti-CHIKV des phorboïdes.

Toutefois, notre étude suggère également que l'activité modulatrice des PKCs n'est pas suffisante pour expliquer l'activité anti-CHIKV. En effet, bien que l'ingénol 3-angelate (I3A) soit un activateur à large spectre de PKCs classiques et nouvelles (cf. partie I.3.3, p. 64), il n'a pas montré d'activité significative sur la réplication du CHIKV. Par ailleurs, des travaux publiés dans la littérature indiquent que l'I3A et le TPA n'induisent pas la même distribution intracellulaire des PKCs entre la membrane plasmique et la membrane nucléaire.<sup>377</sup> Ceci pourrait expliquer les différences de propriétés antivirales observées entre ces deux constituants vis-à-vis du CHIKV et du VIH. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la distribution des PKCs dans la cellule était un facteur prépondérant dans le mécanisme d'action anti-CHIKV des phorboïdes.

---

(377) Kedei, N.; Lundberg, D. J.; Toth, A.; Welburn, P.; Garfield, S. H.; Blumberg, P. M. Characterization of the Interaction of Ingenol 3-Angelate with Protein Kinase C. *Cancer Res.* **2004**, *64* (9), 3243–3255.

### III. 3. Élaboration d'une stratégie de déréplication des phorboïdes par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse multi-niveaux (LC-MS<sup>n</sup>)

#### III. 3. 1. Déréplication par une approche LC-MS<sup>n</sup> ciblée

Dans le but de confirmer ou d'infirmer la présence d'esters diterpéniques de phorbol (PE), de déoxyphorbol (dPE) et d'ingénol (IE) dans les extraits actifs d'*Euphorbia*, une méthode utilisant la chromatographie liquide (LC) haute performance couplée à un spectromètre de masse (à trappe d'ions capable de faire des analyses multi-dimensionnelles (MS<sup>n</sup>) a été développée (cf. partie, II.1, p. 84).<sup>1</sup> Afin d'obtenir le maximum d'informations sur la composition des mélanges, 27 diterpènes commerciaux ont été inclus dans la méthode ; aussi bien ceux ayant montrés une forte activité contre la réplication du virus CHIKV que les autres composés « standards » (cf. partie supra, III.2, p. 94).

La méthode de chromatographie liquide a été optimisée à l'aide d'un mélange de référence représentatif des esters diterpéniques incluant des PE et des dPE. Le mode d'ionisation positive a été choisi car il s'est montré capable d'induire une ionisation satisfaisante de ces dérivés, permettant l'obtention de spectres de masse informatifs lors de la dissociation induite par collision (*collision-induced dissociation*, CID). Dans le but d'optimiser l'ionisation des ions quasi-moléculaires, les paramètres de source du spectromètre de masse ont été ajustés à l'aide du mélange de référence. Pour une molécule de chaque classe ciblée (PE/dPE/IE), deux transitions précurseur-à-produit ont été sélectionnées et les conditions de fragmentation par CID ont été optimisées par infusion directe. Puis, les temps de rétention de chaque standard ont été enregistrés dans des conditions chromatographiques prédéfinies. Des expériences de MS<sup>n</sup> par détection multiple de transition précurseur-à-produit (*multiple reactions monitoring*, MRM), suivi d'une expérience dynamique d'acquisition du spectre de masse MS<sup>n</sup> (par CID de l'ion précurseur) ont été menées à l'aide de plusieurs mélanges. Ainsi, les spectres de masse obtenus pour chaque constituant de référence ont été enregistrés et intégrés dans une banque de spectres.

Les extraits AcOEt d'*Euphorbia*, possédant une forte activité anti-CHIKV, ont été analysés par la méthode LC-MS<sup>n</sup> ciblée. Les résultats ont montré que : *E. peplus* contenait de l'ingénol 3-mébutate (I3A) et de l'ingénol 3,20-dibenzoate (IDB) ; *E. pithyusa* subsp. *pithyusa* du 13-*O*-isobutyryl-12-déoxyphorbol 20-acétate (IDA) ; et *E. segetalis* subsp. *pineae* de l'IDB. Ces composés sont présents en quantité relativement faible dans les extraits et exhibent de

modestes activités anti-CHIKV (IDB :  $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ , IS = 6,4 et IDA :  $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ , IS = 5). En outre, nous avons constaté qu'aucune molécule douée d'une forte activité inhibitrice et sélective de la réplication du CHIKV (TPA, PDD, prostratin) n'était détectée dans les extraits d'*Euphorbia* analysés. Sur la base de ces observations, il a été considéré que la présence d'autres phorboïdes (non détectés par cette méthode ciblée) pourrait expliquer la forte activité anti-CHIKV de l'ensemble des extraits. En effet, cette approche analytique ciblée a l'avantage d'être sensible et sélective. Néanmoins, aucune information ne peut être obtenue sur la présence éventuelle d'analogues de phorboïdes.

### III. 3. 2. Développement d'une méthode de détection par LC-MS<sup>n</sup> non-ciblée

Afin d'obtenir des informations sur la présence d'analogues de phorboïdes, une méthode LC-MS<sup>n</sup> non-ciblée a été développée (cf. partie II.3, p. 102) en utilisant une approche comparable aux travaux développés par Vogg *et al* sur un spectromètre de masse triple quadripoles (QqQ).<sup>370</sup> Ces résultats sont décrits dans l'article publié dans *Journal of Chromatography A*.<sup>5</sup> Toutefois, la méthode développée dans le cadre de cette thèse exploite les potentialités permises par l'utilisation de spectromètres hybrides à trappe d'ions permettant de faire de la MS<sup>n</sup>. La séquence mise en œuvre est composée de deux analyses successives :

(A) Une première analyse en mode MS<sup>n</sup> est réalisée par la combinaison d'une expérience de détection multiple des transitions précurseur-à-produit (MRM) des squelettes cibles (PE/dPE/IE), puis une expérience d'acquisition automatique de spectres de masse CID sur les précurseurs ciblés et détectés au cours de l'expérience MRM.

(B) Une seconde analyse en mode MS<sup>n</sup> est effectuée pour détecter les ions précurseurs à partir d'un ion caractéristique d'un des squelettes ciblés lors de l'étape (A), puis un spectre de masse CID est obtenu automatiquement à partir de l'ion précurseur le plus intense.

Le développement de cette méthode LC-MS<sup>n</sup> a débuté par l'étude de la fragmentation de molécules représentatives de chaque classe de phorboïdes (PE/dPE/IE). Comme décrit précédemment par Vogg *et al*,<sup>370</sup> les squelettes des esters d'ingénols et de déoxyphorbols n'ont pu être discriminés puisqu'ils produisaient par CID des ions similaires. Deux transitions précurseur-à-produit ont ensuite été sélectionnées et optimisées par infusion pour chacun des trois squelettes ( $m/z$  311→293, 311→283 pour les PE, et 313→295, 313→285 pour les dPE et les IE). Des spectres de masse MS<sup>n</sup> des ions  $m/z$  311 pour les PE et  $m/z$  313 pour les dPE et IE ont été enregistrés dans la banque spectrale. Les conditions de source des ions

sélectionnés comme précurseurs de l'étape (A) et comme produits de l'étape (B) ont été optimisées de façon à obtenir un rapport signal/bruit maximal.

Lors de l'analyse des extraits d'*Euphorbia* par la méthode LC-MS<sup>n</sup> non-ciblée, les résultats de l'étape (A) ont suggéré que de nombreux métabolites présentaient des fragmentations caractéristiques des PE, dPE et IE. L'interprétation des expériences réalisées dans l'étape (B) a permis d'annoter seulement deux esters d'ingénols (extraits d'*E. peplus* et de *E. segetalis* subsp. *pinea*) et deux esters de déoxyphorbol (*E. amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*). Les spectres MS/MS des autres métabolites détectés présentaient des ions supplémentaires, non-caractéristiques des squelettes ciblés. Par ailleurs, les spectres MS/MS de ces composés présentaient des ions quasi-moléculaires ayant une masse moléculaire élevée et des pertes neutres indiquant la présence de plus de trois groupements esters sur leur structure (ce qui n'a jamais été observé pour les squelettes étudiés). Nous avons donc conclu qu'il s'agissait probablement d'autres types d'esters de diterpène dont la fragmentation contenait des transitions analogues à celles des PE, dPE et IE.

Le développement de cette méthode non-ciblée a permis de simplifier et consolider la détection des PE, dPE et IE en mélange. De plus, son application aux extraits d'*Euphorbia* a permis de redéfinir les limites de cette approche, notamment au niveau de sa spécificité. Cette méthode doit être utilisée avec discernement, puisque divers squelettes de diterpènes d'Euphorbiaceae produisent des ions fragments similaires. L'approche analytique développée peut néanmoins être transposée aux autres types d'esters diterpéniques (lathyrane, daphnane, myrsinane), sous réserve que leurs voies de fragmentations soient décrites et que des données bibliographiques soient disponibles sur la nature des molécules présentes dans la plante à étudier.

### **III. 4. Caractérisation chimique et activité antivirale de l'extrait d'*Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata***

L'espèce *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* a été choisie pour une étude phytochimique sur la base de : (i) sa très forte activité inhibitrice et sélective de la réplication du CHIKV ; (ii) la non détection des phorboïdes ciblés par LC-MS<sup>n</sup> ; (iii) la détection, par l'approche LC-MS<sup>n</sup> non ciblée, de dérivés d'esters de déoxyphorbol ; (iv) son aire de distribution corso-sarde ; et (v) la quantité de matière végétale disponible.



### III. 4. 1. Identification de nouveaux esters de diterpène de type jatrophane

Un fractionnement bioguidé a été réalisé sur un extrait AcOEt d'*Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* afin d'isoler les métabolites ayant une activité anti-CHIKV. Ces résultats sont décrits dans un article publié dans *Journal of Natural Products* en 2014 (cf. partie II.4, p. 116).<sup>2</sup> En premier lieu, l'extrait a été fractionné par chromatographie flash en phase normale. Puis, l'activité inhibitrice des fractions obtenues a été évaluée sur le CHIKV. Les résultats ont montré que les fractions notées F7-F9 possédaient une forte activité antivirale. L'investigation de la fraction F9 par chromatographie liquide haute performance préparative a permis d'isoler douze molécules. L'élucidation de la structure tridimensionnelle de ces constituants a été réalisée grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution (*electrospray ionisation - high resolution mass spectrometry*, ESI-HRMS) et de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (*nuclear magnetic resonance*, RMN). Les composés identifiés sont des esters de diterpènes de type jatrophane (notés JE), dont six sont décrits pour la première fois. La configuration absolue de ces derniers a été déduite de l'analyse par diffraction des rayons X des cristaux.

Par la suite, trois jatrophanes supplémentaires ont été isolés et identifiés à partir d'*Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*, dont un composé possédant un cycle hémicétalique inédit, baptisé jatrohémicétal. Ces résultats sont décrits dans un article publié dans *Journal of Natural Products* en 2015.<sup>4</sup> L'élucidation structurale de ces constituants a été réalisée par l'analyse des données ESI-HRMS et RMN. La détermination de la structure tridimensionnelle du jatrohémicétal a requis l'utilisation d'une approche innovante reposant sur la comparaison des résultats expérimentaux issus de l'analyse RMN, avec ceux obtenus à partir d'analogues simulés par modélisation moléculaire. Une analyse conformationnelle a été effectuée sur les quatre diastéréoisomères possibles (configuration des carbones C-6 et C-9), puis la géométrie de chacune des structures a été optimisée. Les valeurs des déplacements chimiques en RMN du <sup>1</sup>H et du carbone <sup>13</sup>C ont été simulées pour les différents diastéréoisomères par des calculs basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Les distances inter-protons ont été déduites de l'étude d'une expérience bidimensionnelle homonucléaire du proton (ROESY). La comparaison des caractéristiques structurales déduites de l'analyse des spectres expérimentaux de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, et ROESY), avec les résultats simulés (DFT-RMN, modèle moléculaire), a permis d'identifier sans ambiguïté la structure du jatrohémicétal et sa configuration absolue.

### III. 4. 2. Étude de la fragmentation par MS<sup>n</sup> des esters de jatrophane

Douze esters diterpéniques de type jatrophane (JE), isolés à partir d'*Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* et classés en deux groupes distincts (notés A et B) selon les fonctions présentes sur le squelette diterpénique, ont fait l'objet d'une étude de leurs voies de fragmentation par spectrométrie de masse (multidimensionnelle et haute résolution). Ces résultats sont décrits dans l'article publié dans *Journal of Chromatography A*.<sup>5</sup> L'objectif principal de ces travaux a été de caractériser, pour la première fois, le profil de fragmentation par CID de ces esters macrocycliques. Cette étude avait également pour objectif d'investiguer l'hypothèse, déduite des résultats de l'analyse non-ciblée du contenu en phorboïdes des extraits d'*Euphorbia* (cf. partie II.3, p. 102), selon laquelle d'autres squelettes d'esters de diterpènes pouvaient générer des fragments similaires aux PE, DE et IE. Deux spectromètres de masse pouvant réaliser des analyses multidimensionnelle (MS<sup>n</sup>) ont été utilisés : - un spectromètre hybride associant un triple quadripôle à une trappe d'ion linéaire ; - un spectromètre hybride à trappe d'ion linéaire et un analyseur à transformée de Fourier (LTQ XL Orbitrap) pour confirmer la formule brute des ions observés dans le spectre CID.

Notre étude a mis en évidence que le profil d'ionisation et de fragmentation des JE s'apparentait à celui des phorboïdes. Dans les conditions expérimentales utilisées, ces molécules s'ionisent préférentiellement en ion quasi-moléculaire [M+Na]<sup>+</sup>, puis se fragmentent par CID en ions correspondants à l'élimination des esters par un mécanisme de pertes neutres. Par ailleurs, les résultats ont montré que certains JE du groupe B (JE-B) se fragmentaient en produisant l'ion *m/z* 313 caractéristique des DE et IE.<sup>5,370</sup> De plus, les spectres de masse générés à partir de cet ion *m/z* 313 sont similaires pour chaque type de diterpènes précités (JE-B, DE et IE). Enfin, l'utilisation de la haute résolution a permis de montrer que la formule brute (C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>), déduite de la masse exacte de l'ion *m/z* 313.1803, était identique aux trois classes considérées. Comme indiqué précédemment (cf. partie III.3.2, p. 167), cette publication a contribué à la mise en lumière des limites de l'annotation des phorboïdes par spectrométrie de masse.

### III. 4. 3. Évaluation de l'activité antivirale des esters de jatrophane

L'évaluation des propriétés biologiques des diterpènes isolés à partir d'*Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* a montré que deux esters de jatrophane possédaient une activité inhibitrice sélective sur la réplication du virus du CHIKV, mais aussi du VIH (cf. partie III.4, p. 116). En effet, des RSA similaires ont été observées pour ces deux activités antivirales. Par ailleurs, les résultats anti-VIH obtenus pour l'un des esters de jatrophane, le composé (**5**), sont en contradiction avec les résultats d'une précédente étude (cf. partie I.3.3, p. 66).<sup>378</sup> En effet, cet ester de jatrophane (dénommé SJ23B) a montré une capacité activatrice de la transcription du VIH-1, dix fois supérieure à celle de la prostratine et une inhibition, de l'ordre du nanomolaire, de la réplication du VIH-1.<sup>379</sup> Cet ester de jatrophane a été isolé par Appendino et coll. à partir d'un extrait d'*E. amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* récoltée en Sardaigne.<sup>226</sup> Ce constituant inhibe la réplication du VIH-1 *in cellulo* ( $IC_{50} = 2$  nM, IS > 48 520, cellules MT-2, virus recombinant NL4.3-Ren) en internalisant les récepteurs CD4, CXCR4 et CCR5. Le mécanisme d'action, par lequel agit la molécule SJ23B, est donc similaire à celui des phorboïdes (cf. partie I.3.3, p. 57). Or, rappelons que dans notre étude, ce composé (noté **5**) n'a montré aucune activité anti-VIH significative ( $IC_{50} = 37,1 \pm 1,5$   $\mu$ M, cellules MT-4, VIH-I(IIIa)).<sup>2</sup> Du fait de l'utilisation de souches virales et de cellules hôtes différentes entre les deux études, il n'a pas été possible d'expliquer cette divergence.

Fort de ce constat, une correspondance a été établie avec le Prof. Giovanni Appendino de l'*Universita Degli Studi Del Piemonte Orientale* (qui nous fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse). Ce dernier nous a précisé que les travaux relatifs à l'étude du mécanisme d'action de la molécule SJ23B avaient été interrompus. En effet, l'échantillon purifié ayant servi à cette étude avait été totalement "consommé" lors des investigations antivirales. Il nous a alors proposé de contacter le Prof. José Alcamí du Centre National de Microbiologie de l'Institut de Santé Calors III à Madrid, afin de poursuivre les études antivirales sur le mécanisme d'action de ce composé. Les résultats de cette évaluation ont confirmé que SJ23B ne possédait pas d'activité anti-VIH (cf. partie II.6, p. 136). Face à cette discordance des résultats, l'hypothèse d'une erreur d'interprétation structurale n'a pas été retenue, puisque les données de RMN des échantillons testés étaient rigoureusement identiques. De plus, une

---

(378) Bedoya, L. M.; Márquez, N.; Martínez, N.; Gutiérrez-Eisman, S.; Álvarez, A.; Calzado, M. A.; Rojas, J. M.; Appendino, G.; Muñoz, E.; Alcamí, J. SJ23B, a Jatrophone Diterpene Activates Classical PKCs and Displays Strong Activity against HIV in Vitro. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77* (6), 965–978.

(379) Alcamí José. SJ23B, a Jatrophone Diterpene, induces HIV receptors downregulation and HIV transcription through activation of Ras-MEK pathway and classical PKCs [http://www.ihlpress.com/pdf%20files/resistance09\\_presentations/04\\_ALCAMI.pdf](http://www.ihlpress.com/pdf%20files/resistance09_presentations/04_ALCAMI.pdf) (accessed Oct 1, 2015).

structure cristalline de la molécule a pu être obtenue ; son analyse par diffraction des rayons X a permis de confirmer aussi bien la structure que la configuration absolue. Ainsi, il a été conclu qu'il était possible que cet échantillon ait pu renfermer une ou plusieurs impuretés possédant un puissant effet contre la réplication du VIH. Ces deux dernières possibilités semblent d'autant plus pertinentes que des phorboïdes (de type 4-déoxyphorbol diesters) ont été isolés de cette même plante au cours de l'isolement de SJ23B<sup>226</sup> et que leurs activités anti-VIH n'a pas été évaluée.<sup>378</sup>

### III. 4. 5. Purification en SFC guidée par réseaux moléculaires MS/MS des esters de diterpène

Dans le but d'isoler et d'évaluer les phorboïdes présents dans l'extrait d'*Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*, un fractionnement ciblé par spectrométrie de masse a été entrepris (cf. partie II.6, p. 136). L'analyse par la méthode LC-MS<sup>n</sup> non ciblé a suggéré qu'au moins deux dérivés de type déoxyphorbol, correspondant à deux dérivés précédemment isolés à partir de la plante de Sardaigne, étaient présents dans l'extrait AcOEt de cette espèce récoltée en Corse (cf. partie II.3, p. 102).

L'isolement des JE d'*E. amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*, a été particulièrement laborieuse.<sup>2</sup> D'autre part, les nombreuses étapes chromatographiques ont nécessité l'utilisation d'importants volumes de solvant organique. La chromatographie en phase CO<sub>2</sub> supercritique (*supercritical fluid chromatography*, SFC) couplée à la MS/MS est une approche relativement peu utilisée, mais qui présente pourtant de nombreux avantages, notamment la possibilité d'automatiser en partie les expériences et d'utiliser de faibles volumes d'éthanol comme unique solvant organique. Par ailleurs, le service de chromatographie du CNRS-ICSN, dirigé par la Dr. Odile Thoison, dispose d'un appareil de chromatographie par SFC semi-préparatif (SFC-semiprép).

Ainsi, une méthode en SFC, couplée à un spectromètre de masse tandem (Q-TOF) pour l'analyse des esters de diterpènes, a été développée par le Dr. David Touboul de l'ICSN dans le cadre du stage de Stéphanie Boutey (Master 2, ICSN, 2015). A l'aide d'un mélange de JE d'*E. amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*, un criblage de différentes phases stationnaires a été réalisé avec de l'éthanol comme co-solvant. L'utilisation d'une phase stationnaire *Hypercarb* (carbone graphite) a permis de réaliser une excellente séparation des constituants en un temps d'analyse satisfaisant. Le détail de ce développement méthodologique n'est pas détaillé dans ce manuscrit.

Trois fractions bioactives (F7-F9) d'*E. amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* ont été choisies pour réaliser des analyses par SFC-UV-MS/MS. Les données MS/MS ont ensuite été interprétées en générant des réseaux moléculaires de spectres.

L'application de réseaux moléculaires MS/MS sur des données issues d'analyses SFC-MS/MS s'est montrée particulièrement efficace pour explorer les groupes de diterpènes présents dans les fractions F7-F9. Grâce aux spectres MS/MS des JE préalablement isolés et à la connaissance de leurs voies de fragmentation,<sup>5</sup> les réseaux ont pu être annotés. Il a été établi que ces trois échantillons contenaient des spectres MS/MS correspondants à des JE du groupe A (JE-A) et du groupe B (JE-B), mais également à un groupe de diterpènes encore inconnu (noté C). Par ailleurs, un ensemble de spectres MS/MS indépendants des JE a été annoté comme étant des esters de 4-dPE (cf. partie II.6, p. 136).

La création d'un calque de représentation original dans le logiciel Cytoscape, que nous avons baptisée "calque de répartition par fraction" (*fraction layout*), a permis de choisir la fraction F9 pour la réalisation d'un fractionnement ciblé par MS<sup>2</sup>MN (réseaux moléculaires de spectre de masse tandem) en SFC-semiprép. Dans ce calque, la taille des perles (spectre MS/MS) est pondérée par la somme totale des intensités de l'ion précurseur pour l'ensemble des échantillons analysés, et où la contribution de l'intensité du précurseur de chaque fraction est représentée sous forme de diagramme circulaire. Grâce à ce procédé, il a pu être établi qu'une fraction était particulièrement intéressante puisqu'elle contenait aussi bien des 4-dPE que des diterpènes annotés comme étant inconnus (group C).

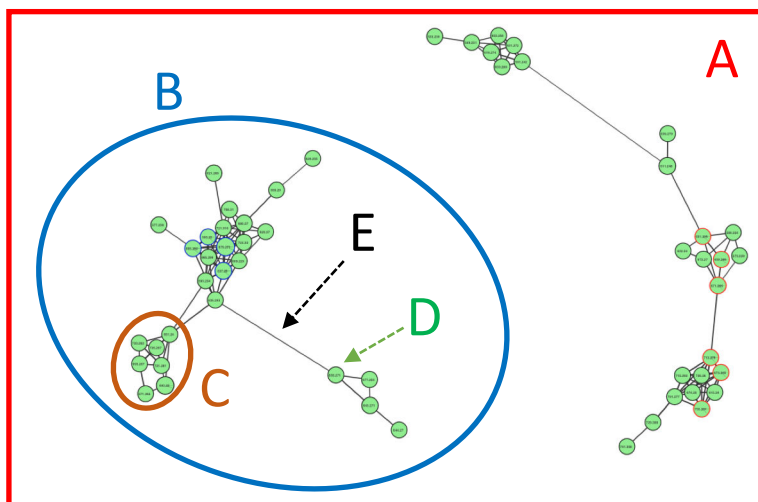
La méthode chromatographique a été transposée sur l'appareil de SFC-semiprép, en utilisant le détecteur UV pour cibler les molécules d'intérêts. La réalisation du fractionnement de F9 a permis d'isoler, en une seule étape, trois dérivés de 4-dPE (**15-17**) selon la numérotation du chap 6) ainsi qu'une sous-fraction (F9-1) contenant un mélange de diterpènes inconnu. La séparation chromatographique des constituants de cette sous-fraction a été optimisée en SFC-MS/MS, puis la sous-fraction F9-1 a été fractionnée de nouveau par SFC-semiprép permettant l'obtention de deux nouveaux esters de jatrophanes (**13** et **14**) appartenant au groupe C (JE-C), ainsi qu'un quatrième 4-dPE (**18**). Ces molécules ont été identifiées par ESI-HRMS, RMN et par l'analyse de la diffraction des rayons X. Ainsi, le développement de cette procédure originale de purification ciblée par MS<sup>2</sup>MN en SFC nous a permis d'isoler des molécules d'intérêt biologique et structurellement inconnues dans cette espèce d'*Euphorbia*.

## Les réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires sont une approche bio-informatique permettant l'interprétation globale de données MS<sup>2</sup> (pour plus de détails, voir l'article en français dans *Spectra analyse* de décembre 2015, Nothias-Scaglia *et al.*). Conçu par les groupes de Pieter C. Dorrestein et de Nuno Bandeira (Université de Californie, San Diego), cet outil innovant repose sur un postulat simple : les molécules structurellement proches partagent des voies de fragmentations similaires en spectrométrie de masse conduisant à des fragments ou des pertes de neutre en commun. Ainsi, dans les réseaux moléculaires, les spectres MS<sup>2</sup> d'un jeu de données, sont comparés deux à deux par alignement spectral, puis un indice de corrélation, appelé similarité cosinus (*cosine score*, CS), est attribué entre chaque paire de spectres MS<sup>2</sup>. L'algorithme d'alignement spectral des spectres MS<sup>2</sup>, sur lequel repose les réseaux moléculaires, est dérivé d'outils bio-informatiques développés originellement pour l'analyse des protéines. Les données MS<sup>2</sup> sont préalablement simplifiées par la fusion des spectres considérés comme identiques (MS-Cluster), puis l'alignement spectral est effectué sur chaque paire de spectre MS<sup>2</sup> sur la base des différences entre les valeurs des *m/z*, et de leur intensité relative. Deux spectres MS<sup>2</sup> superposables ont un CS de 1, alors que deux spectres MS<sup>2</sup>, sans ion ou perte de neutre commun, ont un CS de 0. Les spectres MS<sup>2</sup> ayant un CS supérieur à une certaine valeur (typiquement 0,7) ont une forte similarité spectrale ; ils sont alors considérés comme issus de la fragmentation de constituants chimiquement apparentés. Les résultats sont ensuite interprétés graphiquement sous la forme de réseaux de similarité spectrale, dénommés par extrapolation, réseaux moléculaires (terminologie employée par l'équipe de l'UCSD). Les premières applications ont été réalisées à partir d'un programme écrit en langage MATLAB et du logiciel de visualisation Cytoscape. L'utilisation de réseaux moléculaires (ou réseaux de similarité spectrale) peut permettre : (i) de détecter un ensemble d'analogues structuraux à partir du spectre MS<sup>2</sup> d'une molécule de référence ; (ii) d'identifier des groupes spectraux MS<sup>2</sup> ; et (iii) de permettre la comparaison fine entre les analyses MS<sup>2</sup> de différents échantillons. Sa puissance réside dans sa capacité à organiser les données MS<sup>2</sup> y compris en condition *ex nihilo*, c'est à dire, sans connaissance préalable de l'échantillon (tel que des spectres MS<sup>2</sup> de composés de référence, ou des informations sur les métabolites présents).

En janvier 2014, les groupes Pieter C. Dorrestein et de Nuno Bandeira ont mis en ligne la plateforme internet *Global Natural Product Social molecular networking* (GNPS), dédiée à la déréplication et l'interprétation des données MS<sup>2</sup> (<http://gnps.ucsd.edu>). Cette plateforme regroupe différents outils pour l'annotation automatique, en particulier des banques spectrales

MS<sup>2</sup>. Elle permet de générer des réseaux de similarité spectrale *ex nihilo* à partir de n'importe quelle analyse MS<sup>2</sup>.



- A** : (*molecular networks*) réseaux/connectome/ espace/toiles/graphes moléculaire ou spectral  
**B** : (*molecular network*) réseau/constellation/ toile/graphe moléculaire ou spectral  
**C** : (*cluster*) sous-réseau/système/amas/groupe/ sous-graphe moléculaire ou spectral  
**D** : (*node*) spectre/ion/perle/noeud  
**E** : (*edge*) lien/similarité/corrélation/score cosinus

L'un des enjeux liés à l'émergence de cette approche, réside dans la création d'une terminologie adaptée à la langue française. Celle-ci doit prendre en compte la complexité inhérente à cette approche novatrice, tout en permettant l'emploi de termes destinés à être compris par un public non-spécialiste. La terminologie anglo-saxonne choisie par l'équipe de P. C. Dorrestein (UCSD) met en avant le fait qu'un spectre MS<sup>2</sup> est produit par un ion-molécule (*molecular networks*). Bien que ce choix semble judicieux pour communiquer auprès d'un public non-spécialiste, celui-ci est susceptible d'induire des contre-sens puisqu'il est basé sur une extrapolation qui peut être vue comme réductrice par le spécialiste. De plus, au delà, de l'apparence cartographique des réseaux moléculaires, cette approche est par nature constituée de plusieurs facettes conceptuelles (mathématique, spectrale, et moléculaire). Ainsi, plutôt que d'utiliser une terminologie basée sur la traduction littérale des termes anglo-saxons inspiré de la terminologie informatique (*molecular networking*, *molecular network*, *node*, *edge*), nous suggérons l'utilisation d'une terminologie multidimensionnelle, où



différents termes pourraient se substituer selon la facette à mettre en exergue. Par exemple, la facette mathématique pourrait être décrite par la terminologie issue de la géométrie dans l'espace (graphe, sommet, arête) et l'aspect cartographique par analogie avec l'astronomie (espaces, constellation, système/amas). De plus, il faut remarquer l'existence du terme « connectome » en neurobiologie, qui pourrait être utilisé pour désigner l'ensemble des relations de similarité spectrale/moléculaire de données. Un sondage informel a été diffusé à l'ICSN et via le RFMF, qui a permis de préciser les possibilités terminologiques s'offrant à la communauté ([https://docs.google.com/forms/d/1\\_ApBEgpHulDTjtrS\\_7AiyUJxYx39o\\_w5Ly\\_CSTs3OxfM/prefill](https://docs.google.com/forms/d/1_ApBEgpHulDTjtrS_7AiyUJxYx39o_w5Ly_CSTs3OxfM/prefill)). Les principales propositions sont présentées dans la Figure ci-dessus.

### III. 4. 5. Évaluation de l'activité antivirale des esters diterpéniques de 4-déoxyphorbols

Les résultats de l'évaluation de l'activité antivirale des dérivés de 4-dPE ont montré que le composé **15** (4-dPE A) était doué de très fortes activités inhibitrices de la réplication du VIH-1 ( $IC_{50} = 8$  nM, SI > 6250, NL4.3-Ren), mais aussi de celle du CHIKV ( $EC_{50} = 1,0 \pm 0,4$   $\mu$ M, SI > 25). L'activité inhibitrice de **15** sur la réplication du VIH-1 est 28 fois supérieure à celle de la prostratine, actuellement en phase clinique. Le composé **18** (4-dPE B) est l'un des plus puissants inhibiteurs connus de la réplication du CHIKV ( $EC_{50} = 0,34 \pm 0,12$   $\mu$ M and SI > 638). Des RSA ont pu être déduites de ces activités antivirales. Ces dernières sont similaires aux RSA faites sur les diterpènes de type PE (cf. partie II.2, p. 94).<sup>3</sup> L'étude du mécanisme d'action anti-VIH de **15** a été réalisée dans le cadre de la thèse d'Erick de la Torre sous la supervision du Pr. J. Alcamí et Dr. L. M. Bedoya (CNM, Madrid). Les résultats ont montré que ce composé agissait sur la réplication du VIH-1 de la même manière que les phorboïdes. La molécule 4-dPE A induit une réactivation des virus latents et une "réinternalisation" des récepteurs CD4, CXCR-4, et CXCR-5.

En considérant la valeur de l'activité inhibitrice de HIV-1 (NL4.3-Ren) pour le composé **15** ( $IC_{50} = 8$  nM, SI > 6250) et la très forte activité inhibitrice de l'échantillon de SJ23B ( $IC_{50} = 3,5$  nM, SI > 14 258), il nous apparaît peu probable que la seule présence de **15** à l'état de trace puisse à elle seule expliquer la forte activité antivirale de l'échantillon de SJ23B. Toutefois, il est possible que d'autres dérivés non encore évalués pour l'activité anti-VIH, tel que le 4-dPE B (**18**), puissent se révéler être encore plus actifs pour inhiber la

réplication du VIH. Pour mieux comprendre l'activité anti-VIH de l'échantillon de SJ23B, des analyses LC-MS<sup>n</sup> devraient être réalisées prochainement sur un reliquat d'échantillon original.

#### IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le chikungunya est une maladie infectieuse tropicale transmise par des moustiques du genre *Aedes*, dont le "moustique tigre" (*Aedes albopictus*). Avec la récente expansion de ce dernier dans plusieurs régions du monde, des épidémies massives se sont produites. Depuis une dizaine d'années, la présence durable du moustique tigre en Corse et en Méditerranée est très inquiétante puisqu'elle pourrait favoriser la survenue de la maladie. A l'heure actuelle, il n'existe ni vaccin, ni thérapie antivirale. Ainsi, l'objectif principal de ces travaux de thèse était d'identifier dans les *Euphorbiaceae* de Corse de nouvelles molécules douées d'activité antivirale sur la réplication du CHIKV. Ils ont été menés grâce à un partenariat entre le laboratoire CPN (UMR CNRS 6134) de l'Université de Corse et l'équipe « Métabolites de végétaux » de l'ICSN (CNRS). Le fruit de ce travail a permis de mettre en évidence et d'explorer la forte activité antivirale d'extraits d'*Euphorbia* sur la réplication du CHIKV et du VIH.

En collaboration avec le Dr. Leyssen (KU Leuven, Belgique), l'évaluation de l'activité anti-CHIKV de 43 extraits, obtenus à partir de 10 espèces d'*Euphorbia* de Corse, a mis en évidence la forte activité inhibitrice et sélective de certains d'entre-eux *in cellulo* (*Fitoterapia*, 2015).

