



HAL
open science

Étude de la diversité structurale et des propriétés biologiques de diterpènes macrocycliques d'Euphorbia de Corse

Mélissa Esposito

► **To cite this version:**

Mélissa Esposito. Étude de la diversité structurale et des propriétés biologiques de diterpènes macrocycliques d'Euphorbia de Corse. Autre. Université Pascal Paoli, 2017. Français. NNT: 2017CORT0009 . tel-03426945

HAL Id: tel-03426945

<https://theses.hal.science/tel-03426945>

Submitted on 12 Nov 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

Mélissa Esposito

Le 27 Novembre 2017

**Étude de la diversité structurale et des propriétés
biologiques de diterpènes macrocycliques
d'*Euphorbia* de Corse**

Directeurs :

Mr Julien PAOLINI, Dr-HDR, Université de Corse Pascal Paoli
Mr Marc LITAUDON, Dr-HDR, CNRS-ICSN

Rapporteurs :

Mme Sophie TOMASI, Professeure, Université de Rennes 1
Mr Xavier CACHET, Dr-HDR, Université de Paris-Descarte V

Jury

Mme Sophie TOMASI, Professeure, Université de Rennes 1
Mme Liliane BERTI, Professeure, Université de Corse Pascal Paoli
Mr Xavier CACHET, Dr-HDR, Université de Paris-Descarte V
Mr Nicolas FABRE, Professeur, Université de Toulouse Paul Sabatier III
Mr Jean COSTA, Professeur émérite, Université de Corse Pascal Paoli

Euphorbia pithyusa



Euphorbia pithyusa subsp. *cupanii*



Euphorbia dendroides

Résumé

Les métabolites de type diterpène produits par les espèces du genre *Euphorbia* sont remarquables aussi bien par la diversité de leur squelette carboné, qu'en raison de leurs multiples propriétés biologiques. Les travaux précédents, réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire des métabolites de plantes et micro-organismes associés (Institut de Chimie des Substances Naturels) et le laboratoire de chimie des produits naturels (Université de Corse), ont permis de mettre en évidence l'activité antivirale, notamment inhibitrice de la réplication du virus du chikungunya (CHIKV), d'extraits obtenus à partir d'espèces du genre *Euphorbia* poussant à l'état spontané en Corse. Dans ce contexte, l'objectif principal du présent travail de doctorat est la découverte de nouveaux composés diterpéniques, possédant une activité anti-CHIKV et/ou modulatrice de la résistance aux médicaments (anti-MDR). Afin de créer de la diversité chimique et d'augmenter leurs potentialités thérapeutiques, des essais de modifications structurales de molécules isolées ont été envisagés.

Les travaux réalisés sur le latex d'*Euphorbia dendroides* ont permis d'isoler 24 esters de diterpène, dont 15 nouvelles molécules. Parmi eux, les esters de déoxyphorbol, isolés par l'utilisation de la prédiction de la bioactivité dans les réseaux moléculaires, ont montré une forte activité anti-CHIKV, tandis que deux esters de jatrophane ont inhibé les récepteurs transmembranaires de *Candida albicans* impliqués dans le phénomène de résistance médicamenteuse. Par ailleurs, une dizaine de composés ont été isolés d'*Euphorbia pithyusa* dont un ester de didéoxyphorbol présentant un pouvoir anti-CHIKV. Une vingtaine d'esters de diterpène, de type myrsinane, prémyrsinane et phorbol ont été isolés à partir d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii*, sous-espèce de la précédente. Une approche métabolomique par LC-MS/MS, basée sur l'utilisation de réseaux moléculaires et l'étude des voies de fragmentations, a été mise en œuvre en vue de comparer la composition diterpénique de ces deux taxa. D'un point de vue chimiotaxonomique, cette méthodologie s'est avérée efficace pour les différencier, mettant en évidence une variabilité chimique intraspécifique. Enfin, des modifications chimiques ont été entreprises sur deux esters de jatrophane isolés en quantité suffisante à partir du latex d'*E. dendroides*, permettant ainsi la formation de six dérivés originaux.

Mots clés : *Euphorbia*, diterpène, anti-CHIKV, anti-MDR, réseaux moléculaires, synthèse.

Abstract

The species belonging to the *Euphorbia* genus are remarkable for their ability to produce a large number of secondary metabolites, especially diterpenoids with a wide variety of carbon skeletons, which possess many interesting biological properties. A previous work demonstrated the strong antiviral activity of *Euphorbia* extracts against the chikungunya virus replication (CHIKV).

The objective of this work was to discover and study new chemical series from *Euphorbia* species growing spontaneously in Corsica and possessing anti-CHIKV and/or an anti-MDR properties (multi-drugs resistance). Several strategies were employed, including the chemical modifications on previously isolated compounds to create chemical diversity, and the isolation of new compounds guided by LC-MS/MS analysis. The investigation carried out on *Euphorbia dendroides* led to the isolation of 24 molecules, of which 15 were described for the first time. Some of isolated deoxyphorbol esters showed strong anti-CHIKV activity, while 2 jatrophone esters inhibited *Candida albicans* receptors responsible for the drug resistance phenomenon. About ten compounds have been isolated from *E. pithyusa* anti-CHIKV extract. Only a dideoxyphorbol ester exhibited a strong anti-CHIKV activity. The interpretation of LC-MS/MS analysis of *E. pithyusa* fractions using molecular networks and fragmentation pathways study, allowed the targeted isolation of twenty myrsinol, premyrsinol and phorbol derivatives to be isolated in its sister species *E. pithyusa* subsp. *cupanii*. Furthermore, molecular networks were used for chemotaxonomic comparison, to highlight chemotaxonomic differences and similarities between the two subspecies. Finally, chemical modifications were carried out on two abundant jatrophone esters isolated from *E. dendroides*, allowing 6 original derivatives to be synthesized.

Keywords: *Euphorbia*, diterpene, anti-CHIKV, anti-MDR, molecular networks.

Riasuntu

L'esteri di diterpenu sò cumposti naturali chì anu pruprietà biologiche chì anu avutu un interessu maiò mentre sti deci anni passati per via di e so pruprietà biologiche numerose. Per quessa, articuli scientifici recenti anu riferitu di l'attività antivirale di tippu dafnanu, tiglianu è ghjatrufanu isolate à partesi da piante di a famiglia di l'*Euphorbiaceae* (generu *Trigonostemon*, *Croton* o *Euphorbia*). Da un'antra parte, i diterpeni di tippu ghjatrufanu sò stati studiati dinù per u so putere inibitivu di ricettori implicati in a resistenza medicamentosa. I vegetali di u generu *Euphorbia* – ripresentati da à pocu pressu 2 000 spezie à livellu mundiale, cù 33 tassumi chì crescenu di modu spontaneu in Corsica – sò cunnisciuti da a so capacità à prудuce una diversità di costituenti di tippu diterpenicu. St'euforbi anu dinù a particolarità di prудuce un latticciu tossicu riccu di e so molecole è chì tene un rolu di difesa contru à i manghjaerbe, l'insetti o ancu i micruorganismi patogeni.

L'uggettivu di stu travagliu di tesa – cunduttu in u quadru d'una cullaburazione trà u laboratoriu di Chimica di i Prudutti Naturali (Università di Corsica) è u laboratoriu di i Metaboliti di Vegetali (ICSN – Gif-sur-Yvette) – hè di caratterizà l'esteri di diterpeni presentati in e spezie di u generu *Euphorbia* di Corsica è di studià e so attività biologiche. U studiu rializatu nantu à stratti d'*Euphorbia dendroides* hà permessu d'isulà una vintina di cumposti di tippu ghjatrufanu, cù dui chì anu una capacità inibitiva di i trasportadori di *Candida albicans* (fungu rispunsivule di candidose) implicati in a resistenza medicamentosa, di modu simile dinù quattru cumposti di tippu diussiforboli chì anu mustratu un'attività è una selettività per raportu à a replicazione virale di chikungunya (CHIKV). D'altronde, e strutture di i dui esteru di ghjatrufanu isolati in quantità chì abbastanza à partesi da stratti d'*E. dendroides* sò stati mudificati à livellu chimicu da furmà derivati uriginali chì pudarianu esse attivi. U studiu di a cumposizione chimica di e duie sottospezie d'*Euphorbia pithyusa* è *E. pithyusa* subsp. *cupanii*, hè statu rializatu, purtendu à l'isulamentu è l'identificazione d'una trentina di diterpeni di tippu premirsinole, mirsinole è forbole. E cumposizioni d'esteru diterpenichi di sti dui tassumi sò state apparacunate per via d'una avvicinata arrimbata nantu à l'utilizazione cumbinata di a LC-MS/MS è di e rete mulecularie.

Parolle impurtante : *Euphorbia*, diterpenu, chikungunya, resistenza medicamentosa, rete mulecularie.

Résumé vulgarisé

Les esters de diterpène sont des composés naturels dont les propriétés biologiques ont suscité un fort intérêt durant les dernières décennies en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques. A ce titre, l'activité antivirale des molécules de type daphnane et tigliane, isolées à partir de plantes de la famille des Euphorbiaceae (genres *Trigonostemon*, *Croton* ou *Euphorbia*), a été rapporté dans des articles scientifiques récents. Par ailleurs, les diterpènes de type jatrophane ont été très étudiés pour leur pouvoir inhibiteur de récepteurs impliqués dans la résistance médicamenteuse. Les végétaux du genre *Euphorbia* – représentés par environ 2000 espèces à l'échelle mondiale, dont 33 taxa poussant à l'état spontané en Corse – sont connus pour leur capacité à produire une grande diversité de composés diterpénique. Ces euphorbes présentent la particularité de produire un latex toxique riche de ces métabolites qui ont un rôle de défense contre les herbivores, les insectes ou les micro-organismes pathogènes.

L'objectif de ce travail de thèse – mené dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de chimie des produits naturels (Université de Corse) et le laboratoire des métabolites de plantes et micro-organismes associés (ICSN – Gif-sur-Yvette) – est de caractériser les esters de diterpène présents dans des espèces de Corse du genre *Euphorbia* et d'étudier leurs activités biologiques. L'étude réalisée sur le latex d'*Euphorbia dendroides* a permis d'isoler une vingtaine de composés de type jatrophane, dont deux possèdent la capacité d'inhiber des transporteurs de *Candida albicans* (champignon responsable de candidoses) impliqués dans la résistance médicamenteuse, ainsi que quatre composés de type déoxyphorbol ayant montré une forte activité et une bonne sélectivité sur l'inhibition de la réplication virale du chikungunya (CHIKV). Par ailleurs, les structures de deux esters de jatrophane, isolés en quantité suffisante à partir du latex d'*E. dendroides*, ont été modifiées chimiquement afin de former des dérivés originaux potentiellement plus actifs. L'étude de la composition chimique des deux sous-espèces, *Euphorbia pithyusa* et *E. pithyusa* subsp. *cupanii*, a été réalisée, amenant à l'isolement et l'identification d'une trentaine de diterpène de type esters de prémyrsinol, myrsinol et phorbol. La composition en esters diterpéniques de ces deux taxa a été comparée grâce à une approche basée sur l'utilisation combinée de la LC-MS/MS et des réseaux moléculaires, mettant en évidence une variabilité chimique intraspécifique.

Mots clés : *Euphorbia*, diterpène, chikungunya, résistance médicamenteuse, réseaux moléculaires, synthèse.

Remerciements

J'ai eu la chance d'effectuer mes travaux de doctorat en codirection au sein de deux équipes de recherche, le laboratoire de Chimie de Produits Naturels (CPN) de l'Université de Corse dirigé par le Pr. Jean Costa et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles ICSN-CNRS à Gif-sur-Yvette dans l'équipe du Dr. Fanny Roussi. J'adresse mes sincères remerciements au charismatique Pr. Jean Costa, non seulement pour m'avoir soutenu dans l'obtention d'un contrat doctoral, mais aussi pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait partager son savoir et son expérience, notamment lors de mes premiers enseignements de la stéréochimie. Je remercie également le Dr. Fanny Roussi de son accueil, sa disponibilité, ses précieux conseils et sa gentillesse.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à mes directeurs de thèse, aux docteurs Julien Paolini et Marc Litaudon pour toutes les connaissances qu'ils m'ont transmises tout au long de cette enrichissante expérience. Ils ont su partager leurs expériences de la chimie des produits naturels en prodiguant de précieux conseils et un encadrement efficace.

Je remercie le Pr. Sophie Tomasi et le Dr. Xavier Cachet pour le travail de rapporteur qu'ils ont effectué sur ce manuscrit de thèse, ainsi que le Pr Liliane Berti, le Pr Nicolas Fabre et le Pr Jean Costa pour leur participation au jury.

Je tiens à adresser mes remerciements et amitiés au Dr Jean-François Gallard, du service de RMN de l'ICSN pour son aide dans l'analyse des composés à basse et haute température, pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je remercie également le Dr Pascal Retailleau de sa disponibilité, son expertise sur l'étude des cristaux et son sens de l'humour. Il a toujours fait son possible dans la réalisation des expériences de cristallographie malgré la qualité parfois sub-optimale des cristaux. Je souhaite témoigner toute ma reconnaissance et mon amitié au Dr. Sandy Desrat pour m'avoir montré les clés de la synthèse organique, d'avoir toujours été disponible, de bons conseils et un collaborateur de haute qualité. Je le remercie également pour sa bonne humeur quotidienne et son sens de l'humour.

D'autres acteurs essentiels au bon déroulement de ce travail de thèse méritent toute ma gratitude, le Dr. David Touboul et le Dr. Isabelle Schmitz-Afonso du service de spectrométrie de masse pour la réalisation des expériences de LC-MSⁿ sur le Q-TOF et l'orbitrap ; le Dr.

Bogdan I. Iorga et le Dr. Hirsto Nedev pour la modélisation d'esters de jatrophane et leur aide dans l'interprétation des résultats.

Je souhaite également évoquer ma gratitude aux collaborateurs : l'équipe du Dr. Pieter Leyssen pour son efficacité dans la réalisation des essais antiviraux (anti-CHIKV) ; au Pr. Attilio di Pietro pour sa participation très appréciable dans la rédaction d'un article et sa collaboration avec l'équipe du Pr. Rajendra Prasad qui a encadré les essais sur les récepteurs de *Candida albicans*.

Je tiens à exprimer à mon mari, mon équipier, mon soutien, le Dr. Louis-Félix Nothias, ma sincère gratitude pour m'avoir donné beaucoup plus que ce que je n'aurais imaginé. Par ses épiques et fructueuses récoltes du latex d'*E. dendroides* et d'*E. pithysa*, ces plantes ont été de solides fondations à ces travaux de recherche. De plus, la plus improbable de nos nombreuses balades insulaires a permis à mon « spécialiste des Euphorbes corses » de repérer *E. pithysa* subsp. *cupanii*, coupée par le personnel de l'entretien des routes. D'un point de vu plus général je le remercie sincèrement d'avoir partagé sa passion des esters de diterpène d'*Euphorbia*, et ses compétences en *computational mass spectrometry* et métabolomique. D'un tempérament franc et généreux, il s'est toujours montré d'un bon soutien moral en m'encourageant dans mes idées, notamment sur les modifications chimiques d'extraits interprétés par les réseaux moléculaires. Tous les deux, nous formons une bonne équipe dans la vie comme dans le travail !!

Au laboratoire CPN, je remercie toute l'équipe, sans oublier Frank pour sa convivialité, son aide et ses capuccinos pendant les longues heures de TP, ainsi qu'Ali et Marion qui ont été plus que des collègues de travail. A l'ICSN, je souhaite remercier mon CEI et particulièrement tous les membres de l'équipe 45, ainsi que les personnes de l'institut avec qui j'ai partagé d'agréables conversations.

Je remercie tous mes amis et les potes de Corte pour avoir avoir partager ces moments de décompression indispensable, tout au long de cette thèse, et plus particulièrement mes deux Caro, Anaïs, Claire, Adeline, Solène, Alice, Fanny, Pauline, Léa, Tom, Polo, Candice et ma voisine de St Rémy, Carène, sans oublier mon chat Ina.

Un grand merci à ma famille, ma sœur Alicia et mon frère Toni et tout particulièrement à mes parents, Mario et Barbara, pour leur écoute, leurs conseils, leur soutien et tout l'amour

qu'ils m'apportent ! Ils ont supporté mes hauts et mes bas, et mon charabia scientifique sans jamais se plaindre, je n'aurais pas pu souhaiter un meilleur soutien, merci Papa et Maman ! Une pensée va à mon Papy, qui me disait toujours pour me taquiner « tu cherches, tu cherches, mais tu ne trouves jamais rien ! ». Je remercie très chaleureusement ma Mamie qui m'a soutenue et offert de fabuleuses réserves alimentaires pendant toutes mes années d'études, ça restera gravé dans ma mémoire !!

Je dédie ce travail à ma fille Emmy qui a su, par sa joyeuse animation *in utero* durant la rédaction de ma thèse, m'apporter énormément de joie, de bonheur et d'amour.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
INTRODUCTION	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
A. LE GENRE <i>EUPHORBIA</i> : UNE SOURCE ABONDANTE EN ESTERS DE DITERPÈNE	6
1. Descriptions botaniques et compositions chimiques	7
• Généralités	7
• <i>Euphorbia dendroides</i> L.	10
• <i>Euphorbia pithyusa</i> L.	13
• <i>Euphorbia pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i> (Guss. Ex Bertol.) Radcl.-Sm.....	15
2. Diversité des esters de diterpène	18
• Généralités	18
• Les esters de diterpène dits « <i>abondants</i> ».....	19
Les esters de diterpène à squelettes jatrophane et lathyrane	19
Les esters de diterpène à squelettes ingénane et tigiane.....	22
• Les esters de diterpène dits « <i>communs</i> »	24
Les esters de diterpène à squelettes myrsinane et prémyrsinane.....	24
Les esters de diterpène à squelettes cyclomyrsinane, ségétane et préségétane	26
• Les esters de diterpène dits « <i>rares</i> ».....	27
Les esters de diterpène à squelettes paraliane, pépluane, daphnane et euphoractine.....	27
B. LES ESTERS DE JATROPHANE ET PHORBOÏDES : POTENTIELS PHARMACOLOGIQUES ET SYNTHÈSES	30
1. Les esters de jatrophane : étude des propriétés inhibitrices sur la glycoprotéine-P	31
• La chimiorésistance médicamenteuse et la glycoprotéine-P	31
• Les esters de jatrophane inhibiteurs de récepteurs MDR.....	33
• Les synthèses totales et modulations chimiques d'esters de jatrophane.....	37

2. Les phorboïdes : études des propriétés anti-chikungunya et modulatrices des protéines kinases C	41
• Le virus du chikungunya et la protéine kinase C	41
• Les phorboïdes anti-CHIKV	45
• Les synthèses totales et modulations chimiques des phorboïdes	48
Les ingénanes	48
Les tiglianes et les daphnanes	52
C. LES RÉSEAUX MOLÉCULAIRES : UN OUTIL EFFICACE POUR L'ORGANISATION DES DONNÉES LC-MS/MS POUR L'ÉTUDE DE PLANTES... 56	
1. Présentation de la LC-MS/MS	57
2. Les réseaux moléculaires : un outil efficace pour la caractérisation d'extraits de plantes 61	
• Le principe des réseaux moléculaires	61
• Applications des réseaux moléculaires à la caractérisation d'extraits de plantes	64
RÉFÉRENCES	68
<u>II. RÉSULTATS</u>	<u>86</u>
A. ARTICLE N°1	87
B. ARTICLE N°2	98
C. ARTICLE N° 3	108
D. ARTICLE N°4	119
E. MANUSCRIT N°5	129
F. MODIFICATIONS CHIMIQUES D'ESTERS DE DITERPÈNE POUR CRÉER DE LA DIVERSITÉ STRUCTURALE	161
1. Contexte, objectifs et moyens mis en œuvre	161
2. Les modifications chimiques des euphodendroidines E et F.....	164
• Époxydation	164
• Amination réductrice	165
• La réaction de Tsuji-Trost.....	166
Généralités.....	166
Utilisation du triéthylsilane (Et ₃ SiH)	167
Utilisation d'amines	169
• Réaction en présence d'acides de Lewis.....	171
Utilisation du trifluorométhanesulfonate d'ytterbium [Yb(OSO ₂ CF ₃) ₃ .H ₂ O]	171
Utilisation du trifluorure de bore (BF ₃ .OEt ₂)	171

• Conclusion et perspectives.....	174
3. Partie expérimentale	174
<u>III. ANALYSE TRANSVERSALE</u>	179
A. ÉTUDE DU LATEX D’<i>EUPHORBIA DENDROIDES</i>	180
1. Schéma récapitulatif	181
2. Identification d’esters de jatrophane.....	182
3. Étude conformationnelle des esters de jatrophane	185
4. Evaluation des esters de jatrophane sur la chimiorésistance	189
5. Evaluation anti-CHIKV des esters de jatrophane.....	191
6. Prédiction de bioactivité : identification des esters de déoxyphorbol	193
7. Modifications chimiques des esters de diterpène	196
B. ÉTUDE DE DEUX SOUS-ESPÈCES : <i>EUPHORBIA PITHYUSA</i> ET <i>EUPHORBIA PITHYUSA</i> SUBSP. <i>CUPANII</i>	200
1. Schéma récapitulatif	201
2. Identification des diterpènes de type prémyrsinane, myrsinane et tigliane.....	202
3. Évaluation anti-CHIKV des prémyrsinanes, myrsinanes et tiglianes.....	206
4. Comparaison chimiotaxonomique de la composition en esters diterpéniques d’ <i>Euphorbia pithyusa</i> et d’ <i>Euphorbia pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i>	209
<u>IV. CONCLUSION.....</u>	213
<u>ANNEXES.....</u>	216

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Ensemble des médicaments approuvés entre 1981 et 2014, par catégories.[10].....	2
Figure 2. Cyathium d' <i>Euphorbia dendroides</i> à différents stades de maturité. Photo : Marc Litaudon..	8
Figure 3. <i>Euphorbia dendroides</i> dans son biotope naturel (calanques de Piana). Photo : Marc Litaudon	10
Figure 4. Dessins de <i>Tithymale dendroides</i> selon l'histoire générale des plantes de Daléchamps et Des Moulins (début du XVIIème siècle).[39].....	11
Figure 5. Rameau d' <i>Euphorbia dendroides</i>	11
Figure 6. Aire de répartition d' <i>Euphorbia dendroides</i> .[37]	12
Figure 7. <i>Euphorbia pithyusa</i> dans son biotope naturel (Cap Corse). Photo : Mario Esposito	13
Figure 8. <i>Euphorbia pithyusa</i> d'après le « Bolletino ».....	14
Figure 9. <i>Euphorbia pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i> dans son biotope naturel (Morosaglia). Photo : Louis- Félix Nothias.....	15
Figure 10. <i>Euphorbia pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i> d'après le « Bolletino ».....	16
Figure 11. Squelette de type jatrophane.	20
Figure 12. Principaux esters retrouvés chez les esters de jatrophane et de lathyrane.....	20
Figure 13. Squelette jatrophane modifié de type 17-bishomojatrophane.	21
Figure 14. Squelette de type lathyrane.	21
Figure 15. Jatrophane et lathyrane réarrangés de type <i>abeo</i> -jatrophane et <i>abeo</i> -lathyrane.....	22
Figure 16. Squelette de type ingénane.....	23
Figure 17. Groupement [(benzamido)benzamido]benzoyle.	23
Figure 18. Squelette de type tigliane.	24
Figure 19. Ester de phorbol de type <i>A-seco</i> -phorbol.....	24
Figure 20. Squelette de type myrsinane.....	25
Figure 21. Squelette de type prémyrsinane.	26
Figure 22. Squelette de type cyclomyrsinane.....	26
Figure 23. Squelettes de type ségétane et préségétane.	27
Figure 24. Squelette de type paraliane et pépluane.	28
Figure 25. Squelette de type daphnane.....	28
Figure 26. Squelette de type euphoractine.....	29
Figure 27. Schéma de la P-gp.[103]	32
Figure 28. Carte des départements et années d'implantation du vecteur <i>Aedes albopictus</i> en France métropolitaine.[153]	42
Figure 29. Schéma des trois classes de PKC.[163]	43
Figure 30. Réarrangement d'un ingénol en tigliane en milieu acide faible.[230]	51