L'activité antivirale d'une série de 27 diterpènes de type phorboïde, disponibles commercialement, a également été étudiée (*Journal of Natural Products*, 2015a). Les résultats ont montré que certains dérivés avaient une forte activité inhibitrice de la réplication du CHIKV, mais aussi de celle du VIH. Ces études ont permis d'une part, de déduire des relations structure-activité inédites et d'autre part, de soutenir l'hypothèse d'un mécanisme d'action anti-CHIKV impliquant l'activation (voir une modulation) des protéines kinases C (PKCs) par les phorboïdes.

Afin de confirmer ou d'infirmer la présence des phorboïdes dans les 43 extraits issus des 10 espèces d'*Euphorbia*, une première méthode utilisant la LC-MS<sup>n</sup>, a été développée à partir des composés standards. L'application de cette méthodologie a révélé qu'aucun des phorboïdes ciblés n'était présent dans les extraits d'*Euphorbia* étudiés (*Fitoterapia*, 2015). Ainsi, une seconde procédure LC-MS<sup>n</sup> a été mise en œuvre afin de détecter - de manière non ciblée - différents types d'esters diterpéniques. L'utilisation de cette approche a révélé que de

nombreux diterpènes, non-apparentés aux phorboïdes, étaient présents dans les extraits (*Journal of Chromatography A*, 2015).

Un extrait de l'espèce *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* a été sélectionné pour réaliser un fractionnement bio-guidé, aboutissant à l'isolement et l'identification de 14 esters de jatrophane, dont neuf sont nouveaux (*Journal of Natural Products*, 2014 et 2015b). L'un de ces dérivés a été identifié par l'utilisation conjointe de la RMN et de la modélisation moléculaire. (*Journal of Natural Products*, 2015b). En outre, certains diterpènes de type jatrophane, isolés à partir de *E. amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*, se sont révélés être des inhibiteurs de la réplication du CHIKV et du VIH (*Journal of Natural Products*, 2014). A *contrario*, l'évaluation des propriétés antivirales de la molécule nommée SJ23B (**5**) a indiqué qu'elle était inactive. Des travaux sont menés actuellement dans le but d'approfondir les résultats sur les activités antivirales des esters de jatrophane.

Dans le cadre du fractionnement bio-guidé de *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata*, de nombreuses difficultés ont été rencontrées sur le plan analytique, tant au niveau de la purification que de l'identification des esters de diterpène. Pour surmonter ces difficultés, des approches méthodologiques originales ont été développées et mises en oeuvre ; celles-ci enrichissent considérablement la palette d'outils disponibles pour caractériser les diterpénoïdes présents dans les Euphorbiaceae ou les Thymelaeaceae.

- L'utilisation du couplage SFC-UV-MS/MS s'est avérée être une technique puissante pour l'analyse des diterpènes d'*Euphorbia* (cf. manuscrit préliminaire). Il en va de même de l'utilisation de réseaux moléculaires MS/MS ; ces derniers offrent une véritable carte de navigation spectrale pour détecter et cibler les composés d'intérêt biologique et/ou chimique. Au cours d'une purification en SFC sémi-préparative, six esters de diterpènes nouveaux ont pu être purifiés et identifiés ; il s'agit de deux nouveaux esters de jatrophane et de quatre esters de 4-déoxyphorbol. De plus, les conditions de SFC présentent l'avantage d'avoir un impact environnemental limité, par l'utilisation d'une phase mobile composée essentiellement d'éthanol et de CO<sub>2</sub>.

D'autre part, l'approche reposant sur l'utilisation conjointe de la RMN et de la modélisation moléculaire, utilisée pour identifier le jatrohémicétal, définie pour la première fois un cadre fiable pour l'élucidation structurale pour les dérivés diterpéniques originaux, mais également pour d'autres molécules dont la structure est complexe (*Journal of Natural Products*, 2015b).

En partenariat avec le Dr. P. Leyssen (KU, Leuven), le phorboïde 4-dPE B (**18**) s'est montré l'un des plus puissants inhibiteurs connus de la réplication du CHIKV ( $EC_{50} = 0,34 \pm$

0,12  $\mu$ M and SI > 638). Des travaux sont en cours, pour étudier l'implication de PKCs dans le mécanisme d'anti-CHIKV.

Par ailleurs, en collaboration avec le Pr. Alcamí (CNM, Madrid), le composé 4-dPE A (**15**) s'est révélé être doué d'un exceptionnel pouvoir inhibiteur de la réplication du VIH-1 ( $IC_{50} = 8$  nM, SI > 6250), soit environ 28 fois supérieur à celui de la prostratine. L'investigation du mécanisme d'action de **15** indique qu'il agirait comme les phorboïdes antiviraux. Pour juger du potentiel thérapeutique des dérivés du 4-déoxyphorbol, des investigations complémentaires sont en cours afin d'évaluer notamment le potentiel pro-inflammatoire et pro-tumoral des constituants isolés dans le cadre de nos travaux. De plus, l'éventualité d'une synergie anti-CHIKV, entre l'activation des PKCs par les phorboïdes et l'activité modulatrice des transporteurs ABC par les diterpènes macrocycliques, est en cours d'étude.

La possibilité de mettre au point des vaccins efficaces pour lutter contre l'infection au CHIKV a été confirmée par plusieurs études récentes. Lorsque ces vaccins seront disponibles, ils constitueront certainement l'approche la plus efficace pour prévenir les épidémies de CHIKV. Par ailleurs, la lutte contre le « Moustique tigre » doit également être une priorité puisqu'il peut transmettre d'autres maladies virales, notamment la dengue et le virus Zika.

Les phorboïdes non-promoteur de tumeur, contenus dans les plantes de la famille des Euphorbiaceae et/ou des Thymelaeaceae, sont susceptibles de devenir des armes thérapeutiques de grandes valeurs pour le traitement du VIH, puisqu'il est peu probable que des vaccins efficaces soient disponibles à court-moyen terme. Les prochains résultats de l'étude clinique sur la prostratine devraient préciser l'avenir thérapeutique de cette classe de métabolite.

Cette thèse aura donc contribué à la caractérisation chimique et à la découverte des propriétés antivirales d'*Euphorbia* de Corse. Néanmoins, ces plantes fascinantes n'ont pas fini d'être une source d'inspiration précieuse pour le chimiste des produits naturels.

L'avenir proche devrait permettre d'étudier leurs compositions de façon plus efficace et plus complète, grâce à l'intégration d'outils bio-informatiques (tel que les réseaux moléculaires) dès la conception de méthodes utilisant la LC-MS<sup>n</sup>, mais aussi grâce aux nouvelles possibilités de couplage en ligne (comme la spectrométrie à mobilité ionique) et hors-ligne (telle la RMN).

# I. Références

- (1) Nothias-Scaglia, L.-F.; Dumontet, V.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. LC-MS2-Based Dereplication of Euphorbia Extracts with Anti-Chikungunya Virus Activity. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 202–209.
- (2) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retaillieu, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Costa, J.; Litaudon, M. Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (6), 1505–1512.
- (3) Nothias-Scaglia, L.-F.; Pannecouque, C.; Renucci, F.; Delang, L.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (6), 1277–1283.
- (4) Nothias-Scaglia, L.-F.; Gallard, J.-F.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Costa, J.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; Litaudon, M. Advanced Structural Determination of Diterpene Esters Using Molecular Modeling and NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (10), 2423–2431.
- (5) Nothias-Scaglia, L.-F.; Schmitz-Afonso, I.; Renucci, F.; Roussi, F.; Touboul, D.; Costa, J.; Litaudon, M.; Paolini, J. 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* **2015**, *1422*, 128–139.
- (6) Weber, C. Characterization of the Chikungunya Virus Entry Process and the Development of Novel Antiviral Strategies. Thèse, Johann Wolfgang Goethe–Universität, 2014.
- (7) Jaffar-Bandjee, M.-C. Étude de La Physiopathologie de L’infection Chikungunya En Phase Aiguë et Chronique Chez L’homme. Thèse, Université de la Réunion, 2010.
- (8) Petidmange, C. Etude Des Cellules NK Au Cours Des Infections Par Le Virus Du Chikungunya et Le Virus de La Dengue, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014.
- (9) Moulay, D. Mathematical Modeling and Study of Dynamical Systems in Epidemiology. Case of the Chikungunya Disease. Thèse, Université du Havre, 2011.
- (10) Lo Presti, A.; Ciccozzi, M.; Cella, E.; Lai, A.; Simonetti, F. R.; Galli, M.; Zehender, G.; Rezza, G. Origin, Evolution, and Phylogeography of Recent Epidemic CHIKV Strains. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12* (2), 392–398.
- (11) Descures, M. Etats Des Lieux de L’évolution Du Chikungunya Sur Les Territoires Français et Rôle Du Pharmacien. Thèse de Pharmacie, Université Toulouse III, 2014.
- (12) Oliva, C. Biological and Behavioral Studies of Two Disease-Transmitting Mosquito Species (*Aedes Albopictus* and *Anopheles Arabiensis*) with the Aim of Developing the Sterile Insect Technique (SIT) against These Vectors on Reunion Island. Thèse, Université de la Réunion, 2012.
- (13) Legros, V. Etude Dynamique et Protéomique de L’interaction Entre *Aedes Albopictus* et Les Virus émergents de La Dengue et Du Chikungunya. Thèse d’exercice, médecine vétérinaire, Université Paul Sabatier de Toulouse, 2014.
- (14) Schwartz, O.; Albert, M. L. Biology and Pathogenesis of Chikungunya Virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (7), 491–500.
- (15) Caglioti, C.; Lalle, E.; Castilletti, C.; Carletti, F.; Capobianchi, M. R.; Bordi, L. Chikungunya Virus Infection: An Overview. *NEW Microbiol.* **2013**, *36*, 211–227.
- (16) Thiberville, S.-D.; Moyen, N.; Dupuis-Maguiraga, L.; Nougairede, A.; Gould, E. A.; Roques, P.; de Lamballerie, X. Chikungunya Fever: Epidemiology, Clinical Syndrome, Pathogenesis and Therapy. *Antiviral Res.* **2013**, *99*, 345–370.
- (17) McGraw, E. A.; O’Neill, S. L. Beyond Insecticides: New Thinking on an Ancient Problem. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11* (3), 181–193.
- (18) Higgs, S.; Vanlandingham, D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 231–240.
- (19) Medlock, J. m.; Hansford, K. m.; Versteirt, V.; Cull, B.; Kampen, H.; Fontenille, D.; Hendrickx, G.; Zeller, H.; Van Bortel, W.; Schaffner, F. An Entomological Review of Invasive Mosquitoes in Europe. *Bull. Entomol. Res.*

2015, *FirstView*, 1–27.

- (20) Powers, A. Chikungunya Virus Outbreak Expansion and Microevolutionary Events Affecting Epidemiology and Epidemic Potential. *Res. Rep. Trop. Med.* **2015**, *6*, 11–19.
- (21) Sam, I.-C.; Kümmerer, B. M.; Chan, Y.-F.; Roques, P.; Drosten, C.; AbuBakar, S. Updates on Chikungunya Epidemiology, Clinical Disease, and Diagnostics. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 223–230.
- (22) Gasque, P.; Couderc, T.; Lecuit, M.; Roques, P.; Ng, L. F. P. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 241–249.
- (23) Robinson, M. C. An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. I. Clinical Features. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1955**, *49* (1), 28–32.
- (24) WHO. Chikungunya [http://www.who.int/denguecontrol/arbo-viral/other\\_arboviral\\_chikungunya/en/](http://www.who.int/denguecontrol/arbo-viral/other_arboviral_chikungunya/en/) (accessed Feb 27, 2015).
- (25) Queyriaux, B.; Simon, F.; Grandadam, M.; Michel, R.; Tolou, H.; Boutin, J.-P. Clinical Burden of Chikungunya Virus Infection. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, *8* (1), 2–3.
- (26) Ross, R. W. The Newala Epidemic. III. The Virus: Isolation, Pathogenic Properties and Relationship to the Epidemic. *J. Hyg. (Lond.)* **1956**, *54* (2), 177–191.
- (27) Lumsden, W. H. R. An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953 II. General Description and Epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1955**, *49* (1), 33–57.
- (28) Powers, A. M. Chikungunya. *Clin. Lab. Med.* **2010**, *30* (1), 209–219.
- (29) Baltimore, D. Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35* (3), 235–241.
- (30) International Committee on Taxonomy of Viruses. Togaviridae. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; Academic Press: London ; Waltham, MA, 2012.
- (31) Strauss, J. H.; Strauss, E. G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiol. Rev.* **1994**, *58* (3), 491–562.
- (32) Powers, A. M.; Brault, A. C.; Shirako, Y.; Strauss, E. G.; Kang, W.; Strauss, J. H.; Weaver, S. C. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *J. Virol.* **2001**, *75* (21), 10118–10131.
- (33) Zhang, R.; Hryc, C. F.; Cong, Y.; Liu, X.; Jakana, J.; Gorchakov, R.; Baker, M. L.; Weaver, S. C.; Chiu, W. 4.4 Å Cryo-EM Structure of an Enveloped Alphavirus Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *EMBO J.* **2011**, *30* (18), 3854–3863.
- (34) Solignat, M.; Gay, B.; Higgs, S.; Briant, L.; Devaux, C. Replication Cycle of Chikungunya: A Re-Emerging Arbovirus. *Virology* **2009**, *393* (2), 183–197.
- (35) Wintachai, P.; Wikan, N.; Kuadkitkan, A.; Jaimipuk, T.; Ubol, S.; Pulmanausahakul, R.; Auewarakul, P.; Kasinrerak, W.; Weng, W.-Y.; Panyasrivanit, M.; et al. Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein. *J. Med. Virol.* **2012**, *84* (11), 1757–1770.
- (36) Wintachai, P.; Thuaud, F.; Basmadjian, C.; Roytrakul, S.; Ubol, S.; Désaubry, L.; Smith, D. R. Assessment of Flavaglines as Potential Chikungunya Virus Entry Inhibitors. *Microbiol. Immunol.* **2015**, *59* (3), 129–141.
- (37) De Ranitz, C. M.; Myers, R. M.; Varkey, M. J.; Isaac, Z. H.; Carey, D. E. Clinical Impressions of Chikungunya in Vellore Gained from Study of Adult Patients. *Indian J. Med. Res.* **1965**, *53* (8), 756–763.
- (38) Nimmannitya, S.; Halstead, S. B.; Cohen, S. N.; Margiotta, M. R. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on Hospitalized Patients with Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1969**, *18* (6), 954–971.
- (39) Deller, J. J.; Russell, P. K. Chikungunya Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1968**, *17* (1), 107–111.
- (40) Suharyono, W. Outbreak of Chikungunya Virus in Indonesia 1982-1985. *Virus Inf. Exch. Newsl.* **1986**, *3*, 91.
- (41) Renault, P.; Balleddier, E.; D’Ortenzio, E.; Bâville, M.; Filleul, L. Epidemiology of Chikungunya Infection on Reunion Island, Mayotte, and Neighboring Countries. *Médecine Mal. Infect.* **2012**, *42* (3), 93–101.
- (42) Cecilia, D. Current Status of Dengue and Chikungunya in India. <http://www.searo.who.int/publications/journals/seaiph/seaiphv3n1p22.pdf?ua=1> **2014**.
- (43) (CDC, C. for D. C. and P. Chikungunya Fever Diagnosed among International Travelers--United States, 2005-2006. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2006**, *55* (38), 1040.
- (44) Pfeffer, M.; Löscher, T. Cases of Chikungunya Imported into Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal.*

*Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **2006**, *11* (3), E060316. 2.

- (45) Rezza, G.; Nicoletti, L.; Angelini, R.; Romi, R.; Finarelli, A.; Panning, M.; Cordioli, P.; Fortuna, C.; Boros, S.; Magurano, F.; et al. Infection with Chikungunya Virus in Italy: An Outbreak in a Temperate Region. *The Lancet* **2007**, *370* (9602), 1840–1846.
- (46) Weaver, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, *8* (6), e2921.
- (47) Nasci, R. S. Movement of Chikungunya Virus into the Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20* (8), 1394–1395.
- (48) Grandadam, M.; Caro, V.; Plumet, S.; Thiberge, J.-M.; Souarès, Y.; Failloux, A.-B.; Tolou, H. J.; Budelot, M.; Cosserrat, D.; Leparç-Goffart, I.; et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17* (5), 910–913.
- (49) Leparç-Goffart, I.; Nougairède, A.; Cassadou, S.; Prat, C.; de Lamballerie, X. Chikungunya in the Americas. *The Lancet* **2014**, 383 (9916), 514.
- (50) Kuehn BM. Chikungunya Virus Transmission Found in the United States: Us Health Authorities Brace for Wider Spread. *JAMA* **2014**, *312* (8), 776–777.
- (51) Mowatt, L.; Jackson, S. T. Chikungunya in the Caribbean: An Epidemic in the Making. *Infect. Dis. Ther.* **2014**, 1–6.
- (52) CIRE Antille Guyane. *Le Chikungunya En Guyane Bulletin Du 9 Au 22 Mars 2015 (S2015-11 et S2015-12)*; Bulletin 6 / 2015; 2015.
- (53) Morrison, T. E. Re-Emergence of Chikungunya Virus. *J. Virol.* **2014**, JVI.01432–14.
- (54) Roth, A.; Mercier, A.; Lepers, C.; Hoy, D.; Duituturaga, S.; Benyon, E.; Guillaumot, L.; Souarès, Y. Concurrent Outbreaks of Dengue, Chikungunya and Zika Virus Infections—an Unprecedented Epidemic Wave of Mosquito-Borne Viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **2013**, *19* (41).
- (55) Cao-Lormeau, V.-M.; Musso, D. Emerging Arboviruses in the Pacific. *The Lancet* **2014**, *384* (9954), 1571–1572.
- (56) Bureau de veille sanitaire. *Surveillance et Veille Sanitaire En Polynésie Française*; Semaine 12 2015; Polynésie française, 2015.
- (57) Mansuy, J.-M.; Grouteau, E.; Mengelle, C.; Claudet, I.; Izopet, J. Chikungunya in the Caribbean—Threat for Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20* (8), 1423–1425.
- (58) Schuffenecker, I.; Iteman, I.; Michault, A.; Murri, S.; Frangeul, L.; Vaney, M.-C.; Lavenir, R.; Pardigon, N.; Reynes, J.-M.; Pettinelli, F.; et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Med* **2006**, *3* (7), e263.
- (59) Tsetsarkin, K. A.; Vanlandingham, D. L.; McGee, C. E.; Higgs, S. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathog* **2007**, *3* (12), e201.
- (60) Tsetsarkin, K. A.; Chen, R.; Leal, G.; Forrester, N.; Higgs, S.; Huang, J.; Weaver, S. C. Chikungunya Virus Emergence Is Constrained in Asia by Lineage-Specific Adaptive Landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (19), 7872–7877.
- (61) Tsetsarkin, K. A.; Chen, R.; Yun, R.; Rossi, S. L.; Plante, K. S.; Guerbois, M.; Forrester, N.; Perng, G. C.; Sreekumar, E.; Leal, G.; et al. Multi-Peaked Adaptive Landscape for Chikungunya Virus Evolution Predicts Continued Fitness Optimization in *Aedes Albopictus* Mosquitoes. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4084.
- (62) Vega-Rúa, A.; Zouache, K.; Girod, R.; Failloux, A.-B.; Lourenço-de-Oliveira, R. High Level of Vector Competence of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J. Virol.* **2014**, *88* (11), 6294–6306.
- (63) Diallo, M.; Thonnon, J.; Traore-Lamizana, M.; Fontenille, D. Vectors of Chikungunya Virus in Senegal: Current Data and Transmission Cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *60* (2), 281–286.
- (64) Campbell, L. P.; Luther, C.; Moo-Llanes, D.; Ramsey, J. M.; Danis-Lozano, R.; Peterson, A. T. Climate Change Influences on Global Distributions of Dengue and Chikungunya Virus Vectors. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *370* (1665), 0135–0144.
- (65) Lambrechts, L.; Scott, T. W.; Gubler, D. J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes Albopictus* for Dengue Virus Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4* (5), e646.



- (66) Tsetsarkin, K. A.; Weaver, S. C. Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence. *PLoS Pathog* **2011**, *7* (12), e1002412.
- (67) Knudsen, A. B.; others. Global Distribution and Continuing Spread of *Aedes Albopictus*. *Parassitologia* **1995**, *37* (2-3), 91–97.
- (68) Li, Y.; Kamara, F.; Zhou, G.; Puthiyakunnon, S.; Li, C.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Yao, L.; Yan, G.; Chen, X.-G. Urbanization Increases *Aedes Albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, *8* (11), e3301.
- (69) Fischer, D.; Thomas, S. M.; Suk, J. E.; Sudre, B.; Hess, A.; Tjaden, N. B.; Beierkuhnlein, C.; Semenza, J. C. Climate Change Effects on Chikungunya Transmission in Europe: Geospatial Analysis of Vector's Climatic Suitability and Virus' Temperature Requirements. *Int J Health Geogr* **2013**, *12* (1), 51.
- (70) Proestos, Y.; Christophides, G. K.; Ergüler, K.; Tanarhte, M.; Waldock, J.; Lelieveld, J. Present and Future Projections of Habitat Suitability of the Asian Tiger Mosquito, a Vector of Viral Pathogens, from Global Climate Simulation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2015**, *370* (1665), 20130554.
- (71) Ministère des affaires sociales et de la santé. *Surveillance Du Moustique Aedes Albopictus En France Métropolitaine - Bilan 2013*; EID - Entente interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen: Corte, 2013.
- (72) Cardi, H. *Surveillance d'Aedes Albopictus En Corse - Bilan Entomologique 2012*; Agence régionale de santé de Corse: Corte, 2012.
- (73) Un cas suspect de chikungunya ou de dengue décelé chez un habitant de Bastia et de Sisco | Bastia | Corse-Matin <http://www.corsematin.com/article/bastia/un-cas-suspect-de-chikungunya-ou-de-dengue-decele-chez-un-habitant-de-bastia-et-de-si.1462850.html> (accessed Mar 9, 2015).
- (74) Moutailler, S.; Barré, H.; Vazeille, M.; Failloux, A.-B. Recently Introduced *Aedes Albopictus* in Corsica Is Competent to Chikungunya Virus and in a Lesser Extent to Dengue Virus. *Trop. Med. Int. Health* **2009**, *14* (9), 1105–1109.
- (75) Parashar, D.; Cherian, S. Antiviral Perspectives for Chikungunya Virus. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, e631642.
- (76) Vontas, J.; Kioulos, E.; Pavlidi, N.; Morou, E.; della Torre, A.; Ranson, H. Insecticide Resistance in the Major Dengue Vectors *Aedes Albopictus* and *Aedes Aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2012**, *104* (2), 126–131.
- (77) Alphey, L.; Benedict, M.; Bellini, R.; Clark, G. G.; Dame, D. A.; Service, M. W.; Dobson, S. L. Sterile-Insect Methods for Control of Mosquito-Borne Diseases: An Analysis. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2009**, *10* (3), 295–311.
- (78) Edelman, R.; Tacket, C. O.; Wasserman, S. S.; Bodison, S. A.; Perry, J. G.; Mangiafico, J. A. Phase II Safety and Immunogenicity Study of Live Chikungunya Virus Vaccine TSI-GSD-218. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *62* (6), 681–685.
- (79) Singh, P.; Chhabra, M.; Mittal, V.; Sharma, P.; Rizvi, M. A.; Chauhan, L.; Rai, A. Current Research and Clinical Trials for a Vaccine against Chikungunya Virus. *Vaccine Dev. Ther.* **2013**, 35–46.
- (80) Ahola, T.; Courderc, T.; Ng, L. F. P.; Hallengård, D.; Powers, A.; Lecuit, M.; Esteban, M.; Merits, A.; Roques, P.; Liljestrom, P. Therapeutics and Vaccines Against Chikungunya Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15* (4), 250–257.
- (81) Chang, L.-J.; Dowd, K. A.; Mendoza, F. H.; Saunders, J. G.; Sitar, S.; Plummer, S. H.; Yamshchikov, G.; Sarwar, U. N.; Hu, Z.; Enama, M. E.; et al. Safety and Tolerability of Chikungunya Virus-like Particle Vaccine in Healthy Adults: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *The Lancet* **2014**, *384* (9959), 2046–2052.
- (82) Kaur, P.; Chu, J. J. H. Chikungunya Virus: An Update on Antiviral Development and Challenges. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 969–983.
- (83) Jadav, S. S.; Korupolu, P.; Sinha, B. N.; Jayaprakash, V. Chikungunya Epidemiological Survey and Current Available Inhibitors. *J. Pharm. Chem.* **2014**, *1* (3), 59–67.
- (84) Rashad, A. A.; Mahalingam, S.; Keller, P. A. Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2013**, *57* (4), 1147–1166.
- (85) Coombs, K.; Mann, E.; Edwards, J.; Brown, D. T. Effects of Chloroquine and Cytochalasin B on the Infection of Cells by Sindbis Virus and Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* **1981**, *37* (3), 1060–1065.
- (86) Helenius, A.; Marsh, M.; White, J. Inhibition of Semliki Forest Virus Penetration by Lysosomotropic Weak

Bases. *J. Gen. Virol.* **1982**, *58 Pt 1*, 47–61.

- (87) Brighton, S. W. Chloroquine Phosphate Treatment of Chronic Chikungunya Arthritis. An Open Pilot Study. *South Afr. Med. J. Suid-Afr. Tydskr. Vir Geneesk.* **1984**, *66* (6), 217–218.
- (88) Maheshwari, R. K.; Srikantan, V.; Bhartiya, D. Chloroquine Enhances Replication of Semliki Forest Virus and Encephalomyocarditis Virus in Mice. *J. Virol.* **1991**, *65* (2), 992–995.
- (89) De Lamballerie, X.; Boisson, V.; Reynier, J.-C.; Enault, S.; Charrel, R. N.; Flahault, A.; Roques, P.; Le Grand, R. On Chikungunya Acute Infection and Chloroquine Treatment. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* **2008**, *8* (6), 837–839.
- (90) Padmakumar, B.; Jayan, J. B.; Menon, R. M.; Krishnankutty, B.; Payippallil, R.; Nisha, R. Comparative Evaluation of Four Therapeutic Regimes in Chikungunya Arthritis: A Prospective Randomized Parallel-Group Study. *Indian J. Rheumatol.* **2009**, *4* (3), 94–101.
- (91) Chopra, A.; Saluja, M.; Venugopalan, A. Effectiveness of Chloroquine and Inflammatory Cytokine Response in Patients with Early Persistent Musculoskeletal Pain and Arthritis Following Chikungunya Virus Infection. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **2014**, *66* (2), 319–326.
- (92) Briolant, S.; Garin, D.; Scaramozzino, N.; Jouan, A.; Crance, J. M. In Vitro Inhibition of Chikungunya and Semliki Forest Viruses Replication by Antiviral Compounds: Synergistic Effect of Interferon- $\alpha$  and Ribavirin Combination. *Antiviral Res.* **2004**, *61* (2), 111–117.
- (93) Ravichandran, R.; Manian, M. Ribavirin Therapy for Chikungunya Arthritis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2008**, *2* (02), 140–142.
- (94) Rothan, H. A.; Bahrani, H.; Mohamed, Z.; Teoh, T. C.; Shankar, E. M.; Rahman, N. A.; Yusof, R. A Combination of Doxycycline and Ribavirin Alleviated Chikungunya Infection. *PLoS ONE* **2015**, *10* (5), e0126360.
- (95) Delogu, I.; Pastorino, B.; Baronti, C.; Nougairède, A.; Bonnet, E.; de Lamballerie, X. In Vitro Antiviral Activity of Arbidol against Chikungunya Virus and Characteristics of a Selected Resistant Mutant. *Antiviral Res.* **2011**, *90* (3), 99–107.
- (96) Herrero, L. J.; Taylor, A.; Mahalingam, S. Antivirals: Bindarit—The Future in Alphavirus Treatment. *J Antivir Antiretrovir* **2013**, *5*.
- (97) Mora, E.; Guglielmotti, A.; Biondi, G.; Sassone-Corsi, P. Bindarit: An Anti-Inflammatory Small Molecule That Modulates the NF $\kappa$ B Pathway. *Cell Cycle* **2012**, *11* (1), 159–169.
- (98) Rulli, N. E.; Rolph, M. S.; Srikiatkachorn, A.; Anantapreecha, S.; Guglielmotti, A.; Mahalingam, S. Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204* (7), 1026–1030.
- (99) Chen, W.; Foo, S.-S.; Taylor, A.; Lulla, A.; Merits, A.; Hueston, L.; Forwood, M. R.; Walsh, N. C.; Sims, N. A.; Herrero, L. J.; et al. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection. *J. Virol.* **2015**, *89* (1), 581–593.
- (100) Delang, L.; Guerrero, N. S.; Tas, A.; Quérat, G.; Pastorino, B.; Froeyen, M.; Dallmeier, K.; Jochmans, D.; Herdewijn, P.; Bello, F.; et al. Mutations in the Chikungunya Virus Non-Structural Proteins Cause Resistance to Favipiravir (T-705), a Broad-Spectrum Antiviral. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69* (10), 2770–2784.
- (101) Lucas-Hourani, M.; Lupan, A.; Desprès, P.; Thoret, S.; Pamard, O.; Dubois, J.; Guillou, C.; Tangy, F.; Vidalain, P.-O.; Munier-Lehmann, H. A Phenotypic Assay to Identify Chikungunya Virus Inhibitors Targeting the Nonstructural Protein nsP2. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18* (2), 172–179.
- (102) Cruz, D. J. M.; Bonotto, R. M.; Gomes, R. G. B.; da Silva, C. T.; Taniguchi, J. B.; No, J. H.; Lombardot, B.; Schwartz, O.; Hansen, M. A. E.; Freitas-Junior, L. H. Identification of Novel Compounds Inhibiting Chikungunya Virus-Induced Cell Death by High Throughput Screening of a Kinase Inhibitor Library. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (10), e2471.
- (103) Gigante, A.; Canela, M.-D.; Delang, L.; Priego, E.-M.; Camarasa, M.-J.; Querat, G.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Pérez-Pérez, M.-J. Identification of [1, 2, 3] Triazolo [4, 5-D] Pyrimidin-7 (6 H)-Ones as Novel Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (10), 4000–4008.
- (104) Kaur, P.; Thiruchelvan, M.; Lee, R. C. H.; Chen, H.; Chen, K. C.; Ng, M. L.; Chu, J. J. H. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (1), 155–167.
- (105) Quintás-Cardama, A.; Cortes, J. Homoharringtonine for the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia.

*Expet Opin Pharmacother* **2008**, *9* (6).

- (106) Su, H.-Y.; Waldron, R.; Gong, R.; Pandol, S.; Lugea, A. Rottlerin Induces ER Stress-Mediated Cell Death in Pancreatic Stellate Cells. *Cancer Res.* **2015**, *75* (15 Supplement), 1769–1769.
- (107) Bertoli, S.; Récher, C. Nouvelles Approches Thérapeutiques Dans Les Leucémies Aiguës Myéloïdes. *Rev. Francoph. Lab.* **2015**, *2015* (471), 65–73.
- (108) Bassetto, M.; De Burghgraeve, T.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Brancale, A. Computer-Aided Design and Evaluation of Novel Anti-CHIKV Compounds. *Antiviral Res.* **2011**, *90* (2), A67.
- (109) Bassetto, M.; De Burghgraeve, T.; Delang, L.; Massarotti, A.; Coluccia, A.; Zonta, N.; Gatti, V.; Colombano, G.; Sorba, G.; Silvestri, R.; et al. Computer-Aided Identification, Design and Synthesis of a Novel Series of Compounds with Selective Antiviral Activity against Chikungunya Virus. *Antiviral Res.* **2013**, *98* (1), 12–18.
- (110) Jadav, S. S.; Sinha, B. N.; Hilgenfeld, R.; Pastorino, B.; de Lamballerie, X.; Jayaprakash, V. Thiazolidone Derivatives as Inhibitors of Chikungunya Virus. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 172–178.
- (111) Hwu, J. R.; Kapoor, M.; Tsay, S.-C.; Lin, C.-C.; Hwang, K. C.; Horng, J.-C.; Chen, I.-C.; Shieh, F.-K.; Leyssen, P.; Neyts, J. Benzouracil–coumarin–arene Conjugates as Inhibiting Agents for Chikungunya Virus. *Antiviral Res.* **2015**, *118*, 103–109.
- (112) Khan, M.; Dhanwani, R.; Patro, I. K.; Rao, P. V. L.; Parida, M. M. Cellular IMPDH Enzyme Activity Is a Potential Target for the Inhibition of Chikungunya Virus Replication and Virus Induced Apoptosis in Cultured Mammalian Cells. *Antiviral Res.* **2011**, *89* (1), 1–8.
- (113) Weber, C.; Sliva, K.; von Rhein, C.; Kümmerer, B. M.; Schnierle, B. S. The Green Tea Catechin, Epigallocatechin Gallate Inhibits Chikungunya Virus Infection. *Antiviral Res.* **2014**, *113*, 1–3.
- (114) Raveh, A.; Delekt, P. C.; Dobry, C. J.; Peng, W.; Schultz, P. J.; Blakely, P. K.; Tai, A. W.; Matainaho, T.; Irani, D. N.; Sherman, D. H.; et al. Discovery of Potent Broad Spectrum Antivirals Derived from Marine Actinobacteria. *PLoS ONE* **2013**, *8* (12), e82318.
- (115) Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Nebigil, C.; Désaubry, L. Recent Advances in the Biology and Chemistry of the Flavaglines. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (6), 1857–1864.
- (116) Allard, P.-M.; Leyssen, P.; Martin, M.-T.; Bourjot, M.; Dumontet, V.; Eydoux, C.; Guillemot, J.-C.; Canard, B.; Poullain, C.; Guéritte, F.; et al. Antiviral Chlorinated Daphnane Diterpenoid Orthoesters from the Bark and Wood of *Trigonostemon Cherrieri*. *Phytochemistry* **2012**, *84*, 160–168.
- (117) Bourjot, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Litaudon, M. Trigocherrierin A, a Potent Inhibitor of Chikungunya Virus Replication. *Molecules* **2014**, *19* (3), 3617–3627.
- (118) Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Prostratin and 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Are Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (12), 2183–2187.
- (119) Corlay, N.; Delang, L.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Clerc, P.; Smadja, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Tigliane Diterpenes from *Croton Mauritianus* as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *Fitoterapia* **2014**, *97*, 87–91.
- (120) Olivon, F.; Palenzuela, H.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Roussi, F.; Grondin, I.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Antiviral Activity of Flexibilane and Tigliane Diterpenoids from *Stillingia Lineata*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (5), 1119–1128.
- (121) Allard, P.-M.; Martin, M.-T.; Tran Huu Dau, M.-E.; Leyssen, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Trigocherrin A, the First Natural Chlorinated Daphnane Diterpene Orthoester from *Trigonostemon Cherrieri*. *Org. Lett.* **2012**, *14* (1), 342–345.
- (122) Evans, F. J.; Schmidt, R. J. An Assay Procedure for the Comparative Irritancy Testing of Esters in the Tigliane and Daphnane Series. *Inflammation* **1979**, *3* (3), 215–223.
- (123) AIDS Research Alliance. Moving Ahead: Prostratin Experiments Requested by the FDA <http://aidsresearch.org/news-events/news/moving-ahead-prostratin-experiments-requested-by-the-fda> (accessed Apr 3, 2015).
- (124) AIDS Research Alliance. Preparing to Test Prostratin on Human Reservoir Cells <http://aidsresearch.org/news-events/news/getting-ready-to-test-prostratin-on-the-reservoir-cells> (accessed Jun 20, 2015).
- (125) Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Da Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity Hotspots for

Conservation Priorities. *Nature* **2000**, *403* (6772), 853–858.

- (126) Médail, F.; Quézel, P. Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. *Conserv. Biol.* **1999**, *13* (6), 1510–1513.
- (127) Verlaque R; Médail F; Quézel P; Babinot JF. Endémisme Végétal et Paléogéographie Dans Le Bassin Méditerranéen. *Geobios* **1997**, No. 21, 159–166.
- (128) Jeanmonod, D.; Gamisans, J. *Flora Corsica*, Edisud 921.; Aix-En-Provence, 2007; Vol. 1.
- (129) Gamisans, J.; Sierra i Rafols, E.; Nuet i Badia, J. *Compléments au prodrome de la flore corse, Annexe I éd. par D. Jeanmonod & H.M. Burdet. - Genève: Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. Compléments au prodrome de la Flore corse*; Ed. des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève: Genève, Suisse, 1991.
- (130) The Angiosperm Phylogeny Group. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**, *161* (2), 105–121.
- (131) Govaerts, R.; Frodin, D. G.; Radcliffe-Smith, A.; Carter, S. *World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)*; Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.
- (132) Jussieu, A.-L. de. *Antonii Laurentii de Jussieu, ... Genera plantarum secundum naturales disposita, juxta methodum in horto regio parisiensi exarata, anno 1774 ([Reprod.])*; Herissant et T. Barrois (Parisiis), 1789.
- (133) Webster, G. L. The Saga of the Spurges: A Review of Classification and Relationships in the Euphorbiales. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94* (1-2), 3–46.
- (134) Webster, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1994**, *81* (1), 33–144.
- (135) (APG), A. P. G. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II. *Bot J Linn Soc* **2003**, *141*, 399–436.
- (136) 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.* **2005**, *92* (8), 1397–1420.
- (137) Tokuoka, T. Molecular Phylogenetic Analysis of Euphorbiaceae Sensu Stricto Based on Plastid and Nuclear DNA Sequences and Ovule and Seed Character Evolution. *J. Plant Res.* **2007**, *120* (4), 511–522.
- (138) Schultes, R. E. Members of Euphorbiaceae in Primitive and Advanced Societies. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94* (1-2), 79–95.
- (139) Pandey, V. C.; Singh, K.; Singh, J. S.; Kumar, A.; Singh, B.; Singh, R. P. *Jatropha Curcas*: A Potential Biofuel Plant for Sustainable Environmental Development. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16* (5), 2870–2883.
- (140) Sehgal, P.; Khan, M.; Kumar, O.; Vijayaraghavan, R. Purification, Characterization and Toxicity Profile of Ricin Isoforms from Castor Beans. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48* (11), 3171–3176.
- (141) Van Duuren, B. L.; Orris, L.; Arroyo, E. Tumour-Enhancing Activity of the Active Principles of *Croton Tiglium* L. *Nature* **1963**, *200* (4911), 1115–1116.
- (142) Rohrschneider, L. R.; Boutwell, R. K. Phorbol Esters, Fatty Acids and Tumour Promotion. *Nature* **1973**, *243* (128), 212–213.
- (143) Horn, J. W.; Xi, Z.; Riina, R.; Peirson, J. A.; Yang, Y.; Dorsey, B. L.; Berry, P. E.; Davis, C. C.; Wurdack, K. J. Evolutionary Bursts in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) Are Linked with Photosynthetic Pathway. *Evolution* **2014**, *68* (12), 3485–3504.
- (144) Berry, P. E.; Hipp, A. L.; Wurdack, K. J.; Ee, B. V.; Riina, R. Molecular Phylogenetics of the Giant Genus *Croton* and Tribe Crotonae (Euphorbiaceae Sensu Stricto) Using ITS and TRNL-TRNF DNA Sequence Data. *Am. J. Bot.* **2005**, *92* (9), 1520–1534.
- (145) Frodin, D. G. History and Concepts of Big Plant Genera. *Taxon* **2004**, *53* (3), 753.
- (146) Halle, F.; Oldeman, R. A. A.; Tomlinson, P. B. *Tropical Trees and Forests: An Architectural Analysis*; Springer Science & Business Media, 2012.
- (147) Smith A.R; Tutin T.G. *Euphorbia L.*; Flora Europaea; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1968.
- (148) Kotaro, K. Plant Latex and Other Exudates as Plant Defense Systems: Roles of Various Defense Chemicals and Proteins Contained Therein. *Phytochemistry* **2011**, *72* (13), 1510–1530.
- (149) Souza, D. P.; Freitas, C. D. T.; Pereira, D. A.; Nogueira, F. C.; Silva, F. D. A.; Salas, C. E.; Ramos, M. V. Laticifer Proteins Play a Defensive Role against Hemibiotrophic and Necrotrophic Phytopathogens. *Planta* **2011**, *234* (1), 183–193.
- (150) Sytwala, S.; Günther, F.; Melzig, M. F. Lysozyme- and Chitinase Activity in Latex Bearing Plants of Genus

- Euphorbia - a Contribution to Plant Defense Mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *95*, 35–40.
- (151) 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.* **2007**, *94* (10), 1612–1629.
- (152) Croizat, L. On the Classification of Euphorbia II. How Should the Cyathium Be Interpreted? *Bull. Torrey Bot. Club* **1937**, 523–536.
- (153) Yang, Y. Phylogenetics and Evolution of Euphorbia Subgenus Chamaesyce., 2012.
- (154) Sage, R. F.; Christin, P.-A.; Edwards, E. J. The C4 Plant Lineages of Planet Earth. *J. Exp. Bot.* **2011**, err048.
- (155) Horn, J. W.; van Ee, B. W.; Morawetz, J. J.; Riina, R.; Steinmann, V. W.; Berry, P. E.; Wurdack, K. J. Phylogenetics and the Evolution of Major Structural Characters in the Giant Genus Euphorbia L. (Euphorbiaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2012**, *63* (2), 305–326.
- (156) Appendino, G.; Szallasi, A. Euphorbium: Modern Research on Its Active Principle, Resiniferatoxin, Revives an Ancient Medicine. *Life Sci.* **1997**, *60* (10), 681–696.
- (157) Secundus, G. P.; Hardouin, J. *Naturalis Historia: Libri 20 - 32*; Franciscus Muguet, 1685; Vol. 4.
- (158) Dioscorides Pedanius. *De Materia Medica*; IBIDIS: Johannesburg, South Africa, 2000.
- (159) *Dictionnaire des sciences médicales*; C.L.F. Panckoucke: Paris, 1821.
- (160) Steinmann, V. W.; Porter, J. M. Phylogenetic Relationships in Euphorbieae (Euphorbiaceae) Based on ITS and ndhF Sequence Data. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **2002**, 453–490.
- (161) Bruyns, P. V.; Mapaya, R. J.; Hedderson, T. A New Subgeneric Classification for Euphorbia (Euphorbiaceae) in Southern Africa Based on ITS and psbA-trnH Sequence Data. *Taxon* **2006**, *55* (2), 397–420.
- (162) Park, K.-R.; Jansen, R. K. A Phylogeny of Euphorbieae Subtribe Euphorbiinae (Euphorbiaceae) Based on Molecular Data. *J. Plant Biol.* **2007**, *50* (6), 644–649.
- (163) Zimmermann, N. F. A.; Ritz, C. M.; Hellwig, F. H. Further Support for the Phylogenetic Relationships within Euphorbia L. (Euphorbiaceae) from nrITS and trnL–trnF IGS Sequence Data. *Plant Syst. Evol.* **2010**, *286* (1-2), 39–58.
- (164) Dorsey, B. L.; Haevermans, T.; Aubriot, X.; Morawetz, J. J.; Riina, R.; Steinmann, V. W.; Berry, P. E. Phylogenetics, Morphological Evolution, and Classification of Euphorbia Subgenus Euphorbia. *Taxon* **2013**, *62* (2), 291–315.
- (165) Riina, R.; Peirson, J. A.; Geltman, D. V.; Molero, J.; Frajman, B.; Pahlevani, A.; Barres, L.; Morawetz, J. J.; Salmaki, Y.; Zarre, S.; et al. A Worldwide Molecular Phylogeny and Classification of the Leafy Spurges, Euphorbia Subgenus Esula (Euphorbiaceae). *Taxon* **2013**, *62* (2), 316–342.
- (166) Peirson, J. A.; Bruyns, P. V.; Riina, R.; Morawetz, J. J.; Berry, P. E. A Molecular Phylogeny and Classification of the Largely Succulent and Mainly African Euphorbia Subg. Athymalus (Euphorbiaceae). *Taxon* **2013**, *62* (6), 1178–1199.
- (167) Frajman, B.; Schönswetter, P. Giants and Dwarfs: Molecular Phylogenies Reveal Multiple Origins of Annual Spurges within Euphorbia Subg. Esula. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2011**, *61* (2), 413–424.
- (168) Barres, L.; Vilatersana, R.; Molero, J.; Susanna, A.; Galbany-Casals, M. Molecular Phylogeny of Euphorbia Subg. Esula Sect. Aphyllis (Euphorbiaceae) Inferred from nrDNA and cpDNA Markers with Biogeographic Insights. *Taxon* **2011**, *60* (3), 705–720.
- (169) La Liste rouge des espèces menacées en France - Comité français de l'UICN <http://www.uicn.fr/liste-rouge-france.html> (accessed Sep 22, 2015).
- (170) Migliore, J.; Baumel, A.; Juin, M.; Diadema, K.; Hugot, L.; Verlaque, R.; Médail, F. Genetic Diversity and Structure of a Mediterranean Endemic Plant in Corsica (*Mercurialis Corsica*, Euphorbiaceae). *Popul. Ecol.* **2011**, *53* (4), 573–586.
- (171) Cazin. *Traité Des Plantes Médicinales*; uses.plantnet-project.org, 1868.
- (172) Dodoens, R.; Clusius, C. *Histoire des plantes, en laquelle est contenue l'histoire entière des herbes...*; de l'imprimerie de Iean Loë, 1557.
- (173) Geoffroy, E. F. *Tractatus de materia medica: sive de medicamentorum simplicium historia, virtute, delectu et usu*, Apud Nicolaum Pezzana.; 1756.
- (174) Daléchamps, J.; Moulins, J. D. *Histoire générale des plantes*; chez les heritiers Guillaume Rouille, 1615.
- (175) Mattioli, P. *Commentaires de M. Pierre André Matthioli médecin sennois, sur les six livres de Ped. Dioscoride Anazarbeen de la matière médicinale : avec certaines tables médicinales, tant des qualités & vertus des*

*simples médicamens, que des remèdes pour toutes maladies, qui peuvent avenir au corps humain, comme aussi des sentences, mots & matières traitées esdicts commentaires ([Reprod.]) / mis en français sur la dernière éd. latine de l'auteur par M. Jean des Moulins, docteur en médecine; par Guillaume Rouille (Lyon), 1579.*

(176) Félice, F. B. de; Diderot, D. *Encyclopedie ou dictionnaire universel raisonne des connoissances humaines mis en ordre par M. De Felice*; 1775.

(177) Dash, B.; Kashyap, L. *Materia Medica of Ayurveda: Based on Ayurveda Saukhyam of Toḍarānanda*; Concept, 1980.

(178) Mali, P. Y.; Panchal, S. S. A Review on Phyto-Pharmacological Potentials of Euphorbia Thymifolia L. *Anc. Sci. Life* **2013**, 32 (3), 165–172.

(179) Adolf, W.; Chanai, S.; Hecker, E. 3-O-Angeloylingenol, the Toxic and Skin Irritant Factor from Latex of Euphorbia Anitiquorum L. (euphorbiaceae) and from a Derived Thai Purgative and Anthelmintic (vermifuge) Drug. **1983**, 9, 081–088.

(180) Ayurvedic Medicine: An Introduction <https://nccih.nih.gov/health/ayurveda/introduction.htm> (accessed Sep 30, 2015).

(181) Hempen, C.-H.; (MD.), T. F. *A Materia Medica for Chinese Medicine: Plants, Minerals, and Animal Products*; Elsevier Health Sciences, 2009.

(182) Guarrera, P. M.; Forti, G.; Marignoli, S. Ethnobotanical and Ethnomedicinal Uses of Plants in the District of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 96 (3), 429–444.

(183) Lieutaghi, P. *Petite ethnobotanique méditerranéenne*; Actes Sud: Arles (Bouches-du-Rhône), 2006.

(184) Bruni, A.; Ballero, M.; Poli, F. Quantitative Ethnopharmacological Study of the Campidano Valley and Urzulei District, Sardinia, Italy. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, 57 (2), 97–124.

(185) Leto, C.; Tuttolomondo, T.; La Bella, S.; Licata, M. Ethnobotanical Study in the Madonie Regional Park (Central Sicily, Italy)—Medicinal Use of Wild Shrub and Herbaceous Plant Species. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, 146 (1), 90–112.

(186) Conrad, M. *Les plantes sauvages dans la vie quotidienne des Corses: essai d'ethnobotanique*, Société des sciences historiques et naturelles de la Corse.; Bastia, 1973.

(187) Conrad, M. *Le maquis de Filosorma et Essai d'Ethnobotanique III*, Bulletin de la Société des Sciences Historiques et Naturelles de la Corse.; Bastia, 1977; Vol. 4<sup>o</sup> tr.

(188) Ballero, M.; Piu, G.; Appendino, G. Immediate Urticaria to Euphorbiaceae. *Allergy* **1999**, 54 (1), 91–92.

(189) Buchwald, A. Spurge Contact Dermatitis. *J. Emerg. Med.* **2011**, 40 (6), 680–681.

(190) Otang, W. M.; Grierson, D. S.; Afolayan, A. J. A Survey of Plants Responsible for Causing Irritant Contact Dermatitis in the Amathole District, Eastern Cape, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, 157, 274–284.

(191) Almiş, H.; Bucak, I. H.; Tekin, M.; Konca, Ç.; Turgut, M. Acute Irritant Bullous Contact Dermatitis Caused by Euphorbia Helioscopia. *Contact Dermatitis* **2015**, 72 (3), 184–185.

(192) Nothias-Scaglia, Louis-Félix. Observation Personnelle.

(193) Sofat, B. K.; Sood, G. C.; Chandel, R. D.; Mehrotra, S. K. Euphorbia Royleana Latex Keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* **1972**, 74 (4), 634–637.

(194) Eke, T.; Al-Husainy, S.; Raynor, M. K. The Spectrum of Ocular Inflammation Caused by Euphorbia Plant Sap. *Arch. Ophthalmol.* **2000**, 118 (1), 13–16.

(195) Pr. Giovanni Appendino. Communication Personelle à L'auteur, 2012.

(196) Shlamovitz, G. Z.; Gupta, M.; Diaz, J. A. A Case of Acute Keratoconjunctivitis from Exposure to Latex of Euphorbia Tirucalli (Pencil Cactus). *J. Emerg. Med.* **2009**, 36 (3), 239–241.

(197) Fortin, J. L.; Bitar, M.-P.; N'Guedia Kenfack, F.; Jabour, S.; Fortin, L.; Coste, S.; Savio, C. Toxicité Par Euphorbia Lathyris : Efficacité Des Solutions Polyamphotères de Lavage. *Toxicol. Anal. Clin.* **2014**, 26 (4), 221.

(198) Appendino, G.; Tron, G. C.; Cravotto, G.; Palmisano, G.; Jakupovic, J. An Expeditious Procedure for the Isolation of Ingenol from the Seeds of Euphorbia Lathyris. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62 (1), 76–79.

(199) Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Tron, G. C.; Appendino, G. Bisnorsesquiterpenoids from Euphorbia Resinifera Berg. and an Expeditious Procedure to Obtain Resiniferatoxin from Its Fresh Latex. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002 (1), 71–78.

(200) Appendino, G.; Della Porta, C.; Conseil, G.; Sterner, O.; Mercalli, E.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. A New P-Glycoprotein Inhibitor from the Capar Spurge (Euphorbia Lathyris). *J. Nat. Prod.* **2003**, 66 (1), 140–142.

- (201) Ponsinet, G.; Ourisson, G. Études Chimio-Taxonomiques Dans La Famille Des Euphorbiacées—I: Introduction Générale et Separation et Identification Des Triterpènes Tétracycliques Monohydroxylés Naturels. *Phytochemistry* **1965**, *4* (6), 799–811.
- (202) Hecker, E. Cocarcinogenic Principles from the Seed Oil of Croton Tiglium and from Other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* **1968**, *28* (11), 2338–2348.
- (203) Adolf, W.; Hecker, E.; Balmain, A.; Lhomme, M. F.; Nakatani, Y.; Ourisson, G.; Ponsinet, G.; Pryce, R. J.; Santhanakrishnan, T. S.; Matyukhina, L. G.; et al. “Euphorbiasteroid” (Epoxy-Lathyrol) A New Tricyclic Diterpene from Euphorbia Lathyris L. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11* (26), 2241–2244.
- (204) Hecker, E.; Schmidt, R. The Irritants and Cocarcinogens of Croton Tiglium L. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., Eds.; Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Springer Vienna, 1974; pp 377–467.
- (205) Evans, F. J.; Kinghorn, A. D. A Comparative Phytochemical Study of the Diterpenes of Some Species of the Genera Euphorbia and Elaeophorbia (Euphorbiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **1977**, *74* (1), 23–35.
- (206) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus Euphorbia. *Chem Rev* **2008**, *108* (10), 4295–4327.
- (207) Vasas, A.; Rédei, D.; Csupor, D.; Molnár, J.; Hohmann, J. Diterpenes from European Euphorbia Species Serving as Prototypes for Natural-Product-Based Drug Discovery. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (27), 5115–5130.
- (208) Vasas, A.; Hohmann, J. Euphorbia Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (17), 8579–8612.
- (209) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3. ed., repr. with corr., repr.; Wiley: Chichester, West Sussex, England ; New York, NY, USA, 2012.
- (210) Lanzotti, V. Diterpenes for Therapeutic Use. In *Natural Products*; Springer, 2013; pp 3173–3191.
- (211) Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahn, H. Glycerinaldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (11), 2564–2566.
- (212) Roberts, S. C. Production and Engineering of Terpenoids in Plant Cell Culture. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (7), 387–395.
- (213) Dubey, V. S.; Bhalla, R.; Luthra, R. An Overview of the Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis in Plants. *J. Biosci.* **2003**, *28* (5), 637–646.
- (214) 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 (Mosc.)* **1970**, *9* (1), 70–79.
- (215) Moesta, P.; West, C. A. Casbene Synthetase: Regulation of Phytoalexin Biosynthesis in Ricinus Communis L. Seedlings: Purification of Casbene Synthetase and Regulation of Its Biosynthesis during Elicitation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *238* (1), 325–333.
- (216) Schmidt, R. The Biosynthesis of Tigliane and Related Diterpenoids; an Intriguing Problem. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94* (1-2), 221–230.
- (217) Kirby, J.; Nishimoto, M.; Park, J. G.; Withers, S. T.; Nowroozi, F.; Behrendt, D.; Rutledge, E. J. G.; Fortman, J. L.; Johnson, H. E.; Anderson, J. V.; et al. Cloning of Casbene and Neocembrene Synthases from Euphorbiaceae Plants and Expression in Saccharomyces Cerevisiae. *Phytochemistry* **2010**, *71* (13), 1466–1473.
- (218) Sato, S.; Hirakawa, H.; Isobe, S.; Fukai, E.; Watanabe, A.; Kato, M.; Kawashima, K.; Minami, C.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; et al. Sequence Analysis of the Genome of an Oil-Bearing Tree, Jatropha Curcas L. *DNA Res.* **2010**, dsq030.
- (219) Nakano, Y.; Ohtani, M.; Polsri, W.; Usami, T.; Sambongi, K.; Demura, T. Characterization of the Casbene Synthase Homolog from Jatropha (Jatropha Curcas L.). *Plant Biotechnol.* **2012**, *29* (2), 185–189.
- (220) King, A. J.; Brown, G. D.; Gilday, A. D.; Larson, T. R.; Graham, I. A. Production of Bioactive Diterpenoids in the Euphorbiaceae Depends on Evolutionarily Conserved Gene Clusters. *Plant Cell* **2014**, *26* (8), 3286–3298.
- (221) Chan, A. P.; Crabtree, J.; Zhao, Q.; Lorenzi, H.; Orvis, J.; Puiiu, D.; Melake-Berhan, A.; Jones, K. M.; Redman, J.; Chen, G.; et al. Draft Genome Sequence of the Oilseed Species Ricinus Communis. *Nat. Biotechnol.*



2010, 28 (9), 951–956.

- (222) Rontein, D.; Onillon, S.; Herbette, G.; Lesot, A.; Werck-Reichhart, D.; Sallaud, C.; Tissier, A. CYP725A4 from Yew Catalyzes Complex Structural Rearrangement of Taxa-4(5),11(12)-Diene into the Cyclic Ether 5(12)-Oxa-3(11)-Cyclotaxane. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (10), 6067–6075.
- (223) Pickard, W. F. Laticifers and Secretory Ducts: Two Other Tube Systems in Plants. *New Phytol.* **2008**, 177 (4), 877–888.
- (224) Pintus, F.; Medda, R.; Rinaldi, A. C.; Spanò, D.; Floris, G. Euphorbia Latex Biochemistry: Complex Interactions in a Complex Environment. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* **2010**, 144 (2), 381–391.
- (225) Nothias-Scaglia, Louis-Félix. Observation Personnelle de L'auteur Dans Le Cap Corse.
- (226) Appendino, G.; Jakupovic, S.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Milon, V.; Ballero, M. Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbia Semiperfoliata. *J Nat Prod* **1998**, 61 (6), 749–756.
- (227) Appendino, G.; Spagliardi, P.; Ballero, M.; Seu, G. Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbia Hyberna L. Subsp. Insularis and Their Reaction with Oxyphilic Reagents. *Fitoterapia* **2002**, 73 (7-8), 576–582.
- (228) Zechmeister, K.; Röhrli, M.; Brandl, F.; Hechtfisher, S.; Hoppe, W.; Hecker, E.; Adolf, W.; Kubinyi, H. Röntgenstrukturanalyse Eines Neuen Makrozyklischen Diterpenesters Aus Der Springwolfsmilch (Euphorbia Lathyris L.). *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11 (35), 3071–3073.
- (229) Tian, Y.; Xu, W.; Zhu, C.; Lin, S.; Li, Y.; Xiong, L.; Wang, S.; Wang, L.; Yang, Y.; Guo, Y.; et al. Lathyrane Diterpenoids from the Roots of Euphorbia Micractina and Their Biological Activities. *J Nat Prod* **2011**, 74 (5), 1221–1229.
- (230) Xu, J.; Jin, D.; Song, H.; Guo, Y.; He, Y. Lathyrane Diterpenes from Euphorbia Prolifera and Their Inhibitory Activities on LPS-Induced NO Production. *Fitoterapia* **2012**, 83 (7), 1205–1209.
- (231) Jiao, W.; Wan, Z.; Chen, S.; Lu, R.; Chen, X.; Fang, D.; Wang, J.; Pu, S.; Huang, X.; Gao, H.; et al. Lathyrol Diterpenes as Modulators of P-Glycoprotein Dependent Multidrug Resistance: Structure–Activity Relationship Studies on Euphorbia Factor L3 Derivatives. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (9), 3720–3728.
- (232) Jiao, W.; Yu, K. B.; Lu, R. H. Configuration Confirmation of Euphorbia Factor L-1 by Single-Crystal X-Ray Diffraction. *Chin. J. Struct. Chem.* **2008**, 27 (12), 1431–1434.
- (233) Kupchan, S. M.; Sigel, C. W.; Matz, M. J.; Saenz Renauld, J. A.; Haltiwanger, R. C.; Bryan, R. F. Jatrophone, a Novel Macrocyclic Diterpenoid Tumor Inhibitor from Jatropha Gossypifolia. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92 (14), 4476–4477.
- (234) Yamamura, S.; Kosemura, S.; Ohba, S.; Ito, M.; Saito, Y. The Isolation and Structures of Euphoscopins a and B. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22 (52), 5315–5318.
- (235) Manners, G. D.; Wong, R. Y. The Absolute Stereochemical Characterization of Two New Jatrophane Diterpenes from Euphorbia Esula. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1985**, 2075–2081.
- (236) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retailliau, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Costa, J.; Litaudon, M. Jatrophane Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77 (6), 1505–1512.
- (237) Wang, H.-B.; Wang, X.-Y.; Liu, L.-P.; Qin, G.-W.; Kang, T.-G. Tigliane Diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae Families. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (9), 2975–3011.
- (238) Opferkuch, H. J.; Hecker, E. On the Active Principles of the Spurge Family (Euphorbiaceae). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1982**, 103 (3), 255–268.
- (239) Evans, F. J.; Taylor, S. E. Pro-Inflammatory, Tumor-Promoting and Anti-Tumour Diterpenes of the Plants of Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Fortschritte Chem. Org. Naturstoffe* **1983**, 44, 1–99.
- (240) Krauter, G.; Von Der Lieth, C.-W.; Schmidt, R.; Hecker, E. Structure/Activity Relationships of Polyfunctional Diterpenes of the Tigliane Type. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 242 (2), 417–427.
- (241) Das, J.; Rahman, G. M. C1 Domains: Structure and Ligand-Binding Properties. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (24), 12108–12131.
- (242) Seip, E. H.; Hecker, E. Lathyrane Type Diterpenoid Esters from Euphorbia Characias. *Phytochemistry* **1983**, 22 (8), 1791–1795.
- (243) Seip, E. H.; Hecker, E. Derivatives of Characiol, Macrocyclic Diterpene Esters of the Jatrophane Type from Euphorbia Characias. *Phytochemistry* **1984**, 23 (8), 1689–1694.
- (244) Hohmann, J.; Vasas, A.; Günther, G.; Dombi, G.; Blazsó, G.; Falkay, G.; Máthé, I.; Jerkovich, G. Jatrophane

- Diterpenoids from Euphorbia Peplus. *Phytochemistry* **1999**, *51* (5), 673–677.
- (245) Corea, G.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. Jatrophone Diterpenes from Euphorbia Spp. as Modulators of Multidrug Resistance in Cancer Therapy. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8* (2), 431–447.
- (246) Ferreira, M.-J. U.; Duarte, N.; Reis, M.; Madureira, A. M.; Molnár, J. Euphorbia and Momordica Metabolites for Overcoming Multidrug Resistance. *Phytochem. Rev.* **2014**.
- (247) Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U.; Nishizuka, Y. Direct Activation of Calcium-Activated, Phospholipid-Dependent Protein Kinase by Tumor-Promoting Phorbol Esters. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257* (13), 7847–7851.
- (248) Saraiva, L.; Fresco, P.; Pinto, E.; Gonçalves, J. Characterization of Phorbol Esters Activity on Individual Mammalian Protein Kinase C Isoforms, Using the Yeast Phenotypic Assay. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *491* (2–3), 101–110.
- (249) Breitkreutz, D.; Braiman-Wiksmann, 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.* **2007**, *133* (11), 793–808.
- (250) Parker, P. J.; Coussens, L.; Totty, N.; Rhee, L.; Young, S.; Chen, E.; Stabel, S.; Waterfield, M. D.; Ullrich, A. The Complete Primary Structure of Protein Kinase C--the Major Phorbol Ester Receptor. *Science* **1986**, *233* (4766), 853–859.
- (251) Slater, S. J.; Kelly, M. B.; Taddeo, F. J.; Rubin, E.; Stubbs, C. D. Evidence for Discrete Diacylglycerol and Phorbol Ester Activator Sites on Protein Kinase C. Differences in Effects of 1-Alkanol Inhibition, Activation by Phosphatidylethanolamine and Calcium Chelation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (25), 17160–17165.
- (252) Slater, S. J.; Ho, C.; Kelly, M. B.; Larkin, J. D.; Taddeo, F. J.; Yeager, M. D.; Stubbs, C. D. Protein Kinase C Contains Two Activator Binding Sites That Bind Phorbol Esters and Diacylglycerols with Opposite Affinities. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (9), 4627.
- (253) Zhang, G.; Kazanietz, M. G.; Blumberg, P. M.; Hurley, J. H. Crystal Structure of the Cys2 Activator-Binding Domain of Protein Kinase C $\delta$  in Complex with Phorbol Ester. *Cell* **1995**, *81* (6), 917–924.
- (254) Newton, A. C. Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2353–2364.
- (255) Kazanietz, M. G.; Caloca, M. J.; Eroles, P.; Fujii, T.; Garcí'a-Bermejo, M. L.; Reilly, M.; Wang, H. Pharmacology of the Receptors for the Phorbol Ester Tumor Promoters: Multiple Receptors with Different Biochemical Properties. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60* (10), 1417–1424.
- (256) Wang, Q. J.; Fang, T.-W.; Fenick, D.; Garfield, S.; Bienfait, B.; Marquez, V. E.; Blumberg, P. M. The Lipophilicity of Phorbol Esters as a Critical Factor in Determining the Pattern of Translocation of Protein Kinase C  $\delta$  Fused to Green Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (16), 12136–12146.
- (257) Stahelin, R. V.; Digman, M. A.; Medkova, M.; Ananthanarayanan, B.; Rafter, J. D.; Melowic, H. R.; Cho, W. Mechanism of Diacylglycerol-Induced Membrane Targeting and Activation of Protein Kinase C $\delta$ . *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (28), 29501–29512.
- (258) Hui, X.; Reither, G.; Kaestner, L.; Lipp, P. Targeted Activation of Conventional and Novel Protein Kinases C through Differential Translocation Patterns. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34* (13), 2370–2381.
- (259) Kedei, N.; Lundberg, D. J.; Toth, A.; Welburn, P.; Garfield, S. H.; Blumberg, P. M. Characterization of the Interaction of Ingenol 3-Angelate with Protein Kinase C. *Cancer Res.* **2004**, *64* (9), 3243–3255.
- (260) Passos, G. F.; Medeiros, R.; Marcon, R.; Nascimento, A. F. Z.; Calixto, J. B.; Pianowski, L. F. The Role of PKC/ERK1/2 Signaling in the Anti-Inflammatory Effect of Tetracyclic Triterpene Euphol on TPA-Induced Skin Inflammation in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *698* (1–3), 413–420.
- (261) Hecker, E. Tumour Promoters of the Irritant Diterpene Ester Type as Risk Factors of Cancer in Man. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94* (1–2), 197–219.
- (262) Strair, R. K.; Schaar, D.; Goodell, L.; Aisner, J.; Chin, K.-V.; Eid, J.; Senzon, R.; Cui, X. X.; Han, Z. T.; Knox, B.; et al. Administration of a Phorbol Ester to Patients with Hematological Malignancies Preliminary Results from a Phase I Clinical Trial of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8* (8), 2512–2518.
- (263) Schaar, D.; Goodell, L.; Aisner, J.; Cui, X. X.; Han, Z. T.; Chang, R.; Martin, J.; Grospe, S.; Dudek, L.; Riley, J.; et al. A Phase I Clinical Trial of 12- O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate for Patients with

- Relapsed/refractory Malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *57* (6), 789–795.
- (264) Harada, S.; Koyanagi, Y.; Nakashima, H.; Kobayashi, N.; Yamamoto, N. Tumor Promoter, TPA, Enhances Replication of HTLV-III/LAV. *Virology* **1986**, *154* (2), 249–258.
- (265) Hossain Chowdhury, M. I.; Koyanagi, Y.; Kobayashi, S.; Hamamoto, Y.; Yoshiyama, H.; Yoshida, T.; Yamamoto, N. The Phorbol Ester TPA Strongly Inhibits HIV-1-Induced Syncytia Formation but Enhances Virus Production: Possible Involvement of Protein Kinase C Pathway. *Virology* **1990**, *176* (1), 126–132.
- (266) Jiang, G.; Dandekar, S. Targeting NF- $\kappa$ B Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2014**, *31* (1), 4–12.
- (267) Warrillow, D.; Gardner, J.; Darnell, G. A.; Suhrbier, A.; Harrich, D. HIV Type 1 Inhibition by Protein Kinase C Modulatory Compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2006**, *22* (9), 854–864.
- (268) Signoret, N.; Oldridge, J.; Pelchen-Matthews, A.; Klasse, P. J.; Tran, T.; Brass, L. F.; Rosenkilde, M. M.; Schwartz, T. W.; Holmes, W.; Dallas, W.; et al. Phorbol Esters and SDF-1 Induce Rapid Endocytosis and Down Modulation of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Cell Biol.* **1997**, *139* (3), 651–664.
- (269) El-Mekkawy, S.; Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T. Anti-HIV-1 Phorbol Esters from the Seeds of Croton Tiglium. *Phytochemistry* **2000**, *53* (4), 457–464.
- (270) Hattori, M. Phorbol Derivatives Having Antivirus Activity. U.S. Patent 6,268,395 B1, 2001.
- (271) Zhong, Y.; Matsuya, Y.; Nemoto, H.; Mori, M.; Saito, H.; Yamamoto, N. Novel Phorbol Esters Exert Dichotomous Effects on Inhibition of HIV-1 Infection and Activation of Latent HIV-1 Expression. *Antivir. Chem. Chemother.* **2005**, *16* (5), 303–313.
- (272) Márquez, N.; Calzado, M. A.; Sánchez-Duffhues, G.; Pérez, M.; Minassi, A.; Pagani, A.; Appendino, G.; Diaz, L.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Muñoz, E. Differential Effects of Phorbol-13-Monoesters on Human Immunodeficiency Virus Reactivation. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75* (6), 1370–1380.
- (273) Cashmore, A. R.; Seelye, R. N.; Cain, B. F.; Mack, H.; Schmidt, R.; Hecker, E. The Structure of Prostratin: A Toxic Tetracyclic Diterpene Ester from Pimelea Prostrata. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17* (20), 1737–1738.
- (274) Gustafson, K. R.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Gulakowski, R. J.; Ishitoya, J.; Szallasi, Z.; Lewin, N. E.; Blumberg, P. M.; Weislow, O. S. A Nonpromoting Phorbol from the Samoan Medicinal Plant Homalanthus Nutans Inhibits Cell Killing by HIV-1. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (11), 1978–1986.
- (275) Szallasi, Z.; Krausz, K. W.; Blumberg, P. M. Non-Promoting 12-Deoxyphorbol 13-Esters as Potent Inhibitors of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-Induced Acute and Chronic Biological Responses in CD-1 Mouse Skin. *Carcinogenesis* **1992**, *13* (11), 2161–2167.
- (276) Szallasi, Z.; Krsmanovic, L.; Blumberg, P. M. Nonpromoting 12-Deoxyphorbol 13-Esters Inhibit Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Induced Tumor Promotion in CD-1 Mouse Skin. *Cancer Res.* **1993**, *53* (11), 2507–2512.
- (277) Gulakowski, R. J.; McMahon, J. B.; Buckheit Jr., R. W.; Gustafson, K. R.; Boyd, M. R. Antireplicative and Anticytopathic Activities of Prostratin, a Non-Tumor-Promoting Phorbol Ester, against Human Immunodeficiency Virus (HIV)1. *Antiviral Res.* **1997**, *33* (2), 87–97.
- (278) Williams, S. A.; Chen, L.-F.; Kwon, H.; Fenard, D.; Bisgrove, D.; Verdin, E.; Greene, W. C. Prostratin Antagonizes HIV Latency by Activating NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (40), 42008–42017.
- (279) AIDS Research Alliance: About Prostratin <http://aidsresearch.org/cure-research/prostratin/> (accessed Sep 30, 2015).
- (280) Wender, P. A.; Warrington, J.; Kee, J. Prostratin and Structural or Functional Analogs Thereof. U.S. Patent 8,546,378 B2, 2013.
- (281) Lewin, S. R.; Rouzioux, C. HIV Cure and Eradication: How Will We Get from the Laboratory to Effective Clinical Trials? *AIDS Lond. Engl.* **2011**, *25* (7), 885–897.
- (282) 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.* **2003**, *59* (2), 89–98.
- (283) Boyle, G. M.; D'Souza, M. M. A.; Pierce, C. J.; Adams, R. A.; Cantor, A. S.; Johns, J. P.; Maslovskaya, L.; Gordon, V. A.; Reddell, P. W.; Parsons, P. G. Intra-Lesional Injection of the Novel PKC Activator EBC-46 Rapidly Ablates Tumors in Mouse Models. *PLoS One* **2014**, *9* (10), e108887.
- (284) Rainforest cancer drug EBC-46 set for human trials <http://www.couriermail.com.au/news/queensland/rainforest-plant-seed-leads-to-cancer-drug/story-e6freoof-1225879154124> (accessed Jul 9, 2013).