Figure 31. Dérivés d'ingénols avec différents degrés d'oxydation.[231].....	52
Figure 32. Schéma général du fonctionnement d'un système CLHP préparif.	57
Figure 33. Schéma général du fonctionnement de la LC-MS/MS.....	58
Figure 34. Schéma de la création d'un réseau moléculaire. a : représente l'alignement spectral et la recherche dans les banques de données puis la visualisation ; b : représente un exemple d'alignement spectral détaillé.[11]	62
Figure 35. Schéma d'un réseau moléculaire.[307]	63
Figure 36. Chiffres sur l'année 2014-2015 de l'utilisation de GNPS dans le monde.[301]	64
Figure 37. Les réseaux moléculaires de l'extrait d' <i>Euphorbia semiperfoliata</i> annotés par les esters de jatrophone (JE-A, JE-B et JE-C) et de 4-déoxyphorbol (4-dPE).[314]	66
Figure 38. Constellation des composés de la famille des schweinfurthins (SWF), issue des réseaux moléculaires générés à partir d'analyses des extraits de plusieurs espèces de <i>Macaranga</i> .[316]	67
Figure 39. <i>Euphorbia dendroides</i> ; Piana. Photo : M. L.....	87
Figure 40. Cyathium d' <i>Euphorbia dendroides</i> . Photo : M. L.	98
Figure 41. Latex d' <i>Euphorbia dendroides</i> ; Photo de M. L.	108
Figure 42. <i>Euphorbia pithyusa</i> . Photo : M. E.....	119
Figure 43. Cyathium d' <i>Euphorbia pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i> . Photo : M. E.	129
Figure 44. Schéma d'extraction du latex d' <i>E. dendroides</i>	182
Figure 45. Euphodendroïdine F.....	183
Figure 46. Structures des euphodendroïdines (à gauche) et des terracinolides (à droite).	184
Figure 47. Spectre RMN ¹ H de l'euphodendroïdine K à température ambiante dans le CDCl ₃	185
Figure 48. Modèles moléculaires des conformères de type <i>exo</i> (gauche) et de type <i>endo</i> (droite) d'un ester de jatrophone.	186
Figure 49. Zoom du spectre RMN ¹ H (6,5 à 3,2 ppm) de l'euphodendroïdine K à basse température.	187
Figure 50. Energie relative des taux de transitions d'interconversion des euphodendroïdines E (rouge), K (vert) et L (bleu).....	188
Figure 51. Les quatre types de dérivés d'esters de jatrophone : les 9-14-dioxojatrophanes (A), les 9-oxojatrophanes (B), les 14-oxojatrophanes (C) et les terracinolides (D).	190
Figure 52. Schéma de fractionnement du latex d' <i>E. dendroides</i> et activités anti-CHIKV des extraits et des fractions correspondantes.	192
Figure 53. Figure du réseau moléculaire du latex d' <i>Euphorbia dendroides</i> présenté dans l' article 3	195
Figure 54. Réactifs, produits et conditions de la réaction : (i) Pd(P(<i>t</i> -Bu) ₃) ₂ , NMO, Et ₃ SiH, THF, 70 °C, 20 h ; (ii) BF ₃ .OEt ₂ , CH ₂ Cl ₂ , température ambiante, 1 h.....	197

Figure 55. Réseaux moléculaires permettant de visualiser la réactivité des composés diterpénique en mélange d' <i>E. dendroides</i> (à gauche) et son diagramme de Venn (à droite).....	198
Figure 56. Réseaux moléculaires obtenus à partir de l'extrait brut d' <i>E. dendroides</i> (en violet) et de l'extrait modifié par l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OET}_2$, (en vert) ; observation des différents types de squelettes diterpéniques : références de type jatrophane (en jaune), terracinelide (en bleu), déoxyphorbol (en rose) et des nouveaux jatrophane modifiés (en rouge).	199
Figure 57. Extraction Solide-Liquide par macération.	202
Figure 58. Extraction Solide-Liquide au Zippertex.....	202
Figure 59. Schémas de fractionnement d' <i>E. pithyusa</i> (à gauche) et d' <i>E. pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i> (à droite).....	203
Figure 60. CCM sous UV : C = extrait MeCN avec chlorophylles (tâches rouges) ; F = extrait AcOEt après étapes de précipitation des chlorophylles.....	203
Figure 61. Trois classes (A, B et C) de dérivés de diterpènes à squelette prémyrsinane.	204
Figure 62. Deux classes (D et E) de dérivés de diterpènes à squelette myrsinane.....	205
Figure 63. Les esters de phorbol (F) et le dérivé auto-oxydé (G).	205
Figure 64. Schéma de fractionnement d' <i>E. pithyusa</i> et activité anti-CHIKV.	206
Figure 65. Schéma de fractionnement d' <i>E. pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i> et activité anti-CHIKV.....	207
Figure 66. Figure des réseaux moléculaires d' <i>E. pithyusa</i> et d' <i>E. pithyusa</i> subsp. <i>cupanii</i> du manuscrit 5	209
Figure 67. Esters de prémyrsinol (A, B et C) et myrsinol (D et E) (références et analogues) et leurs ions CARACTERISTIQUES DE LA FRAGMENTATION DE LEUR SQUELETTE.....	211

LISTE DES ABRÉVIATIONS

^{13}C	Carbone 13
^1H	Proton 1
4-dPE	Ester de 4-déoxyPhorbol
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
AcOEt	acétate d'éthyle
APG	<i>Angiosperms Phylogeny Group</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine- TriPhosphate
CC ₅₀	Concentration nécessaire à 50% de Cytotoxicité
CDCl ₃	chloroforme deutéré
CHIKV	Virus du CHIKungunya
CID	Dissociation Induite par Collision
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Pression ou performance
CLUHP	Chromatographie Liquide Ultrat Haute Pression ou performance
COSY	<i>COrrrelation SpectroscopY</i>
CPN	Chimie des Produits Naturels (UMR SPE)
CS	Score Cossinus
DAG	DiAcylGlycérol
DFT	Théorie de la Fonctionnelle de la Densité
EC ₅₀	Concentration Efficace à 50%
ESI	<i>ElectroSpray Ionisation</i>
ESL	Extraction Solide-Liquide
EtOH	éthanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTICR	<i>Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social molecular networking</i>
GP	Groupe Partant
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IC ₅₀	Concentration nécessaire à 50% d' Inhibition

ICSN	Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS)
IT	<i>Ion Trap</i>
<i>J</i>	constante de couplage
JE	Ester de Jatrophane
LC	Chromatographie Liquide
LIT	<i>Linear Ion Trap</i>
<i>m/z</i>	rapport masse sur charge
MDR	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MeCN	acétonitrile
MeOH	méthanol
MHz	MégaHertz
MN	<i>Molecular Networks</i>
MS	Spectrometrie de Masse
MS ²	spectrométrie de masse tandem (MS/MS)
MS ⁿ	spectrométrie de masse multidimensionnelle
NR	Rouge Nil
P-gp	<i>Permeability-glycoprotein</i>
PKC	Protéine Kinase C
PLL	Partition Liquide-Liquide
ppm	partie par million
pyridine- <i>d</i> ₅	pyridine deutérée
Q	Quadripôle
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	<i>Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
SFC	<i>Supercritical Fluid Chromatography</i>
SI	Indice de Sélectivité (CC50/(IC50 ou CC50))
TC	Température de Coalescence
TOF	temps de vol, <i>Time Of Flight</i>
TPA	12- <i>O</i> -TétradécanoylPhorbol 13-Acétate
UV	UltraViolet
Vero cells	cellules épithéliale de rein de singe <i>Cercopithecus aethiops</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
α_D	pouvoir rotatoire
δ_C	déplacement chimique du carbone
δ_H	déplacement chimique du proton

INTRODUCTION

De très nombreux articles scientifiques relatent de l'intérêt que portent les chercheurs à la question du rôle des produits naturels et/ou de leurs structures dans la découverte et le développement de nouvelles drogues.[1–7] Les composés naturels ont été à l'origine ou inspiré la découverte d'un grand nombre de médicaments (plus d'un quart).[8] Cependant, les inconvénients relatifs à la découverte et l'exploitation industrielle de ces molécules naturelles tels que les difficultés d'accès et d'approvisionnement, la complexité et le temps requis à la purification, ainsi que les préoccupations liées aux droits à la propriété intellectuelle sont autant de facteurs qui ont amené les entreprises pharmaceutiques à réduire leurs investissements dans ce domaine de recherche, malgré les réussites précédentes.[9] Néanmoins, la diversité chimique propre au règne végétal reste une source intéressante pour la découverte de nouveaux principes actifs, débouchant sur la création de bibliothèque (chimiothèque) de produits naturels. Ces dernières années, les limites techniques liées à la recherche de produits naturels à visé thérapeutique ont été atténuées, permettant à de nombreux constituants prometteurs d'être développés. En effet, l'étude menée par Newman et Cragg démontre que la proportion en composés issus ou dérivés de la nature (N, NB et ND), approuvés en tant que médicaments, représente environ un quart des principes actifs découverts entre 1981 et 2014 (Figure 1).[10] Un grand nombre de ces métabolites naturels ont été synthétisés (ou semi-synthétisés), soulignant l'intérêt des chercheurs pour le développement de nouvelles voies de synthèse. Malgré les progrès dans la préparation de synthons¹ plus ou moins fonctionnalisés, les synthèses totales de produits naturels restent un pari difficile, notamment dans le cas des diterpènes macrocycliques. Le travail d'isolement et de caractérisation de nouvelles substances actives restent également un défi dans la mesure où il s'appuie généralement sur un procédé de bio-guidage, dans lequel chaque étape (de la purification à l'élucidation structurale) conduisant aux composés recherchés, est longue et fastidieuse.

¹ Un **synthon** est une entité moléculaire mise en œuvre dans la synthèse d'une molécule afin d'y introduire un motif structural donné.

Introduction

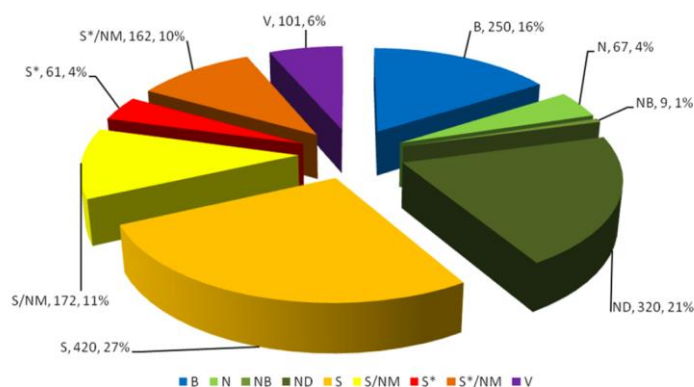


Figure 1. Ensemble des médicaments approuvés entre 1981 et 2014, par catégories². [10]

Afin d'optimiser la recherche de composés actifs, un certain nombre de techniques analytiques ont été développées, notamment la spectrométrie de masse tandem. Bien que la MS/MS soit une technique de choix dans l'étude de mélanges complexes, l'interprétation des résultats reste difficile à effectuer et généralement incomplète. Des travaux de recherche ayant pour objectifs de faciliter l'organisation des données obtenues par MS/MS ont permis le développement d'outils bio-informatiques innovants. Depuis 2015, la plateforme GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) a ainsi mis à disposition de la communauté scientifique un outil de visualisation automatisé et intelligent, appelé « réseaux moléculaires ».[11]

Le genre *Euphorbia* – représenté au sein de la flore Corse par une quinzaine d'espèces poussant à l'état spontané, dont quatre taxa endémiques – est connu pour sa capacité à produire une diversité de constituants de type diterpénique. Ces derniers sont représentés par un large panel d'esters de diterpène, qui possèdent non seulement des squelettes carbonés variés, mais également des propriétés biologiques intéressantes (antibiotique, cytotoxique et

² Les principales catégories :

B : biologique, un grand peptide ou une protéine (> 50 résidus), soit isolé d'un organisme ou d'une lignée cellulaire, soit produit par des moyens biotechnologiques chez un hôte de substitution.

N : produit naturel non modifié, produit par semi ou synthèse totale.

NB : produit naturel issu de plantes

ND : dérivé d'un produit naturel, généralement par modification semi-synthétique

S : drogues entièrement synthétiques, souvent résultant d'un dépistage ou modification aléatoire d'un agent existant.

S* : drogue fabriquée par synthèse totale dont le pharmacophore provient d'un produit naturel.

V : vaccin.

Introduction

antiproliférative), et plus particulièrement des activités antivirales et inhibitrices des pompes impliquées dans la chimiorésistance. Les phorboïdes sont notamment connus pour leur pouvoir de modulation des protéines kinases C impliquées dans les mécanismes antiviraux. A titre d'exemple, des travaux réalisés en 2017 ont permis de démontrer l'implication de ces protéines dans la modulation de la réplication du virus du chikungunya ainsi que la forte activité antivirale d'un certain nombre d'esters diterpéniques de type tigliane et daphnane. D'autres diterpènes tels que les jatrophanes et les lathyranes présentent également des propriétés biologiques prometteuses, notamment au niveau de l'inhibition de la glycoprotéine-P qui joue un rôle majeur dans les mécanismes de chimiorésistance.

Ces travaux de doctorat s'inscrivent dans les thématiques du laboratoire de « Chimie des Produits Naturels » (CPN) de l'Université de Corse (UMR CNRS 6134 SPE) dont l'un des axes concerne la caractérisation et la valorisation des ressources naturelles végétales. Fruit d'un partenariat avec le laboratoire des « métabolites de plantes et micro-organismes associés : isolement, synthèse et bioactivité » de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) à Gif-sur-Yvette, l'objectif principal de cette thèse est de poursuivre le programme scientifique sur les esters de diterpène contenus dans les *Euphorbia* de Corse, travail initié en 2011 dans le cadre du doctorat de Louis-Felix Nothias (thèse soutenue le 7 décembre 2015). En effet, la mise en évidence de métabolites biologiquement actifs à partir des *Euphorbiaceae* constitue la voie de recherche privilégiée de cette collaboration ; elle doit permettre la découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. A cet effet, des partenaires – incluant le laboratoire de virologie de l'institut Rega (Université Catholique de Leuven, Belgique), l'école des sciences de la vie (Université de Jawaharlal Nehru, Inde) et l'Institut de protéines biologiques et chimiques (Université de Lyon, France) – ont été établis pour mener à bien l'évaluation des propriétés biologiques des extraits et des molécules isolées lors de la présente étude. Ainsi, ce travail de doctorat s'est voulu pluridisciplinaire en s'articulant autour de trois objectifs principaux :

- (i) Découvrir de nouvelles séries chimiques ou de nouveaux composés valorisables d'un point de vue thérapeutique, à partir de trois taxa du genre *Euphorbia* (*E. dendroides*, *E. pithyusa* et *E. pithyusa* subsp. *cupani*) poussant en Corse ;
- (ii) Rechercher des constituants dotés d'une activité inhibitrice de la réplication du virus du chikungunya et/ou des récepteurs de *Candida albicans* impliqués dans la chimiorésistance ;

Introduction

- (iii) Modifier par hémisynthèse des composés préalablement isolés à partir des extraits afin de créer de la diversité chimique et d'entreprendre des études sur les relations structure-activité.

Le format « **thèse sur article** » a été choisi pour présenter les résultats afférents aux travaux réalisés au cours de ce doctorat.

Le premier chapitre de la partie « **synthèse bibliographique** » est consacré à la description botanique des espèces d'*Euphorbia* étudiées dans ce travail, puis à la diversité structurale des esters de diterpène au sein du genre. Le second chapitre traite des principales activités décrites pour les esters de jatrothane et les phorboïdes en lien avec nos collaborations précitées, puis de leurs synthèses et modifications chimiques respectives. Enfin, le dernier chapitre a pour objet d'introduire le principe des réseaux moléculaires et leurs intérêts applicatifs pour la caractérisation chimique d'extraits de plantes.

La partie « **résultats** » intègre quatre articles référencés dans des journaux scientifiques internationaux : quatre publiés dans *Journal of Natural Products*. Une cinquième publication est également présentée dans ce manuscrit en vue d'une parution dans *phytochemistry* (non soumis). Cette partie se termine par la présentation des modifications chimiques réalisées à partir d'esters de jatrothane préalablement isolés du latex d'*E. dendroides*. Les informations complémentaires essentielles, associées à chaque chapitre de cette partie, sont incluses dans les annexes du manuscrit. Cependant, pour les articles parus seulement, l'intégralité de ces informations ne sera pas présentée mais un lien vers ces données sera mentionné au début de chaque publication.

Une dernière partie « **analyse transversale** » est consacrée à la présentation succincte de l'ensemble des résultats obtenus afin d'explicitier le cheminement scientifique ayant guidé ces travaux. Celle-ci fait référence aux articles et éléments présentés dans la partie « résultats » sans en reprendre la description détaillée. Enfin, les abréviations utilisées dans le manuscrit sont en anglais afin de conserver une certaine cohérence avec les articles de références ; elles sont présentées en note de bas de page.

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. LE GENRE *EUPHORBIA* : UNE SOURCE ABONDANTE EN ESTERS DE DITERPÈNE

Cette partie du manuscrit a pour objectif de présenter un état de l'art sur les plantes du genre *Euphorbia* ayant fait l'objet de mes travaux de thèse, à savoir *Euphorbia dendroides*, *Euphorbia pithyusa* et *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*. Le présent projet de caractérisation phytochimique d'*Euphorbia* de Corse s'inscrit dans le prolongement du doctorat de Louis-Félix Nothias (2012–2015). Au cours de ce dernier, une étude bibliographique relative à la diversité végétale du genre *Euphorbia* au sein du bassin méditerranéen a été menée ; elle s'est notamment attachée aux descriptions botaniques des espèces Corses et Corso-Sardes, à leurs usages traditionnels, ainsi qu'à l'origine biogénétique des diterpènes macrocycliques qu'elles produisent. En continuité avec ce travail bibliographique, nous nous intéresserons – dans une première partie A – à la diversité et à l'abondance des esters de diterpène au sein du genre *Euphorbia* en réalisant une description exhaustive des squelettes qui ont été rapportés à ce jour dans la littérature. Ce chapitre permet de mettre en évidence la richesse structurale des esters de diterpène, clé de compréhension de leurs activités biologiques et de leurs voies de synthèses et d'hémisynthèses, qui seront abordées dans la seconde partie B.

1. Descriptions botaniques et compositions chimiques

• Généralités

La famille des Euphorbiacées comprend environ 220 genres et 6500 espèces dont la répartition à l'échelle du globe est hétérogène, avec une présence marquée dans les zones tropicales et sub-tropicales.[12,13] Cette famille regroupe des plantes dicotylédones³ – groupe appartenant aux angiospermes (ou plantes à fleurs) – de morphologies variables allant de l'arbre, le buisson ou la liane jusqu'aux plantes arborescentes et herbacées.[14]

Le genre *Euphorbia* est le plus important de cette famille et le plus large chez les angiospermes, comprenant un peu plus de 2000 espèces.[15,16] Le terme français « expurger » (« *spurge* » en anglais) est associé à ces plantes du fait de leur effet purgatif bien connu. Les espèces de ce genre se distribuent essentiellement en Afrique et en Amérique, mais également dans les zones plus tempérées, notamment sur le pourtour méditerranéen. Il en résulte une multitude de morphologie allant de l'aspect cactiforme à l'arbre ligneux ou à la plante succulente.[17] Ces plantes sont des annuelles ou des vivaces, caractérisées par un lait toxique nommé latex, produit au niveau des canaux laticifères.[18] Il est connu depuis l'antiquité pour engendrer, après un contact direct, de fortes inflammations et éruptions de la peau et des yeux.[19] Leurs inflorescences uniques, nommées cyathium, sont caractéristiques des espèces de ce genre (**Figure 2**). Bien qu'elles aient été décrites en 1753 par Linnaeus comme des fleurs à part entière, la communauté scientifique s'est accordée à décrire le cyathium comme une inflorescence, suite aux propositions de Payer (1857) et Baillon (1858).[20] Celui-ci se présente sous une forme ovale de bractées fusionnées, souvent avec des glandes nectarifères extra-florales distinctes. Au sein de cet involucre caliciforme se distingue un seul terminal, le gynécée (décrit comme une fleur femelle), entouré de quatre à cinq groupes d'étamines (interprétés comme des inflorescences partielles de fleurs mâles sans périanthe) (**Figure 2**). Le gynécée va donner à maturation le fruit qui contiendra ensuite les graines.

³ Selon la nouvelle classification **APG III** (*Angiosperms Phylogeny Group*).

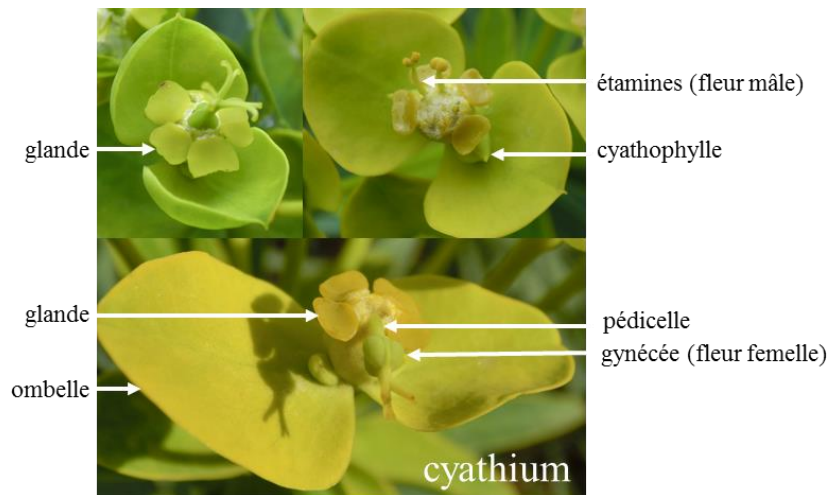


Figure 2. Cyathium d'*Euphorbia dendroïdes* à différents stades de maturité.

Photo : Marc Litaudon

Salmaki *et al.* ont souligné l'importance de l'étude des graines et des glandes dans la taxonomie et la phylogénie des espèces du genre *Euphorbia*, allant jusqu'à proposer une clé de classification reposant sur les caractéristiques micro-morphologiques des graines.[21] Au niveau de la phylogénétique moléculaire des espèces du genre *Euphorbia*, quatre études principales ont été menées ; elles s'accordent à reconnaître quatre clades⁴ de sous-genre : *Rhizanthium* (A), *Esula* (B), *Euphorbia* (C) et *Chamaesyce* (D).[22–25] Le clade A, *Rhizanthium*, se distingue par des espèces (n ≅ 200) de morphologies diverses dont l'aire de distribution est principalement sud-africaine.[25] Le sous-genre *Esula* se compose essentiellement d'espèces herbacées (n ≅ 500) présentes dans l'hémisphère nord tempéré, allant de l'est méditerranéen à l'Asie centrale. Cependant, au-delà de cette zone, les taxa appartenant à ce clade B peuvent adopter des morphologies ligneuses succulentes⁵ ou à stature d'arbre.[26,27] Le clade C, soit le sous-genre *Euphorbia*, est le plus diversifié (n ≅ 700), tant par le nombre d'espèces que par leur aspect végétatif variable.[28,29] La majorité des espèces (n ≅ 350) qui appartenaient anciennement au genre *Chamaesyce* sont maintenant regroupées dans le clade D (sous-genre du même nom).[30,31] Ce dernier inclut également plusieurs lignées relativement pauvres en espèces (n ≅ 160) principalement retrouvées en Afrique et à Madagascar.[25] Malgré des connaissances récentes sur la phylogénie des espèces d'*Euphorbia*,[22,25,32–34] les relations interspécifiques

⁴ Un **clade** regroupe un ancêtre et l'ensemble de ses descendants.

⁵ Les plantes **succulentes** sont charnues afin de s'adapter pour survivre dans des milieux arides, nommées communément « plantes grasses ».

Synthèse bibliographique

au sein de ce genre et entre les clades restent encore ambiguës, nécessitant un croisement des données botaniques, génétiques et chimiques. Une étude récente s'est attachée à mettre en relation l'activité biologique des produits naturels d'*Euphorbia* vis-à-vis de la répartition taxonomique de ces espèces. Elle a permis de mettre en avant que la diversité des espèces de ce genre était non seulement liée à la forme, la géolocalisation et l'habitat, mais aussi aux utilisations traditionnelles.[35]

Dans le cadre de ces travaux de thèse, trois taxa du genre *Euphorbia*, poussant à l'état spontané en Corse, ont été investigués ; il s'agit d'*Euphorbia dendroides*, d'*Euphorbia pithyusa* et d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii*. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons plus particulièrement aux descriptions botaniques⁶ et aux biotopes⁷ de ces trois espèces ([Tableau 1](#)) ainsi qu'aux principales études relatives à leur composition chimique.

Tableau 1. Classification taxonomique des trois espèces du genre *Euphorbia* de Corse étudiées, selon la classification APG III.

clade	Spermatophyta		
clade	Angiospermes		
clade	Dicotylédones vraies		
clade	Rosidées		
clade	Fabidées		
Ordre	Malpighiales		
Famille	Euphorbiaceae		
Genre	<i>Euphorbia</i>		
espèce	<i>dendroides</i>	<i>pithyusa</i>	
sous-espèce		<i>pithyusa</i>	<i>cupanii</i>
nom français	Euphorbe arborescente	Euphorbe des Baléares	Euphorbe de cupani

⁶ La **botanique** générale recouvre différentes sciences. Dans le cadre de ces descriptions, nous nous intéressons à la morphologie végétale en décrivant les organes ou parties des végétaux.

⁷ En écologie, un **biotope** caractérise un type de lieu de vie, définissant l'aire de répartition des végétaux.

• *Euphorbia dendroides* L.



Figure 3. *Euphorbia dendroides* dans son biotope naturel (calanques de Piana).

Photo : Marc Litaudon

L'Euphorbe arborescente a été baptisée *Euphorbia dendroides* L. par le naturaliste suédois Linnaeus, fondateur de la nomenclature binomiale au XVIII^e siècle. Auparavant, cette espèce était appelée « *Tithymalos dendroides* » ou encore « *Tithymalus arboreus* » (Figure 4).[36] *Euphorbia dendroides* est une des espèces les plus curieuses de littoral français du fait de sa grande taille, exceptionnelle pour une Euphorbe de nos régions.[37] De plus, il s'agit de la seule plante présente dans une sous-section qui compte seulement une dizaine d'espèces subtropicales. Elle est également remarquable par son port particulier et par son abondance dans des stations où elle arrive même à être dominante. Elle se présente sous la forme d'un arbrisseau très ramifié (Figure 3, A), d'où son appellation Euphorbe arborescente.[38] Sa hauteur peut atteindre trois mètres et ses rameaux (Figure 5) ne sont feuillés qu'à leurs extrémités, avec des feuilles lancéolées⁸–linéaires d'une dizaine de centimètres de long sur 1 cm de large. Ses cyathes, généralement de couleur jaune, se regroupent en amas aux extrémités des tiges (Figures 3, B et 5). La pollinisation est assurée par des insectes (mouches, abeilles, guêpes et papillons)

⁸ **Lancéolée** : la base du limbe est plus élargie que le sommet.

Synthèse bibliographique

au niveau du cyathium lors de la période de floraison qui s'étend de mars à avril, avant que la plante ne prenne une couleur rougeâtre et perde toutes ses feuilles lors de la morte-saison, l'été. Ses feuilles apparaissent au mois de septembre et persistent tout l'hiver. Ses graines sont brunes et lisses, munies d'une caroncule⁹.

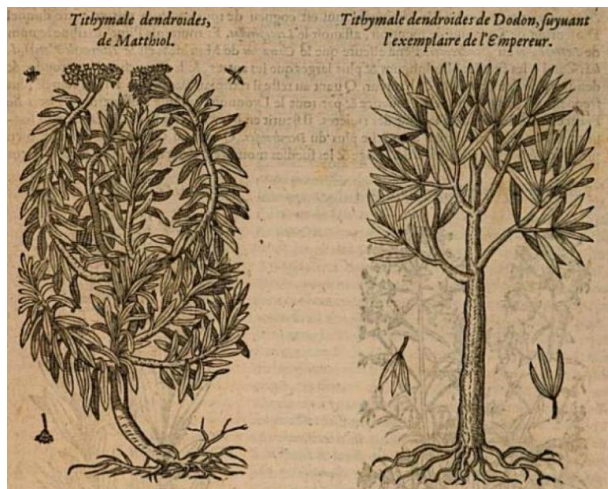


Figure 4. Dessins de *Tithymale dendroides* selon l'histoire générale des plantes de Daléchamps et Des Moulins (début du XVIIème siècle).[39]

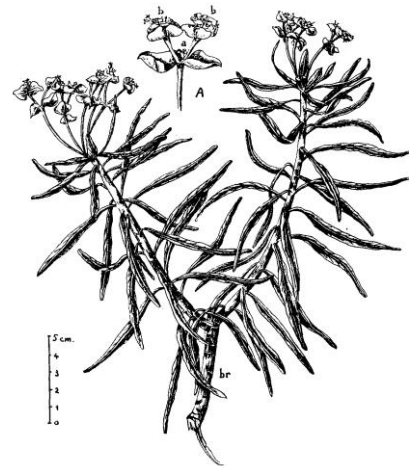


Figure 5. Rameau d'*Euphorbia dendroides*.

L'aire de répartition de cette espèce thermophile (**Figure 6**) s'étend sur une grande partie des côtes rocheuses du pourtour méditerranéen à l'exception de la Slovénie, la Bosnie, la Syrie, la Lybie et du Maroc.[37] Cette Euphorbe arborescente – strictement euméditerranéenne¹⁰ – se rencontre principalement sur les côtes européennes méridionales, en Afrique du Nord et sur les îles méditerranéennes mais ne s'écarte guère du littoral. Elle a toutefois été observée de manière exceptionnelle dans le sud de l'Italie et en Tunisie à l'intérieur des terres. D'un point de vue morphologique, ce taxon paraît homogène puisqu'aucune des flores consultées ne signale de sous-espèce ou de variété. L'espérance de vie de ces arbres peut dépasser les 30 ans, sachant que l'individu le plus vieux recensé en 2002 avait 47 ans (Espagne).

⁹ **Caroncule** : excroissance du tégument situé près du hile de la graine.

¹⁰ **Euméditerranéenne** : zone de végétation qui borde au plus près la Méditerranée.

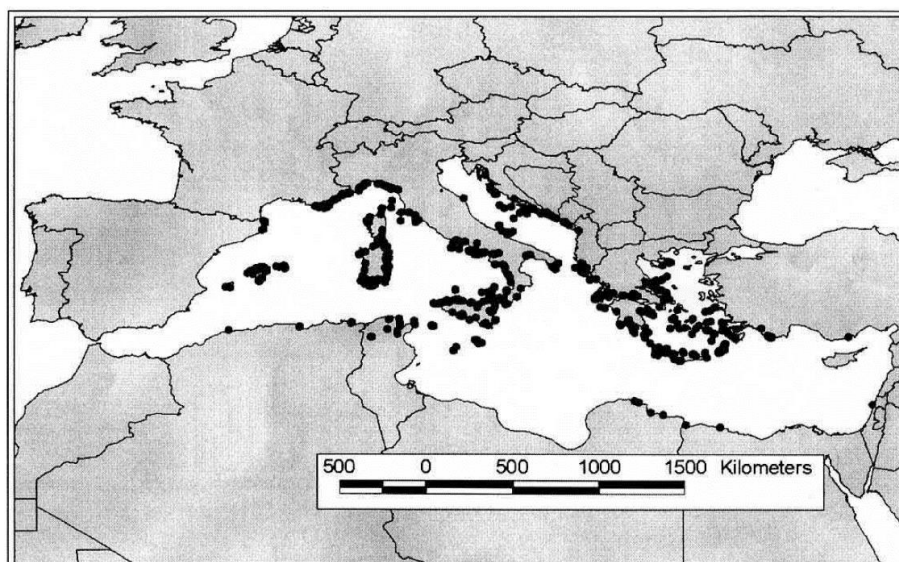


Figure 6. Aire de répartition d'*Euphorbia dendroides*. [37]

Un grand nombre d'Euphorbes méditerranéennes sont décrites dans les rapports de pharmacologie de *Dioscorides* et Pline le jeune. A ce titre, le latex d'*E. dendroides* est connu depuis l'antiquité pour ses propriétés irritantes et ses graines ont été utilisées comme purgatif, à l'instar de la grande majorité des Euphorbes. [39,40] Au XIX^e et XX^e siècle, cette espèce était récoltée par les pêcheurs pour le braconnage ; ils répandaient son latex dans les lacs et les mers, empoisonnant ainsi les poissons qui remontaient à la surface. Cette pratique piscicole se faisait aussi bien en Grèce qu'en Sardaigne. [41,42] Enfin, ce taxon a également été valorisé en tant que insecticides dans certains pays du bassin méditerranéen. [43] Par la suite (1987), les premiers travaux de recherche réalisés sur la partie insaponifiable d'*E. dendroides*, en vue d'une valorisation de la biomasse pour la production de biocarburant, ont montré une forte proportion d'huile (58%) dans cette plante, principalement des acides gras C₂₇, C₂₉ et C₃₁. L'étude de la fraction alcoolique a montré quant à elle la présence de cinq composés majoritaires, le cycloarténol, le 24-méthylcycloarténol, le lanostérol, l' α -amyrin et le butyrospermol. [44] En 2002, une équipe grecque s'est intéressée à la composition volatile de six espèces d'*Euphorbia* dont *E. dendroides*. [45] Elle aussi, elle a pu mettre en évidence la présence de grandes quantités d'hydrocarbures linéaires (34,6%) et de diterpènes (20,8%), ainsi qu'une faible proportion en aldéhydes linéaires (8,4%), en monoterpènes (8,0%) et en sesquiterpènes (6,6%), tandis que les esters d'alcool gras et les cétones linéaires sont retrouvés à l'état de traces (1,6 et 0,8%, respectivement). Un an plus tard, le latex d'*E. dendroides* récolté en Sardaigne a été investigué par Corea et ses collaborateurs, [46,47] permettant l'identification de 21 diterpènes macrocycliques de type esters de jatrophane et dérivés. L'activité de ces derniers a été évaluée

Synthèse bibliographique

sur un récepteur impliqué dans la résistance médicamenteuse, la glycoprotéine P. Plusieurs constituants ont exhibé de puissantes propriétés inhibitrices, ouvrant ainsi une nouvelle voie de valorisation pour cette classe de métabolites.[48] Les parties aériennes de cette plante échantillonnée au Monténégro ont également été étudiées, conduisant à l'identification de 19 esters de jatrophane, dont la stéréochimie du carbone C-13 diffère de celle des composés isolés précédemment de la plante de Sardaigne. Par ailleurs, cette étude a également permis d'isoler un diterpène à squelette tigliane. Ces molécules diterpéniques ont été évaluées sur la glycoprotéine P pour leur pouvoir modulateur de la chimiorésistance, mettant en évidence la forte activité inhibitrice de certaines d'entre-elles.[49–51]

• *Euphorbia pithyusa* L.



Figure 7. *Euphorbia pithyusa* dans son biotope naturel (Cap Corse). Photo : Mario Esposito

Euphorbia pithyusa, appelée également « Euphorbe des Baléares » ou encore « Euphorbe sapinette » du fait de sa ressemblance avec un petit pin, est une plante vivace, à tige papilleuse et ligneuse à la base (Figure 7). Elle s'étend sur les zones sablonneuses et rocheuses de la côte méditerranéenne, avec une distribution limitée à la Provence, la Corse, l'archipel de la Toscane, la Sardaigne, la Sicile et aux îles Baléares, au niveau des bandes côtières de faible altitude,

Synthèse bibliographique

caractérisées par des biotopes venteux, arides et ensoleillés. Les petits arbustes d'*E. pithyusa*, allant de 10 à 130 cm de haut, possèdent des feuilles serrées sur des tiges très ramifiées et des branches érigées portant des rameaux stériles (Figure 8).

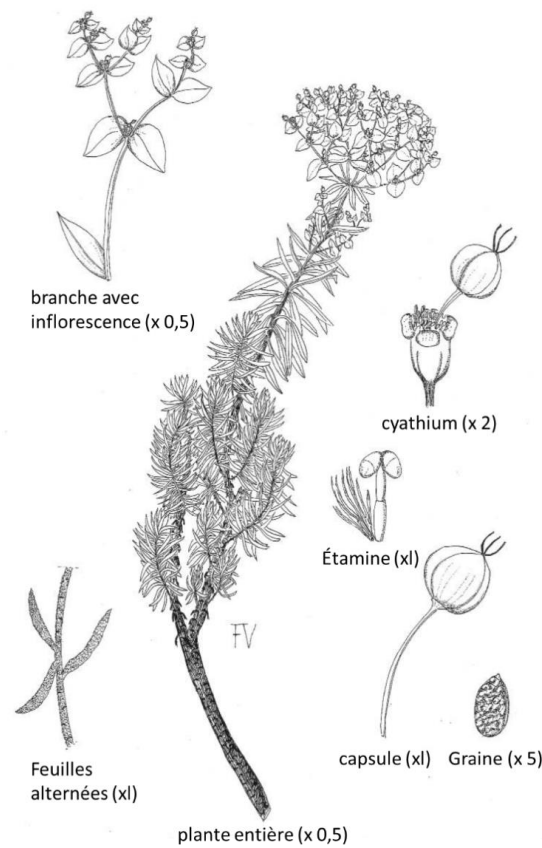


Figure 8. *Euphorbia pithyusa* d'après le « Bolletino ».

Les feuilles de la partie inférieure de la tige sont linéaires ou lancéolées, glauques¹¹, un peu coriaces, aiguës et à bords relevés, tandis que les feuilles supérieures sont plus grandes et moins denses. Les inflorescences sont unies pour former une ombelle¹² avec 5–7 rayons bifides. Les cyathes, présents de mai à septembre, comportent des glandes jaunes en forme de croissant. La capsule est verdâtre et lisse, contenant à maturité des graines sombres et ovalaires avec de petites fossettes. Jusqu'à ce jour, aucune étude sur la composition chimique d'*E. pithyusa* n'a été réalisée.[38]

¹¹ **Glauque** : nuance de couleur imprécise entre bleuâtre et verdâtre pale.

¹² **Ombelle** : inflorescence indéfinie dans laquelle les fleurs sont portées par des pédoncules partant tous d'un même point et se terminant dans un même plan ou presque.

• *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* (Guss. Ex Bertol.) Radcl.-Sm.



Figure 9. *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* dans son biotope naturel (Morosaglia). Photo : Louis-Félix Nothias

Son espèce sœur, *E. pithyusa* subsp. *cupanii*, est une espèce endémique Corso-Sarde-Sicile.[38] Elle se trouve dans les terres et se développe en arbuste dressé (Figure 9), allant jusqu'à un mètre de haut, dans les zones non cultivées comme les bordures de route ou les bords de rivière à diverses altitudes. En Corse, ce taxon est présent dans une seule station à 800 m d'altitude,[38] à proximité de Morosaglia, ce qui en fait une espèce protégée en France (liste rouge des espèces menacées ; UICN¹³ France),[52] tandis qu'elle est très abondante en Sardaigne. Les graines d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* sont ovoïdes, finement alvéolées avec des zones blanchâtres superposées sur des zones sombres. Le rhizome¹⁴ de cette espèce émet de nombreuses branches ascendantes, glauques, simples et dépourvues de feuilles en dessous (Figure 10). Cette plante est habillée de feuilles à taille égale, linéaires–lancéolées, croissantes et cambrées. Ses inflorescences globulaires présentent 5–10 rayons bifides pendant la floraison

¹³ UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature.

¹⁴ Rhizome : tige souterraine portant des racines adventives en général.

Synthèse bibliographique

qui s'étend de juin à octobre. Les glandes jaunes semi-lunaires possèdent des cornes latérales avec un sommet arrondi, quant à la capsule, elle est globuleuse, ovoïde, profondément sillonnée et finement striée (Figure 10).

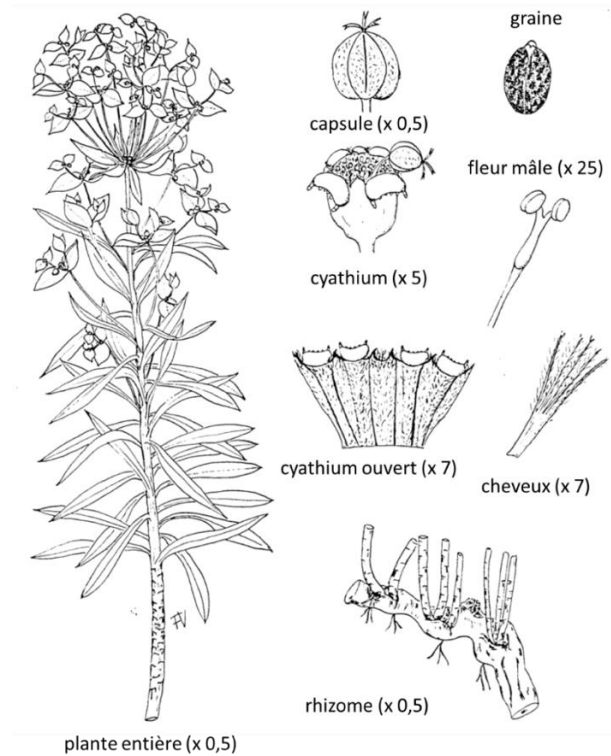


Figure 10. *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* d'après le « Bolletino ».

Comme indiqué précédemment, *E. pithyusa* est une espèce typique de certaines communautés végétales des zones côtières avec des exigences écologiques bien définies, tandis qu'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* a une propagation particulière, préférant les zones non cultivées ou abandonnées par les cultures. En outre, *E. pithyusa* subsp. *cupanii* est une géophyte¹⁵ rhizomateuse avec des branches dressées simples, provenant de la base et formant un buisson à plusieurs tiges alors qu'*E. pithyusa* est une chaméphyte¹⁶ avec une ramification initiale débutant à une certaine hauteur du sol de sorte que la plante prend l'apparence d'un buisson très ramifié. *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* se distingue également du taxon *E. pithyusa* (Figure 8 et 10)

¹⁵ **Géophyte** : type biologique correspondant à une plante passant l'hiver en ne conservant que des organes souterrains.

¹⁶ **Chaméphyte** : type biologique de plante dont les tiges aériennes persistent et dont les bourgeons sont situés à moins de 50 cm du sol.

Synthèse bibliographique

par divers caractères comme l'absence de branches stériles pendant la floraison, la forme des feuilles et des glandes ou encore la morphologie des capsules et des graines. [38,42,53] Enfin, le nombre de chromosomes diffère entre ces deux taxa : $2n = 36$ pour *E. pithyusa* subsp. *cupanii* tandis que $2n = 28$ chez *E. pithyusa*. [54]

Le manque évident de similitudes entre *E. pithyusa* subsp. *cupanii* et les autres espèces du genre *Euphorbia* présentes dans le bassin méditerranéen, a permis à Francesca Valsecchi (1980) [53] de proposer ce taxon comme une espèce polyploïde¹⁷ paléo-endémique – flore relique de formes anciennes, en voie de disparition, ayant subi une réduction de leur aire en raison de conditions de plus en plus défavorables ou d'une concurrence d'espèces à pouvoir adaptatif et compétitif plus puissant – et de considérer ces deux sous-espèces apparentées comme deux taxa distincts. Néanmoins, des points de convergence morphologique existent entre ces deux plantes selon le stade végétatif considéré, notamment lorsque la sous-espèce *cupanii* se développe dans des environnements humides.

D'un point de vue de la composition chimique, *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* s'est avérée remarquable par sa richesse en constituants phénoliques, mais également par sa forte teneur en huile (54%) qui présente un taux important en stéroïdes. [44] En 1999, Appendino et son équipe se sont intéressés à la composition diterpénique de cette sous-espèce ; leurs travaux ont débouché sur l'identification de 11 nouveaux diterpénoides appartenant aux types lathyrane, prémyrsinane et tigliane. [55] Il s'agit des deux seules études phytochimiques réalisées sur ce taxon.

¹⁷ Une espèce **polyploïde** contient plus de deux jeux complets de chromosomes.