- (285) Adolf, W.; Hecker, E. Diterpenoid Irritants and Cocarcinogens in Euphorbiaceae and Thymelaeaceae: Structural Relationships in View of Their Biogenesis. *Isr. J. Chem.* **1977**, *16* (1), 75–83.
- (286) Adolf, W.; Hecker, E. On the Active Principles of the Thymelaeaceae. *Planta Med.* **1982**, *45* (07), 177–182.
- (287) Liao, S.-G.; Chen, H.-D.; Yue, J.-M. Plant Orthoesters. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (3), 1092–1140.
- (288) Huang, L.; Ho, P.; Yu, J.; Zhu, L.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H. Picomolar Dichotomous Activity of Gnidimacrin Against HIV-1. *PLoS ONE* **2011**, *6* (10), e26677.
- (289) Sorg, B.; Schmidt, R.; Hecker, E. Structure/activity Relationships of Polyfunctional Diterpenes of the Ingenane Type. I. Tumor-Promoting Activity of Homologous, Aliphatic 3-Esters of Ingenol and of Delta 7,8-Isoingenol-3-Tetradecanoate. *Carcinogenesis* **1987**, *8* (1), 1–4.
- (290) Vogg, G.; Mattes, E.; Rothenburger, J.; Hertkorn, N.; Stefan Achatz; Sandermann Jr., H. Tumor Promoting Diterpenes from Euphorbia Leuconura L. *Phytochemistry* **1999**, *51* (2), 289–295.
- (291) Fujiwara, M.; Ijichi, K.; Tokuhisa, K.; Katsuura, K.; Shigeta, S.; Konno, K.; Wang, G.; Uemura, D.; Yokota, T.; Baba, M. Mechanism of Selective Inhibition of Human Immunodeficiency Virus by Ingenol Triacetate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40* (1), 271.
- (292) Blanco-Molina, M.; Tron, G. C.; Macho, A.; Lucena, C.; Calzado, M. A.; Muñoz, E.; Appendino, G. Ingenol Esters Induce Apoptosis in Jurkat Cells through an AP-1 and NF- $\kappa$ B Independent Pathway. *Chem. Biol.* **2001**, *8* (8), 767–778.
- (293) Hong, K.-J.; Lee, H. S.; Kim, Y.; Kim, S. S. Ingenol Protects Human T Cells From HIV-1 Infection. *Osong Public Health Res. Perspect.* **2011**, *2* (2), 109–114.
- (294) Pandeló, J. D.; Bartholomeeusen, K.; da Cunha, R. D.; Abreu, C. M.; Glinski, J.; da Costa, T. B. F.; Bacchi Rabay, A. F. M.; Pianowski Filho, L. F.; Dudycz, L. W.; Ranga, U.; et al. Reactivation of Latent HIV-1 by New Semi-Synthetic Ingenol Esters. *Virology* **2014**, *462–463*, 328–339.
- (295) Abreu, C. M.; Price, S. L.; Shirk, E. N.; Cunha, R. D.; Pianowski, L. F.; Clements, J. E.; Tanuri, A.; Gama, L. Dual Role of Novel Ingenol Derivatives from Euphorbia Tirucalli in HIV Replication: Inhibition of De Novo Infection and Activation of Viral LTR. *PLoS ONE* **2014**, *9* (5), e97257.
- (296) Jiang, G.; Mendes, E. A.; Kaiser, P.; Sankaran-Walters, S.; Tang, Y.; Weber, M. G.; Melcher, G. P.; Thompson, G. R.; Tanuri, A.; Pianowski, L. F.; et al. Reactivation of HIV Latency by a Newly Modified Ingenol Derivative via Protein Kinase C $\delta$ -NF- $\kappa$ B Signaling: *AIDS* **2014**, *28* (11), 1555–1566.
- (297) Weedon, D.; Chick, J. Home Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Med. J. Aust.* **1976**, *1* (24), 928.
- (298) Green, A. C.; Beardmore, G. L. Home Treatment of Skin Cancer and Solar Keratoses. *Australas. J. Dermatol.* **1988**, *29* (3), 127–130.
- (299) Ramsay, J. r.; Suhrbier, A.; Aylward, J. h.; Ogbourne, S.; Cozzi, S.-J.; Poulsen, M. g.; Baumann, K. c.; Welburn, P.; Redlich, G. l.; Parsons, P. g. The Sap from Euphorbia Peplus Is Effective against Human Nonmelanoma Skin Cancers. *Br. J. Dermatol.* **2011**, *164* (3), 633–636.
- (300) Ogbourne, S. M.; Parsons, P. G. The Value of Nature's Natural Product Library for the Discovery of New Chemical Entities: The Discovery of Ingenol Mebutate. *Fitoterapia* **2014**, *98*, 36–44.
- (301) Ogbourne, S. M.; Suhrbier, A.; Jones, B.; Cozzi, S.-J.; Boyle, G. M.; Morris, M.; McAlpine, D.; Johns, J.; Scott, T. M.; Sutherland, K. P.; et al. Antitumor Activity of 3-Inganyl Angelate Plasma Membrane and Mitochondrial Disruption and Necrotic Cell Death. *Cancer Res.* **2004**, *64* (8), 2833–2839.
- (302) Challacombe, J. M.; Suhrbier, A.; Parsons, P. G.; Jones, B.; Hampson, P.; Kavanagh, D.; Rainger, G. E.; Morris, M.; Lord, J. M.; Le, T. T. T.; et al. Neutrophils Are a Key Component of the Antitumor Efficacy of Topical Chemotherapy with Ingenol-3-Angelate. *J. Immunol.* **2006**, *177* (11), 8123–8132.
- (303) Rosen, R. H.; Gupta, A. K.; Tyring, S. K. Dual Mechanism of Action of Ingenol Mebutate Gel for Topical Treatment of Actinic Keratoses: Rapid Lesion Necrosis Followed by Lesion-Specific Immune Response. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *66* (3), 486–493.
- (304) LEO Pharma - 2009-sep-03 LEO Pharma to Acquire Peplin for US\$287.5m | LEO Pharma [http://www.leo-pharma.com/Home/LEO-Pharma/Media-Centre/News/News-2009/2009-sep-03-LEO-Pharma-to-Acquire-Peplin-for-US\\$287.5m.aspx](http://www.leo-pharma.com/Home/LEO-Pharma/Media-Centre/News/News-2009/2009-sep-03-LEO-Pharma-to-Acquire-Peplin-for-US$287.5m.aspx) (accessed Sep 28, 2015).
- (305) Tzogani, K.; Nagercoil, N.; Hemmings, R. J.; Samir, B.; Gardette, J.; Demolis, P.; Salmonson, T.; Pignatti, F. The European Medicines Agency Approval of Ingenol Mebutate (Picato) for the Cutaneous Treatment of Non-Hyperkeratotic, Non-Hypertrophic Actinic Keratosis in Adults: Summary of the Scientific Assessment of the

- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Eur. J. Dermatol.* **2014**, *24* (4), 457–463.
- (306) Haute Autorité de Santé - PICATO (mébutate d'ingenol), chimiothérapie à usage local [http://has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1623645/fr/picato-mebutate-d-ingenol-chimiotherapie-a-usage-local](http://has-sante.fr/portail/jcms/c_1623645/fr/picato-mebutate-d-ingenol-chimiotherapie-a-usage-local) (accessed Sep 28, 2015).
- (307) Karam, A.; Misery, L. Mélanome de Dubreuilh Traité Par Mébutate D'ingénol Topique. *Ann. Dermatol. Vénérologie* **2014**, *141* (12, Supplement), S404.
- (308) Siller, G.; Rosen, R.; Freeman, M.; Welburn, P.; Katsamas, J.; Ogbourne, S. M. PEP005 (ingenol Mebutate) Gel for the Topical Treatment of Superficial Basal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase IIa Trial. *Australas. J. Dermatol.* **2010**, *51* (2), 99–105.
- (309) Lebwohl, M.; Sohn, A. Ingenol Mebutate (ingenol 3-Angelate, PEP005): Focus on Its Uses in the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer. *Expert Rev. Dermatol.* **2012**, *7* (2), 121–128.
- (310) Braun, S. A.; Jansen, T. M.; Homey, B.; Gerber, P. D. P. A. Erfolgreiche Therapie von Condylomata acuminata mit Ingenolmebutat. *Hautarzt* **2015**, *66* (4), 223–225.
- (311) Jiang, G.; Mendes, E. A.; Kaiser, P.; Wong, D. P.; Tang, Y.; Cai, I.; Fenton, A.; Melcher, G. P.; Hildreth, J. E. K.; Thompson, G. R.; et al. Synergistic Reactivation of Latent HIV Expression by Ingenol-3-Angelate, PEP005, Targeted NF- $\kappa$ B Signaling in Combination with JQ1 Induced P-TEFb Activation. *PLoS Pathog* **2015**, *11* (7), e1005066.
- (312) European Medicines Agency. *Assessment Report of PICATO*; 2012.
- (313) Avila, L.; Perez, M.; Sanchez-Duffhues, G.; Hernández-Galán, R.; Muñoz, E.; Cabezas, F.; Quiñones, W.; Torres, F.; Echeverri, F. Effects of Diterpenes from Latex of Euphorbia Lactea and Euphorbia Laurifolia on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reactivation. *Phytochemistry* **2010**, *71* (2–3), 243–248.
- (314) Daoubi, M.; Marquez, N.; Mazoir, N.; Benharref, A.; Hernández-Galán, R.; Muñoz, E.; Collado, I. G. Isolation of New Phenylacetyltingol Derivatives That Reactivate HIV-1 Latency and a Novel Spirotriterpenoid from Euphorbia Officinarum Latex. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (13), 4577–4584.
- (315) Tian, Y.; Xu, W.; Zhu, C.; Lin, S.; Guo, Y.; Shi, J. Diterpenoids with Diverse Skeletons from the Roots of Euphorbia Micractina. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (6), 1039–1046.
- (316) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Modified Jatrophone Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance from Euphorbia Dendroides L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (23), 5221–5227.
- (317) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Motti, R.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Jatrophone Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance. Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of the Potent Lead Pepluanin A. *J Med Chem* **2004**, *47* (4), 988–992.
- (318) Ferreira, R. J.; dos Santos, D. J.; Ferreira, M.-J. U. P-Glycoprotein and Membrane Roles in Multidrug Resistance. *Future Med. Chem.* **2015**, *7* (7), 929–946.
- (319) Ferreira, M.; Duarte, N.; Lage, H.; Molnar, J. Reversal of Multidrug Resistance by Macrocyclic and Polycyclic Diterpenoids from Euphorbia Species. *RPMP* **2011**, 32.
- (320) Aljančić, I. S.; Pešić, M.; Milosavljević, S. M.; Todorović, N. M.; Jadranin, M.; Milosavljević, G.; Povrenović, D.; Banković, J.; Tanić, N.; Marković, I. D.; et al. Isolation and Biological Evaluation of Jatrophone Diterpenoids from Euphorbia Dendroides. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (7), 1613–1620.
- (321) Vieira, C.; Duarte, N.; Reis, M. A.; Spengler, G.; Madureira, A. M.; Molnár, J.; Ferreira, M.-J. U. Improving the MDR Reversal Activity of 6,17-Epoxyalthryane Diterpenes. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (22).
- (322) Madureira, A. M.; Gyémánt, N.; Ascenso, J. R.; Abreu, P. M.; Molnár, J.; Ferreira, M.-J. U. Euphoportlandols A and B, Tetracyclic Diterpene Polyesters from Euphorbia Portlandica and Their Anti-MDR Effects in Cancer Cells. *J Nat Prod* **2006**, *69* (6), 950–953.
- (323) Vasas, A.; Sulyok, E.; Martins, A.; Rédei, D.; Forgo, P.; Kele, Z.; Zupkó, I.; Molnár, J.; Pinke, G.; Hohmann, J. Cyclomyrsinane and Premyrsinane Diterpenes from Euphorbia Falcata Modulate Resistance of Cancer Cells to Doxorubicin. *Tetrahedron* **2012**, *68* (4), 1280–1285.
- (324) Prasad, R.; Sharma, M.; Rawal, M. K. Functionally Relevant Residues of Cdr1p: A Multidrug ABC Transporter of Human Pathogenic *Candida Albicans*. *J. Amino Acids* **2011**, *2011*, e531412.
- (325) Wolfender, J.-L.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. Current Approaches and Challenges for the Metabolite Profiling of Complex Natural Extracts. *J. Chromatogr. A*.
- (326) Corradini, D. *Handbook of HPLC, Second Edition*; CRC Press, 2010.

- (327) Dong, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*; John Wiley & Sons, 2006.
- (328) Xu, Q. A. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*; Wiley: Hoboken, N.J., 2013.
- (329) Griffiths, W. J.; Wang, Y. Mass Spectrometry: From Proteomics to Metabolomics and Lipidomics. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (7), 1882.
- (330) Carter, G. T. NP/MS since 1970: From the Basement to the Bench Top. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 711–717.
- (331) Abian, J. The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 157–168.
- (332) Beckey, H. D.; Schulten, H.-R. Field Desorption Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14 (6), 403–415.
- (333) Lovins, R. E.; Ellis, S. R.; Tolbert, G. D.; McKinney, C. R. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Coupling of a Liquid Chromatograph to a Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **1973**, 45 (8), 1553–1556.
- (334) Baldwin, M. A.; McLafferty, F. W. Direct Chemical Ionization of Relatively Involatile Samples. Application to Underivatized Oligopeptides. *Org. Mass Spectrom.* **1973**, 7 (12), 1353–1356.
- (335) Ito, Y.; Takeuchi, T.; Ishii, D.; Goto, M. Direct Coupling of Micro High-Performance Liquid Chromatography with Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1985**, 346, 161–166.
- (336) Caprioli, R. M.; Fan, T.; Cottrell, J. S. A Continuous-Flow Sample Probe for Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1986**, 58 (14), 2949–2954.
- (337) Aberth, W.; Burlingame, A. L. Comparison of Three Geometries for a Cesium Primary Beam Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry Source. *Anal. Chem.* **1984**, 56 (14), 2915–2918.
- (338) Blakley, C. R.; Carmody, J. J.; Vestal, M. L. Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer for Analysis of Nonvolatile Samples. *Anal. Chem.* **1980**, 52 (11), 1636–1641.
- (339) Niessen, W. M. A. State-of-the-Art in Liquid Chromatography–mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, 856 (1–2), 179–197.
- (340) Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* **1985**, 57 (3), 675–679.
- (341) Horning, E. C.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Haegele, K. D.; Horning, M. G.; Stillwell, R. N. Liquid Chromatograph—mass Spectrometer—computer Analytical Systems: A Continuous-Flow System Based on Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1974**, 99, 13–21.
- (342) Schappler, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; Guilleme, D. Coupling UHPLC with MS: The Needs, Challenges, and Applications. In *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*; John Wiley & Sons, 2013; pp 95–132.
- (343) Gika, H. G.; Theodoridis, G. A.; Plumb, R. S.; Wilson, I. D. Current Practice of Liquid Chromatography–mass Spectrometry in Metabolomics and Metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 87, 12–25.
- (344) Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Barceló, D. Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Interfaces for the HPLC/MS Analysis of Pesticides. *Anal. Chem.* **2001**, 73 (22), 5441–5449.
- (345) Montange, D.; Bérard, M.; Demarchi, M.; Muret, P.; Piédoux, S.; Kantelip, J. P.; Royer, B. An APCI LC-MS/MS Method for Routine Determination of Capecitabine and Its Metabolites in Human Plasma. *J. Mass Spectrom.* **2010**, 45 (6), 670–677.
- (346) Li, W.; Zhang, J.; Tse, F. L. S. Strategies in Quantitative LC-MS/MS Analysis of Unstable Small Molecules in Biological Matrices. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, 25 (1-2), 258–277.
- (347) Dams, R.; Huestis, M. A.; Lambert, W. E.; Murphy, C. M. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14 (11), 1290–1294.
- (348) Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. Matrix Effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-Line and on-Line Extraction Procedures. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1058 (1–2), 61–66.
- (349) Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, 20 (6), 362–387.
- (350) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, 2012, 1–40.
- (351) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, 2007.

- (352) Gross, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*; Springer Science & Business Media, 2011.
- (353) Douglas, D. J.; Frank, A. J.; Mao, D. Linear Ion Traps in Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24* (1), 1–29.
- (354) Wong, P. S.; Graham Cooks, R. Ion Trap Mass Spectrometry. *Curr. Sep.* **1997**, *16*, 85–92.
- (355) 3200 QTRAP® LC/MS/MS System | Mass Spectrometer with Excellent Value | AB SCIEX <http://www.absciex.com/products/mass-spectrometers/qtrap-lcms-systems/3200-qtrap-lcmsms-system> (accessed Feb 24, 2015).
- (356) Thermo Fisher :: Orbitrap :: LTQ Orbitrap XL <http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl/#tab:schematic> (accessed Feb 25, 2015).
- (357) Evans, F. J.; Kinghorn, A. D. Thin-Layer Chromatographic Behaviour of the Acetates of Some Polyfunctional Diterpene Alcohols of Toxicological Interest. *J. Chromatogr. A* **1973**, *87* (2), 443–448.
- (358) Girin, M. A.; Paphassarang, S.; David-Eteve, C.; Chaboud, A.; Raynaud, J. Determination of Ingenol in Homoeopathic Mother Tinctures of Euphorbia Species by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **1993**, *637* (2), 206–208.
- (359) Bicchi, C.; Appendino, G.; Cordero, C.; Rubiolo, P.; Ortelli, D.; Veuthey, J.-L. HPLC-UV and HPLC-Positive-ESI-MS Analysis of the Diterpenoid Fraction from Caper Spurge (*Euphorbia Lathyris*) Seed Oil. *Phytochem. Anal.* **2001**, *12* (4), 255–262.
- (360) Hou, J.-J.; Wu, W.-Y.; Liang, J.; Yang, Z.; Long, H.-L.; Cai, L.-Y.; Fang, L.; Wang, D.-D.; Yao, S.; Liu, X.; et al. A Single, Multi-Faceted, Enhanced Strategy to Quantify the Chromatographically Diverse Constituents in the Roots of *Euphorbia Kansui*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *88*, 321–330.
- (361) Devappa, R. K.; Bingham, J.-P.; Khanal, S. K. High Performance Liquid Chromatography Method for Rapid Quantification of Phorbol Esters in *Jatropha Curcas* Seed. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 211–219.
- (362) Zhang, S.; Zhang, F.; Li, X.; Dong, W.; Wen, L.; Wang, S. Evaluation of *Daphne Genkwa* Diterpenes: Fingerprint and Quantitative Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* **2007**, *18* (2), 91–97.
- (363) Hou, X.-R.; Wan, L.-L.; Zhan, Z.-J.; Li, C.-P.; Shan, W.-G. Analysis and Determination of Diterpenoids in Unprocessed and Processed *Euphorbia Lathyris* Seeds by HPLC-ESI-MS. *J. Pharm. Anal.* **2011**, *1* (3), 197–202.
- (364) Tang, Q.; Su, Z.; Han, Z.; Ma, X.; Xu, D.; Liang, Y.; Cao, H.; Wang, X.; Qu, X.; Hoffman, A.; et al. LC-MS Method for Detecting Prostratin in Plant Extracts and Identification of a High-Yielding Population of *Euphorbia Fischeriana*. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5* (1), 214–218.
- (365) Liu, X.; Li, L.; Li, W.; Lu, D.; Chen, F.; Li, J. Quantitative Determination of Phorbol Ester Derivatives in Chinese *Jatropha Curcas* Seeds by High-Performance Liquid Chromatography/mass Spectrometry. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *47*, 29–32.
- (366) Chow, S.; Fletcher, M. T.; McKenzie, R. A. Analysis of Daphnane Orthoesters in Poisonous Australian *Pimelea* Species by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric Food Chem* **2011**, *58* (12), 7482–7487.
- (367) Wang, J.-H.; Zhou, Y.-J.; Bai, X.; He, P. Jolkinolide B from *Euphorbia Fischeriana* Steud Induces Apoptosis in Human Leukemic U937 Cells through PI3K/Akt and XIAP Pathways. *Mol. Cells* **2011**, *32* (5), 451–457.
- (368) Jarret, M.; Katsamas, J.; Cawkill, K.; Henderson, L.; Welburn, P. A Pharmacokinetic Study Using a Highly Sensitive and Specific Method to Determine Systemic Exposure of Ingenol Mebutate and Its Two Main Metabolites, PEP015 and PEP025 in Human Whole Blood after Topical Administration. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2013**, *68* (4, Supplement 1), AB156.
- (369) Zhang, L.; Shu, X.; Ding, A.; Yu, L.; Tang, Y.; Duan, J.; Shang, E.; Shen, X. LC-DAD-ESI-MS-MS Separation and Chemical Characterization of the Inflammatory Fraction of the Roots of *Euphorbia Kansui*. *Chromatographia* **2009**, *70* (5), 805–810.
- (370) Vogg, G.; Achatz, S.; Kettrup, A.; Sandermann Jr., H. Fast, Sensitive and Selective Liquid Chromatographic-tandem Mass Spectrometric Determination of Tumor-Promoting Diterpene Esters. *J. Chromatogr. A* **1999**, *855* (2), 563–573.
- (371) Ichihashi, K.; Yuki, D.; Kurokawa, H.; Igarashi, A.; Yajima, T.; Fujiwara, M.; Maeno, K.; Sekiguchi, S.; Iwata, M.; Nishino, H. Dynamic Analysis of Phorbol Esters in the Manufacturing Process of Fatty Acid Methyl Esters



- from *Jatropha Curcas* Seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88* (6), 851–861.
- (372) Baldini, M.; Ferfuaia, C.; Bortolomeazzi, R.; Verardo, G.; Pascali, J.; Piasentier, E.; Franceschi, L. Determination of Phorbol Esters in Seeds and Leaves of *Jatropha Curcas* and in Animal Tissue by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *59*, 268–276.
- (373) Xia, B.; Xu, K.; Liu, X.; Chai, Y.; Sun, C.; Gu, Y.; Ding, L.; Zhou, Y. Tandem Mass Spectrometric Analysis and Density Functional Theory Calculations on the Fragmentation Behavior of Two Tetradecanoylgingenol Regioisomers from *Euphorbia Wallichii*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26* (21), 2502–2508.
- (374) Yang, M.; Lu, Z.; Yu, K.; Wang, Q.; Chen, X.; Li, Y.; Liu, X.; Wu, W.; Guo, D. Studies on the Fragmentation Pathways of Ingenol Esters Isolated from *Euphorbia Esula* Using IT-MS<sup>n</sup> and Q-TOF-MS/MS Methods in Electrospray Ionization Mode. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *323–324*, 55–62.
- (375) Jiao, W.; Fang, D.-M.; Wu, Z.-J.; Chen, J.-Z.; Shao, H.-W.; Zhang, G.-L. Analysis of Lathyrane Diterpenes Using Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: Letter to the Editor. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (1), 276–280.
- (376) Punsuvon, V.; Nokkaew, R.; Karnasuta, S. Determination of Toxic Phorbol Esters in Biofertilizer Produced with *Jatropha Curcas* Seed Cake. *ScienceAsia* **2012**, *38* (2), 223.
- (377) Kedei, N.; Lundberg, D. J.; Toth, A.; Welburn, P.; Garfield, S. H.; Blumberg, P. M. Characterization of the Interaction of Ingenol 3-Angelate with Protein Kinase C. *Cancer Res.* **2004**, *64* (9), 3243–3255.
- (378) Bedoya, L. M.; Márquez, N.; Martínez, N.; Gutiérrez-Eisman, S.; Álvarez, A.; Calzado, M. A.; Rojas, J. M.; Appendino, G.; Muñoz, E.; Alcamí, J. SJ23B, a Jatrophone Diterpene Activates Classical PKCs and Displays Strong Activity against HIV in Vitro. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77* (6), 965–978.
- (379) Alcamí José. SJ23B, a Jatrophone Diterpene, induces HIV receptors downregulation and HIV transcription through activation of Ras- MEK pathway and classical PKCs [http://www.ihlpress.com/pdf%20files/resistance09\\_presentations/04\\_ALCAMI.pdf](http://www.ihlpress.com/pdf%20files/resistance09_presentations/04_ALCAMI.pdf) (accessed Oct 1, 2015).

## II. Annexes

Information complémentaires de la partie II.6, p. 136

Figure S1. ESI-HRMS/MS of JE-C1 (**13**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS spectra, (B) Molecular formula deduced from  $m/z$  675.2613

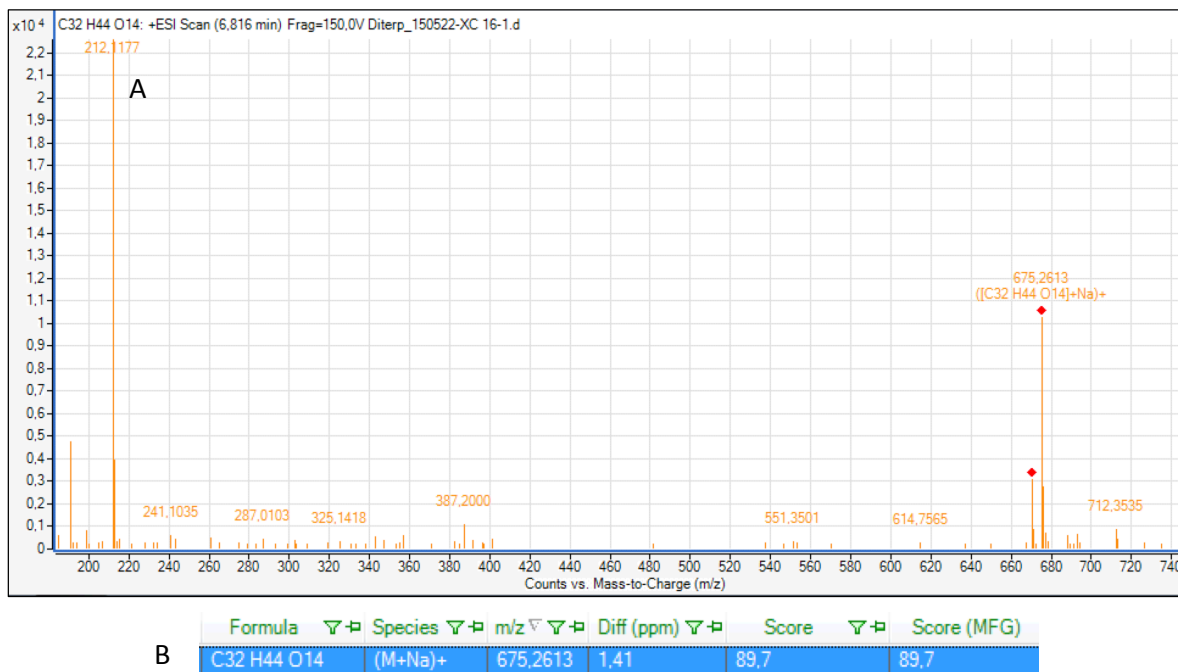


Figure S2. ESI-HRMS/MS of JE-C1 (**13**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS/MS spectra of  $m/z$  675.2611. (B) Zoom on diterpene backbone ions

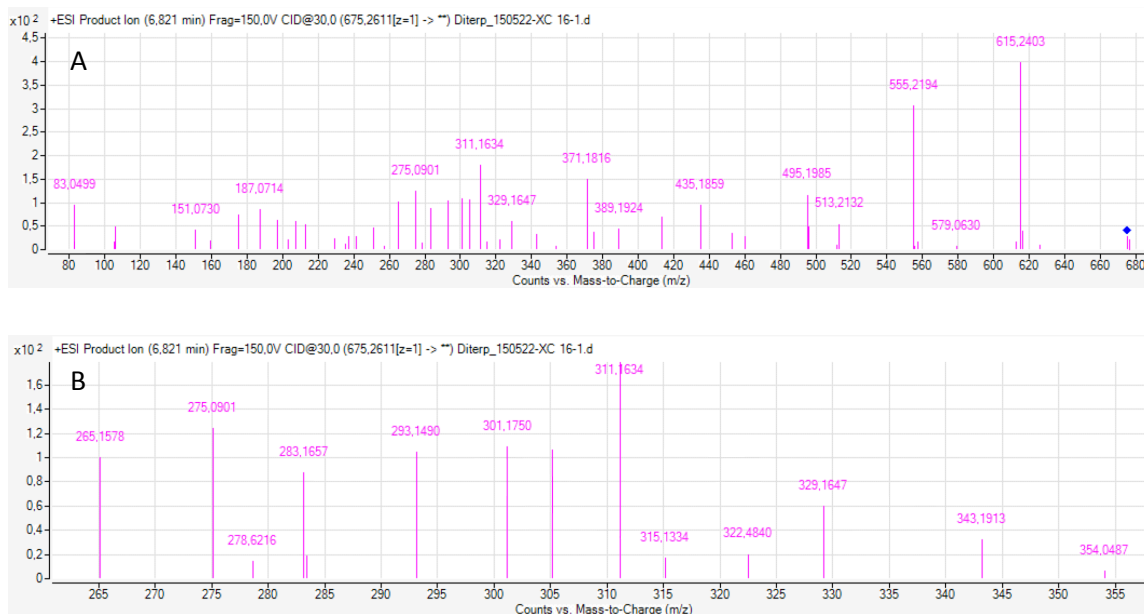


Figure S3.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of JE-C1 (**13**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