2. Diversité des esters de diterpène

• Généralités

La composition chimique des Euphorbiacées apparait diversifiée, aussi bien au niveau des alcaloïdes que des composés terpéniques.[56] Cette diversité métabolique est considérée comme le témoin de l'adaptation de ces végétaux durant des millions d'années aux attaques des herbivores et des microorganismes.[39,57] Les espèces du genre *Euphorbia* ont la remarquable capacité de synthétiser une grande diversité de terpènes, notamment des esters de diterpène constitués de quatre unités isoprènes. En raison de leur richesse en constituants diterpéniques, la caractérisation de la composition chimique des extraits de ces plantes s'avère souvent complexe. Cette variabilité s'exprime par la présence de squelettes macrocycliques divers allant de la fusion de deux cycles comme pour les jatrophanes, de trois cycles tels que les lathyranes, les myrsinanes et les daphnanes, et jusqu'à quatre cycles dans le cas des ingénanes, tiglianes, prémyrsinanes, cyclomyrsinanes, ségétanes, paralianes, pépluanes et euphoractines. La présence des esters de diterpène dans différentes parties des plantes comme les feuilles, les racines, les graines ou encore les écorces a été rapportée ; néanmoins, ce type de métabolites sont généralement concentrés dans le latex.[17] Cependant, Hohmann *et al.* ont pu démontrer que la production d'esters de diterpène était très faible voire inexistante chez certaines espèces d'Euphorbes.[58]

Les revues de la littérature réalisées par Shi *et al.* en 2008 [59] ainsi que Vasas et Hohmann en 2014 [60] référencent l'ensemble des esters de diterpène isolés dans le genre *Euphorbia* jusqu'en 2012. Dans la partie suivante, nous proposons une synthèse de ces études, en y intégrant les récentes publications sur le sujet et en classant les constituants sur la base des différents squelettes répertoriés à ce jour. Suite à ce travail de recensement des esters de diterpène présents dans le genre *Euphorbia*, trois catégories de composés ont pu être déterminées et qualifiées avec les termes suivants : « *abondants* », « *communs* » et « *rare*s ». Ce classement a été établi en fonction du nombre de constituants dérivant d'un même squelette ayant été identifiés dans le genre *Euphorbia* mais aussi selon le nombre d'espèces végétales contenant le type considéré (Tableau 2).

Tableau 2. Abondance des esters de diterpène dans le genre *Euphorbia* en fonction des espèces végétales considérées.

Catégories des diterpènes	Type de squelette	Nombre de molécules isolées	Nombre d'espèces végétales
<i>Abondants</i>	jatrophane	244	32
	lathyrane	116	27
	tigliane	109	11
	ingénane	87	19
<i>Communs</i>	myrsinane	50	7
	prémyrsinane	47	13
	cyclomyrsinane	25	6
	ségétane	20	3
	préségétane		
<i>Rares</i>	paraliane	10	3
	pépluane		
	daphnane	8	3
	euphoractine	8	2

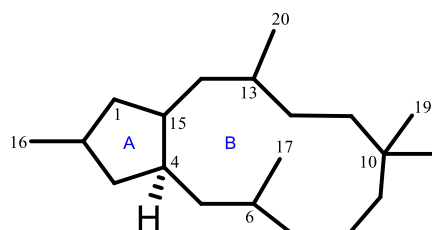
• Les esters de diterpène dits « *abondants* »

Les esters de diterpène à squelettes jatrophane et lathyrane

Les esters de jatrophane et de lathyrane (Figures 11 et 14) sont les composés diterpéniques les plus largement représentés dans le genre *Euphorbia* puisqu'ils ont été rapportés dans 32 et 27 espèces, respectivement. A ce jour, 244 esters de jatrophane [51,61–70] et 116 esters de lathyrane [71–75] ont été caractérisés dans ces extraits végétaux.

Les diterpènes de type jatrophane sont retrouvés exclusivement sous forme de polyesters. Ces composés macrocycliques possèdent un squelette de type bicyclo[10.3.0]pentadécane ; ils ne comportent pas de troisième cycle de type cyclopropane (Figure 11), contrairement aux esters de lathyrane et à la plupart des esters de diterpène. Ils présentent une grande variabilité du fait : (i) du nombre et de la position des doubles liaisons, (ii) de la nature, du nombre et de la position des fonctions oxygénées et (iii) de la configuration des carbones asymétriques. Les

fonctions oxygénées recensées peuvent être de type hydroxyle, cétone, époxyde, éther et ester. Les jatrophanes sont polyacylés, avec un nombre de groupements esters variant de trois à huit. Ces résidus acyles sont généralement des acétate, benzoate, isobutyrate, 2-méthylbutyrate et nicotinate, et plus rarement des propionate, butanoate, angélate, tiglate et cinnamate (Figure 12). Il existe également des esters de jatrophane dit modifiés de type 17-bishomojatrophane (Figure 13), nommés salicinols, terracinolides et sororianolides, du fait de la présence d'un cycle lactonique à 6 ou 8 chaînons (C-17-C-5, C-17-C-3 et C-17-C-9, respectivement). D'autres dérivés possèdent des cycles tétrahydrofuraniques (C-17-C-5) ou hémicétaliques (C-11-C-14, C-12-C-15 ou C-6-C-9). Les esters de jatrophane ayant un exométhylène en C-6-C-17 sont remarquables par leur capacité à adopter deux conformations, *endo* et *exo*. Le conformère de type *endo* est caractérisé par l'exométhylène perpendiculaire au plan du macrocycle, constituant un angle proche de 120° entre H-4 et H-5, représenté par une grande constante de couplage ($J_{H4-H5} = 8-10$ Hz). A l'inverse chez le conformère de type *exo*, un angle orthogonal se forme entre H-4 et H-5 ($J_{H4-H5} = 1-2$ Hz) du fait que l'exométhylène se trouve parallèle au plan du macrocycle.



jatrophane

Figure 11. Squelette de type jatrophane.

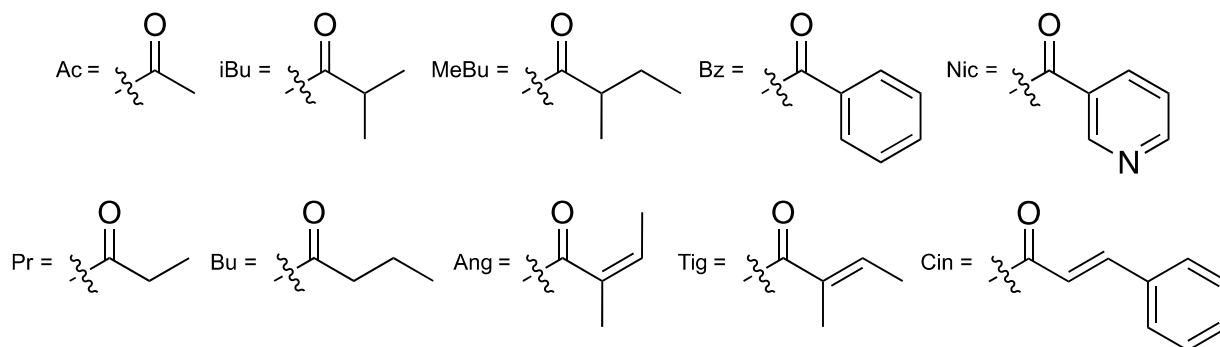


Figure 12. Principaux esters retrouvés chez les esters de jatrophane et de lathyrane.

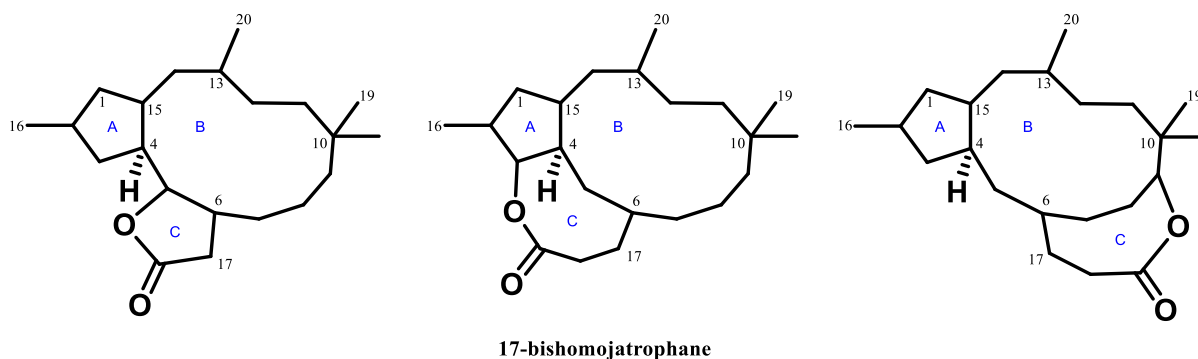


Figure 13. Squelette jatropane modifié de type 17-bishomojatropane.

Les esters de diterpènes à squelette lathyrane sont les composés tricycliques ([5.11.3]) les plus largement représentés dans le genre *Euphorbia* (Figure 14). La configuration de la fusion des cycles A et B est habituellement *trans*, tandis que la jonction entre les cycles B et C est de configuration *cis*. Différents dérivés ont été caractérisés ; ils peuvent posséder une fonction époxyde entre C-4–C-15, C-5–C-6 ou C-6–C-17, et/ou une double liaison entre C-5–C-6, C-6–C-17 ou C-12–C-13. Les 4,15-époxy-lathyranes sont plus connus sous la dénomination particulière de « ingols ». Les diterpènes macrocycliques de type lathyrane sont des composés polyesterifiés dont le nombre, la position et la nature des groupements acyles varient, de la même manière que les esters de jatropane. Par ailleurs, une fonction cétone est très fréquemment rencontrée en position C-14. Enfin, il a été signalé la présence d'un lathyrane glycosylé en C-16 dans *E. helioscopia* [76] et de l'acide lathyranolique isolé à partir d'*E. lathyris*. [77]

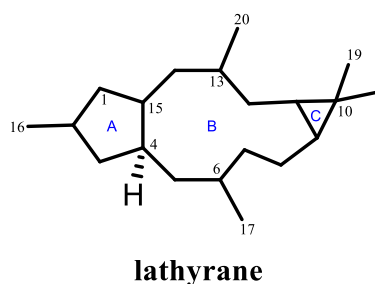


Figure 14. Squelette de type lathyrane.

Des esters de jatropane et de lathyrane réarrangés ont également été identifiés et nommés *abeo*-jatropane et *abeo*-lathyrane, respectivement (Figure 15). Pour ces derniers, une

hypothèse biosynthétique a été proposée par Corea et *al* en 2003,[46] puis par Gao et *al* en 2007.[78]

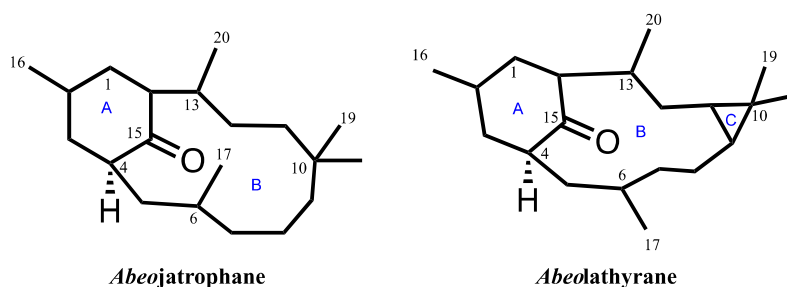


Figure 15. Jatrophone et lathyrane réarrangés de type *abeo*-jatrophone et *abeo*-lathyrane.

Les esters de diterpène à squelettes ingénane et tigliane

A l'instar des lathyrane et des jatrophone, les diterpènes à squelette tétracyclique ont largement été rapportés chez les espèces du genre *Euphorbia*. Quarante-sept ingénanes [79,80] et 109 tiglianes (dont les esters de phorbol) [74,81] ont été isolés à partir de 19 et 11 espèces, respectivement.

Le système 5/7/7/3-tétracyclique incluant une fonction cétone pontée entre C-8 et C-10 est caractéristique du squelette ingénane (Figure 15). Une double liaison peut être retrouvée sur le cycle A entre C-1–C-2 et une autre entre C-6–C-7 au niveau du cycle B. Chez la grande majorité des ingénanes, le carbone C-4 est substitué par un groupe β -hydroxyle et la jonction entre les cycles A et B est *trans*. Il est également possible de trouver à différentes positions (C-3, C-5, C-13, C-17 et C-20) une fonction oxygénée telle qu'un groupe hydroxyle, acétyle, benzoyle, angéloyle, palmitoyle ou un ester avec une longue chaîne alkyle (saturées ou insaturées et linéaires ou ramifiées). Plus exceptionnellement, la présence d'un groupement [(benzamido)benzamido]benzoyle (Figure 17) rattaché au carbone 3 a été décrite pour un ingénane isolé d'*E. leuconera*. [82]

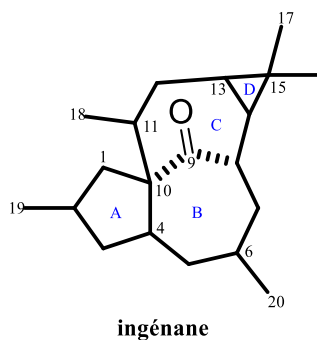


Figure 16. Squelette de type ingénane.

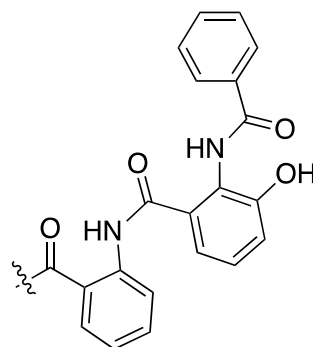


Figure 17. Groupement [(benzamido)benzamido]benzoyle.

Les diterpènes de type tigliane ont un système tétracyclique [5.7.6.3] (Figure 18) avec des jonctions intercycliques A/B et B/C généralement de configuration *trans*, tandis que la jonction des cycles C/D est *cis*. Ces composés sont caractérisés par la présence d'une fonction cétone α,β -insaturée au niveau du cycle A, motif exclusivement retrouvé chez ce type de composés. Les dérivés à squelette tigliane possèdent communément plusieurs groupements hydroxylés en position C-12, C-13 et C-20 pouvant être estérifiés. Il en découle des composés de type 13-monoester, 12,13- ou 12,20-diesters, et 12,13,20- ou 13,16,20-triesters, qui peuvent être estérifiés par des acétate, isobutyrate, tigliate, 2-méthylbutyrate ou par des longues chaînes aliphatiques d'acides gras saturées ou non. Les dérivés présentant des substituants en C-16 ou C-17 forment un autre sous-groupe de tiglianes ; ces substitutions peuvent aller d'un groupement hydroxyle à un ester. En outre, deux composés possédant un système atypique de type 5-èn-7-one et 5-èn-7-ol ont été isolés à partir d'*E. grandicornis*. [83]

Le terme "phorbol" représente une classe de composés à squelette tigliane contenant cinq groupements hydroxyles plus ou moins estérifiables. La grande majorité des esters de phorbol existe sous la forme 12,13- ou 13,20-diester, et en moindre proportion sous la forme 12,13,20-triester. En général, une fonction cétone est présente en position C-3, toutefois, deux dérivés de phorbol ont été trouvés sous une forme hydroxylée en cette position. [84] Les 12-déoxyphorbols et les 4-déoxyphorbols sont très fréquemment rencontrés dans le genre *Euphorbia*, puisque 79 déoxyphorbols ont été identifiés jusqu'à présent, soit six fois plus que les phorbols *sensu stricto* (13 composés). Il est à noter que deux sous-groupes subdivisent les 12-déoxyphorbols, ceux qui sont 13,20-diestérifiés et les 13-monoestérifiés avec un hydroxyle libre en C-20. Deux sous-groupes existent aussi chez les 4-déoxyphorbols, dénommés 4 β - et 4 α -déoxyphorbols. Les molécules de ces deux sous-groupes présentent des caractéristiques

Synthèse bibliographique

RMN¹⁸ différentes, notamment au niveau des déplacements chimiques des protons H-1, H-7, H-10 et des carbones correspondants. Les composés di- et tri-désoxygénés de type phorbol sont plus rarement identifiés ; en effet, seulement deux dérivés de type 12,20-didéoxyphorbols et un seul de type 4,12,20-tridéoxyphorbol ont été isolés jusqu'à présent.[55,85] Des tiglianes atypiques ont également été rapportés chez *E. fisheriana* et *E. macrolada*,[86,87] il s'agit de constituants ayant un groupement aldéhyde en position C-20 et d'un composé de type A-*seco*-phorbol (Figure 19).

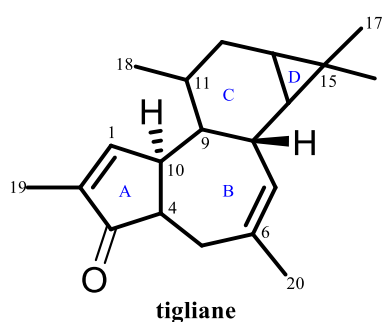


Figure 18. Squelette de type tigliane.

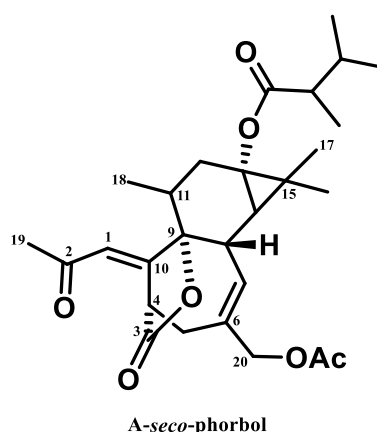


Figure 19. Ester de phorbol de type A-*seco*-phorbol.

• Les esters de diterpène dits « *communs* »

Les esters de diterpène à squelettes myrsinane et prémyrsinane

Les diterpènes de type myrsinane et prémyrsinane, rarement décrits avant 2008, ont été fréquemment isolés depuis. Cinquante et un esters de myrsinol et 47 esters de prémyrsinol ont été identifiés à partir de 7 et 13 espèces du genre *Euphorbia*, respectivement.[67,74,75,79,88,89]

Les diterpènes à squelette myrsinane se présentent sous la forme de tricyclic [5.7.6] (Figure 20) dont les cycles A/B et B/C sont fusionnés entre eux par une jonction *trans*. Il est classique de trouver des groupements esters en position C-3, C-5, C-7 et C-15, une double liaison en C-8–C-9 ainsi qu'un groupement méthyléthylène C-10–C-18(C19). Chez la majorité des esters de myrsinol, un motif nommé à tort comme un cycle 13,17-époxy, peut aussi être observé. En

¹⁸ RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

Synthèse bibliographique

réalité, il se présente comme un cycle additionnel avec une liaison éther entre C-13–C-17 ou entre C-15–C-17 formant ainsi un cycle furanique ou pyranique, respectivement. De manière plus sporadique, il a été rapporté la présence d'une fonction hydroxyle estérifiée ou non sur les carbones C-10, C-2 ou C-17, ou encore celle d'une fonction cétone en C-7. Chez un faible nombre de dérivés de myrsinol, un cycle furanique entre C-10–C-13 ainsi qu'une lactone entre C-9–C-10 ont également pu être identifiés. Les diverses configurations possibles des carbones asymétriques associées à la variabilité des groupements esters (nombre, position et nature) sont autant de paramètres permettant d'expliquer la grande diversité des composés à squelette myrsinane.

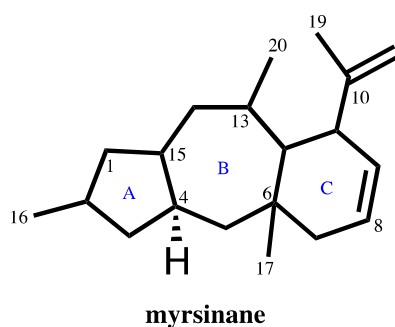
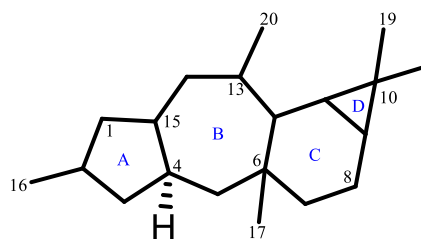


Figure 20. Squelette de type myrsinane.

Les molécules de type prémyrsinane (**Figure 21**) ont la particularité de posséder un tétracycle de type 5/7/6/3, avec un cycle D correspondant à un cyclopropane. Ce dernier est également caractéristique du squelette lathyrane ; ceci a conduit à émettre l'hypothèse que les prémyrsinanes seraient issus d'un réarrangement des lathyranes. Les esters de prémyrsinol sont remarquables par le nombre de groupes hydroxyles susceptibles d'être estérifiés (C-3, C-5, C-7, C-13, C-15 et C-17). Sur un plan structural, les esters de myrsinol et de prémyrsinol sont relativement proches puisqu'il est possible d'observer des motifs communs à ces deux squelettes, tels que la présence d'un cycle furanique ou d'un hémicétal. Toutefois et contrairement aux esters de myrsinol, les composés à squelette prémyrsinane peuvent posséder aussi bien une fonction cétone qu'un groupement hydroxyle ou ester en position C-14. Dans de rares cas, il a été rapporté la présence d'un groupe ester sur le C-18 ou le C-19, d'une double liaison C-1–C-2 et/ou C-5–C-4, d'une fonction cétone en C-3 ou encore d'un groupe hydroxyle en C-2.

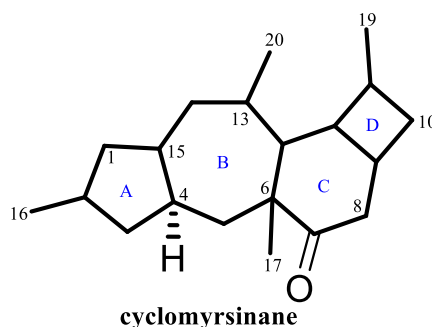


prémyrsinane

Figure 21. Squelette de type prémyrsinane.

Les esters de diterpène à squelettes cyclomyrsinane, ségétane et préségétane

Les esters de diterpène de type cyclomyrsinane (Figure 22) sont moins représentés que leurs homologues myrsinane et prémyrsinane ; à ce jour, seulement 25 composés ont été isolés à partir de 6 espèces du genre *Euphorbia*. [74,90,91] Ces molécules possèdent un tétracycle caractéristique de type [5.7.6.4] ainsi qu'un cycle furanique supplémentaire dû à une liaison éther entre C-13–C-17. Une fonction cétone est présente en position C-7 et ces composés sont généralement polyestérifiés en position C-2, C-3, C-5, C-8, C-10, C-14 et/ou C-15. La diversité structurale de ces constituants réside essentiellement dans le nombre, la nature et la position des groupements esters.



cyclomyrsinane

Figure 22. Squelette de type cyclomyrsinane.

Les diterpènes tétracycliques 5/7/6/5 sont des composés de type ségétane tandis que les préségétanes sont présents sous la forme de tricycle [5.9.5] (Figure 23). Une vingtaine de composés appartenant à ces deux types ont été isolés dans le genre *Euphorbia*. [70] Chez les esters de ségétane, une seule fonction cétone est souvent retrouvée en C-9, parfois en C-11 et dans de rares cas sur ces deux positions. Les positions C-3, C-5, C-6, C-15 et C-17 sont

systematiquement oxygénées et peuvent être estérifiées tandis que les carbones C-8, C-11 et C-14 sont substitués uniquement chez certains dérivés. Une double liaison peut également être observée entre C-8–C-12. Les esters de diterpène de type préségétane se distinguent par la présence de deux fonctions cétones en position C-9 et C-14, et parfois une double liaison entre C-6–C-17. Un dérivé original isolé d'*E. segetalis* a été décrit comme un *epi*-préségétane.[92]

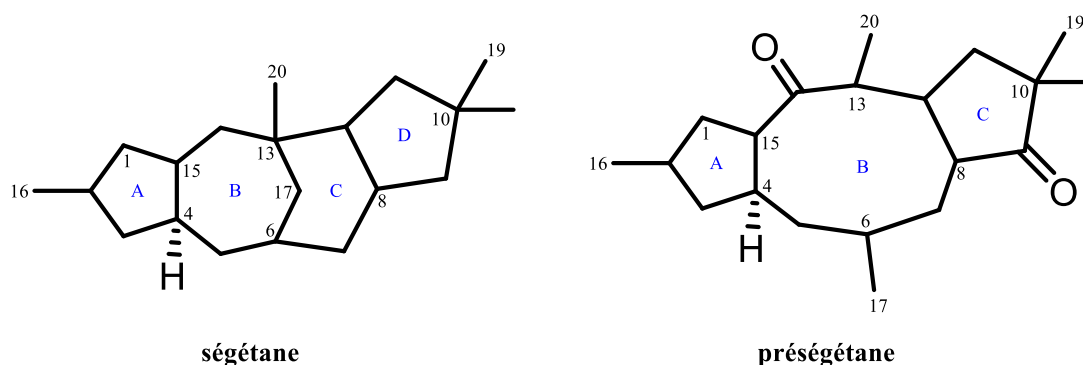


Figure 23. Squelettes de type ségétane et préségétane.