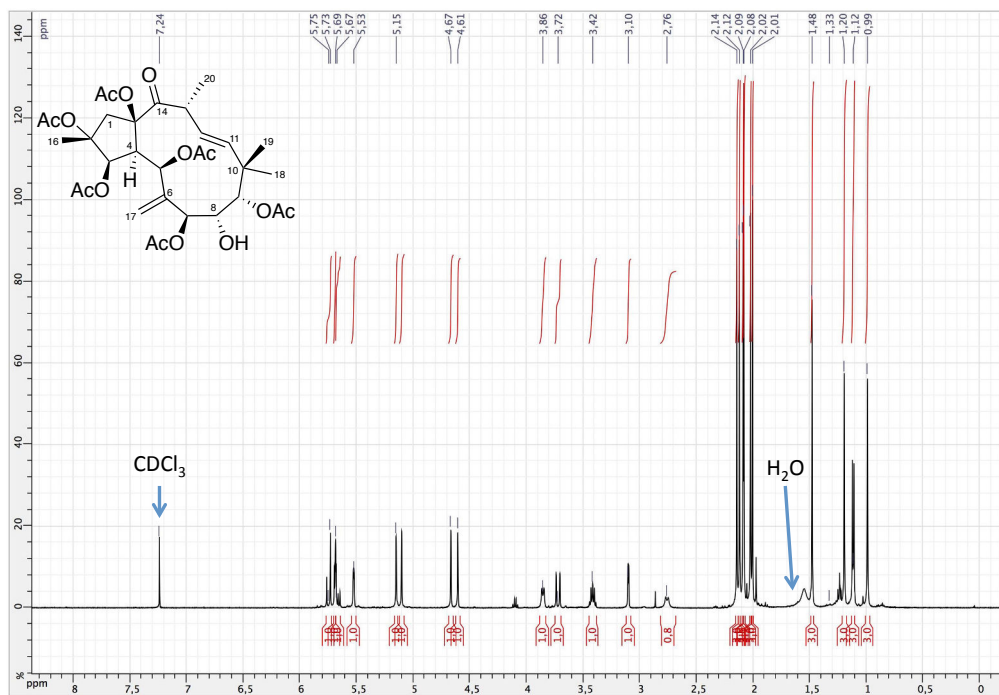


Figure S4.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of JE-C1 (**13**) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

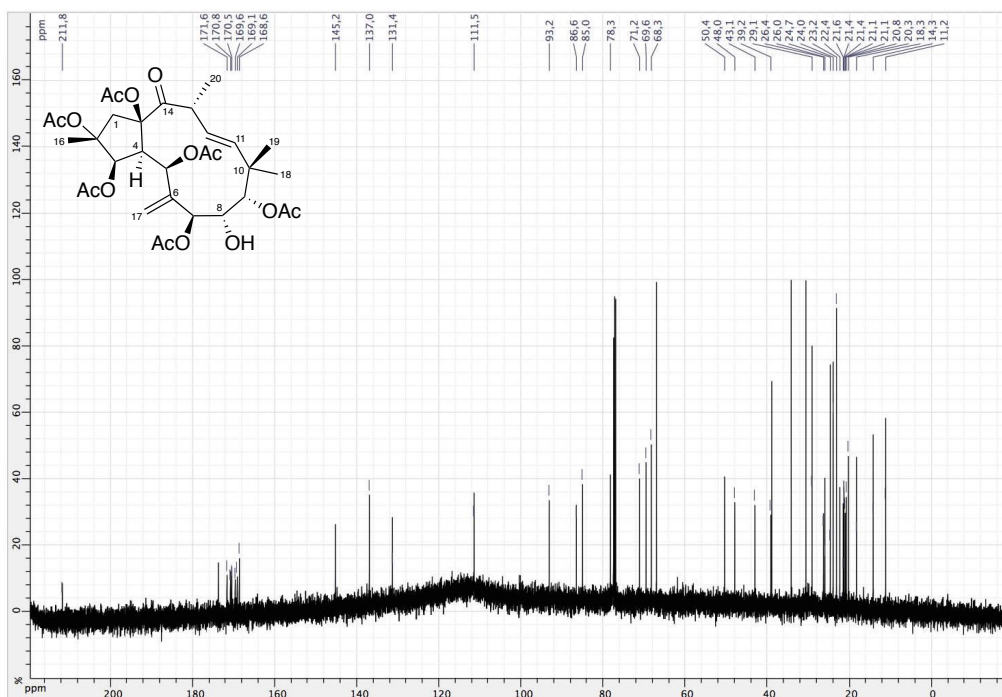


Figure S5. COSY spectrum of JE-C1 (**13**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

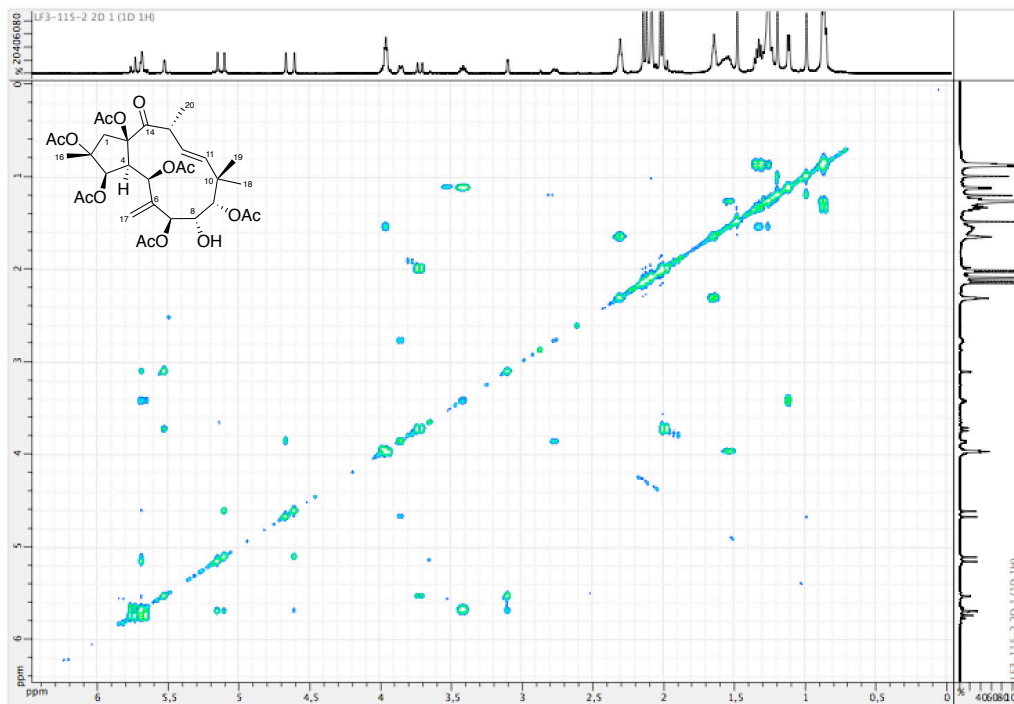


Figure S6. HSQC spectrum of JE-C1 (**13**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

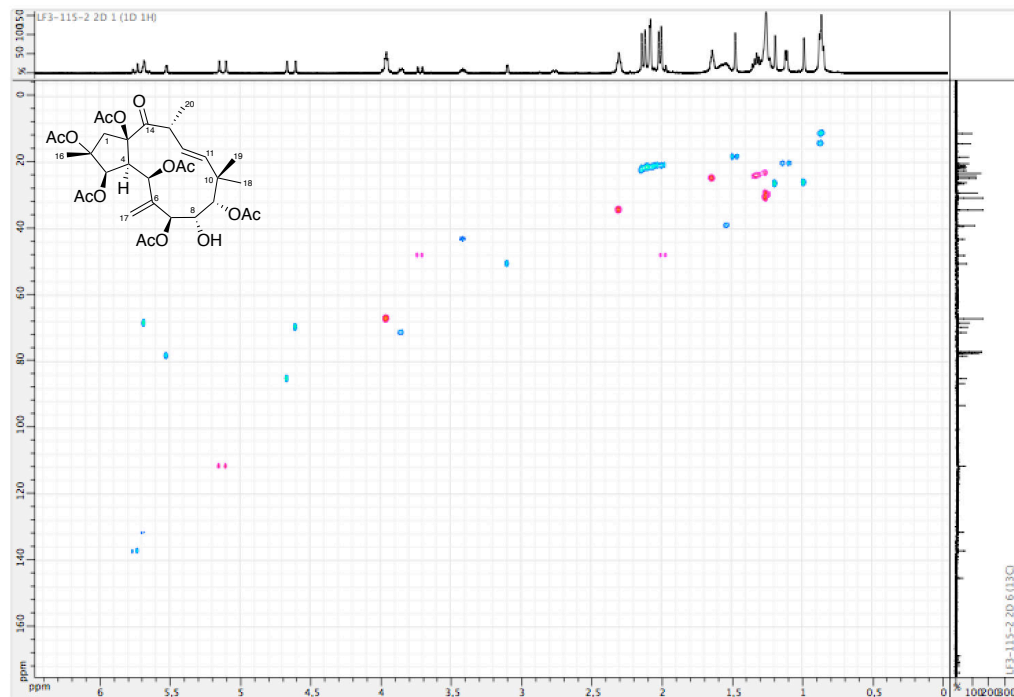


Figure S7. HMBC spectrum of JE-C1 (**13**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

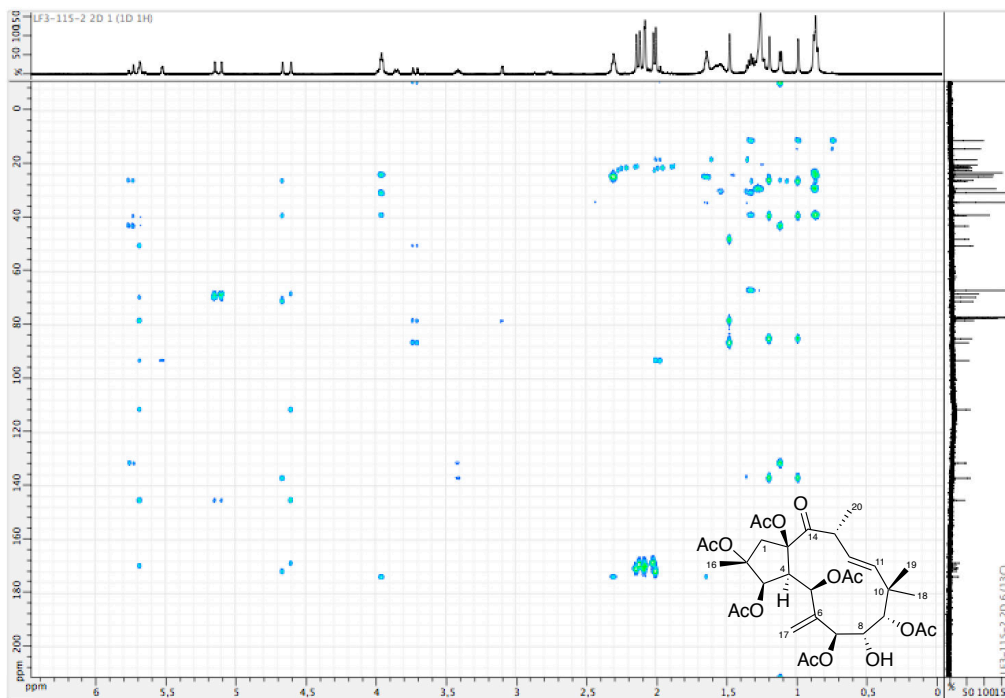


Figure S8. ROESY spectrum of JE-C1 (**13**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

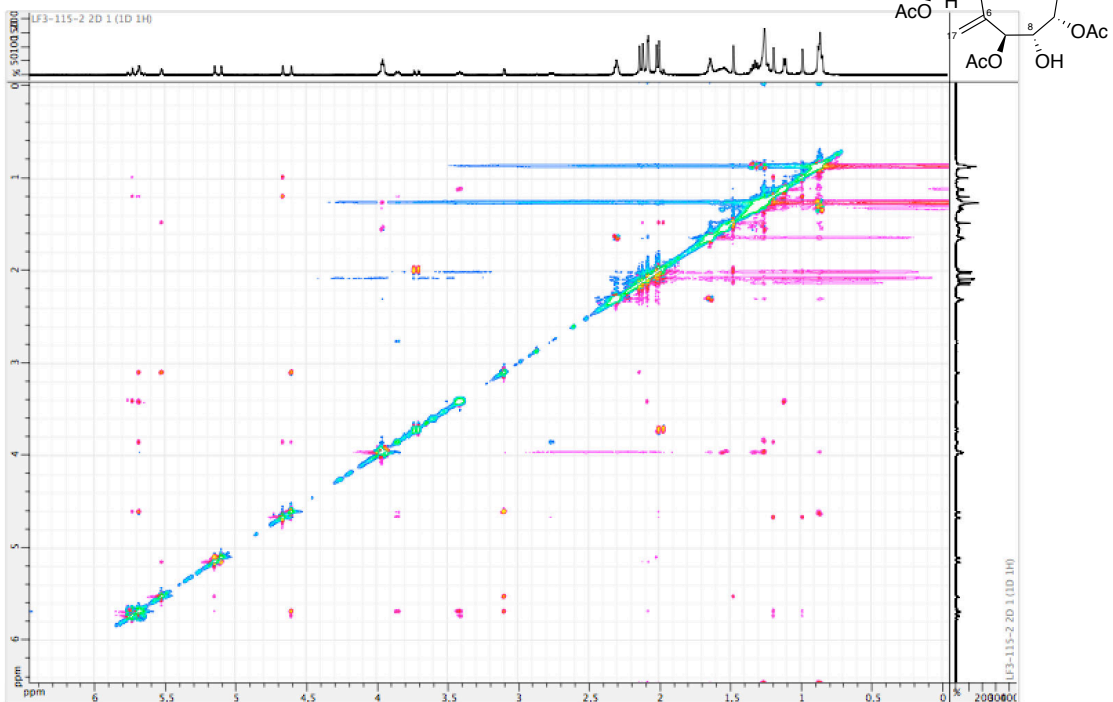


Figure S9. ESI-HRMS/MS of JE-C2 (**14**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS spectra. (B) Molecular formula deduced from  $m/z$  717.2733

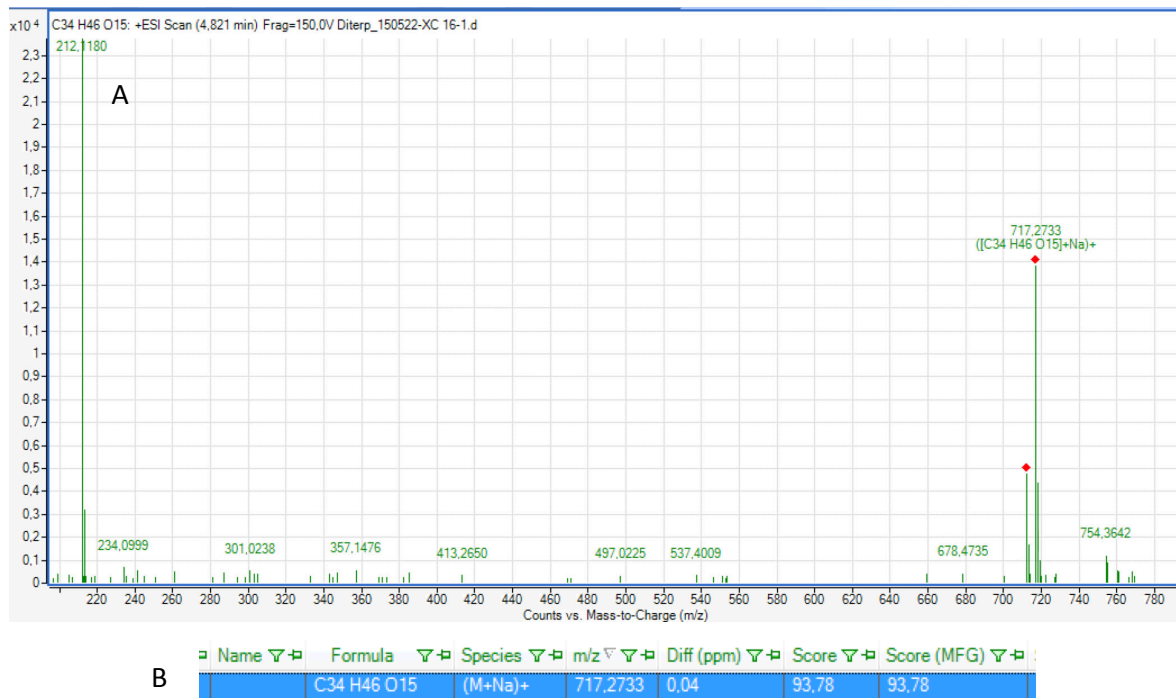


Figure S10. ESI-HRMS/MS of JE-C2 (**14**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS/MS spectra of  $m/z$  717.2711. (B) Zoom on diterpene backbone ions

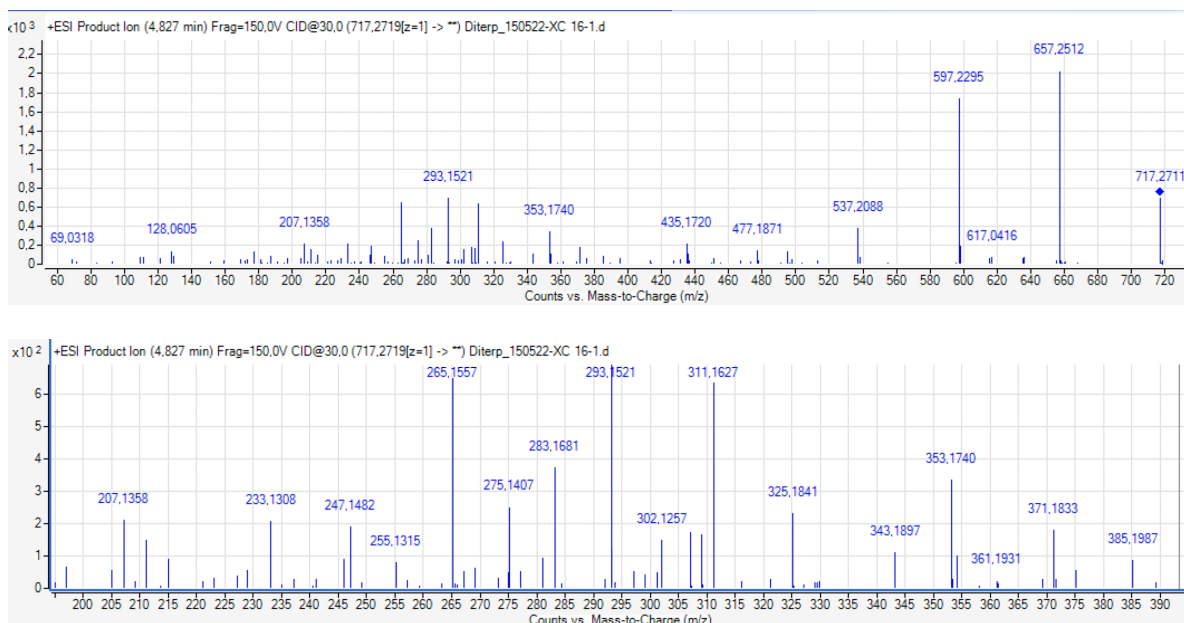




Figure S11.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of JE-C2 (**14**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

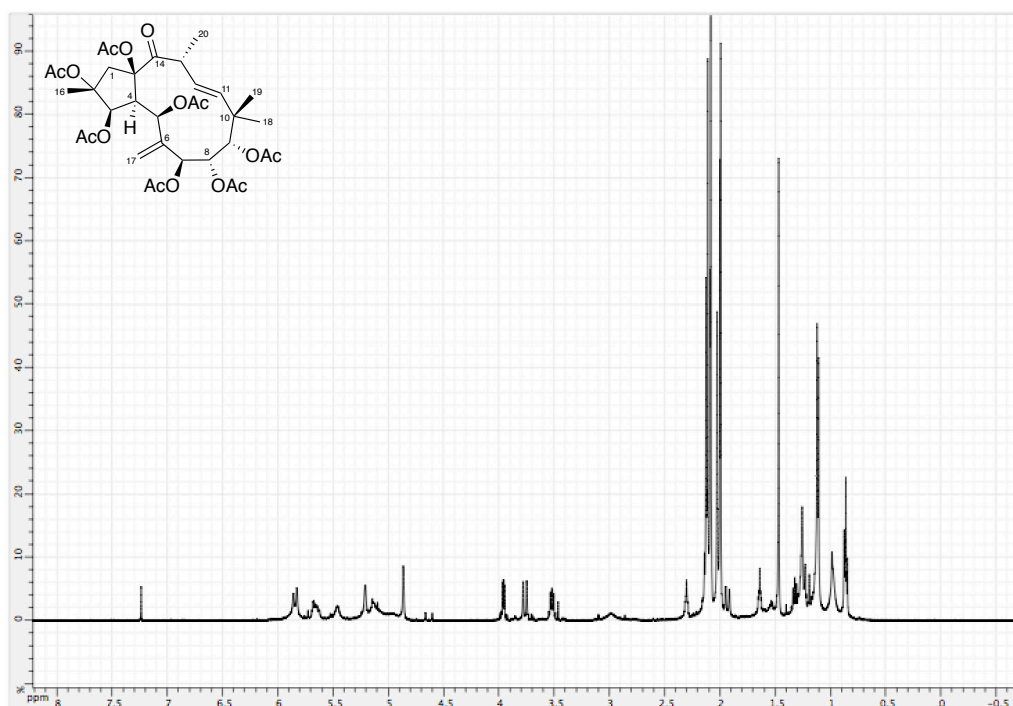


Figure S12.  $^1\text{H}$  NMR spectra of JE-C2 (**14**) at different temperatures (500 MHz, pyridine- $d_5$ )

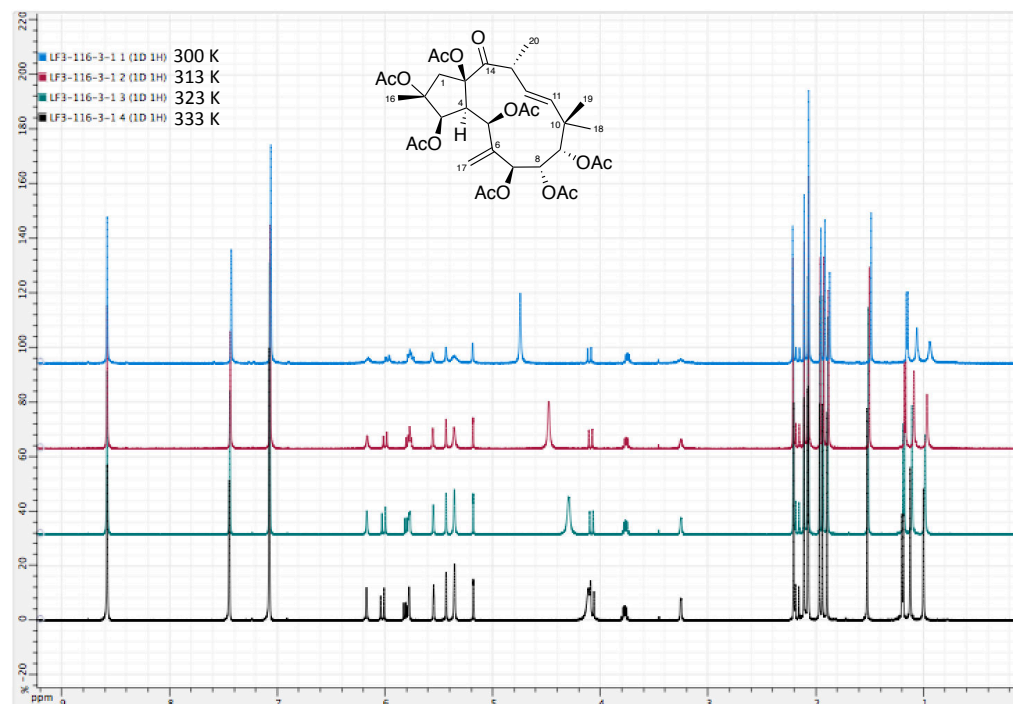


Figure S13.  $^1\text{H}$  RMN spectrum of JE-C2 (**14**) (500 MHz, pyridine- $d_5$ , 325 K)

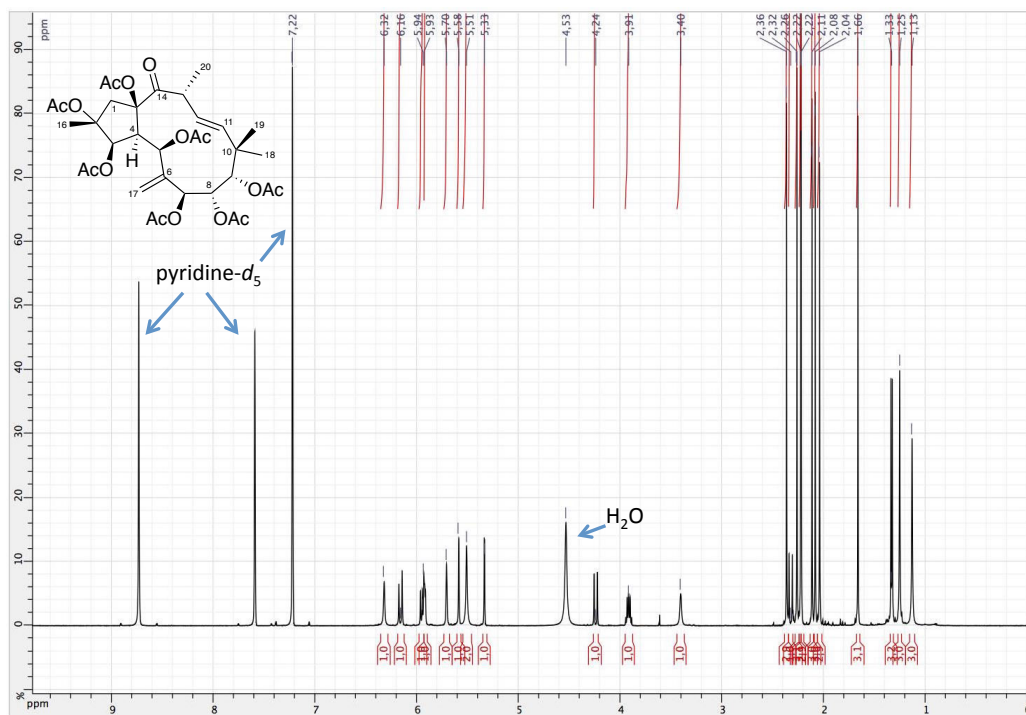


Figure S14.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of JE-C2 (**14**) (75 MHz, pyridine- $d_5$ , 325 K)

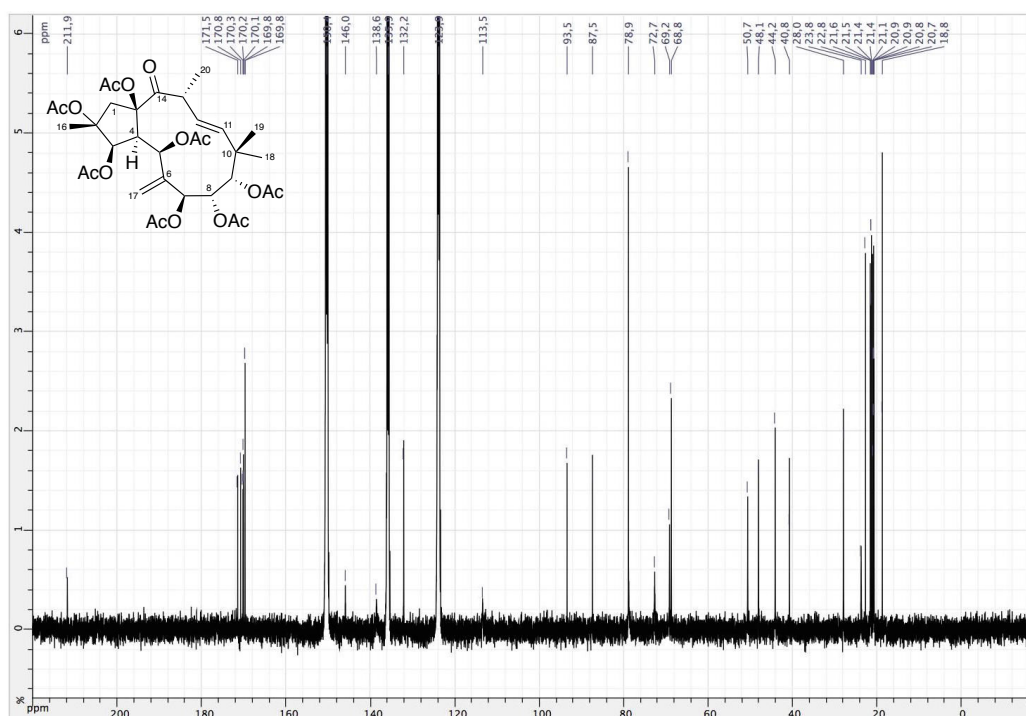


Figure S15. COSY spectrum of JE-C2 (**14**) (500 MHz, 325 K, pyridine- $d_5$ )

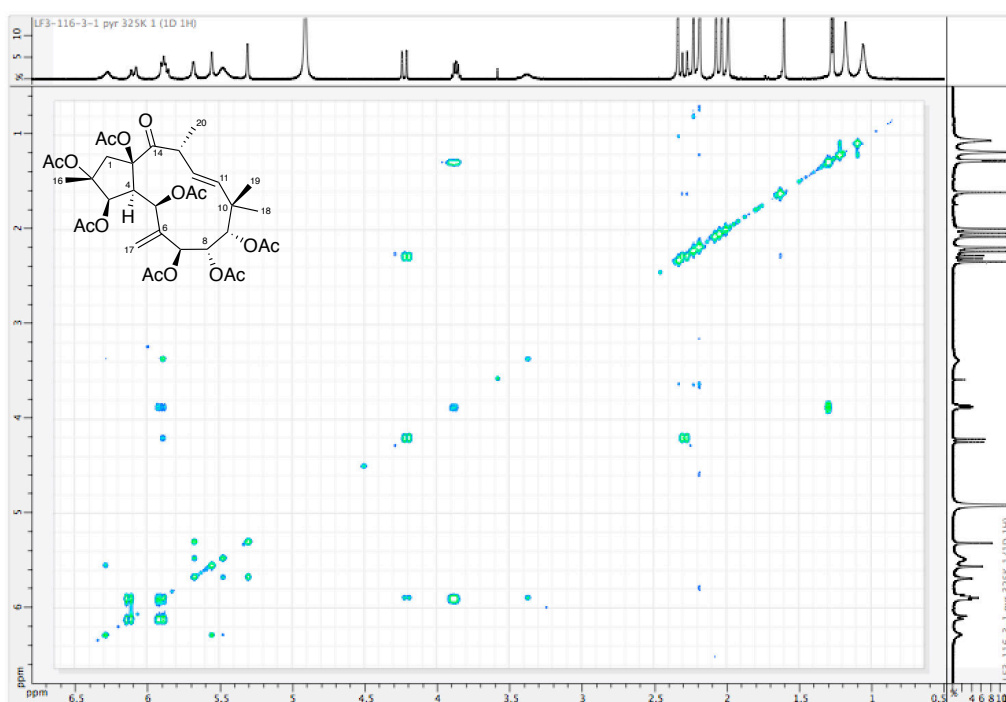


Figure S16. HSQC spectrum of JE-C2 (**14**) (500 MHz, 325 K, pyridine- $d_5$ )

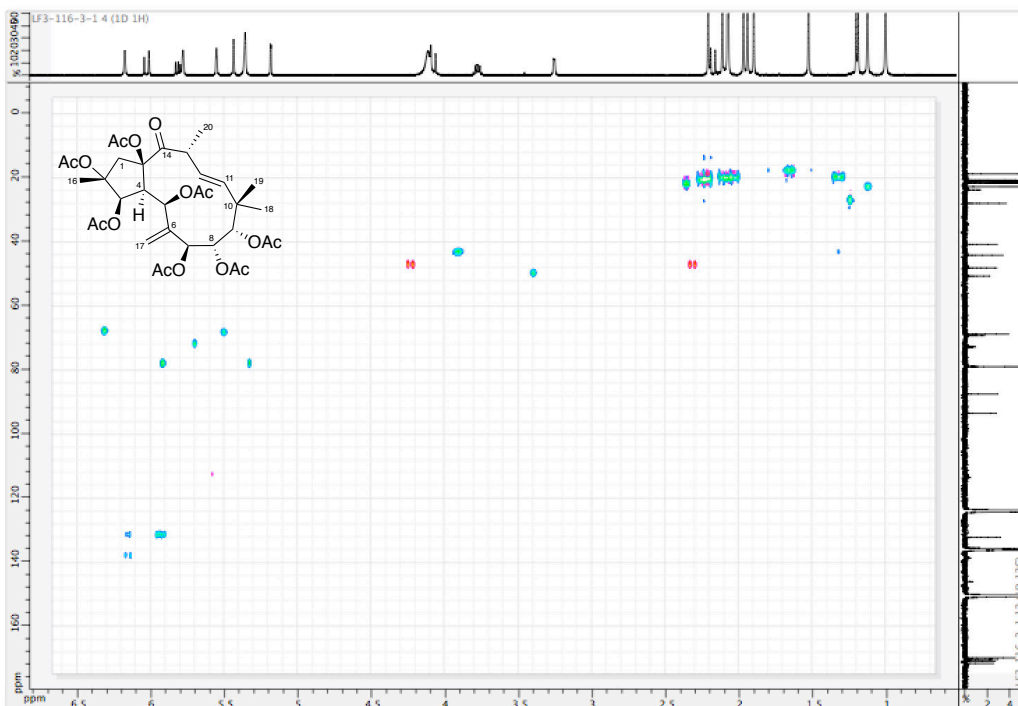


Figure S17. HMBC spectrum of JE-C2 (**14**) (500 MHz, 325 K, pyridine- $d_5$ )