• Les esters de diterpène dits « *rare*s »

Les esters de diterpène à squelettes paraliane, pépluane, daphnane et euphoractine

Les esters de pépluane et de paraliane, possédant respectivement un tétracycle de type 5/6/5/5 et 5/6/5/6 (Figure 24), ont rarement été isolés dans les espèces du genre *Euphorbia*. [70] En effet, seule une dizaine de molécules ont été décrites jusqu'à présent dans la littérature. Il s'agit de composés polyesterifiés en C-3, C-5, C-14 ou C-15. Les dérivés à squelette paraliane peuvent présenter des fonctions hydroxyles estérifiables en C-1, C-2, C-8, C-11 et C-17, tandis que chez les esters de pépluane, ces fonctions sont principalement retrouvées en C-1, C-8, C-9, C-10 et C-11. Tous les esters de paraliane possèdent une seule fonction cétone en position 9, à l'exception d'un composé présentant une deuxième fonction cétone en C-14. Concernant le squelette pépluane, un dérivé ayant une fonction cétone en C-9 a également été identifié ainsi que quelques composés avec le cycle D aromatique.

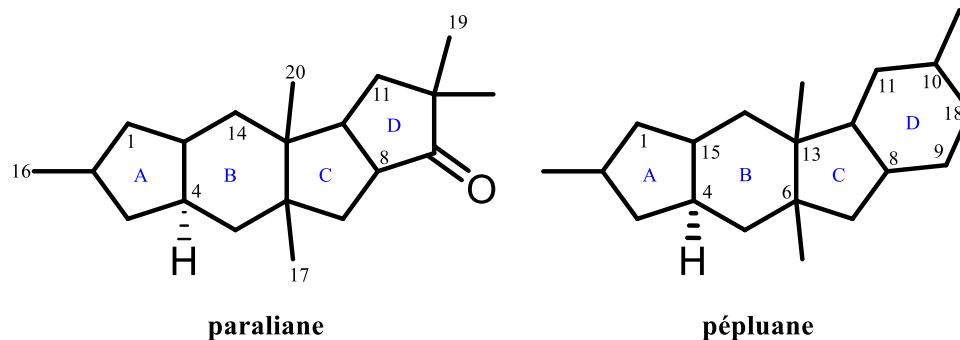


Figure 24. Squelette de type paraliane et pépluane.

Le système tricyclique [5.7.6] avec des jonctions A/B et B/C de configuration *trans*, est caractéristique du squelette daphnane (Figure 25). Une fonction cétone en C-3, des groupes hydroxyles sur les carbones C-4, C-9 et C-20 et des doubles liaisons en C-1–C-2 et C-6–C-7, sont souvent présents sur ces dérivés. Les constituants de type daphnane sont fréquemment retrouvés dans les espèces de la famille des Euphorbiaceae, mais ils sont rares dans le genre *Euphorbia* puisque seulement 8 molécules ont été identifiées à ce jour.[81] Ces composés diterpéniques sont également fréquemment rencontrés dans les espèces de la famille des Thymelaeaceae, tels que les genres *Daphne* ou *Thymelea*.

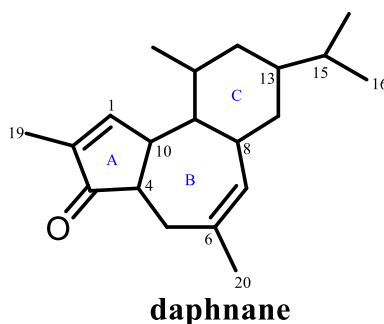
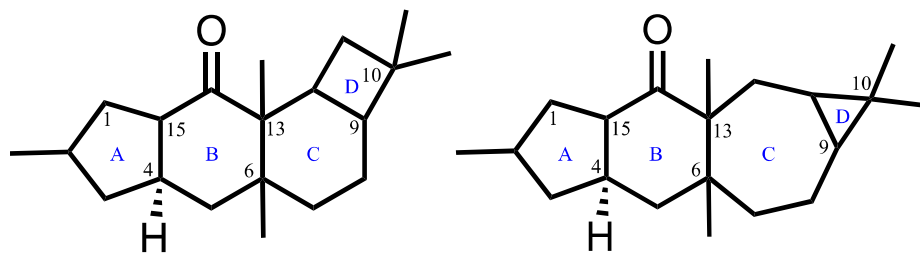


Figure 25. Squelette de type daphnane.

Huit composés de type euphoractine (Figure 26), possédant un tétracycle carboné de type 5/5/5/4 ou 5/5/7/3, ont été rapportés dans deux espèces du genre *Euphorbia*.[93–95] Ces molécules présentent toutes une fonction cétone en position 14 et certaines d'entre-elles exhibent une double liaison au niveau du cycle B entre C-4–C-15.



euphoractine

Figure 26. Squelette de type euphoractine.

B. LES ESTERS DE JATROPHANE ET PHORBOÏDES : POTENTIELS PHARMACOLOGIQUES ET SYNTHÈSES

Un certain nombre de revues bibliographiques s'est focalisé sur les activités biologiques (cytotoxique, antipyrétique, antimicrobienne, inhibitrice de récepteurs impliqués dans la chimiorésistance, promotrice de tumeurs, antiproliférative, etc.) des esters de diterpène isolés d'espèces du genre *Euphorbia*.^[48,59,60,81] Dans le chapitre suivant, nous avons fait le choix de nous focaliser sur les propriétés biologiques des squelettes diterpéniques isolés au cours de nos travaux. Nous nous attacherons notamment à l'activité inhibitrice des composés de type esters de jatrophane vis-à-vis de récepteurs impliqués dans la résistance aux médicaments (anti-MDR¹⁹) ainsi qu'à celle des phorboïdes sur la réplication virale du chikungunya (anti-CHIKV²⁰). Les esters de jatrophane – constituants macrocycliques très diversifiés d'un point de vue structural au sein du genre *Euphorbia* (cf. partie I, p.19-22) – possèdent un fort potentiel d'inhibition des récepteurs de résistance MDR, ce qui en fait un objet d'étude particulièrement intéressant dans la lutte contre la chimiorésistance. Une première partie traitera donc de ces aspects pharmacologiques alors que dans une seconde partie, nous détaillerons les travaux relatifs à la synthèse totale et aux modifications chimiques des molécules de type jatrophane. Ensuite, nous nous intéresserons aux phorboïdes, à leur potentiel modulateur des protéines kinases C (PKC), cibles récemment validées dans le mécanisme d'action anti-CHIKV de ces dérivés. Nous terminerons ce chapitre par une revue de la littérature des synthèses et modifications chimiques ayant été entreprises sur cette classe de métabolites.

¹⁹ MDR : *Multi-Drug Resistance*.

²⁰ CHIKV : *CHIKungunya Virus*.

1. Les esters de jatrophane : étude des propriétés inhibitrices sur la glycoprotéine-P

• La chimiorésistance médicamenteuse et la glycoprotéine-P

Les cancers, tumeurs malignes ou néoplastes²¹ sont les termes génériques utilisés pour désigner un développement tissulaire anormal au sein d'un tissu, affectant toutes les parties du corps. Une des caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales, liées à un tissu ou un organe, pouvant se propager sous forme de cellules circulantes appelées métastases. La chimiothérapie est une approche efficace dans le traitement de ces maladies. Cependant, la résistance de ces cellules (intrinsèque²² ou acquise²³) à de nombreuses classes de drogues anticancéreuses pose un sérieux obstacle au succès des traitements médicamenteux.[96]

Les mécanismes de la résistance des tumeurs face aux chimiothérapies ne sont pas complètement définis. Cependant, nous savons que la cellule tumorale développe des mécanismes de protection face aux cytostatiques²⁴ en augmentant l'expression de certaines protéines comme celles impliquées dans le transport MDR. Ces récepteurs, situés au niveau des membranes cellulaires externes, vont refouler vers l'extérieur de la cellule les cytostatiques, les rendant ainsi totalement inopérants. Ce type de résistance est généralement décrit comme un phénomène classique de chimiorésistance. Cependant, la surexpression de transporteurs transmembranaires n'explique pas à elle seule ce phénomène. Il existe des formes alternatives de chimiorésistance, comme l'altération de mécanismes impliqués dans l'apoptose,[96–98] qui sont classées parmi les résistances atypiques. L'efflux actif des cytostatiques est le mécanisme le plus étudié, tant dans la thérapie anti-tumorale que dans les infections bactériennes et virales, dont plusieurs transporteurs ABC²⁵ sont décrits pour leurs rôles dans ce processus.[98] La particularité de la superfamille des protéines ABC – diversifiées aussi bien chez les mammifères que chez les organismes procaryotes – réside dans leur implication pour le transport d'une grande variété de composés à travers les membranes biologiques.[99,100] Afin que les cytostatiques ne soient pas expulsés à l'extérieur de la cellule, des approches thérapeutiques

²¹ **Néoplaste** : tumeur à croissance tissulaire.

²² Résistance **intrinsèque** : absence de réponse des tumeurs face aux chimiothérapies.

²³ Résistance **acquise** : modification de la réponse des tumeurs face aux chimiothérapies au cours du traitement.

²⁴ Les **cytostatiques** regroupent les médicaments administrés dans le cadre d'une chimiothérapie.

²⁵ Transporteurs **ABC** pour *ATP-Binding Cassette*.

Synthèse bibliographique

misent sur le développement de chimiosensibilisateurs, principalement des inhibiteurs de la glycoprotéine-P (P-gp²⁶).

La P-gp est une glycoprotéine impliquée dans le transport de substances exogènes potentiellement toxiques, lui conférant un rôle de protection de l'organisme.[101] Elle a été décrite pour la première fois en 1976 par V. Ling comme une protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC, codée chez l'homme par le gène *MDR1*. [102] Son fonctionnement s'apparente à une pompe aspirante-refoulante transmembranaire avec une consommation d'ATP²⁷ contre un gradient chimique qui provoque l'efflux des agents toxiques hors de la cellule. Cette protéine membranaire de 170 kDa, a 1280 acides aminés et se présente sous la forme de deux moitiés homologues, TMD1 et TMD2, reliées entre elles (Figure 27).[103] Le résultat de sa surexpression chez les tumeurs malignes entraîne une résistance à de nombreux agents thérapeutiques.

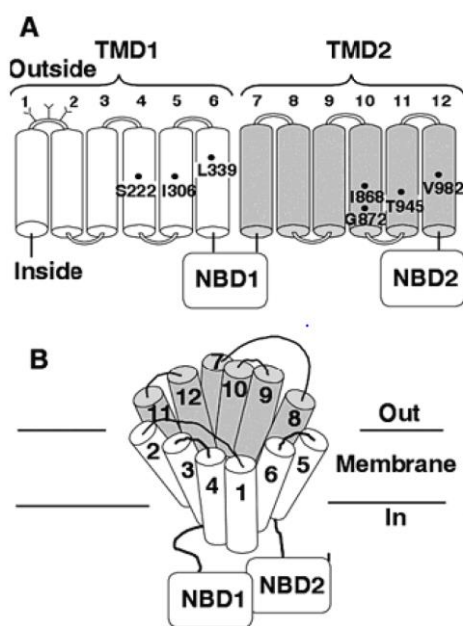


Figure 27. Schéma de la P-gp.[103]

Les chimiorésistances médicamenteuses sont responsables d'environ 50% des échecs thérapeutiques. Les principaux médicaments anti-tumoraux qui sont soumis à la résistance

²⁶ P-gp : *Permeability-GlycoProtein*.

²⁷ ATP : Adénosine-TriPhosphate.

induite par ce transporteur sont les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine), les vinca alcaloïdes (vinblastine, vincristine), les épipodophylotoxines (étoposide, teniposide) et le paclitaxel.[104] Deux possibilités d'inverser la chimiorésistance induite par la P-gp ont été envisagées : la modulation de la fonction protéique ou la suppression de l'expression de la protéine.[102] Les mécanismes de modulation de la résistance peuvent être classés en deux groupes principaux : les mécanismes spécifiques ou non spécifiques. Un des mécanismes spécifiques est l'interaction directe de l'agent modulateur (également appelé inhibiteur de MDR ou chimiosensibilisateur) avec un ou plusieurs sites de liaison à la P-gp, bloquant ainsi le transport. Cette interaction peut-être de type compétitive ou non compétitive selon le site de liaison.[105] Il s'agit du mécanisme le plus étudié. Le mécanisme non spécifique suggère que les modulateurs peuvent modifier les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires, soit en modifiant le pH intracellulaire et/ou le potentiel électrique membranaire régulant ainsi l'expression de la P-gp.[105] A l'instar de plusieurs composés prometteurs pour la modulation de la chimiorésistance, certaines classes d'esters diterpéniques se sont avérées être des inhibiteurs intéressants de la P-gp.

• Les esters de jatrophane inhibiteurs de récepteurs MDR

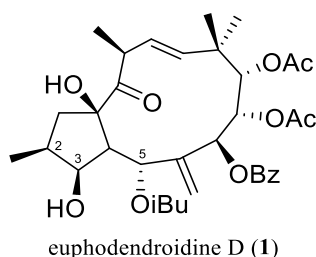
Durant ces vingt dernières années, de nombreuses investigations ont montré que les diterpènes de type jatrophane et lathyrane possédaient des propriétés inhibitrices des pompes à efflux impliquées dans la résistance médicamenteuse, et dont le mécanisme d'action reposait sur une modulation de la P-gp. Les premiers travaux de Hohmann *et al.* (2001, 2002 et 2003)[106–108] ont souligné le pouvoir modulateur d'esters de jatrophane isolés d'espèces du genre *Euphorbia* sur les récepteurs des cellules de lymphome²⁸ de souris. Ensuite, les travaux de Corea *et al.* (2003, 2004)[46,47,109] ont consisté à évaluer les esters de jatrophane sur l'inhibition de la P-gp en mesurant l'efflux de la daunomycine²⁹. Ces études et les suivantes ont permis de mettre en évidence de puissants inhibiteurs des récepteurs impliqués dans la chimiorésistance et principalement de la P-gp, dont les plus actifs sont détaillés ci-après.

²⁸ **Lymphome** : tumeurs malignes du système lymphatique.

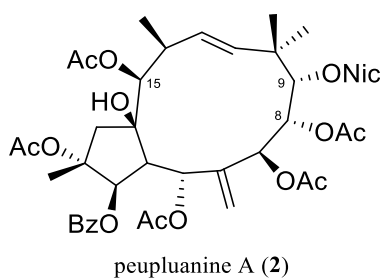
²⁹ Antibiotique utilisé dans le traitement de certain cancer.

Synthèse bibliographique

Une série d'esters de jatrophane isolés d'*Euphorbia dendroides*, récoltée en Sardaigne, a été évaluée sur l'inhibition de la P-gp.[47] Le composé le plus actif de la série, nommé euphodendroidine D (**1**), a montré une activité inhibitrice deux fois plus forte que la cyclosporine³⁰ (considérée à 100%) avec une efficacité de $183 \pm 17\%$ sur l'inhibition de l'efflux de la daunomycine. Par ailleurs, l'étude des relations structure-activité a révélé l'effet positif de substituants en position C-2, C-3 et C-5, d'un hydroxyle libre en C-3 et de l'absence d'oxydation en C-2. Ces travaux précisent également l'aspect favorable d'un groupement acétate en C-5 plutôt qu'un nicotinate, qu'un 2-méthylbutyrate ou qu'un isobutyrate.



La peupluanine A (**2**) a également montré une forte activité comparable à l'euphodendroidine D (**1**), avec un taux d'inhibition du transport de la daunomycine par la P-gp de $207 \pm 17\%$. [109] A partir de la série d'esters de jatrophane isolés d'un extrait d'*E. peplus* (dont la peupluanine A), les relations structure-activité ont révélé l'importance de la présence d'un groupement acétyle en C-8 à la place d'un hydroxyle libre et d'un acétate en C-9 plutôt qu'un nicotinate. La présence d'un hydroxyle libre en C-15 est favorable à l'activité, de même que la présence d'un carbonyle en C-14 pourrait encore augmenter celle-ci.



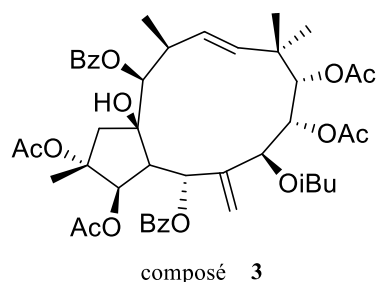
L'étude phytochimique d'*E. sarroria* a conduit à l'isolement et l'identification du composé **3** [110] dont l'activité inhibitrice est similaire à la peupluanine A (**2**) et à l'euphodendroidine D (**1**). En effet, ce composé (**3**) exhibe un potentiel inhibiteur supérieur au vérapamil³¹ (utilisé

³⁰ Agent immunosuppresseur utilisé comme standard de la modulation de P-gp.

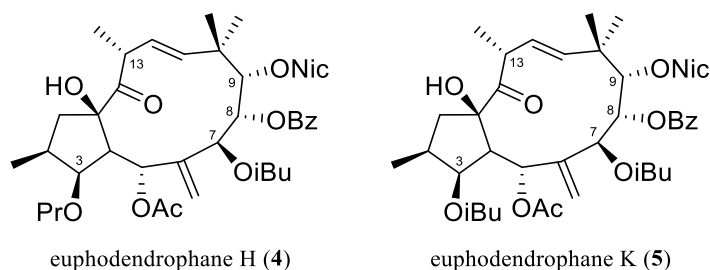
³¹ Antagoniste calcique spécifique.

Synthèse bibliographique

comme standard) des pompes à efflux P-gp sur les cellules KBv200, avec 177,9% d'inhibition de la Rhodamine-123³² (Rho-123).



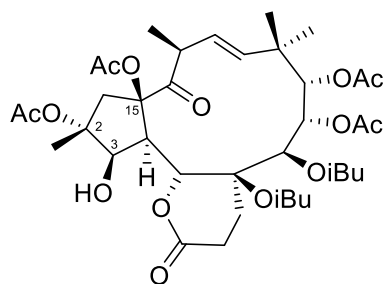
L'étude d'un extrait d'*E. dendroides* récolté au Monténégro a permis l'isolement d'esters de diterpène de type jatrophane nommés euphodendrophanes.[51] Cette série diffère de celle isolée de la même plante récoltée en Sardaigne par la configuration du carbone asymétrique 13. L'évaluation de cette série sur l'inhibition de la P-gp dans les cellules DLD1-TxR a montré que les euphodendrophanes H (4) et K (5) sont deux fois plus actifs que le vérapamil, mais moins efficaces que le tariquidar³³. Les groupements esters en position C-7, C-8 et C-9 sont nécessaires à l'activité inhibitrice, et plus particulièrement la présence d'un benzoate en C-8, d'un nicotinate en C-9 et d'un acétate en C-3.



Des esters de jatrophane modifiés de type 17-bishomojatrophane (terracinolides), isolés d'*E. terracina* et d'*E. dendroides*, ont été évalués sur l'inhibition de l'efflux de la daunomycine via la P-gp.¹⁷⁻²⁰ Le terracinolide H (6) a montré une forte activité inhibitrice allant jusqu'à 138 ± 17% d'inhibition de l'efflux. Chez ces dérivés de jatrophane, la présence d'un substituant en C-2 ainsi qu'un hydroxyle libre en C-3 et C-15 semble importante pour accroître l'activité inhibitrice.

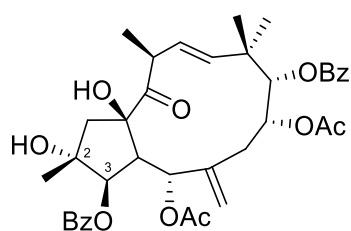
³² Colorant traceur dans l'eau.

³³ Inhibiteur non-spécifique de la P-gp.

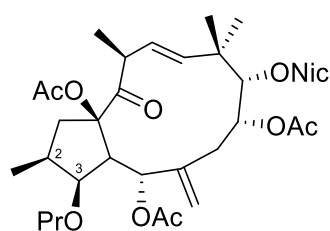


terracinolide H (6)

Des esters de jatropane isolés d'*E. charachias* ont présenté des propriétés inhibitrices de l'efflux de la daunomycine.[114] Parmi ces composés, les euphocharacines C (7) et I (8) inhibent le transport transmembranaire avec un pourcentage de l'ordre de $123 \pm 2-3\%$. L'activité est amplifiée chez les euphocharacines avec un hydroxyle libre en C-2 ou lorsqu'elles possèdent un ester de type benzoate plutôt qu'un nicotinate sur ce même carbone. Chez les composés hydroxylés en position 2, l'activité est augmentée lorsqu'ils présentent un groupement propionate en C-3 plutôt qu'un benzoate, qu'un isobutyrate ou qu'un acétate.

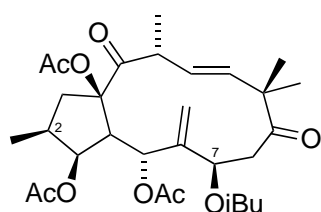


euphocharacine C (7)

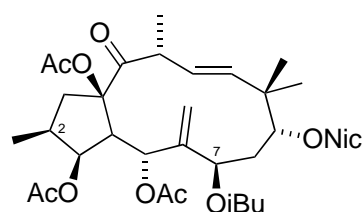


euphocharacine I (8)

L'activité modulatrice de récepteurs MDR sur des cellules de lymphome de souris a également été mesurée pour une série d'esters de jatropane isolés d'*E. esula*. [115] Deux composés, les ésulatine J (9) et M (10) se sont avérées être de bons inhibiteurs puisqu'elles sont deux à cinq fois plus efficaces que le standard R+vérapamil. Les relations structure-activité mettent en évidence une meilleure inhibition des récepteurs résistants avec les composés ayant une fonction ester en C-7 ainsi qu'avec ceux dépourvus d'oxygénation ou de groupement aromatique (type benzoate ou nicotinate) en C-2.