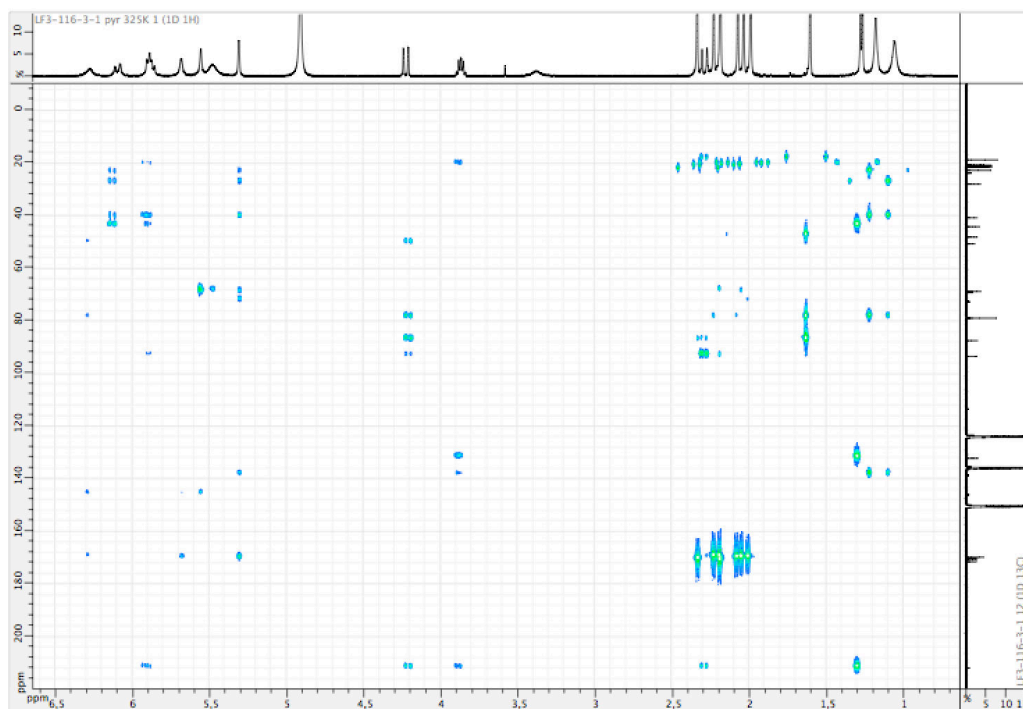
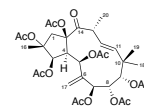


Figure S17. HMBC spectrum of JE-C2 (**14**) (500 MHz, 325 K, pyridine- $d_5$ )

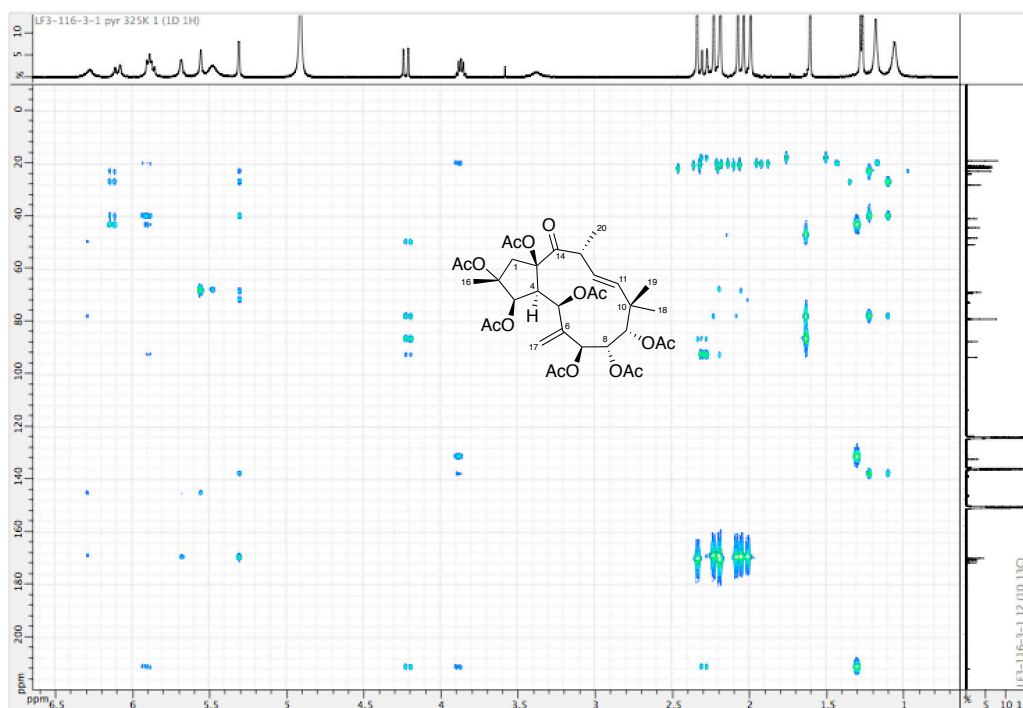


Figure S18. ROESY spectrum of JE-C2 (**14**) (500 MHz, 325 K, pyridine- $d_5$ )

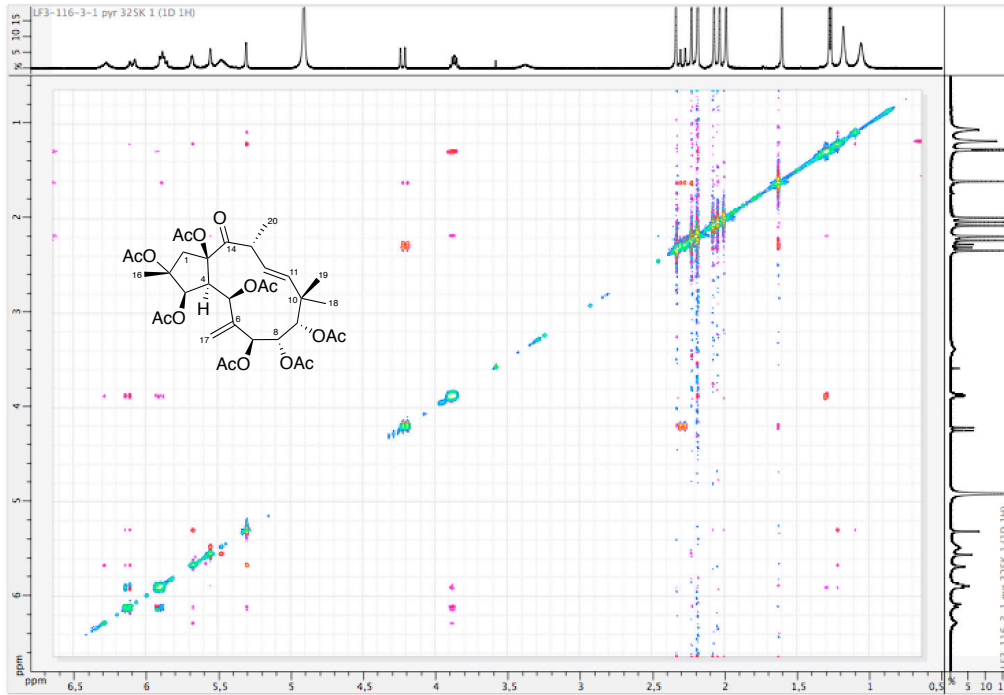
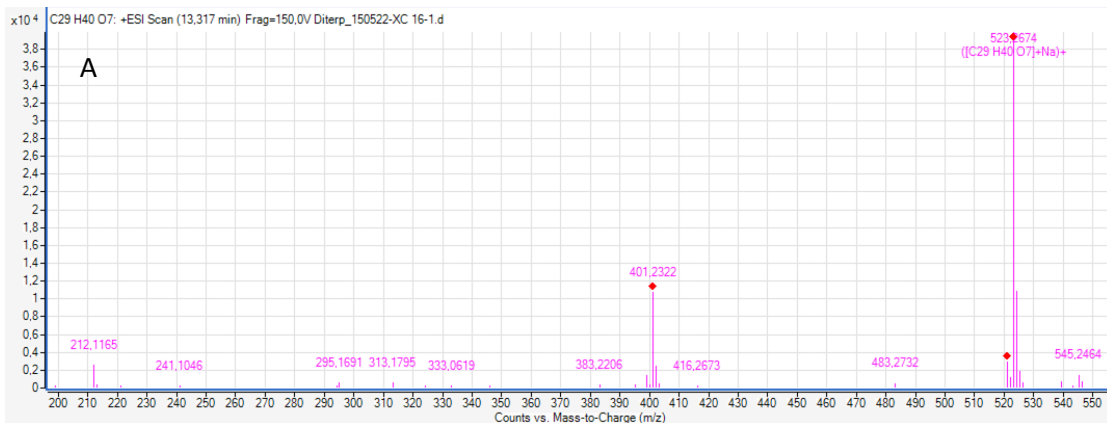


Figure S19. ESI-HRMS/MS of 4-dPE A (**15**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS spectra. (B) Molecular formula deduced from  $m/z$  523.2675



B

Formula	Species	$m/z$	Diff (ppm)	Score	Score (MFG)
C29 H40 O7	(M+Na) <sup>+</sup>	523.2674	-0.87	94.28	94.28

Figure S20. ESI-HRMS/MS of 4-dPE A (**15**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS/MS spectra of  $m/z$  523.2675. (B) zoom on backbone ions

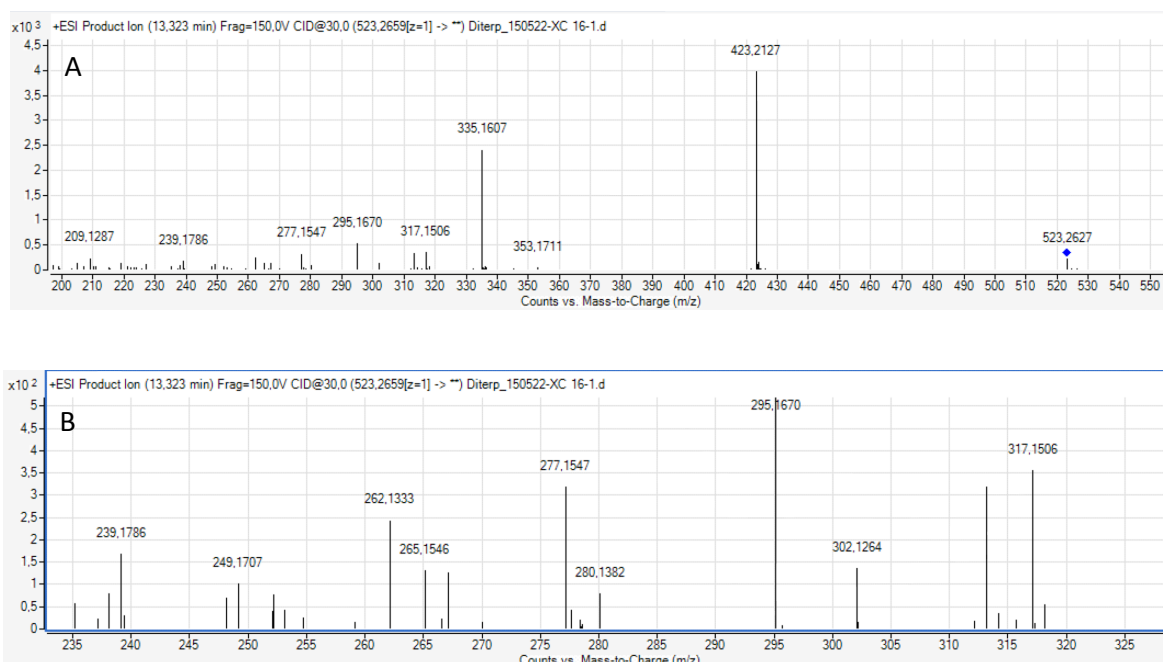


Figure S21.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4-dPE A (**15**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

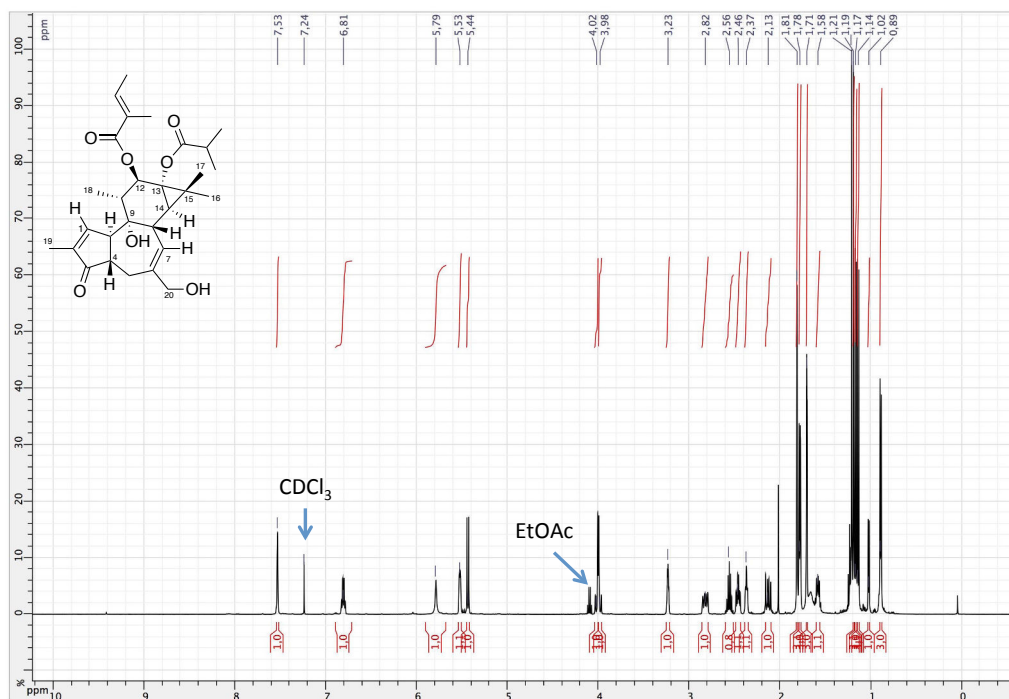




Figure S21.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4-dPE A (**15**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

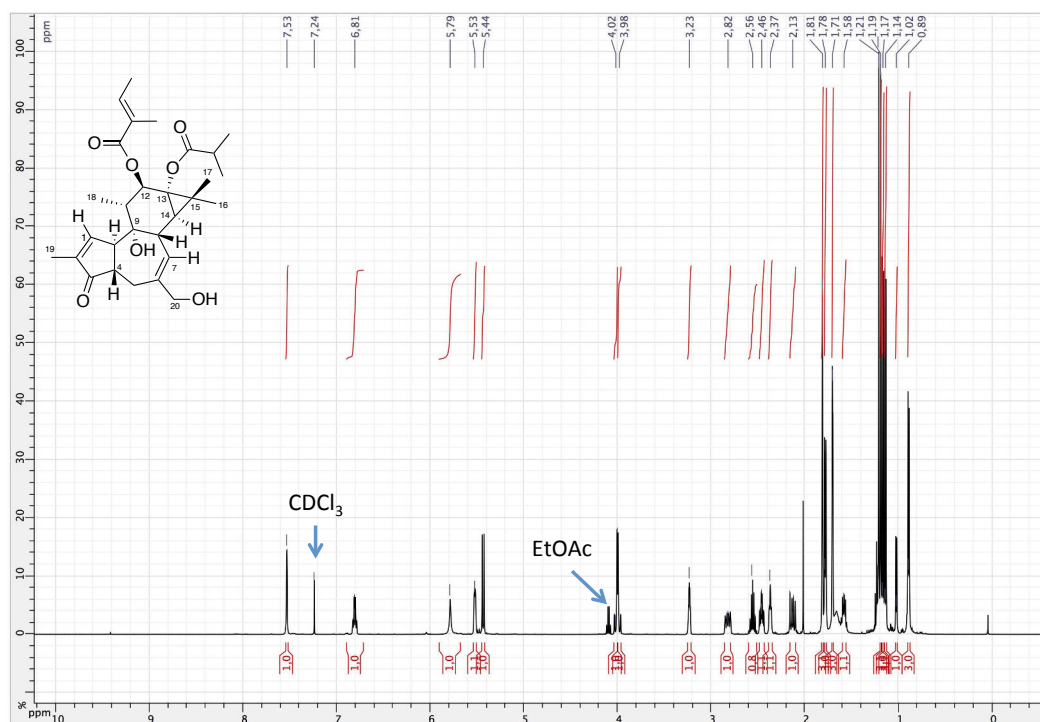


Figure S22.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4-dPE A (**15**) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

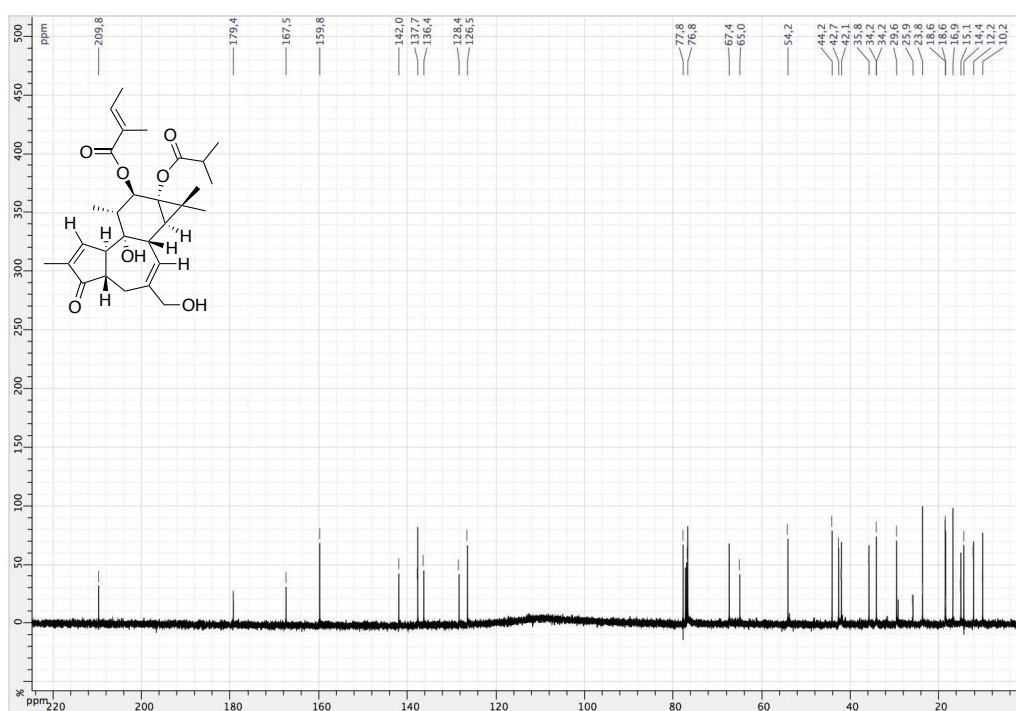


Figure S23. COSY spectrum of 4-dPE A (**15**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

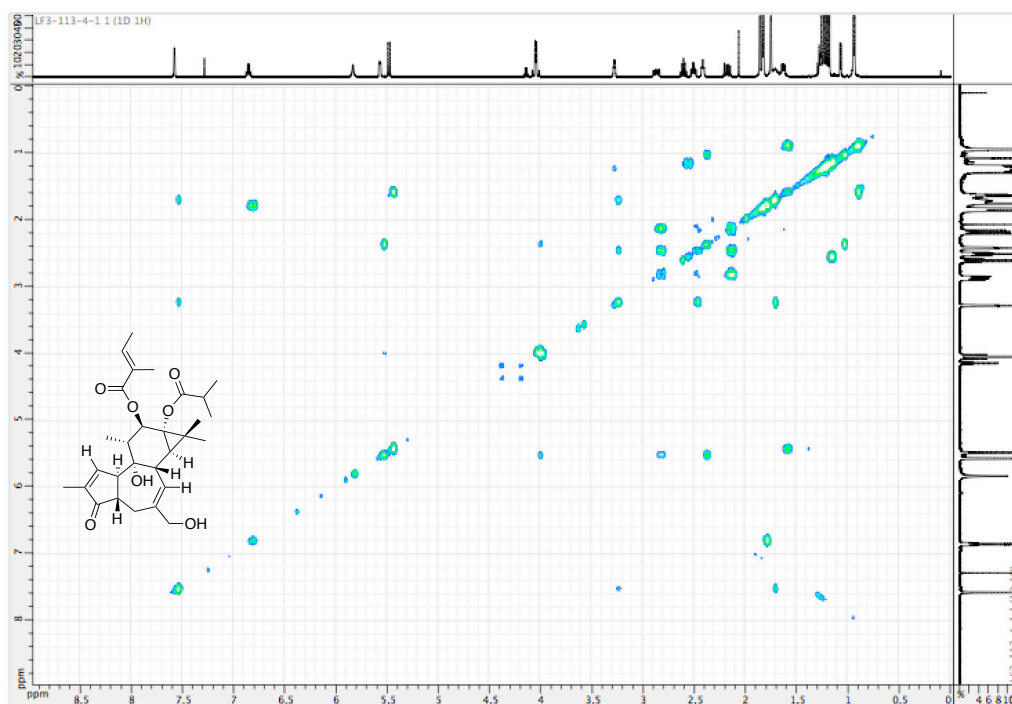


Figure S24. HSQC spectrum of 4-dPE A (**15**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

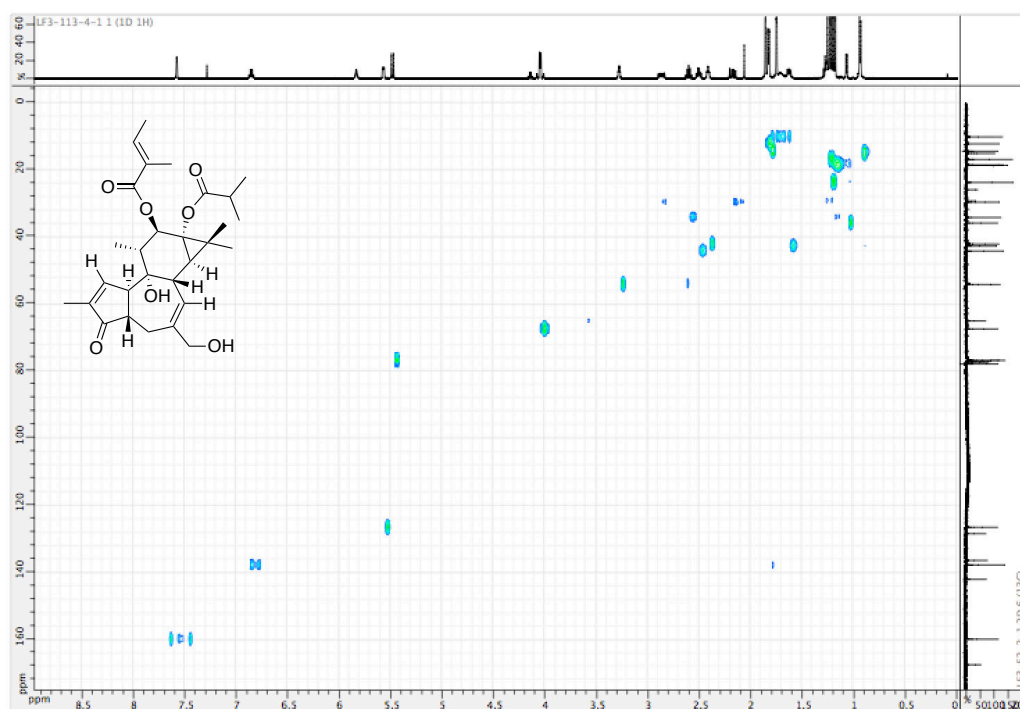




Figure S25. HMBC spectrum of 4-dPE A (**15**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

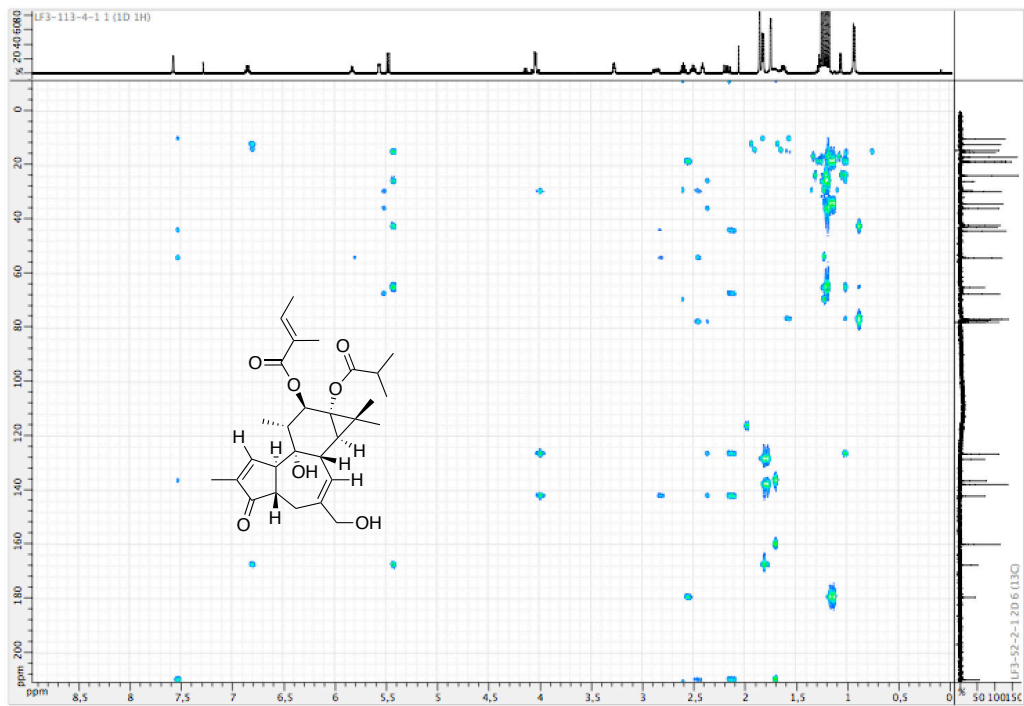


Figure S26. ROESY spectrum of 4-dPE A (**15**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

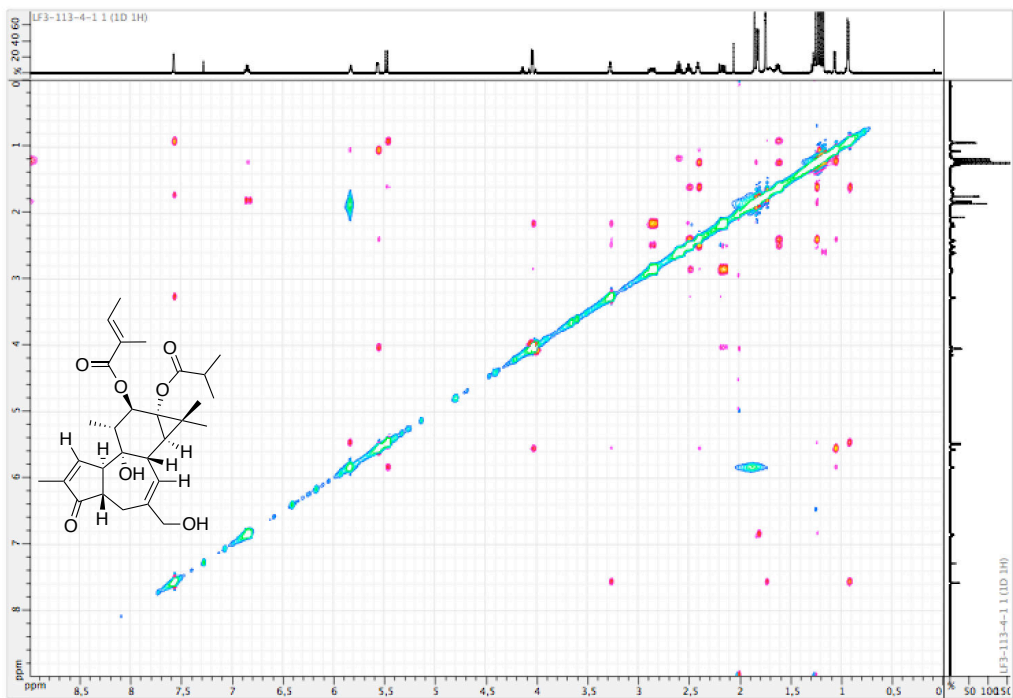


Figure S27. ESI-HRMS/MS of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS spectra. (B) Molecular formula deduced from  $m/z$  523.2675

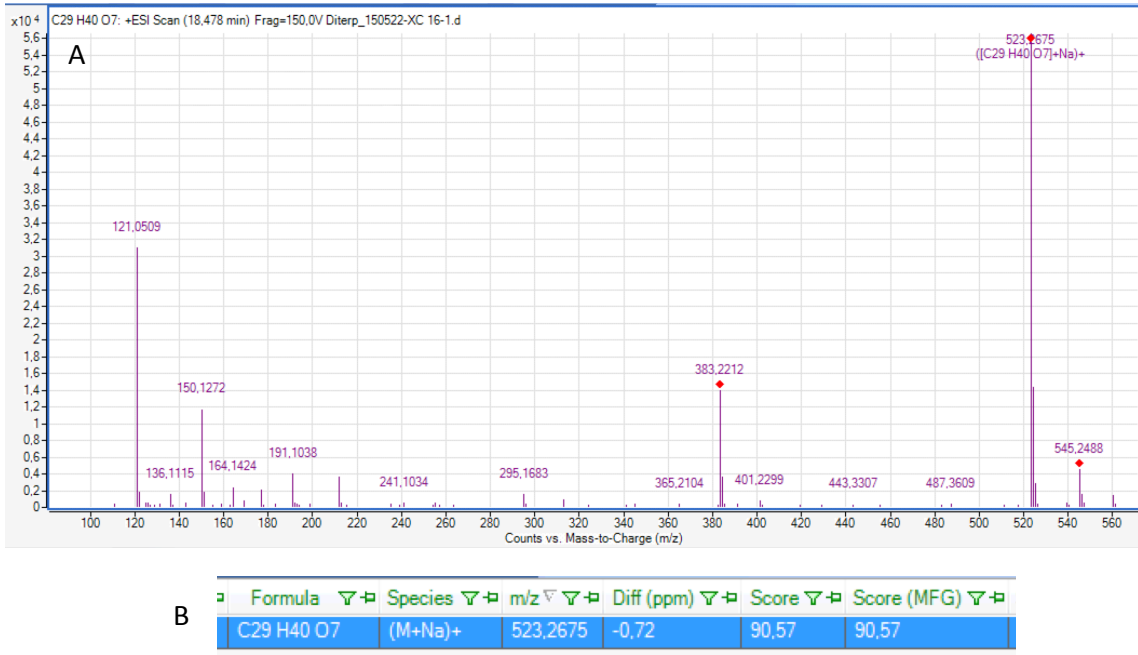


Figure S28. ESI-HRMS/MS of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS/MS spectra of  $m/z$  523.2675. (B) Zoom on backbone ions