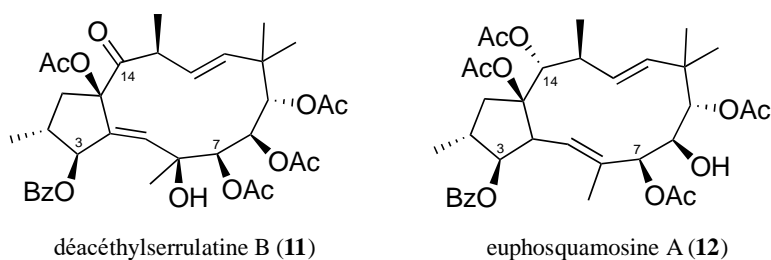
ésulatine J (9)



ésulatine M (10)

Synthèse bibliographique

Une étude récente a indiqué que les esters de jatrophane sont aussi des inhibiteurs efficaces de transporteurs transmembranaires induisant la résistance médicamenteuse aux antifongiques chez *Candida albicans* (*CaCdr1p* et *CaMdr1p*).^[116] Deux d'entre eux, la déacétylserrulatine B (**11**) et l'euphosquamosine C (**12**) ont montré non seulement une forte inhibition de ces récepteurs, mais aussi une synergie avec un antifongique, le fluconazole. Les relations structure-activité ont permis de souligner l'effet bénéfique d'un acétate en C-7 et d'un benzoate en C-3. En revanche, la présence d'un acyle ou d'une cétone en C-14 n'apporte pas de gain significatif à l'activité.



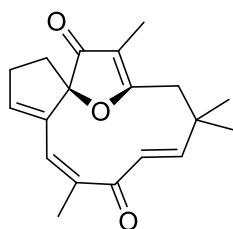
• Les synthèses totales et modulations chimiques d'esters de jatrophane

Les diterpènes à squelette jatrophane ont été isolés pour la première fois en 1970 par Kupchan et ses collaborateurs à partir d'*Euphorbia gossypifolia*.^[117] Depuis, une diversité de structures a été décrite pour ce type de composés (cf. partie I, p.19-22). La synthèse de ces diterpènes macrocycliques est un sujet complexe sur lequel des équipes de recherche s'y sont penchées à plusieurs reprises. Comme indiqué précédemment, cette classe est connue pour son pouvoir modulateur de récepteurs MDR, ce qui en fait un matériel de choix pour la modification par des procédés synthétiques, donnant accès à de nouveaux dérivés, clé de compréhension des relations structure-activité. Malgré les progrès dans la préparation de synthons plus ou moins fonctionnalisés, les synthèses totales de ces produits naturels restent un pari difficile. En outre, les nombreuses fonctions oxygénées présentes sur ces constituants nécessitent la mise en œuvre de stratégies s'appuyant sur l'emploi de groupements protecteurs sophistiqués. Par ailleurs, le nombre important de centres asymétriques complique la synthèse de ces diterpènes. La problématique d'accès à une synthèse totale des esters de jatrophane s'exprime également dans le nombre de synthèses partielles qui ont été publiées au cours de ces dernières années.^[117–121]

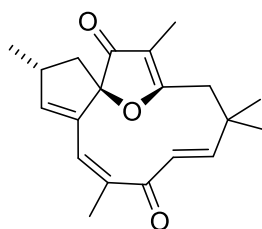
En dépit de ces difficultés, des synthèses totales de diterpène à squelette jatrophane ont été entreprises avec succès. Toutefois, il a fallu attendre 1981 pour voir la première synthèse totale de deux composés racémiques, la norméthyljatrophone (**13**) et la jatrophone (**14**), réalisée par

Synthèse bibliographique

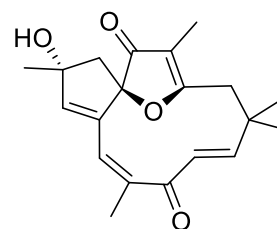
l'équipe de Smith,[122] suivit en 1989 par la préparation des hydroxyjatrophones A et B (**15** et **16**, respectivement).[123] Un an après, les équipes de Stille et Hegedus ont présenté la synthèse d'une nouvelle jatrophone (**17**) et de l'*epi*-jatrophone, composés également racémiques.[124] En 1992, les équipes de Han et Wiemer ont proposé un protocole différant de ceux décrits auparavant, permettant la synthèse d'un produit naturel non racémique, la (+)-jatrophone (**17**).[125] Ce n'est qu'en 2004 que la synthèse énantiosélective³⁴ du fragment cyclopentane (C-5-C-14) du squelette jatrophone a été réalisée par Hiersemann et ses coéquipiers. Cette dernière a permis de démontrer tout le potentiel de la réaction intramoléculaire ène-carbonyl pour former une liaison carbone-carbone.[126] Cette étape fut décisive pour la première synthèse totale asymétrique³⁵ du squelette jatrophone puisqu'en 2009, les équipes de Hiersemann et Schnabel achèvent la synthèse du 15-acétyl-3-propionyl-17-norcharaciol (**18**).[127]



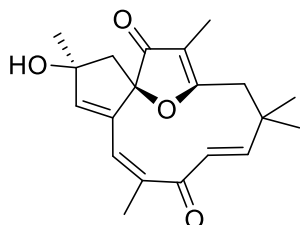
norméthyljatrophone (**13**)



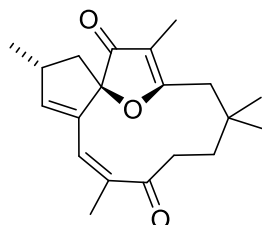
jatrophone (**14**)



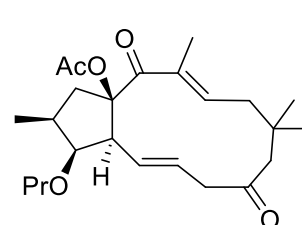
hydroxyjatrophone A (**15**)



hydroxyjatrophone B (**16**)



jatrophone (**17**)



15-acétyl-3-propionyl-17-norcharaciol (**18**)

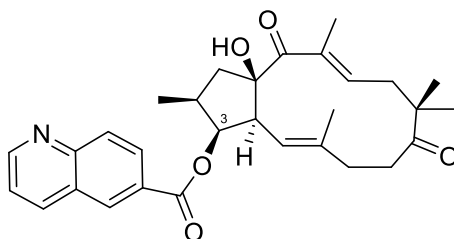
Au-delà du challenge synthétique, les esters de jatrophone ont montré d'intéressantes activités inhibitrices de la glycoprotéine-P, ce qui a accru l'intérêt des chimistes pour la préparation d'analogues plus puissants et plus solubles. Un an après la première synthèse asymétrique de l'ester de jatrophone **18**, Hiersemann, Schnabel et leurs collaborateurs ont réalisé la synthèse totale d'esters de jatrophone naturel et non naturel de type 5,12-dièn-jatrophone, afin de mieux appréhender les propriétés modulatrices de ces dérivés sur les

³⁴ La synthèse **énantiosélective** est une réaction au cours de laquelle sont obtenus deux énantiomères en quantité inégale à partir d'un précurseur chiral.

³⁵ La synthèse **asymétrique** consiste en la formation d'un énantiomère en partant d'une matière première achirale.

Synthèse bibliographique

transporteurs MDR.[128] Au total, 18 molécules ont été préparées puis évaluées sur les transporteurs ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP) et ABCC1 (MRP1). Cette étude a permis de révéler l'effet délétère d'un hydroxyle libre ou d'un carbonyle en C-3, mais également l'importance de la stéréochimie de ce carbone, puisque l'énantiomère non-naturel 3*R* s'est montré beaucoup plus actif que son stéréoisomère 3*S* naturel. L'ajout d'un résidu quinoline sur cette même position (composé **19**) a mis en évidence le rôle de ce substituant dans l'activité modulatrice de la P-gp. En effet, ce composé est le plus actif de la série avec un pourcentage d'inhibition comparable au standard R+vérapamil (environ 60% d'inhibition totale à 10 $\mu\text{mol/L}$). D'une manière générale, les composés présentant un résidu lipophile sont les plus actifs de la série au regard de la P-gp.



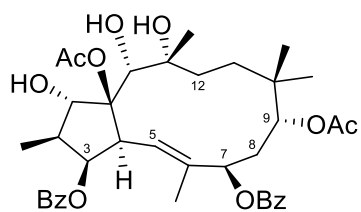
ester de jatrophane de synthèse (**19**)

En 2016, des modifications chimiques des esters de jatrophane, isolés de *Pedilanthus tithymaloides*, ont été réalisées avec l'objectif de préciser le rôle bénéfique ou délétère de certains substituants vis-à-vis de la P-gp.[129] A partir de 13 esters de jatrophane naturels, 22 nouveaux dérivés ont été obtenus par différentes estérification, hydrolyse, hydrogénation et époxydation. Ces derniers ont été évalués sur l'efflux de la Rho123, puis par des essais de réversibilité de la P-gp sur les lignées cellulaires HepG2 de carcinome hépatocellulaire humain (HepG2/ADR) et MCF-7 (MCF-7/ADR) de l'adénocarcinome mammaire, résistantes à l'adriamycine³⁶. Plusieurs paramètres semblent avoir une influence positive sur l'inhibition de la pompe, tels que la présence d'esters ou d'hydroxyles sur le fragment C-1–C-15–C-14–C-13, et un motif époxyde entre C-5–C-13. Cette étude a souligné que l'estérification de l'hydroxyle en C-3, rendant la molécule moins polaire, permettait d'accroître l'activité inhibitrice, tandis que la présence d'un carbonyle, d'un acétate ou d'un benzoate en C-7 avait peu d'influence. D'autres facteurs n'entraînent pas un gain significatif d'inhibition comme un CH₂ ou un CH-OAc en C-8, voire la diminue comme la présence d'un hydroxyle libre en C-5, C-7, C-9 et C-12. Parmi les 22 nouveaux dérivés, trois ont montré une capacité à inhiber le récepteur tout en

³⁶ Appelée également doxorubicine, elle appartient au groupe d'anticancéreux appelés antinéoplasiques.

Synthèse bibliographique

étant moins cytotoxique que le tariquidar. Cependant, seul le composé **20** possède une grande stabilité métabolique *in vitro*. En effet, ce dernier a montré un fort potentiel anti-tumoral lorsqu'il est coadministré *in vivo* dans une tumeur de souris (volume de 44.88 mm³ pour 144,48 mm³ chez le groupe control).



ester de jatrophane de synthèse (**20**)

2. Les phorboïdes : études des propriétés anti-chikungunya et modulatrices des protéines kinases C

• Le virus du chikungunya et la protéine kinase C

Le virus du chikungunya (CHIKV) appartient au groupe IV des alphavirus, famille des Togaviridae.[130] Les moustiques du genre *Aedes* sont à l'origine de la transmission de ce virus à l'Homme, et plus particulièrement les espèces *A. aegypti* et *A. albopictus*. [131,132] Lorsqu'il infecte l'organisme humain, ce virus entraîne généralement de fortes fièvres, des frissons, des céphalées, des myalgies et des éruptions cutanées. Ces symptômes peuvent être associés à la fois aux maladies dues aux virus du chikungunya, de la dengue ou du Zika.[133,134] Chez 30 à 40% des personnes atteintes, une polyarthralgie³⁷ peut se déclarer, pouvant s'étendre sur plusieurs mois, provoquant une forte invalidité chez ces personnes.[135,136] C'est en 1952 que sont survenues les premières épidémies au Sud-Est de la Tanzanie actuelle.[137] Avant les années 1960-70, le CHIKV était uniquement présent dans les pays d'Afrique, puis il a provoqué de nombreuses épidémies dans le monde au fil des années.[138–146] Le réchauffement climatique et la mondialisation a permis au vecteur de se propager jusque dans les zones tempérées (Etats-Unis et Europe). En Europe notamment, une première épidémie s'était déclarée dans le nord de l'Italie, touchant plus de 200 personnes,[147] tandis que deux cas ont été recensés dans le sud de la France (région de Fréjus dans le Var) en août-septembre 2010 chez des personnes n'ayant pas voyagé.[148] En septembre-octobre 2014, 12 cas sont survenus à Montpellier (Hérault).[149] Ces exemples, parmi d'autres, illustrent la propagation du virus dans les zones tempérées et laissent présager de futurs épisodes épidémiques.[150,151]

Le moustique *A. albopictus* – plus connu sous le nom de « moustique tigre » et originaire du sud-est asiatique – est aujourd'hui présent sur tous les continents et plus particulièrement au niveau des zones équatoriales et tempérées. En France métropolitaine, ce moustique s'est implanté dans les Alpes Maritimes en 2004, en Corse en 2006–2007,[152] puis il a progressivement envahi toutes les régions méditerranéennes jusqu'à progresser vers l'Ouest et le Nord (**Figure 28**).[153] Selon Proestos, l'expansion actuelle d'*A. albopictus* dans le monde suppose qu'il sera présent sur plus de 70% de la surface terrestre en 2050.[154]

³⁷ **Polyarthralgie** : douleurs aux articulations.

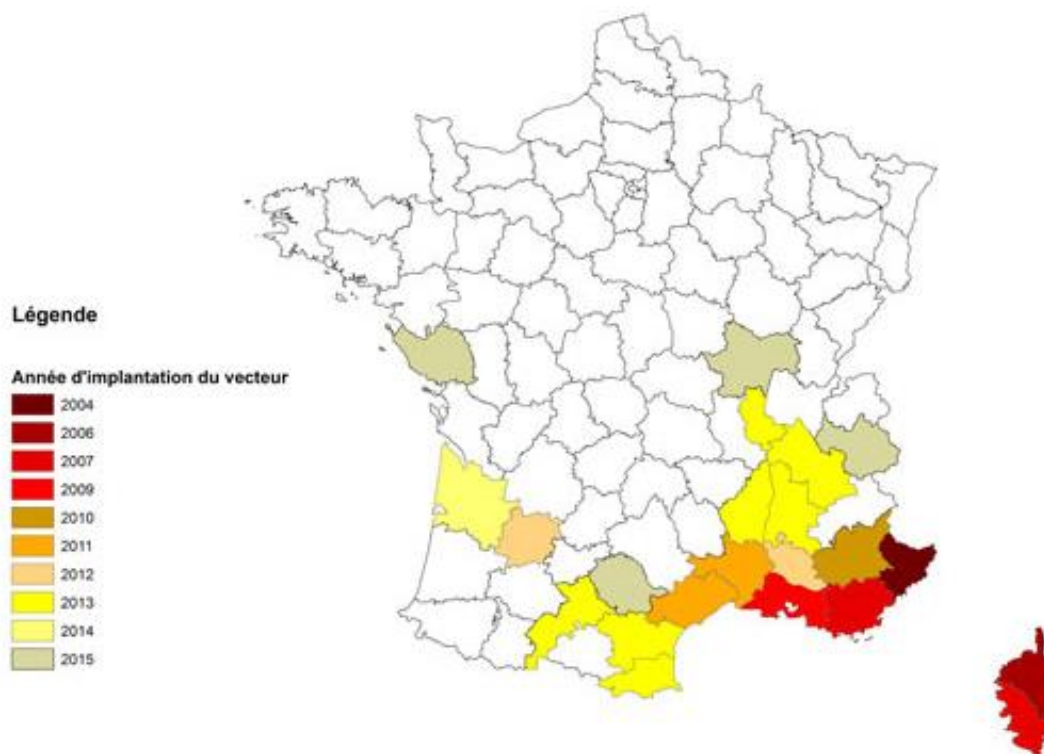


Figure 28. Carte des départements et années d'implantation du vecteur *Aedes albopictus* en France métropolitaine.[153]

La nécessité de lutter contre ce fléau devient urgente. En effet, la maladie résultant de cette infection ne connaît actuellement qu'un traitement symptomatique du fait de l'absence de vaccin et de traitements curatifs, bien qu'un vaccin contre la dengue, le Dengvaxia[®], ait été récemment mis sur le marché aux Philippines, au Mexique et au Brésil.[155] Le besoin de développer de nouvelles molécules anti-CHIKV est indéniable ; ceci passe nécessairement par la compréhension des voies d'inhibition de la répllication virale. Trois classes d'inhibiteurs du CHIKV ont été décrites dans plusieurs rapports synthétiques allant jusqu'à 2014.[156–159] Il s'agit de molécules organiques naturelles ou de synthèse, de séquences interférentes (ARNi³⁸) et de facteurs cellulaires de croissance. En 2017, les travaux de Neyts *et al.* ont permis de mettre en évidence l'implication des protéines kinases C comme une cible potentielle pour l'inhibition de la répllication du virus du chikungunya.[160]

³⁸ ARNi : Acide RiboNucléique interférent.

Synthèse bibliographique

La protéine Kinase C (PKC) fut identifiée en 1977 comme protéine sérine/thréonine³⁹ activée par protéolyse.[161] Les études qui suivirent ont démontré qu'elle est activée de manière réversible par un lipide neutre, le diacylglycérol (DAG), en présence de phospholipides. L'identification de la PKC comme le récepteur principal des promoteurs de tumeurs de type esters de phorbol mimant le DAG, a fortement stimulé la recherche sur cette protéine et les voies de signalisation afférentes.[162,163] Les PKC sont fréquemment activées par phosphorylation,[164,165] et agissent sous leur forme active dans les cascades métaboliques essentielles aux processus cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et l'apoptose.[164,166] La famille des PKC est représentée par trois classes qui diffèrent selon leurs structures et leurs fonctions (Figure 29) : les PKC conventionnelles (α , β I, β II et γ) et nouvelles (δ , ϵ , η et θ), capables de lier le DAG et les esters de phorbol,[164,165,167] et les PKC atypiques (ζ , ι et λ) ne pouvant lier ce type de molécules [164,165]. La structure d'une PKC consiste en un domaine catalytique C-terminal avec un site de fixation à l'ATP et au substrat, et un domaine N-terminal impliqué dans la régulation.[167]

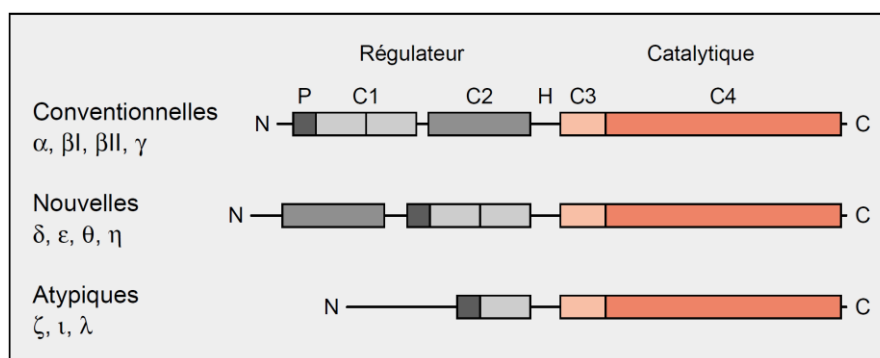


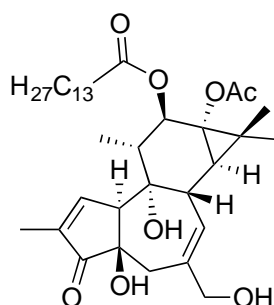
Figure 29. Schéma des trois classes de PKC.[163]

Le 12-*O*-tétradécanoatephorbol 13-acétate (TPA) et la prostratine, sont des esters de phorbol isolés de l'huile de croton (*Croton tiglium*) et de *Pimelea prostrata*, respectivement.[168,169] Ces tiglianes sont connus pour leur fort pouvoir activateur de PKC, du fait de leur structure proche du DAG.[164,165] La structure du TPA (21) se lie directement à la PKC avec une affinité 250 fois plus élevée que le DAG.[170] Cette propriété lui confère une puissante activité pro-tumorale à tel point qu'il est utilisé couramment en biologie pour créer des tumeurs chez des modèles.[171] Le TPA a montré une forte inhibition du CHIKV avec une

³⁹ La **protéine sérine/thréonine** est une enzyme appartenant à la famille des transférases.

Synthèse bibliographique

concentration efficace médiane inférieure à 3 nM (EC_{50}^{40}). Cependant, son pouvoir promoteur de tumeur rend cette molécule non exploitable pour un traitement thérapeutique.



TPA (**21**)

$EC_{50} = 2,9 \pm 0,3 \text{ nM}$, $SI > 1965$

Contrairement au TPA, la prostratine (12-déoxyphorbol 13-acétate, **22**) est un ester de phorbol non promoteur de tumeur [172,173] considéré comme un agent thérapeutique potentiel dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, ce constituant est capable de réactiver les réservoirs de latence des cellules infectées,[174] principale barrière empêchant l'éradication du virus dans le corps humain. Il suit une voie métabolique impliquant les PKC et agissant sur le VIH selon deux mécanismes d'action. Ces derniers consistent en une diminution de l'expression des récepteurs à VIH-1 (CD4 et CCR5), ce qui réduit le risque d'infection des cellules saines, et en une réactivation de l'expression du VIH-1 dans les cellules où le virus est à l'état latent.[165] La prostratine est actuellement en phase clinique III aux USA comme complément indispensable au traitement du VIH.[175,176] Cette molécule est également un inhibiteur anti-CHIKV intéressant avec un bon indice de sélectivité (SI^{41}).[177]

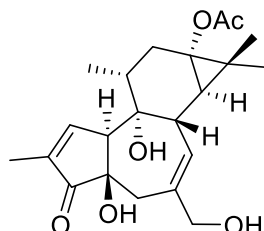
Une étude récente, menée par les membres de l'équipe de Neyts, avait pour objectif de mettre en avant les voies de la réplication du CHIKV afin d'amorcer le développement d'agents anti-CHIKV cliniquement pertinents.[160] Ils se sont penchés sur l'activité anti-CHIKV de la prostratine (**22**) afin de cerner le mécanisme par lequel ce composé exerce son activité antivirale, mais aussi de souligner le rôle des PKC dans la réponse liée à l'infection. Leurs travaux ont révélé que l'activité anti-CHIKV de la prostratine était bien induite par l'activation de certains isoformes de PKC classiques. Précédemment, des études avaient montré une

⁴⁰ EC_{50} : *Effective Concentration*, est la concentration d'un principe actif qui induit une réponse où 50% de l'effet maximal est observé.

⁴¹ SI : *Selective Indice*, est défini comme un ratio entre la CC_{50} (*Cytotoxic Concentration* du composé inhibant de 50% la croissance cellulaire) et l' EC_{50} .

Synthèse bibliographique

activation des PKC α et PKC θ par cette molécule liée à son pouvoir anti-VIH sur les cellules T.[178] Ce résultat suppose l'implication de ces mêmes isoformes de PKC dans la réponse anti-CHIKV ; toutefois, des recherches complémentaires doivent être entreprises afin de valider cette hypothèse et de décrire précisément le mécanisme d'action de la prostratine sur l'inhibition de la réplication virale du CHIKV.



prostratine (22)

$EC_{50} = 2,6 \pm 1,5 \mu M$, SI > 30

Comme indiqué précédemment, la famille des esters de phorbol est connue pour activer les PKC en mimant le DAG.[162,163] De plus, la prostratine présente un mécanisme PKC-dépendant dans son activité anti-CHIKV. Ce lien entre l'inhibition de la réplication du CHIKV et l'implication de certains isoformes de PKC nous laisse supposer que de nombreux esters de phorbol pourraient exhiber des propriétés analogues à la prostratine.