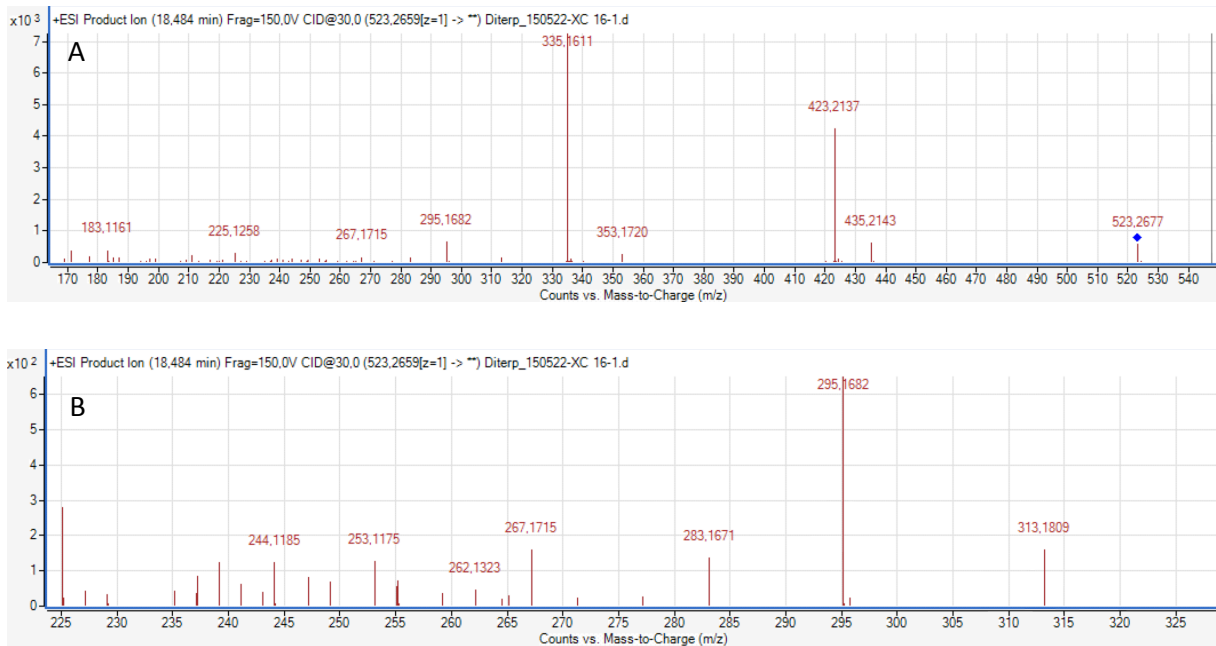


Figure S29.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

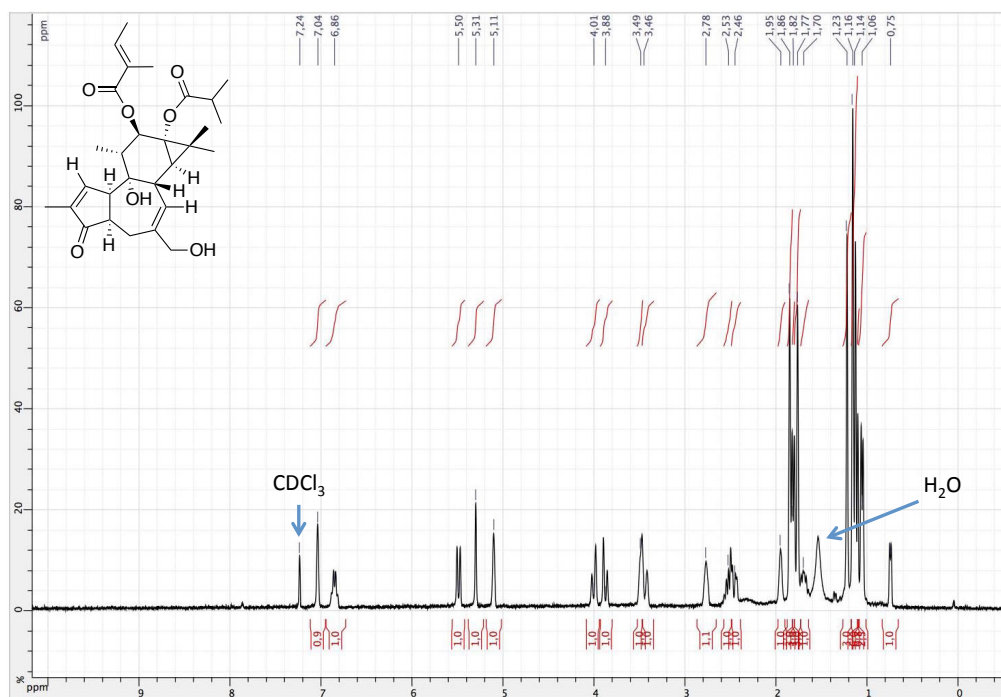


Figure S30.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

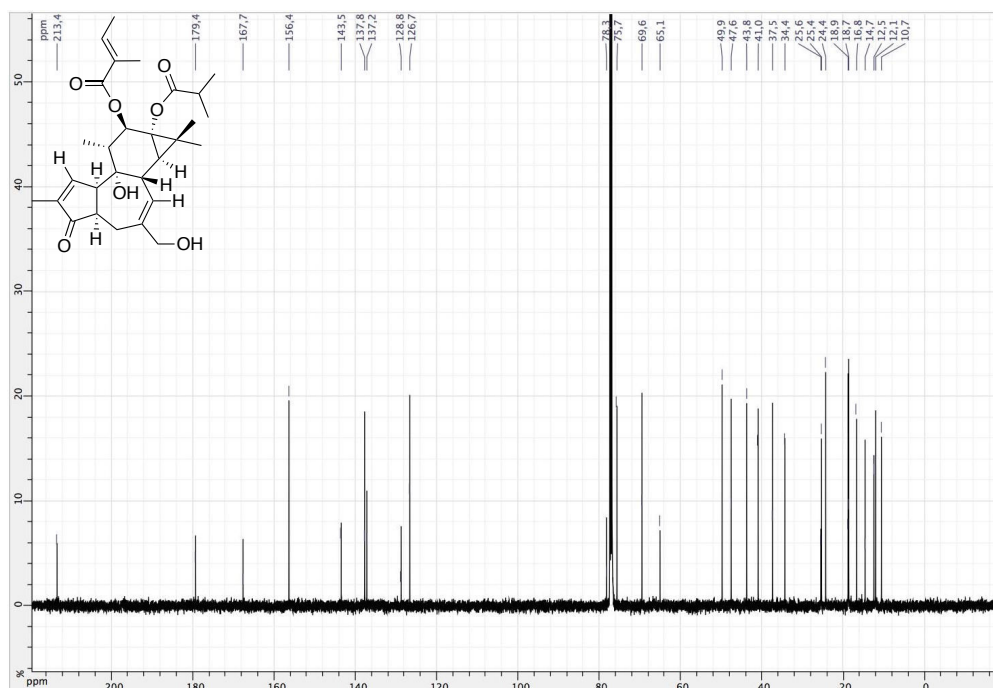


Figure S31. COSY spectrum of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

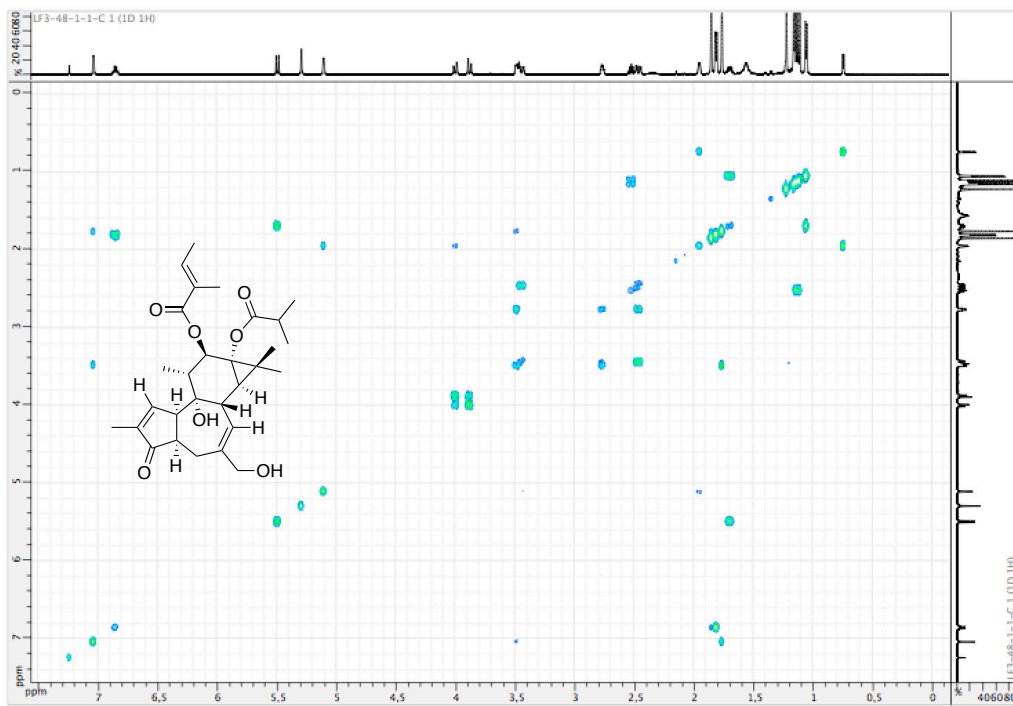


Figure S32. HSQC spectrum of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

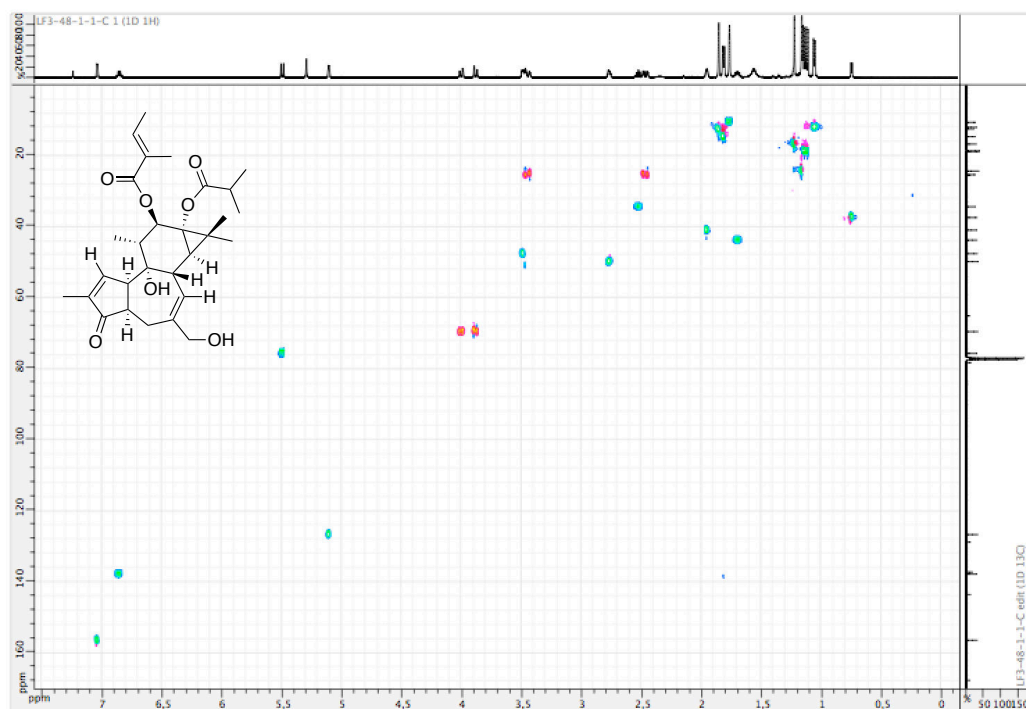


Figure S33. HMBC spectrum of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

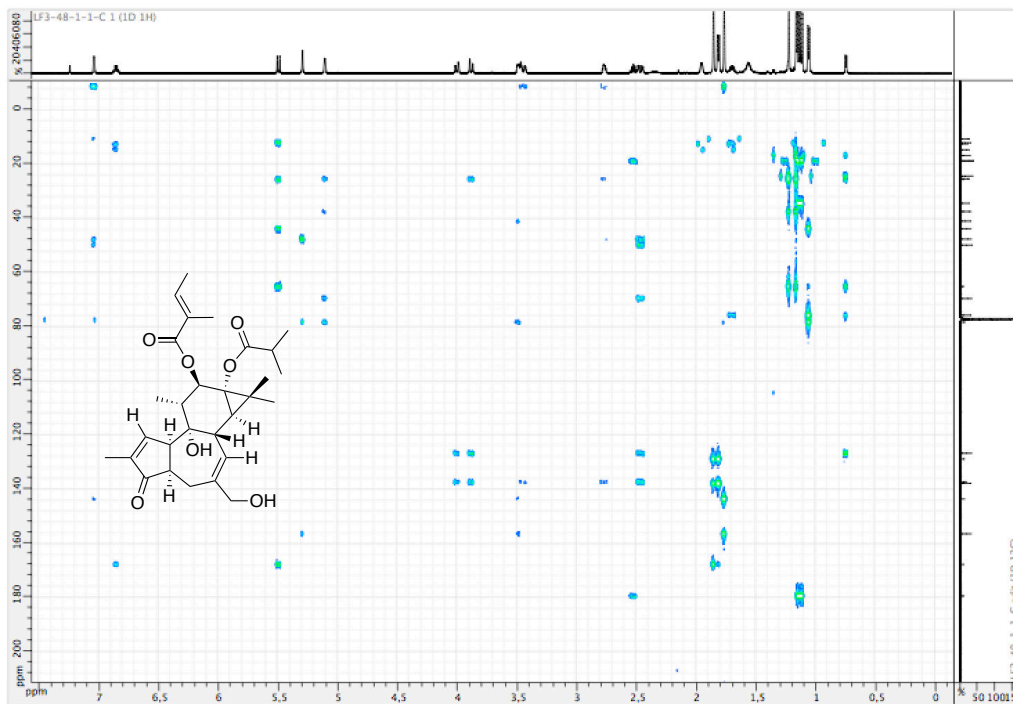


Figure S34. ROESY spectrum of 4 $\alpha$ -dPE A (**16**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

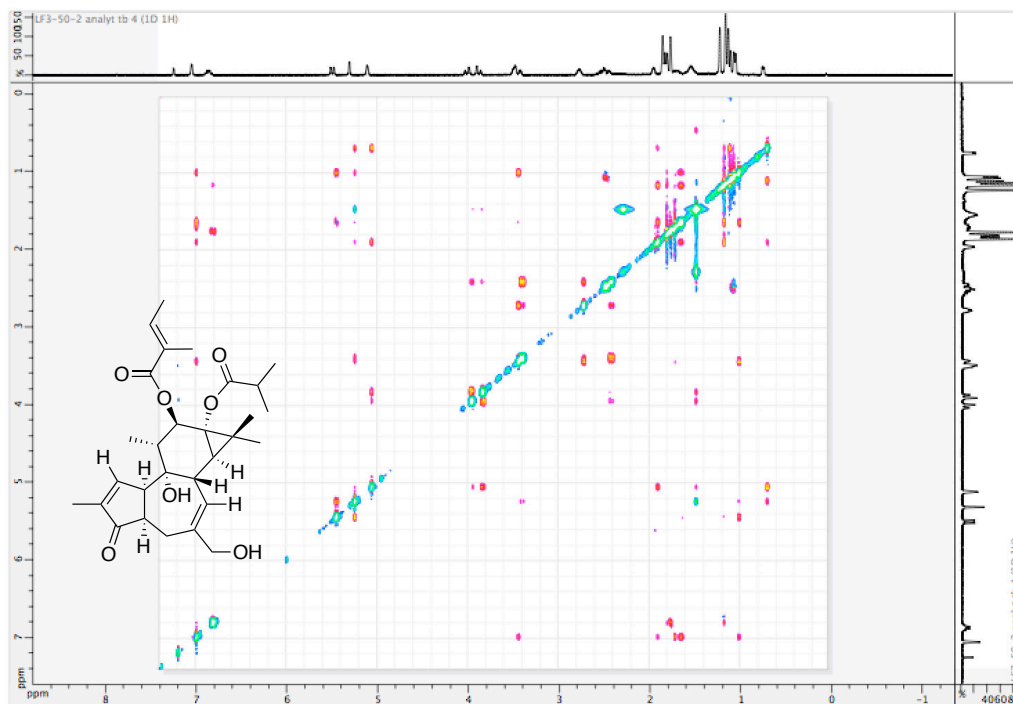


Figure S35. ESI-HRMS/MS of 4,20-ddPE A (**17**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS spectra (B) molecular formula deduced from  $m/z$  521.2517

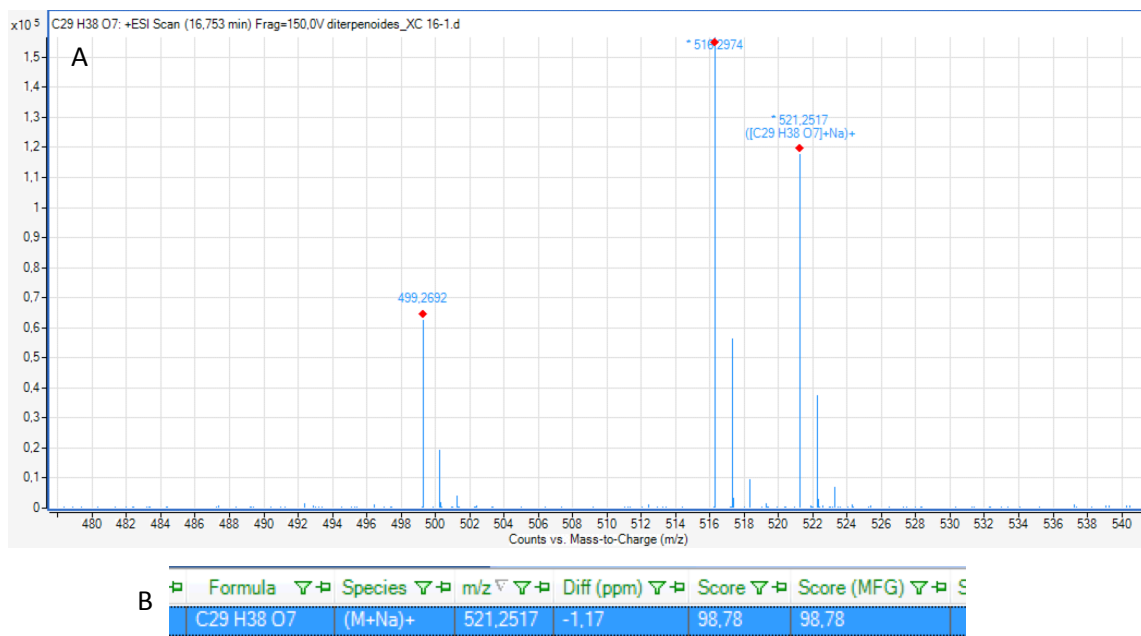


Figure S36. ESI-HRMS/MS of 4,20-ddPE A (**17**) (Q-TOF). (A) ESI-MS/MS spectra of  $m/z$  521.2516. (B) zoom on diterpene backbone ions

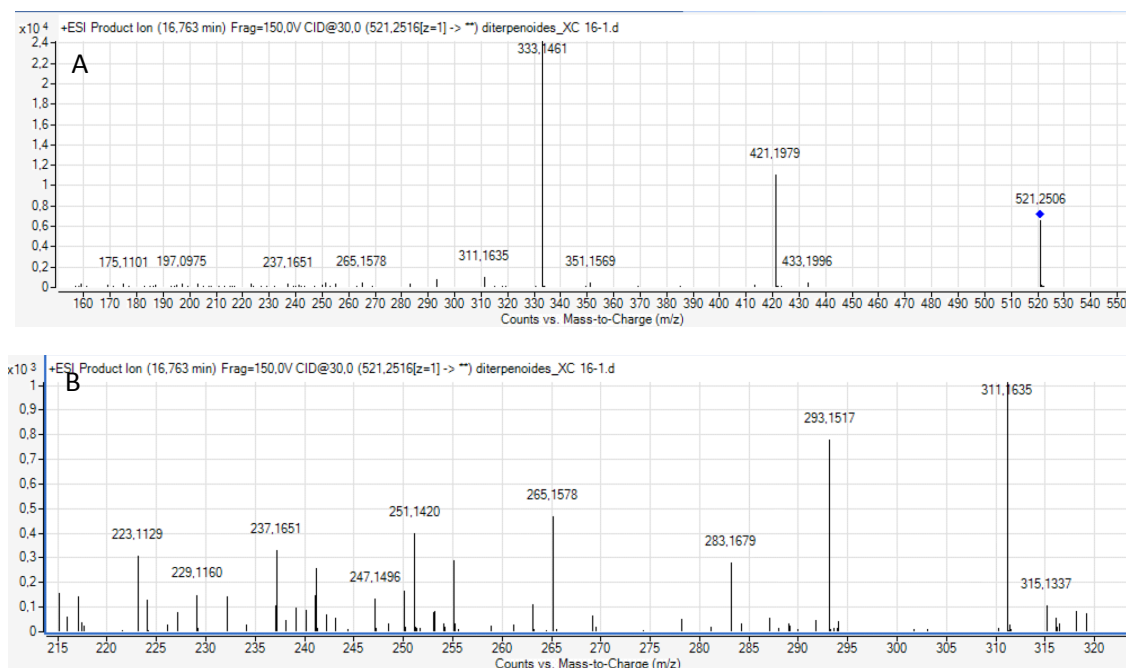




Figure S37.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4,20-ddPE A (**17**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

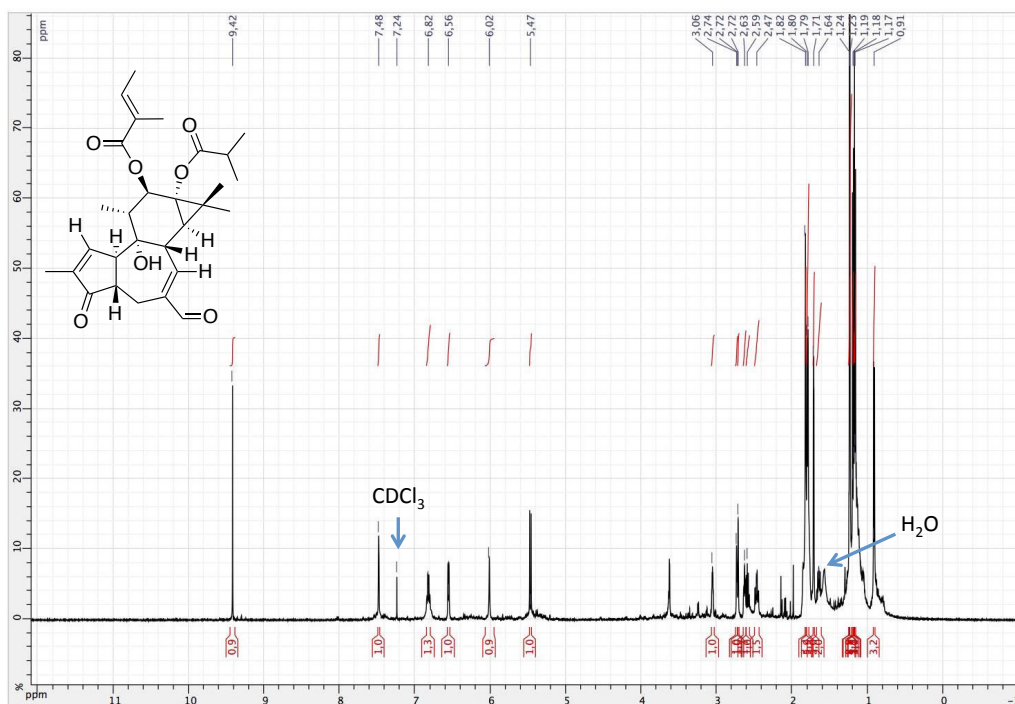


Figure S38.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4,20-ddPE A (**17**) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

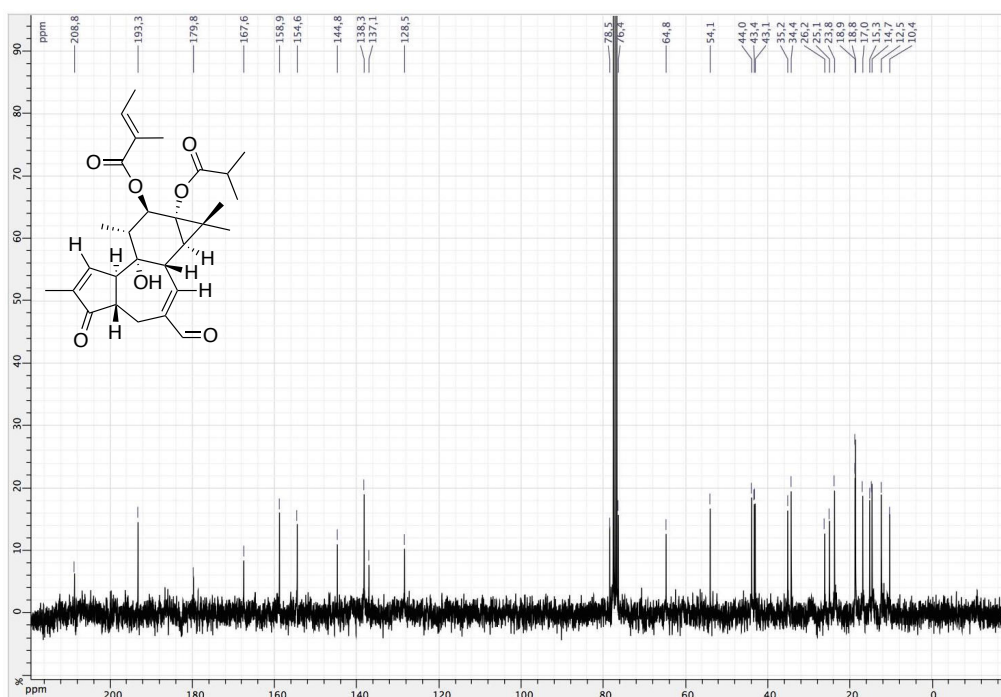




Figure S39. COSY spectrum of 4,20-ddPE A (**17**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

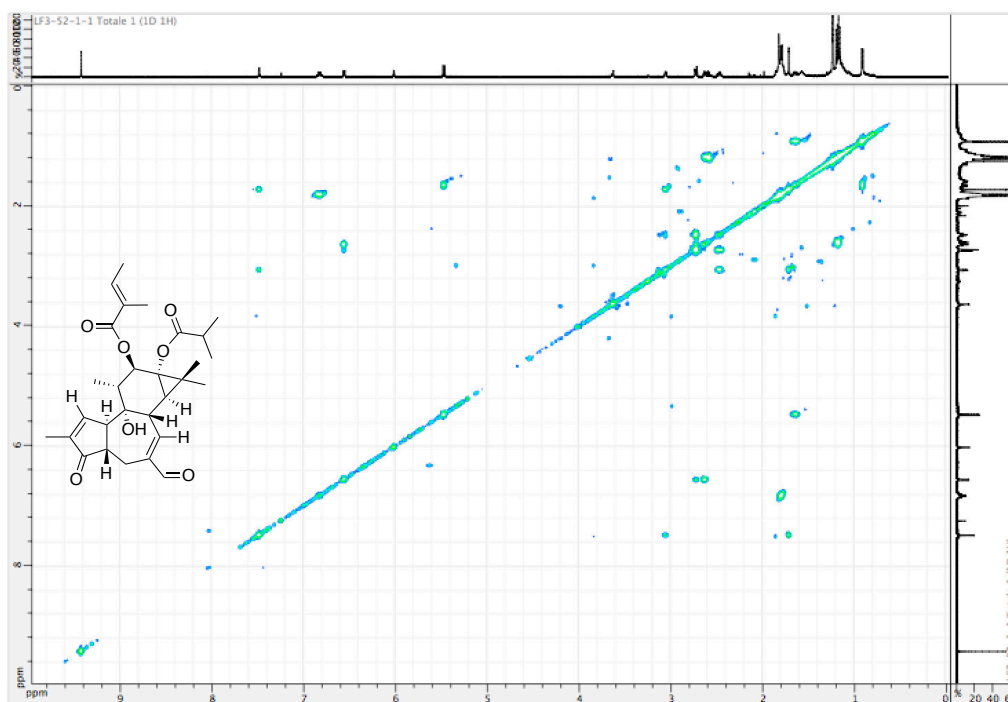


Figure S40. HSQC spectrum of 4,20-ddPE A (**17**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

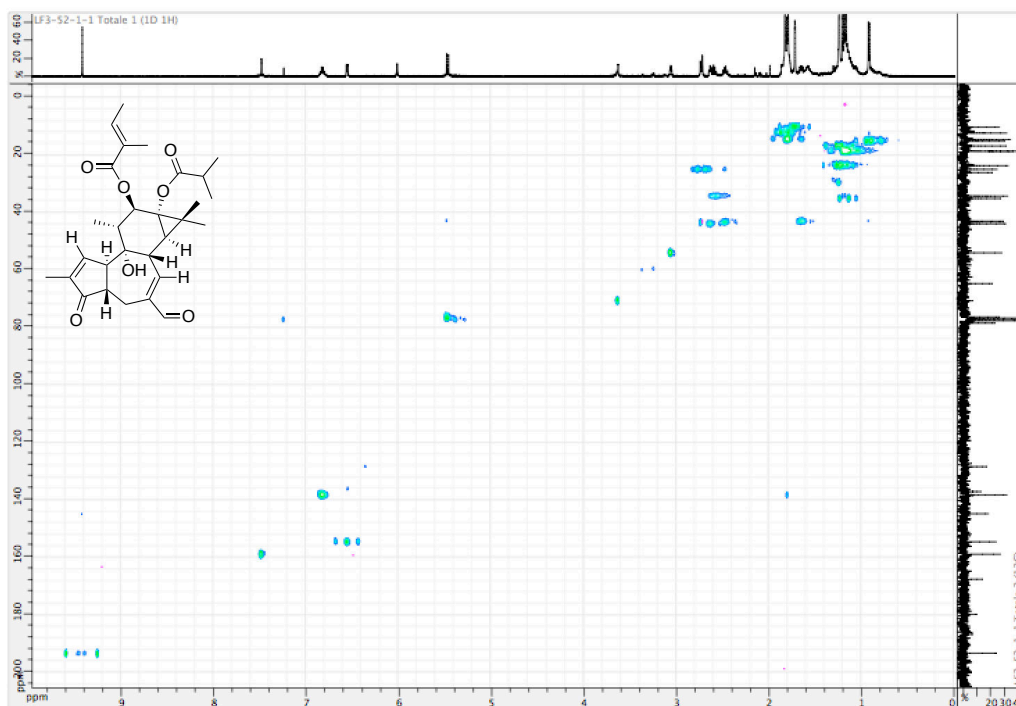


Figure S41. HMBC spectrum of 4,20-ddPE A (**17**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

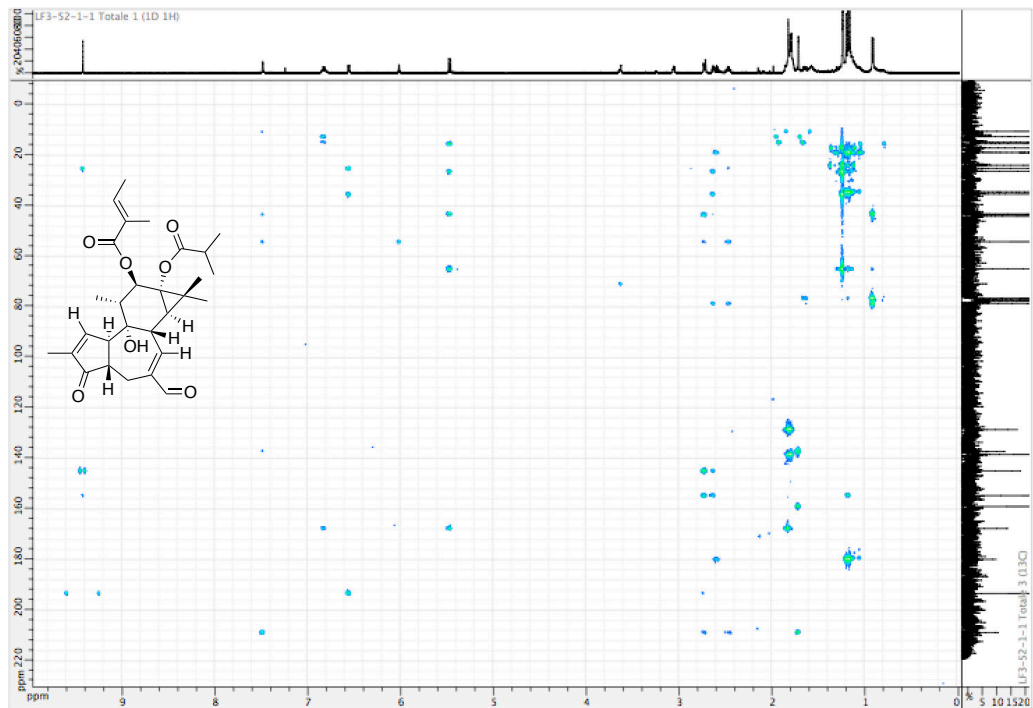


Figure S42. NOESY spectrum of 4,20-ddPE A (**17**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

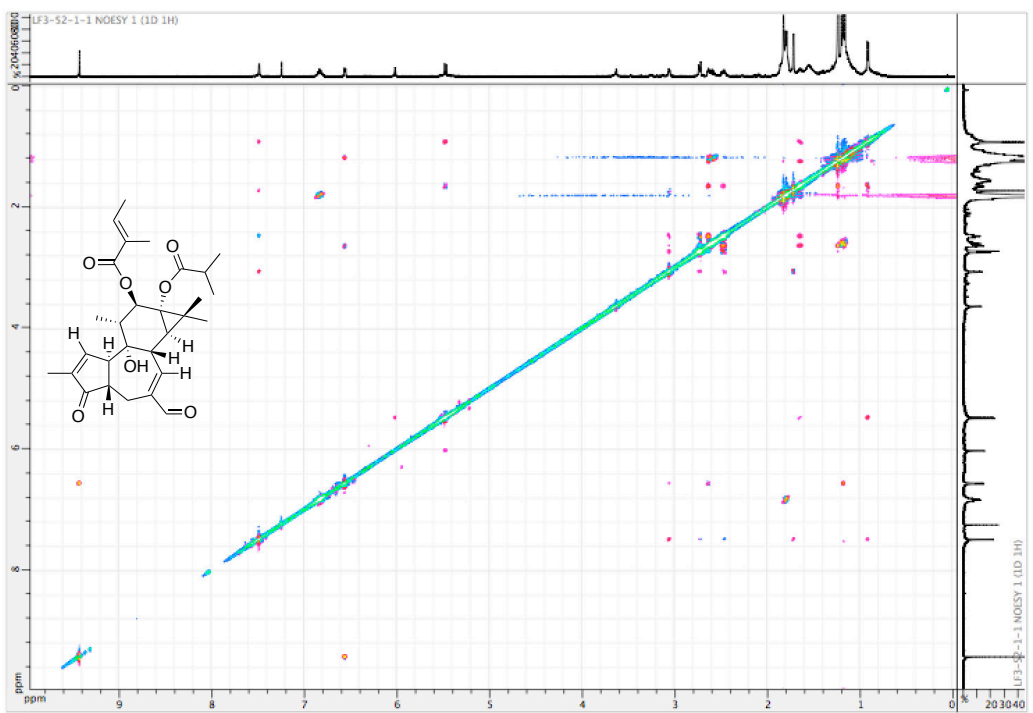


Figure S43. ESI-HRMS/MS of 4-dPE B (**18**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS spectra. (B) Molecular formula deduced from  $m/z$  483.2348