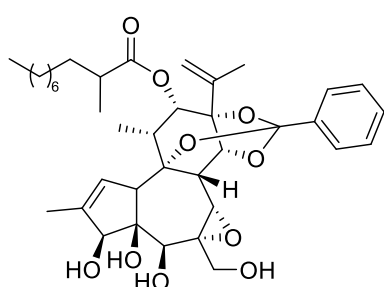
• Les phorboïdes anti-CHIKV

Les constituants appartenant aux phorboïdes sont des diterpènes polycycliques regroupant les squelettes de type tigliane (ou phorbol), ingénane et daphnane. Ces composés sont retrouvés exclusivement chez les espèces des familles des Euphorbiaceae et des Thymelaeaceae.[179] Bien que ces composés soient généralement associés à un fort pouvoir pro-tumoral, il n'en demeure pas moins qu'un certain nombre présentent des activités biologiques sans effet cytotoxique. Depuis quelques années, cette classe de molécules s'est montrée très intéressante dans la lutte antivirale et notamment contre le CHIKV. Les phorboïdes décrits comme étant les plus actifs seront détaillés dans la partie suivante.

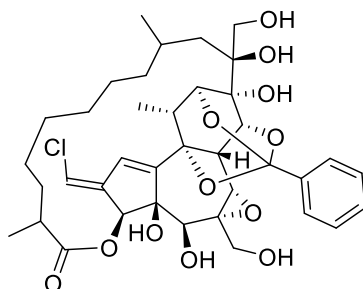
Une série de daphnane orthoesters, nommés trigocherrines et trigocherriolides, isolés à partir des extraits (écorces, bois et feuilles) de *Trigonostemon cherrieri*, a été évaluée sur la réplication du virus du chikungunya. À l'exception de la trigocherrierine A (23), tous ces composés ont la particularité d'être halogénés. La trigocherrierine A, le trigocherriolide E (24)

Synthèse bibliographique

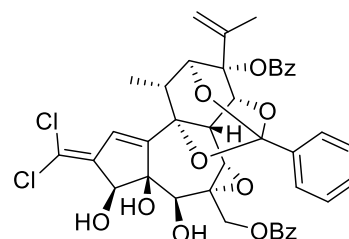
et la trigocherrine B (**25**) ont montré les plus fortes activités avec une EC_{50} sub-micromolaire ou micromolaire et une valeur de SI élevée.[180–182]



trigocherrierine A (**23**)
 $EC_{50} = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$, SI = 72

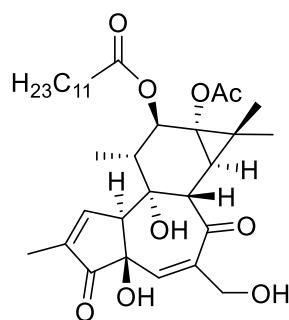


trigocherriolide E (**24**)
 $EC_{50} = 0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$, SI = 9,4



trigocherrine B (**25**)
 $EC_{50} = 2,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$, SI = 35,1

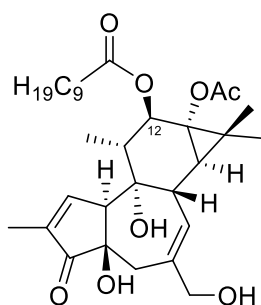
La trigowiine A (**26**), isolée des feuilles de *Trigonostemon howii*, est un diterpène de type tigliane possédant une structure relativement proche des dérivés bien connus que sont la prostratine, le TPA et le 4 α -TPA.[177] Les résultats relatifs de leur évaluation sur le CHIKV ont mis en avant que le 4 β -TPA s'est démarqué des autres par une puissante activité inhibitrice, avec une EC_{50} de l'ordre du nanomolaire, associée à un SI proche des 2000. De plus, cette observation a permis de souligner l'importance de la configuration du C-4 en bêta (4 β -TPA *versus* 4 α -TPA) pour obtenir une meilleure activité anti-CHIKV.



trigowiine A (**26**)
 $EC_{50} = 43 \pm 12 \mu\text{M}$, SI > 2,3

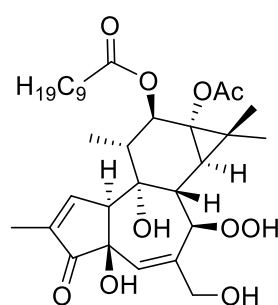
Deux diterpènes de type tigliane, le 12-*O*-décanoyl-4 β -phorbol 13-acétate (**27**) et le 12-*O*-décanoyl-7-hydropéroxy-5-ène-4 β -phorbol 13-acétate (**28**), ont été isolés des feuilles de *Croton mauritanus* et évalués sur la réplication du CHIKV.[183] Ces deux composés ont montré une forte inhibition de la réplication virale avec une EC_{50} inférieure à 5 μM , mais associée à une forte cytotoxicité (SI faible). Il est à noter que le phorbol **27** présente une structure analogue au TPA mais une sélectivité moindre ; cette observation suggère que la longueur de la chaîne carbonée de l'ester en C-12 a une influence vis-à-vis de l'activité sur le CHIKV.

Synthèse bibliographique



12-*O*-décanoyl-4β-phorbol 13-acétate (**27**)

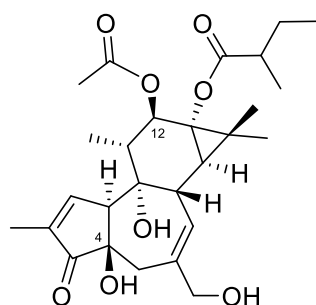
$EC_{50} = 2,4 \pm 0,3 \mu M$, $SI = 2,0$



12-*O*-décanoyl-7-hydroperoxy-5-ène-4β-phorbol 13-acétate (**28**)

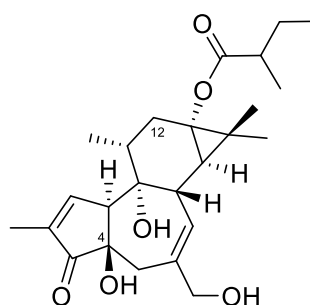
$EC_{50} = 4,0 \pm 0,8 \mu M$, $SI = 1,9$

L'étude des extraits de *Stillingia lineata* a conduit à la caractérisation de nombreux diterpènes dont plusieurs esters de phorbol. L'évaluation anti-CHIKV de ces composés a révélé le fort pouvoir inhibiteur de deux phorbols (**29** et **30**) possédant également une bonne sélectivité.[184] Les relations structure-activité de cette série d'esters de phorbol ont permis de mettre en évidence l'effet favorable d'un hydroxyle en 4β d'une part, et une cytotoxicité liée à la présence d'une longue chaîne d'acide gras en C-12 d'autre part.



29

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



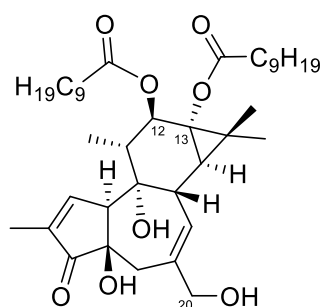
30

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

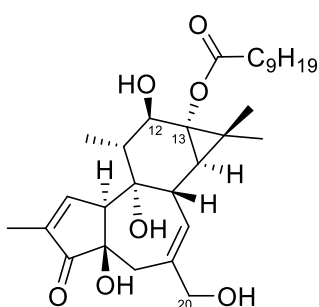
Une étude ayant pour objectif d'explorer les relations structure-activité des phorboïdes vis-à-vis du CHIKV a été menée à partir de 29 diterpènes commerciaux de type tigliane, daphnane et ingénane.[185] Parmi les tiglianes, le phorbol-12,13-diacétate (**31**) présente un pouvoir inhibiteur remarquable et similaire à celui décrit pour le TPA. Trois autres esters de phorbol (**32**, **33** et **34**) ont montré une forte activité anti-CHIKV, associée à une cytotoxicité, d'où un indice de sélectivité relativement faible pour ces trois constituants. Grâce à ces résultats, il a été démontré l'importance de la longueur et de la position des chaînes acyles. Une longue chaîne aliphatique en position C-12 apparaît comme favorable à l'activité anti-CHIKV pour les molécules monoesterifiées, tandis que chez les 4β-phorbol-12,13-diesteres, cette chaîne montre

Synthèse bibliographique

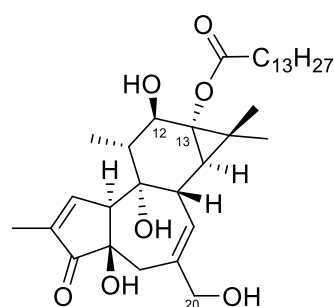
son effet potentialisateur en C-13. Par ailleurs, l'observation d'une plus forte inhibition avec les dérivés de 4 β -phorbol plutôt qu'avec leurs analogues 4 α a été confirmée lors de cette étude. Elle a également mis en avant l'effet délétère d'un carbonyle en C-20, tandis que la présence d'un groupement ester sur cette même position n'a aucun impact sur l'activité antivirale. En ce qui concerne les composés de type ingénane, l'ingénol-3,20-dibenzoate (**35**) a montré un potentiel inhibiteur intéressant alors que celui de l'alcool correspondant est moindre. Un seul composé de type daphnane orthoester a été évalué ; il a induit une mort cellulaire du fait de son fort pouvoir cytotoxique.



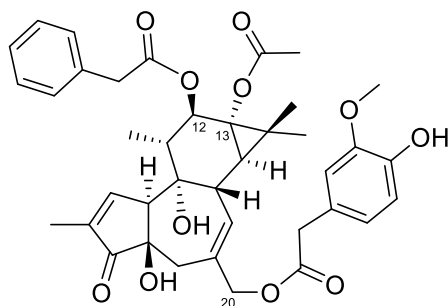
phorbol-12,13-didécanoate (**31**)
 $EC_{50} = 6,0 \pm 0,9$ nM, SI = 686



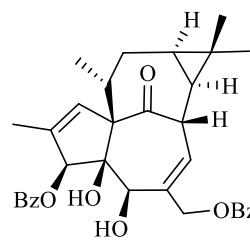
phorbol-13-décanoate (**32**)
 $EC_{50} = 2,2 \pm 0,1$ μ M, SI = 9,7



phorbol-13-tétradécanoate (**33**)
 $EC_{50} = 0,99 \pm 0,03$ μ M, SI = 9,0



12-O-phénylacétate-13-O-acétylphorbol-20-homovallinate (**34**)
 $EC_{50} = 1,7 \pm 0,3$ μ M, SI = 14,2



ingénol-3,20-dibenzoate (**35**)
 $EC_{50} = 1,8 \pm 0,2$ μ M, SI = 6,4

• Les synthèses totales et modulations chimiques des phorboïdes

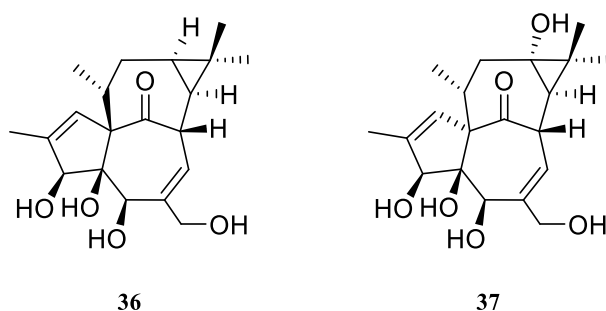
Les ingénanes

La synthèse totale du système tétracyclique 5/7/7/3 propre au squelette ingénane représente un réel défi pour les chimistes. Les caractéristiques structurales inhabituelles de ce système, incluant une fonction cétone pontée entre C-8 et C-10, ont motivé les chercheurs à la réalisation de sa synthèse. En particulier, celle-ci devra tenir compte de la jonction intercyclique *trans*

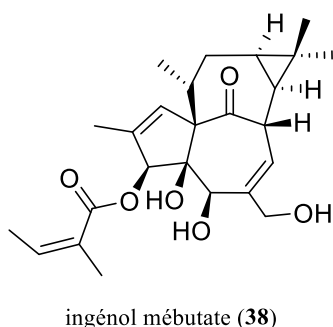
Synthèse bibliographique

entre les cycles B et C, connue sous le nom de stéréochimie in/out.[186] Les approches réussies de cette jonction annulaire B/C ont généralement reposé sur des stratégies de fragmentations et de réarrangements,[187–190] alors que les tentatives de construction de la tête de pont *trans* ont abouti à une stéréochimie *cis*. [191–194] Des travaux ultérieurs se sont attachés à faire progresser la synthèse totale d'ingénols grâce à la construction complète du squelette ingénane via une métathèse de fermeture de cycle. Cette étape a permis d'obtenir une jonction de cycle entre B et C de configuration *trans*. [195]

La première synthèse totale d'un diterpène de type ingénane (**36**) a été achevée par Funk et ses collaborateurs en 1993.[188,189] Plusieurs décennies d'efforts ont abouti à trois autres synthèses totales de ce dernier,[196–198] une synthèse totale du 13-oxyingénol (**37**),[199] et de nombreuses approches pour la construction de ce squelette tétracyclique.[200–202] Bien que les synthèses totales du composé **36** fussent couronnées de succès, elles nécessitent cependant un grand nombre d'étapes (37–46 étapes).



En 2013 et 2014, Baran et ses collègues ont proposé une synthèse de l'ingénol (**36**) et de dérivés de l'ingénol mébutate (**38**) en 14 étapes.[203,204] Cette « synthèse terpénique en deux phases » suit la logique de la biosynthèse des terpènes, par (i) la construction du noyau polycyclique (étape cyclisante) et (ii) la décoration avec des groupes hydroxyles (étape oxydante).



Synthèse bibliographique

L'efficacité de la synthèse par mimétisme de la biosynthèse a déjà été démontrée pour le taxol^{®42}. [205] Cette approche tend à se généraliser à l'ensemble des terpènes polyoxygénés. En effet, elle permet de s'affranchir des ponts oxygènes qui se forment lors des réactions de cyclisations et d'obtenir les liaisons carbone-carbone nécessaires à la formation de ce type d'échafaudage polycyclique.

A l'instar des esters de phorbol, les ingénanes sont connus pour leur pouvoir activateur des PKC par mimétisme du DAG, [206] conférant à ces composés des propriétés pharmacologiques prometteuses telles qu'anti-cancéreuses [207] et anti-VIH [208]. En 1968, le premier ingénane (**36**) caractérisé par Hecker a montré un fort pouvoir cancérigène. [209] Au sein de cette classe diterpénique, il convient aussi de signaler le dérivé **38**, l'ingénol mébutate commercialisé sous le nom de Picato[®] par LEO Pharma. Le Picato[®] a été approuvé par la FDA⁴³ au début de l'année 2012 pour le traitement topique⁴⁴ de la kératose actinique, une affection cutanée précancéreuse. [210–212] Isolé d'*E. peplus*, cet ingénane a été découvert dans diverses plantes médicinales utilisées par les populations indigènes en Australie. [213,214] Outre les indications approuvées par la FDA, cet ingénol (**38**) a été soumis à des tests cliniques pour le traitement topique du carcinome. [215] La synthèse de dérivés à squelette ingénane spécifiquement modifiés a fait l'objet d'un grand intérêt scientifique, non seulement pour déterminer les exigences structurelles nécessaires à l'activation de PKC, mais aussi pour développer de nouveaux agents thérapeutiques dans le traitement de maladies inflammatoires et prolifératives. [216–222]

Le groupe de Winkler s'est attaché à reproduire toutes les synthèses d'analogues fonctionnalisés de l'ingénol répertoriées avant 1999, [189,193,194,200,223–227] afin de réaliser l'évaluation biologique de ces composés synthétiques. Les analogues de synthèse ont montré une meilleure activation des PKC que le composé **39**, dont l'activité avait été décrite précédemment. [228] Les dérivés d'ingénol **40** et **41**, les plus actifs de la série, présentent de longues chaînes carbonées en C-3 qui jouent un rôle significatif dans la modulation du récepteur

⁴² Nom générique de la molécule de paclitaxel : produit naturel isolé pour la première fois de l'If du pacifique en 1971 et utilisé en tant qu'anticancéreux de type néoplasique depuis 1993.

⁴³ **FDA** : *Food and Drug Administration*, est l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux.

⁴⁴ **Topique** : application à la surface du corps pour une action locale.

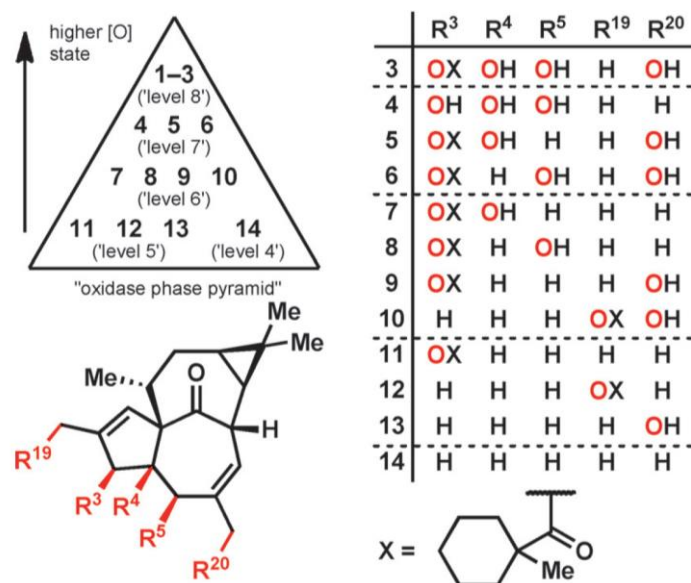
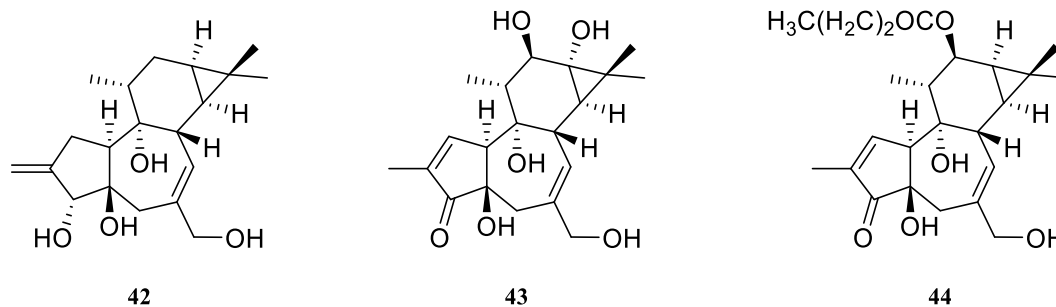


Figure 31. Dérivés d'ingénols avec différents degrés d'oxydation.[231]

Les tiglianes et les daphnanes

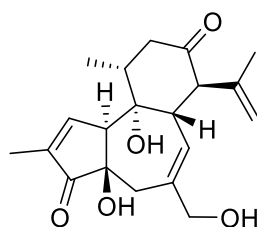
Jusqu'en 2015, seulement quatre synthèses totales [232–236] de phorbols ont été rapportées en 40–52 étapes. Wender et ses collaborateurs ont publié la première synthèse totale d'un phorbol (**42**) en 1987.[232] En 1990, ce même groupe a proposé une seconde synthèse totale du phorbol (**43**) en utilisant un intermédiaire polycyclique synthétisé préalablement.[233] Dans la continuité de leurs travaux, une synthèse asymétrique du système 5/7/6 du squelette phorbol a été achevée.[234] Les travaux suivants de Shibasaki *et al.*[235] et de Cha *et al.*[236], bénéficiant de ces avancées, ont rapporté les synthèses d'un phorbol optiquement actif (**44**) et du (+)-phorbol (**43**), respectivement.



Par la suite, d'autres travaux ont également été entrepris en vue de la construction du squelette tigliane.[237–239] Récemment, la synthèse chimique des ingénanes [203,231,240] a

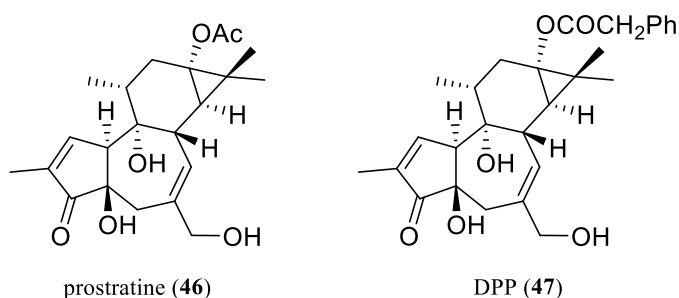
Synthèse bibliographique

bénéficié d'une stratégie inspirée de la logique de biosynthèse des terpènes en deux phases dans laquelle des constructions de liaisons C-C et des oxydations des liaisons C-H vont de pair. En 2016, l'équipe de Baran a mis en œuvre cette approche pour obtenir une synthèse totale énantiosélective du (+)-phorbol (**43**) en seulement 19 étapes à partir du monoterpène (+)-3-carène.[241] Dans la même année, Inoue et son équipe ont développé une stratégie pour la synthèse totale de la crotophorbolone (**45**),[242] dérivé de phorbol isolé en 1934 et identifié en 1969.[243,244] En 2010, cette molécule a également été isolée à partir des racines d'*Euphorbia fishcheriana*.^[84] La structure tricyclique complexe de ce constituant a été construite en 33 étapes par un couplage efficace de fragments simples et une puissante cyclisation via un intermédiaire radicalaire.



crotophorbolone (**45**)

Wender et ses collaborateurs ont présenté en 2008 des hémisynthèses pratiques et échelonnées de la prostratine (**46**) et du DPP (**47**) à partir du phorbol (**43**) ou de la crotophorbolone (**45**), soit deux composés disponibles à partir de sources renouvelables.[245] Ils ont également montré que cette voie de synthèse est suffisamment souple pour accéder à de nouveaux analogues.



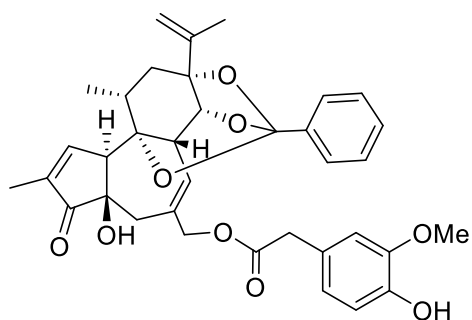
prostratine (**46**)

DPP (**47**)

Les tiglianes et les daphnanes partagent des similarités structurales, ce qui permet aux approches développées pour les tiglianes d'être applicables aux daphnanes et inversement. De nombreux efforts de synthèse du squelette daphnane ont été entrepris.[246–249] Cependant, la résinifératoxine (**48**) est le seul daphnane pour lequel une synthèse totale asymétrique a été rapportée, proposée par l'équipe de Wender en 1997.[250] Ce composé a été isolé et identifié à

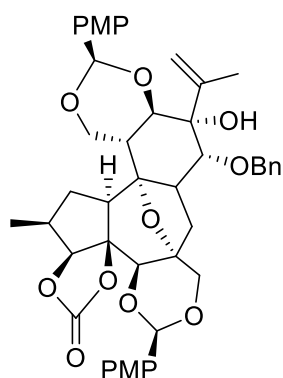
Synthèse bibliographique

partir du latex d'*Euphorbia resinifera*, suite à l'observation d'une forte activité irritante de ce dernier.[251,252]

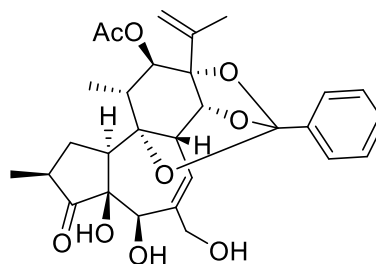


résinifératoxine (48)

Les tiglianes et les daphnanes présentent des activités biologiques prometteuses généralement associées à l'activation d'isoformes de la protéine kinase C.[60,81,239,253] Le groupe de Wender a adapté les hémisynthèses rapportée précédemment pour la prostratine (44), afin de synthétiser des analogues de ce composé et d'évaluer leur pouvoir anti-VIH et leur capacité de liaison aux PKC. Les résultats ont montré que ces dérivés synthétiques de phorbol surpassaient la prostratine, certains étant 100 fois plus puissants que le candidat clinique actuel.[254] En 2011, cette même équipe a rapporté : (i) le développement d'une voie de synthèse d'un précurseur commun (49), (ii) celle d'analogues de la yuanhuapine, et (ii) l'étude de l'activation des PKC par ces dérivés.[255] La dés-époxy-yuanhuapine (50) s'est présenté comme un puissant activateur de PKC.



précurseur général (49)

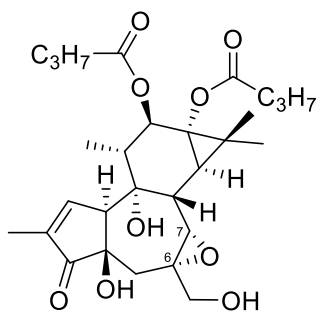


dés-époxy-yuanhuapine (50)

De nombreux produits naturels (environ une centaine) de type daphnane et tigliane possèdent un époxyde en C-6–C-7 dont l'influence sur l'activité biologique est peu étudiée. Quelques études se sont attachées à réaliser l'époxydation des tiglianes et daphnanes.[256,257] Cependant, la seule époxydation asymétrique a été réalisée par l'équipe de Wender en

Synthèse bibliographique

2015.[258] Cette étude a produit le premier α -époxyde (**51**) dans la série des phorbols ainsi que d'autres dérivés époxydés de phorbols et d'ingénols.