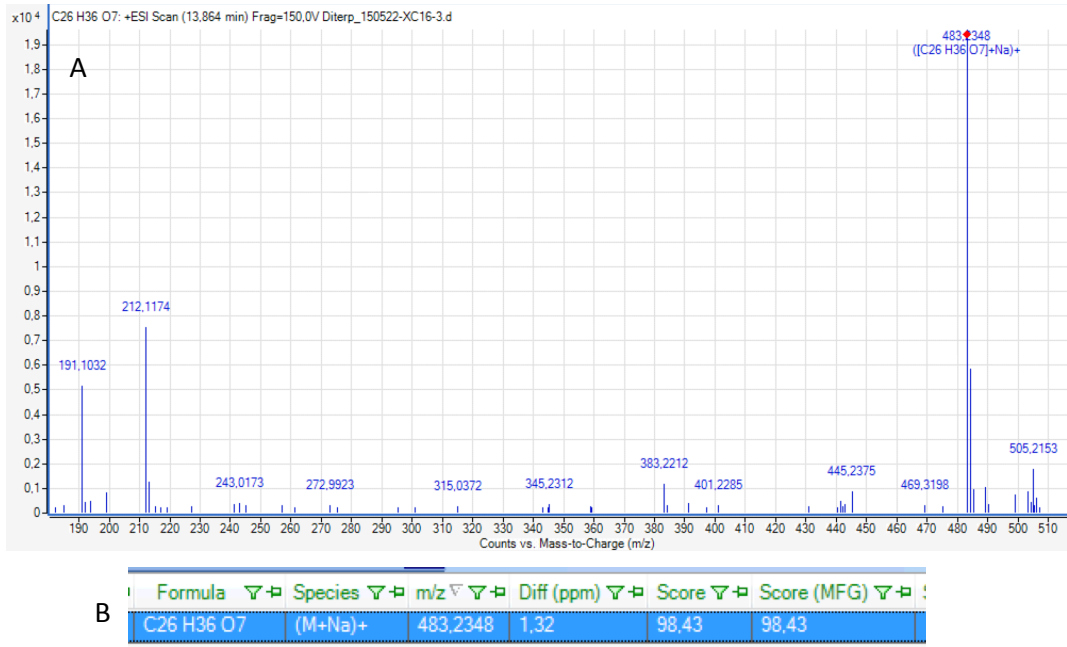


Figure S44. ESI-HRMS/MS of 4-dPE B (**18**) (Q-TOF). (A) ESI-HRMS/MS spectra of  $m/z$  483.2347. (B) Zoom on diterpene backbone ions

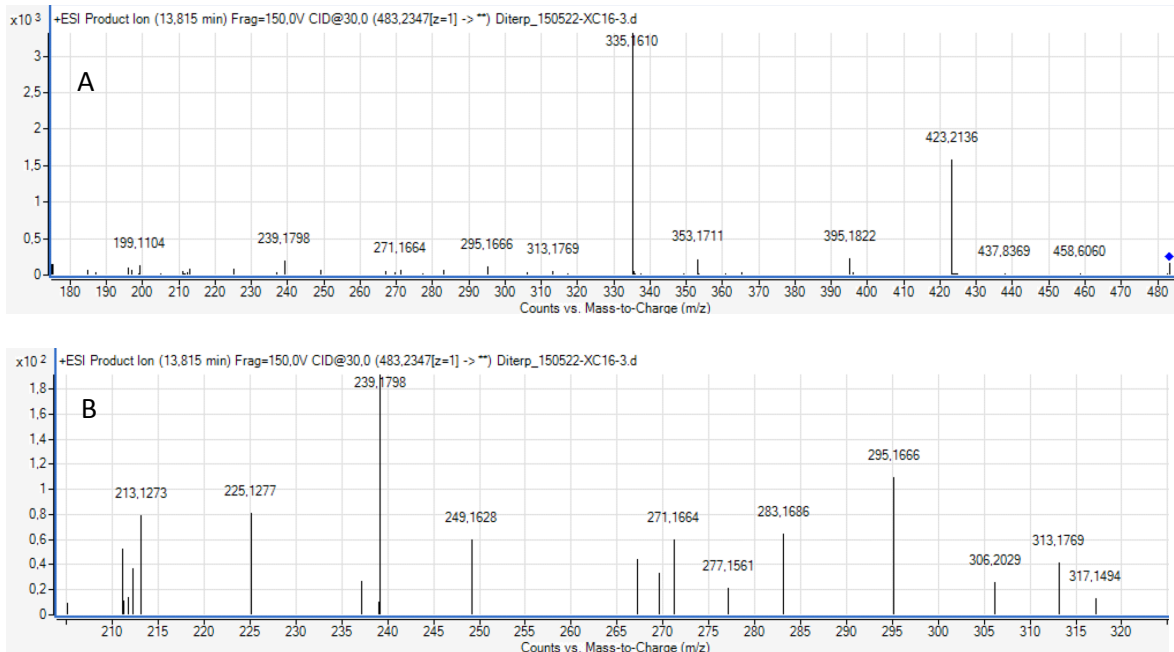


Figure S45.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

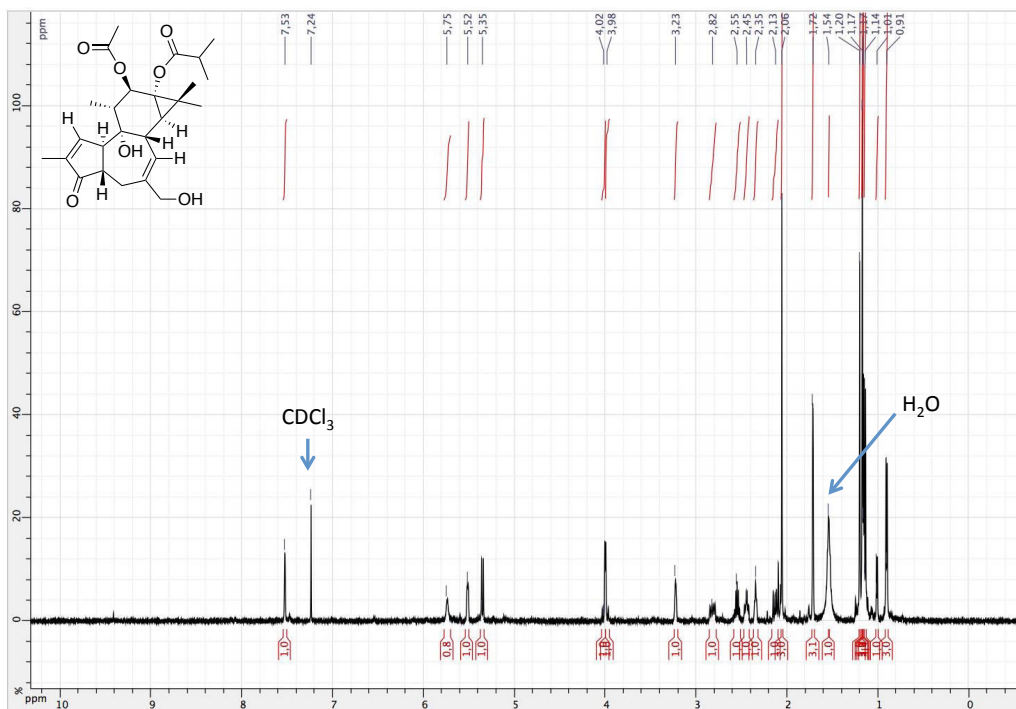


Figure S46.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4-dPE B (**18**) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

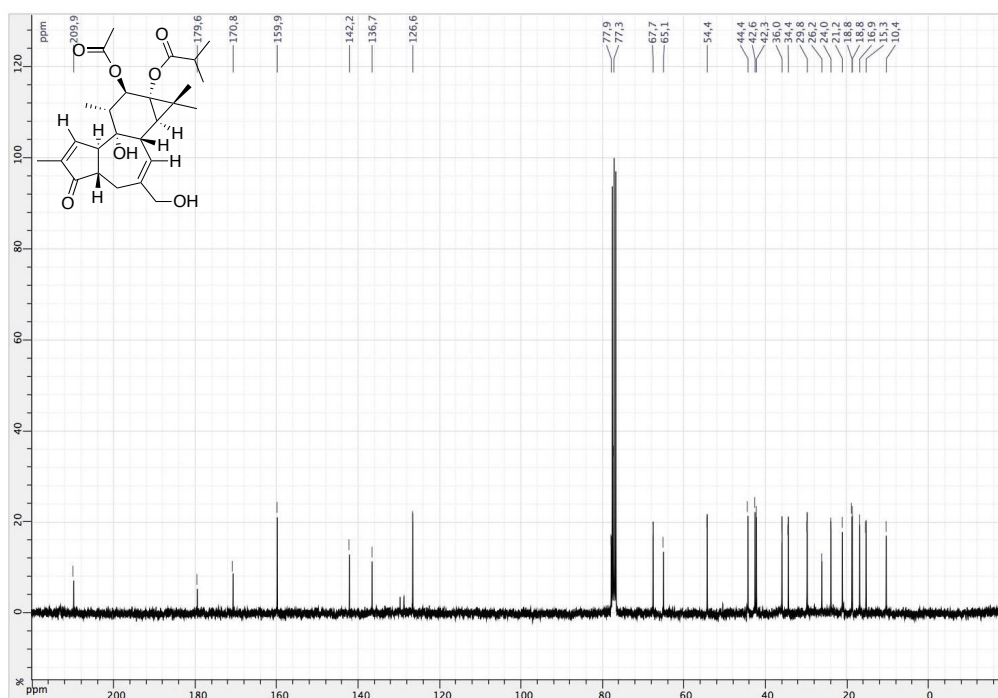


Figure S45.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

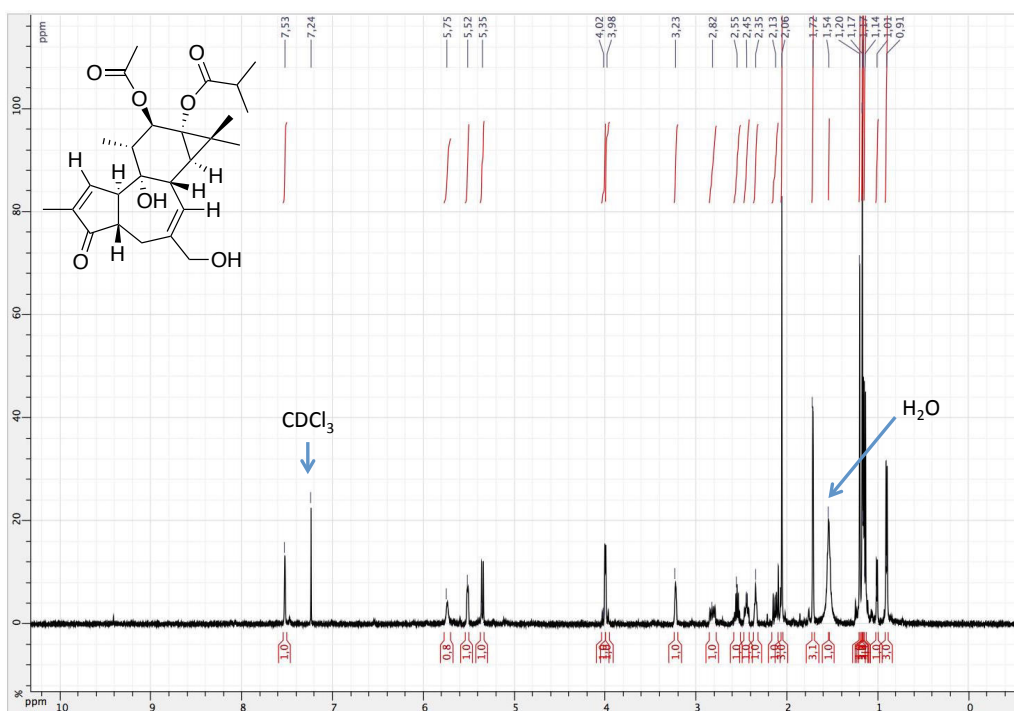


Figure S46.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4-dPE B (**18**) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

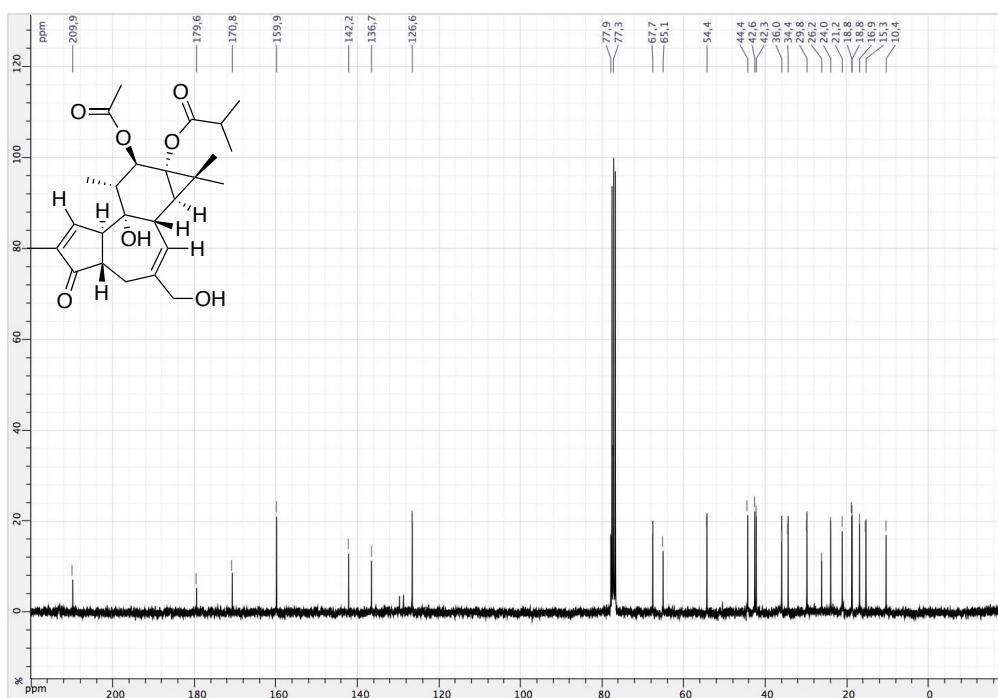


Figure S47. COSY spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)

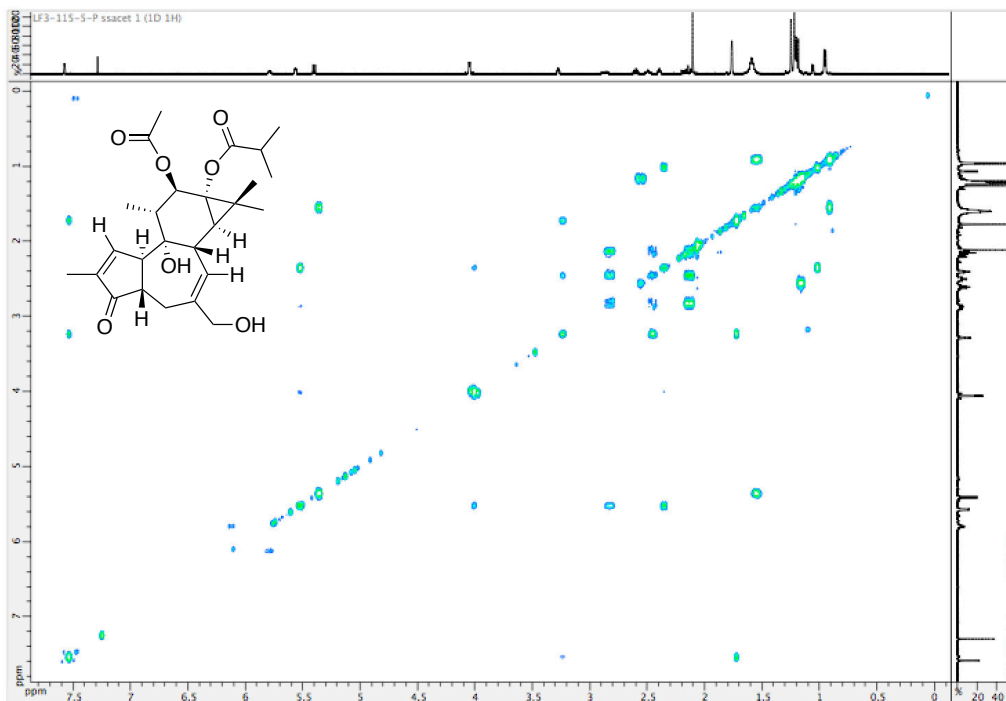


Figure S47. COSY spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

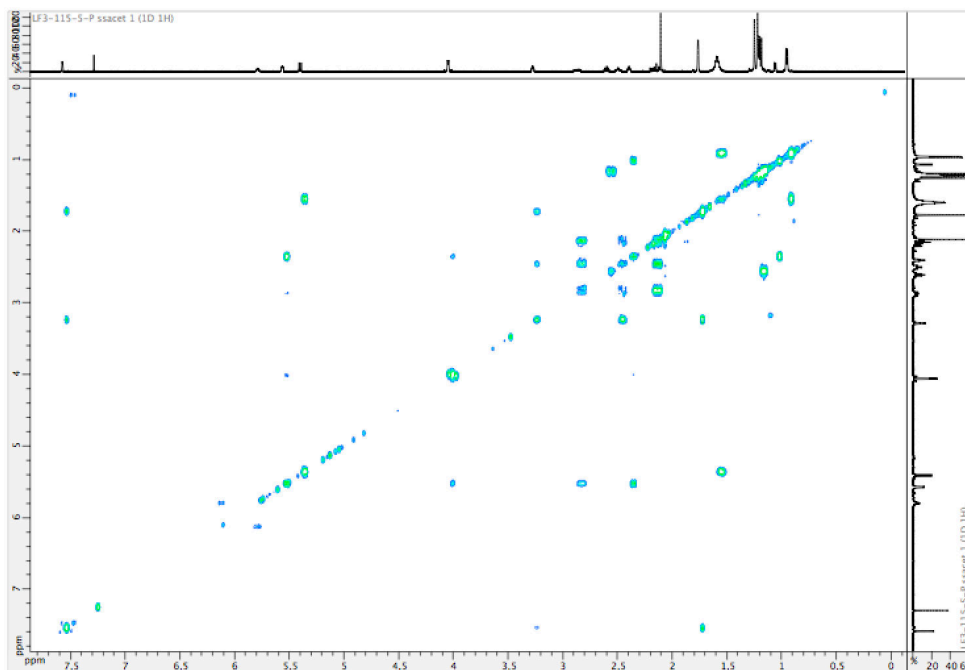
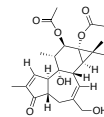


Figure S48. HMQC spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

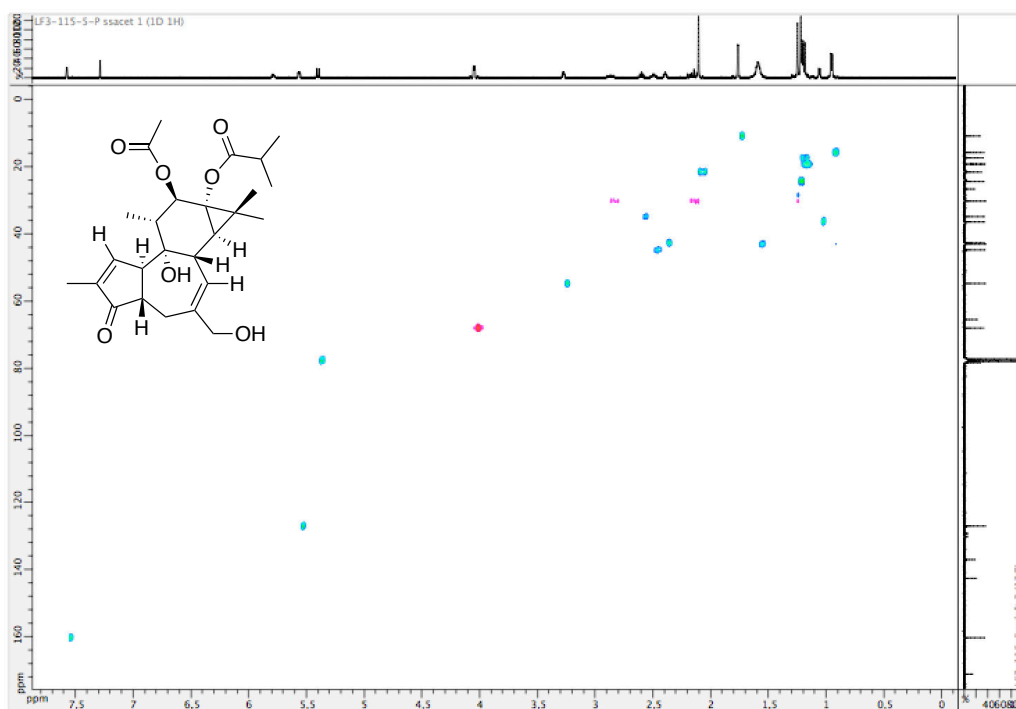




Figure S48. HMQC spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

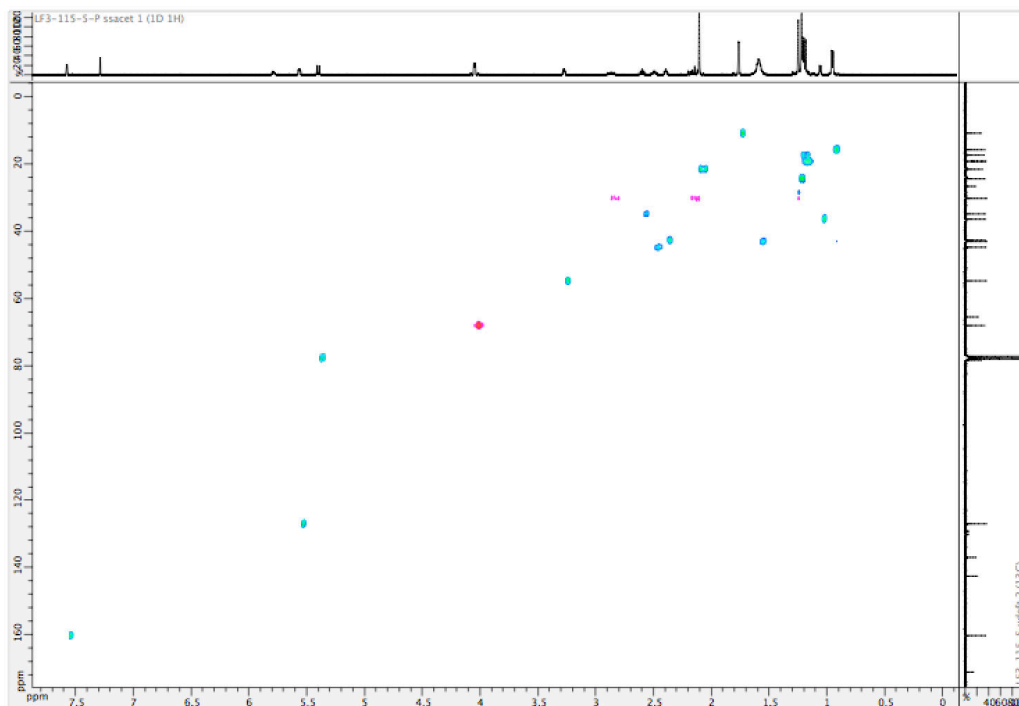
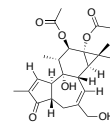


Figure S49. HMBC spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

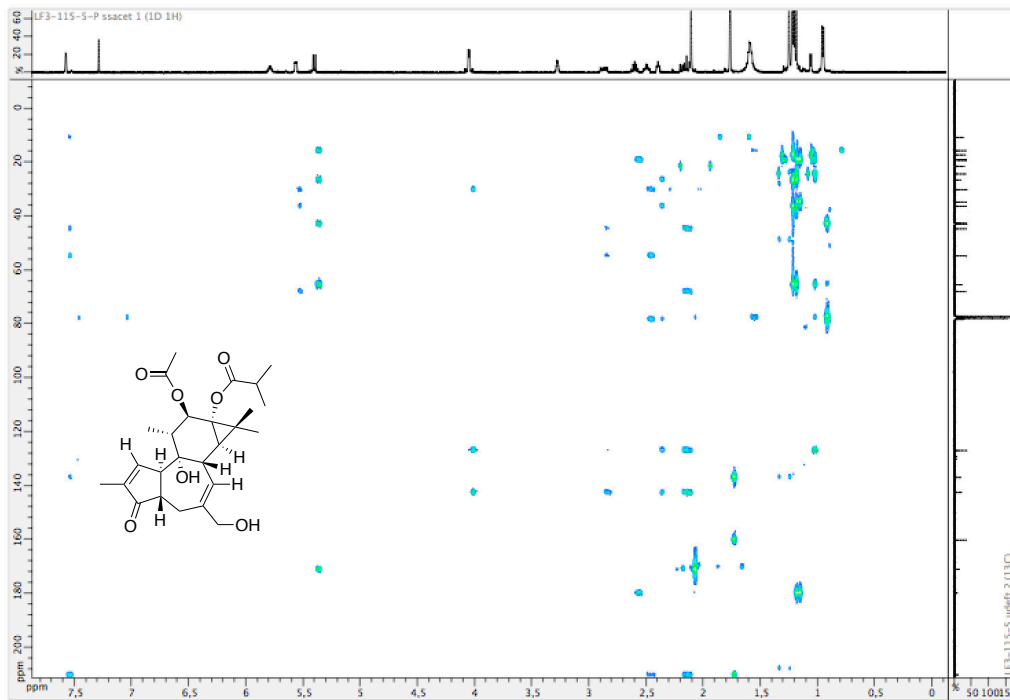


Figure S49. HMBC spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)

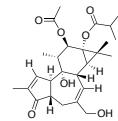
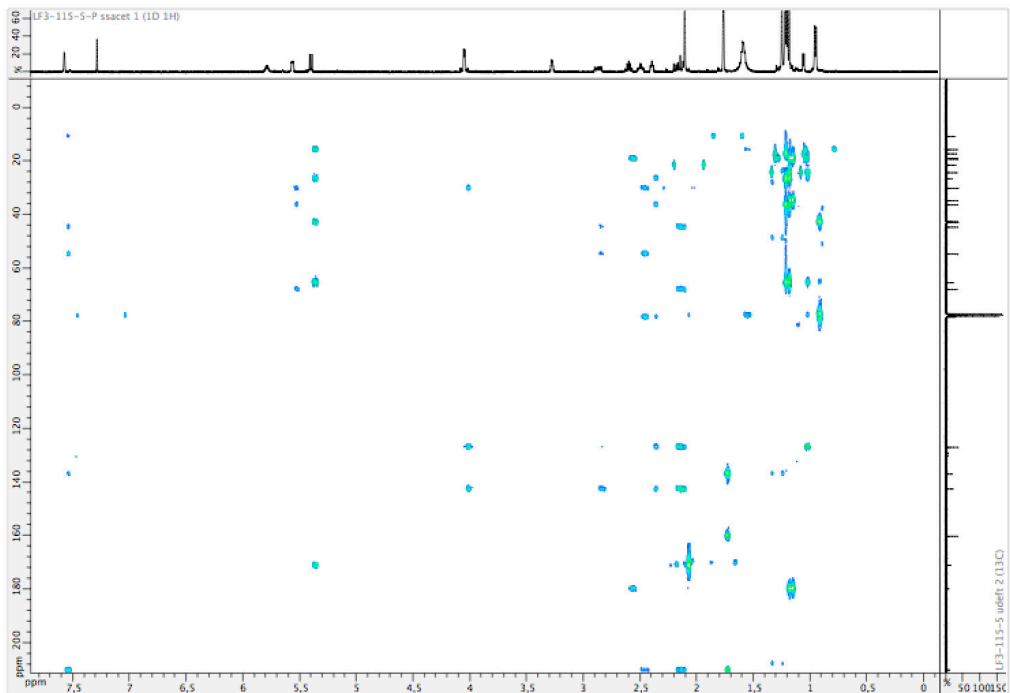
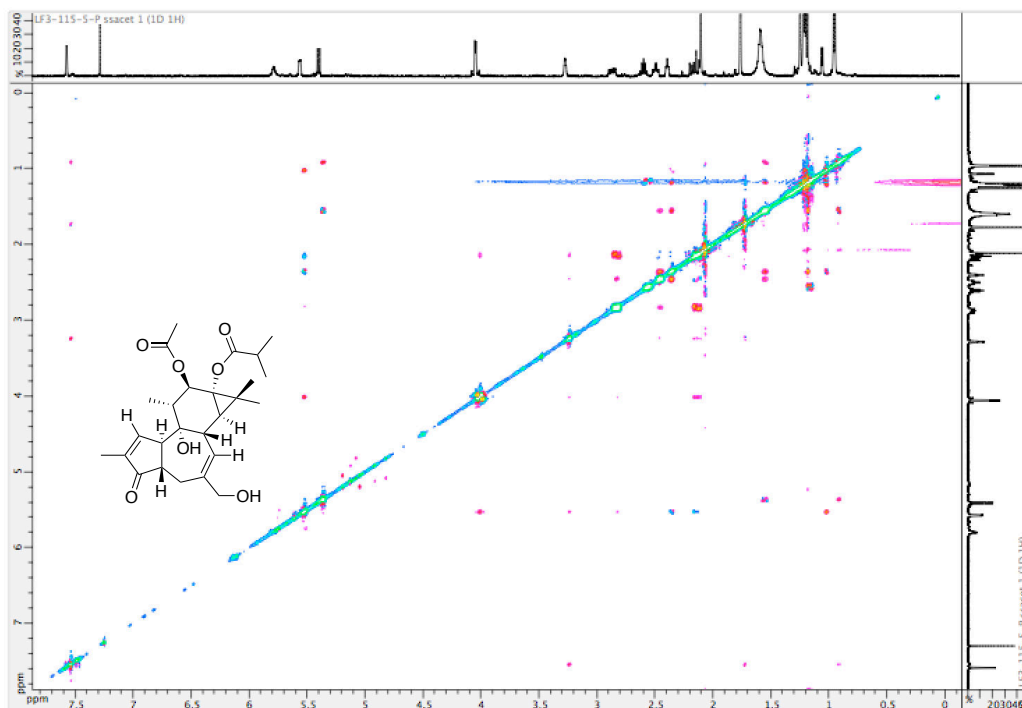


Figure S50. ROESY spectrum of 4-dPE B (**18**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K)



## Résumé

Le chikungunya est une maladie transmise par des moustiques du genre *Aedes* (dont *A. albopictus*, dit "moustique tigre"). Cette maladie provoque d'intenses fièvres et des douleurs articulaires chroniques fortement invalidantes. Les moustiques potentiellement vecteurs du virus du chikungunya (CHIKV) sont des espèces invasives qui, à la faveur du réchauffement climatique, se sont récemment implantés dans plusieurs régions du monde, dont la région méditerranéenne. Sa présence constitue un terreau favorable à la survenue d'épidémie. A l'heure actuelle, il n'existe ni vaccin, ni traitement médicamenteux efficace. Toutefois, des articles scientifiques ont récemment rapporté que des esters de diterpène isolés du genre *Trigonostemon* (Euphorbiaceae), avaient une activité inhibitrice de la réplication du CHIKV.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, des extraits de plantes du genre *Euphorbia* de Corse ont été étudiés dans le but d'isoler de nouvelles molécules douées d'activité antivirale sur la réplication du CHIKV. En collaboration avec le Dr. P. Leyssen (KU Leuven, Belgique), l'évaluation de l'activité anti-CHIKV de 45 extraits, obtenus à partir de 11 Euphorbiaceae de Corse, a permis de mettre en évidence la forte activité inhibitrice et sélective des extraits d'espèces du genre *Euphorbia in cellulo*. L'activité antivirale d'une série de 27 diterpènes de type phorboïde, disponibles commercialement, a également été étudiée. Les résultats ont montré que certains dérivés avaient une forte activité inhibitrice de la réplication du CHIKV, mais aussi sur celle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ces études ont permis d'une part, de déduire des relations structure-activité inédites et d'autre part, de soutenir l'hypothèse d'un mécanisme d'action anti-CHIKV impliquant la modulation des protéines kinases C (PKCs) par les phorboïdes. Dans le but de confirmer ou d'infirmer la présence des phorboïdes dans les extraits d'*Euphorbia*, une première méthode utilisant la chromatographie liquide (LC) haute performance couplée à un spectromètre de masse à trappe d'ions ( $MS^n$ ), a été développée à partir des composés standards. L'application de cette méthodologie a révélé qu'aucun des phorboïdes ciblés n'était présent dans les extraits d'*Euphorbia*. Ainsi, une seconde procédure LC- $MS^n$  a été mise en œuvre afin de détecter - de manière non ciblée - différents types d'esters diterpéniques. L'utilisation de cette approche a révélé que de nombreux diterpènes, non-apparentés aux phorboïdes, étaient présents dans les extraits. Un extrait de l'espèce *Euphorbia amygdaloides* subsp. *semiperfoliata* a été sélectionné pour réaliser un fractionnement bio-guidé, aboutissant à l'isolement et l'identification de 14 esters de jatrophane, dont neuf nouveaux composés. Parmi eux, l'un s'est avéré inhiber la réplication du CHIKV et du VIH. Par ailleurs, la structure d'un ester de jatrophane atypique, le jatrohémicétal, a été élucidée grâce à une approche originale combinant modélisation moléculaire et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Enfin, une nouvelle procédure de purification ciblée par spectrométrie de masse tandem (MS/MS) en chromatographie en phase fluide supercritique (SFC) a été développée et appliquée sur des fractions bioactives d'*E. amygdaloïdes* subsp. *semiperfoliata*. L'interprétation des données MS/MS s'est appuyée sur la génération de réseaux moléculaires. Par cette méthodologie, quatre nouvelles molécules ont pu être détectées, purifiées et identifiées ; il s'agit de deux nouveaux esters de jatrophane et de quatre esters dérivés du 4-déoxyphorbol. L'activité anti-VIH des constituants isolés a également pu être explorée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Alcami (CNM, Espagne). Ainsi, l'un des esters de 4-déoxyphorbol s'est révélé être doué d'un exceptionnel pouvoir inhibiteur de la réplication du VIH-1 ( $IC_{50} = 8$  nM et index de sélectivité  $> 6250$ ). Son mécanisme d'action semble s'apparenter à celui de la prostratine (molécule antivirale de référence) mais avec des propriétés antivirales environ 28 fois supérieur. Un deuxième ester de 4-déoxyphorbol s'est avéré être un des plus puissants inhibiteurs du CHIKV isolé à ce jour ( $EC_{50} = 0,34 \pm 0,12$   $\mu$ M and SI  $> 638$ ).

**Mots clés :** *Euphorbia*, activité antivirale, chikungunya, diterpène, spectrométrie de masse