51

C. LES RÉSEAUX MOLÉCULAIRES : UN OUTIL EFFICACE POUR L'ORGANISATION DES DONNÉES LC-MS/MS POUR L'ÉTUDE DE PLANTES

La métabolomique vise à analyser le phénotype métabolique (molécules d'une masse moléculaire inférieure à 1500 Da) d'un système biologique, c'est-à-dire à étudier les molécules qui le composent mais également leurs rôles fonctionnels. Dans le règne végétal, le métabolome est complexe puisque l'estimation du nombre de molécules différentes est comprise entre 50 000 et 200000.[259] Les extraits végétaux se présentent généralement sous la forme d'un mélange complexe contenant une diversité de constituants, issus aussi bien du métabolisme primaire⁴⁵ que secondaire⁴⁶ et présents à des concentrations variables. Ces produits naturels continuent de jouer un rôle important dans la découverte de nouveaux principes actifs.[9,260] Le couplage de la chromatographie liquide haute pression (CLHP) avec la spectrométrie de masse tandem (MS/MS⁴⁷), est l'une des techniques les plus performantes dans la détection, l'identification et la quantification des métabolites contenus dans ces mélanges.[261–263] Cette méthode d'analyse possède de nombreux avantages, notamment en terme de sensibilité et de sélectivité (approche ciblée) ; toutefois, de multiples inconvénients subsistent tels que la quantité importante de données générées au cours d'une approche non-ciblée, dite de *profiling*, rendant leurs interprétations difficiles et fastidieuses, voire incomplètes. L'utilisation des réseaux moléculaires permet de traiter et d'organiser ces données, présentant alors un réel atout pour la caractérisation moléculaire d'extraits végétaux. Dans cette partie consacrée aux réseaux moléculaires utilisés pour l'étude d'extraits de plantes, dans un premier temps, nous introduirons brièvement le fonctionnement de la spectrométrie de masse tandem couplée à la CLHP (LC-MS/MS) en s'attachant particulièrement aux approches utilisées pour obtenir les réseaux moléculaires. Ensuite, nous traiterons du fonctionnement de ces derniers, pour finir sur quelques exemples de l'utilisation de cet outil dans l'étude d'extraits végétaux.

⁴⁵ Les **métabolites primaires** sont directement impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction d'un organisme ou d'une cellule.

⁴⁶ Les **métabolites secondaires** chez les végétaux ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures.

⁴⁷ **MS** : *Mass Spectrometry*.

1. Présentation de la LC-MS/MS

L'un des premiers outils indispensables à l'analyse de mélanges est la chromatographie liquide (LC⁴⁸) haute pression ou performance (CLHP ou HPLC⁴⁹). [262] Cette technique permet la séparation des composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de leurs affinités avec les phases stationnaire et mobile. [263,264] Le choix de ces phases, associées aux principaux types de conditions de partage (normal, inverse et par interaction hydrophile), permet une adaptation des conditions analytiques en fonction des constituants de la mixture. Ces derniers, après une séparation dans la colonne chromatographique, sont détectés par un détecteur approprié, spectrophotométrique et/ou spectrométrique, qui enregistre le signal sous forme d'un chromatogramme (Figure 32). [264] Les stratégies actuelles, visant à caractériser un mélange complexe tel qu'un extrait de plante, nécessitent l'emploi en parallèle ou couplé d'outils analytiques combinant une CLHP et un détecteur approprié ; le plus souvent UV⁵⁰, MS ou RMN. La séparation des métabolites par la colonne permet une collecte des composés séparés en fonction des critères de sélection propres au détecteur (Figure 32).

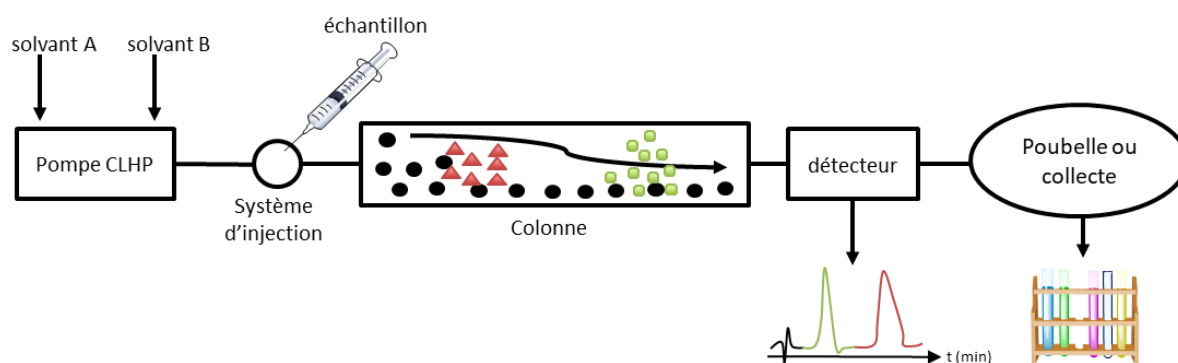


Figure 32. Schéma général du fonctionnement d'un système CLHP préparatif.

Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS) a été développé dans les années 1970, [265] permettant au flux sortant de la LC d'être directement relié *on-line* à la MS. [266,267] La LC-MS/MS est composée d'une partie LC (CLHP ou CLUHP⁵¹), d'un spectromètre de masse qui comprend une source d'ionisation (à pression

⁴⁸ LC : *Liquide Chromatography*.

⁴⁹ HPLC : *High Pressure Liquid Chromatography*.

⁵⁰ UV : *UltraViolet*.

⁵¹ CLUHP : *Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance, UHPLC*.

Synthèse bibliographique

atmosphérique ou sous vide, ionisation ou désorption), plusieurs analyseurs (séparant et/ou fragmentant les ions produits) et un détecteur pour le comptage des ions (Figure 33). Cette technique est couramment utilisée dans les domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques pour la séparation, l'identification et/ou la quantification de composés non volatiles, thermolabiles⁵² et/ou de hauts poids moléculaires.[263] Elle présente de nombreux avantages comme la rapidité de l'analyse ainsi qu'une sensibilité et une résolution élevées.[268–270]

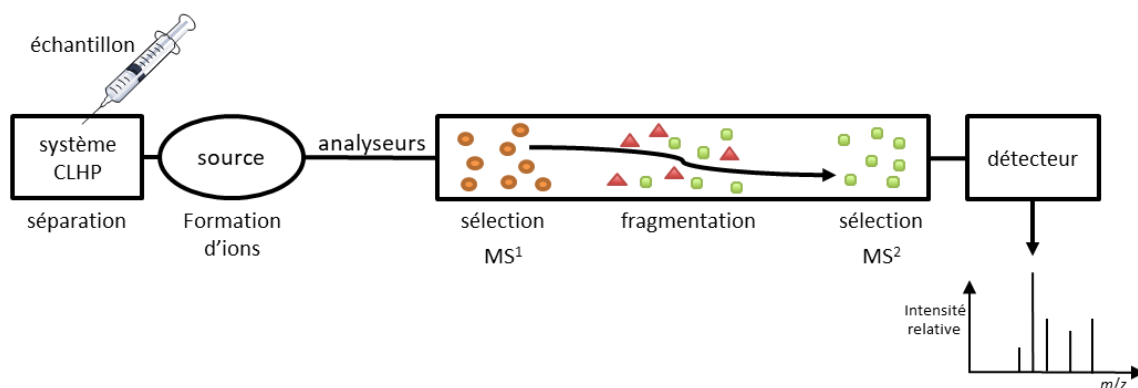


Figure 33. Schéma général du fonctionnement de la LC-MS/MS.

Bien qu'une diversité de sources ait été développée en LC-MS/MS, l'ionisation par électrospray (ESI⁵³)[271] reste toutefois la plus utilisée pour l'étude de métabolites secondaires et en protéomique⁵⁴. [272,273] Cette technique dite « douce » permet de visualiser les ions moléculaires des constituants étudiés ; selon le mode d'acquisition (positif ou négatif) et la phase mobile utilisée, des ions protonés $[M+H]^+$ ou déprotonés $[M-H]^-$ sont générés, mais également des adduits cationiques, $[M+Na]^+$, $[M+H_3O]^+$ ou $[M+NH_4]^+$. [274] L'analyseur permet de discriminer les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z) ou de les fragmenter par des collisions (CID⁵⁵) avec un gaz neutre, généralement du diazote. Lors d'expériences de MS/MS, le premier analyseur et troisième analyseurs ont pour fonction la transmission et la filtration des ions, tandis que le second est utilisé en tant que cellule de collision. [275] Il existe différents types d'analyseurs qui possèdent leurs spécificités propres, allant du spectromètre de

⁵² Une substance **thermolabile** est détruite ou perd ses propriétés à une température peu élevée.

⁵³ **ESI** : *Electrospray Ionisation*.

⁵⁴ La **protéomique** est la science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organe, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un moment donné et sous des conditions données.

⁵⁵ **CID** : *Collision Induced Dissociation*.

Synthèse bibliographique

masse basse résolution de type quadripôle (Q), piège à ions 3D (IT⁵⁶) ou linéaire (LIT⁵⁷) et les spectromètres de masse haute résolution tels que le temps de vol (TOF⁵⁸), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR⁵⁹) et l'Orbitrap. Ces derniers possèdent une exactitude de mesure (ion monoisotopique $\pm 1-5$ ppm) permettant d'accéder à des formules brutes précises. Les spectres MS¹ correspondent à la détection des ions générés en source, tandis que les spectres MS² sont constitués d'ions produits à l'issue de la fragmentation de l'ion précurseur sélectionné. Ces derniers sont riches en informations structurales puisqu'il est possible d'observer les pertes neutres caractéristiques de motifs structuraux.

Des analyses ESI-MS/MS ont été réalisées pour étudier les voies de fragmentation des esters de diterpène, notamment les constituants à squelette tigliane,[276–278] ingénane,[279,280] lathyrane[281] et jatrophane.[282] L'ionisation en mode positif de ces composés conduit généralement à la formation d'adduits cationiques de type $[M+Na]^+$. De plus, leurs spectres MS² sont généralement caractérisés par des pertes neutres correspondantes aux fonctions esters ; comme par exemple HOAc (- 60 Da), HOiBu (-88 Da) et/ou HOBz (- 122 Da). Dans certains cas, l'observation d'ions spécifiques a permis de discriminer des régioisomères [280] ou d'établir la voie de fragmentation caractéristique du squelette diterpénique.[282] Toutefois, bien que les spectres MS² des diterpènes soient très informatifs, certaines limites demeurent lors de l'identification de nouvelles molécules. En effet, la position des substituants ne peut être déterminée avec certitude par la simple utilisation de cette approche. En outre, les esters de diterpène ayant des squelettes différents tels que certains déoxyphorbols, ingénols ou encore jatrophanes peuvent présenter des voies de fragmentation analogues.[276, 282]

Deux types d'approches par LC-MS/MS sont généralement distingués en métabolomique. Lors d'une approche ciblée, les données obtenues pour l'échantillon sont comparées à celles de bibliothèques de composés standards (temps de rétention, spectres de masses, transitions ion parent/ion fils). Ce processus vise à recenser au sein de mélanges complexes une ou plusieurs (jusqu'à une centaine) molécules déjà connues et référencées. Lors de ce processus nommé

⁵⁶ **IT** : *Ion Trap*.

⁵⁷ **LIT** : *Linear Ion Trap*.

⁵⁸ **TOF** : *Time Of Flight*.

⁵⁹ **FTICR** : *Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance*.

Synthèse bibliographique

déréplication⁶⁰, les données obtenues pour chacun des métabolites identifiés par l'approche ciblée permettent d'établir des schémas de fragmentations spécifiques à chaque classe chimique et ainsi de détecter des analogues structuraux via l'approche non ciblée.[283] La principale limite d'une approche ciblée réside dans la faible disponibilité et le prix des molécules de références. Une approche métabolomique non ciblée se base sur l'obtention de plus amples informations sur la composition d'une matrice complexe par la détection de composés (plusieurs centaines voire milliers) appartenant à diverses familles chimiques, appelé profilage métabolomique. Le traitement statistique à l'aide d'outils chimiométriques et bioinformatiques permet d'obtenir l'empreinte métabolomique des échantillons (véritable « carte d'identité » d'un mélange), sans identification préalable des constituants.[284] La majorité des approches mises en œuvre actuellement sont ciblées, mais les approches non ciblées sont de plus en plus utilisées en raison de développements informatiques tels que les analyses statistiques multivariées ou les réseaux moléculaires. Ces derniers permettent d'obtenir une visualisation graphique sur la complexité des mélanges en se basant sur les profils chromatographiques et les données spectrométriques générées par LC-MS/MS non-ciblée. Ces deux approches restent toutefois complémentaires avec d'une part, la sensibilité et la sélectivité de l'approche ciblée et d'autre part, la rapidité et l'exhaustivité de l'approche non ciblée.

⁶⁰ La **déréplication** correspond à l'identification dans un mélange complexe des composés déjà identifiés dans la littérature grâce leurs caractéristiques physico-chimiques.

2. Les réseaux moléculaires : un outil efficace pour la caractérisation d'extraits de plantes

• Le principe des réseaux moléculaires

La LC-MS/MS est une technique analytique de choix pour la caractérisation des produits naturels, notamment lors de l'étude de la composition chimique d'extraits de plantes.[285] Cependant, l'obtention de plusieurs centaines voire plusieurs milliers de spectres MS² rendent l'interprétation de ces données fastidieuse et généralement incomplète. Au cours des années 2000, l'utilisation généralisée de la LC-MS/MS a permis le développement de banques de spectres MS/MS accessibles en ligne, comme c'est le cas de GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), MassBank [286], Metlin [287], mzCloud [288] et ReSpec,[289] permettant une déréplication plus rapide et aisée des composés du mélange.[290–293]

La plateforme publique GNPS [11] – disponible depuis 2015 (<http://gnps.ucsd.edu>) – a pour vocation de permettre et de faciliter le partage des données MS/MS, et l'accès à un super ordinateur dans la communauté scientifique.[11] Les bibliothèques de spectres MS/MS de GNPS (incluant MassBank et ReSpec), ou de spectres déposés au préalable,[294–296] conduisent à l'annotation automatique des molécules présentes dans les mélanges, améliorant la précision des analyses et en diminuant considérablement le temps consacré au traitement des données. En effet, l'outil bio-informatique innovant, développé par les groupes de Pieter C. Dorrestein et de Nuno Bandeira (Université de Californie à San Diego), permet l'organisation des données MS² sous forme cartographique.[11] Appelé « réseaux moléculaires » (*molecular networking* : MN), cet outil en perpétuelle évolution a pour objets l'organisation des analyses MS/MS selon la similarité spectrale sous forme graphique afin de visualiser les ions propres à chaque molécule qui sont détectés et fragmentés, permettant de repérer les familles chimiques en regroupant les composés en fonction des analogies entre les spectres MS/MS, et de déréplicer de manière rapide et relativement efficace grâce aux bibliothèques spectrales.[297–301]

L'utilisation des réseaux moléculaires nécessite trois étapes clés détaillées ci-dessous.[297,302–304] La première étape (A) consiste à réaliser les analyses des échantillons par LC-MS/MS à partir de spectromètre de masse basse ou haute résolution. Toutefois, certains

paramètres expérimentaux (tolérance de masse de l'ion précurseur et de l'ion fragment, seuil de détection, etc.) doivent être adaptés en fonction du type d'appareillage utilisé. La seconde étape (B) nécessite l'enregistrement des données MS/MS obtenues dans la première étape (A) sur le serveur de la plateforme bio-informatique GNPS afin de générer le MN grâce à un algorithme⁶¹ qui transforme chaque spectre MS/MS en vecteur, puis les compare un à un (Figure 34). Cet algorithme renseigne ainsi sur le degré de similarité spectrale entre tous les spectres MS/MS.[297,298] Les données MS/MS brutes sont préalablement simplifiées afin de diminuer le temps de calcul, grâce à la fusion des spectres de même rapport m/z et ayant des spectres MS/MS similaires, sous forme d'un spectre « consensus ».[300,305] La vectorisation est ensuite appliquée à chaque spectre MS/MS consensus, puis les vecteurs de ces derniers sont comparés entre-eux à l'aide du score cosinus⁶² (*cosine score*, CS), donnant accès au degré de similarité spectrale. L'une des limites de cette approche est le rassemblement dans un même spectre MS/MS consensus de spectres issus d'isomères, devenant alors un seul nœud dans le MN alors qu'il s'agit de différents constituants.

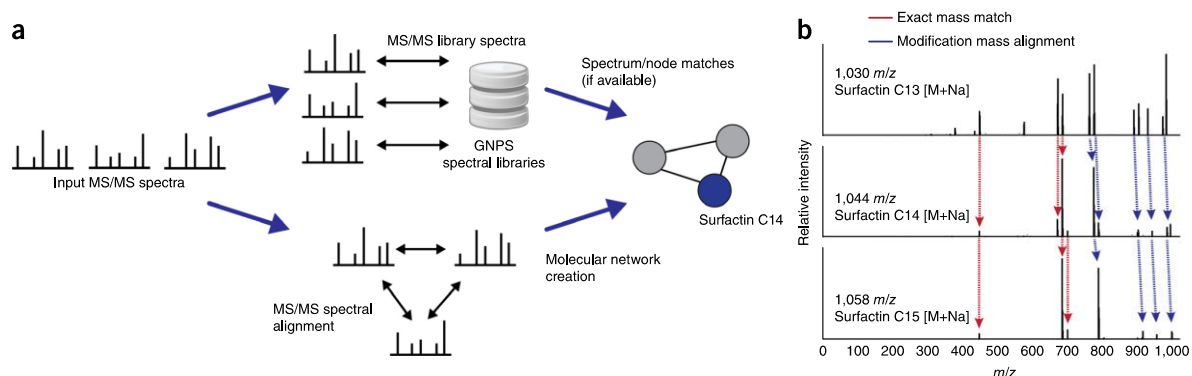


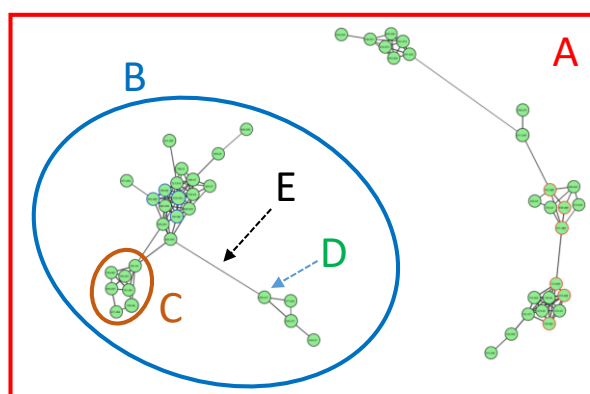
Figure 34. Schéma de la création d'un réseau moléculaire. **a** : représente l'alignement spectral et la recherche dans les banques de données puis la visualisation ; **b** : représente un exemple d'alignement spectral détaillé.[11]

Enfin, dans la dernière étape (C), les résultats sont visualisés sous forme graphique, où les nœuds et les connexions représentent une véritable cartographie de spectres MS/MS (Figure 35). Ces réseaux moléculaires (MN), bien qu'ils soient visualisables en ligne sur GNPS, sont préférentiellement interprétés hors ligne avec le logiciel Cytoscape® (A, Figure 35).[306] Dans

⁶¹ **Algorithme** : séquence d'opérations intégrées par des calculs informatiques.

⁶² **Score cosinus** : angles entre une paire de spectres MS/MS vectorisés.

le MN, les divers sous-ensembles (**B** et **C**, **Figure 35**), représentent des composés structurellement proches pouvant correspondre à des familles chimiques.[302] Un nœud (**D**, **Figure 35**) représente un spectre MS/MS consensus, annoté généralement par la masse de l'ion précurseur, dont le contour ou la taille peuvent varier en fonction du paramètre désiré (score cosinus, intensité de l'ion précurseur, etc.). Les nœuds sont reliés entre eux par des liens (**E**, **Figure 35**) représentatifs de l'indice de similarité spectrale. L'épaisseur du trait entre les nœuds augmente en fonction de la valeur de cet indice de corrélation qui varie de 0 à 1 (avec 1 correspondant à des spectres MS/MS identiques). L'interprétation du MN visualisé via Cytoscape® est facilitée par la visualisation directe de groupes spectraux grâce à l'utilisation de calques qui permettent de cartographier les informations, comme différencier des échantillons entre eux ou mettre en évidence une activité biologique. Des diagrammes circulaires (*piechart*) au sein des nœuds ou bien des formes diverses de ces derniers (rond, carré, losange, etc...) peuvent être utilisés pour distinguer les informations.



- 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

Figure 35. Schéma d'un réseau moléculaire.[307]

• Applications des réseaux moléculaires à la caractérisation d'extraits de plantes

L'intérêt scientifique suscité par les réseaux moléculaires générés via la plateforme GNPS (gratuite et libre d'accès) est symbolisé par un nombre d'utilisateurs qui ne cesse d'augmenter à l'échelle mondiale. En effet, 9 267 utilisateurs de GNPS ont été recensés entre 2014 et 2015 dans une centaine de pays, ce qui représente 42 486 analyses sur une année, soit un peu plus de 93 millions de spectres traités par les réseaux moléculaires (Figure 36).[301] Fin 2017, la plateforme GNPS a attiré plus de 35,000 issues d'une centaine de pays. Ces quelques chiffres illustrent parfaitement l'ampleur du phénomène, laissant envisager un développement continu au cours des prochaines années.

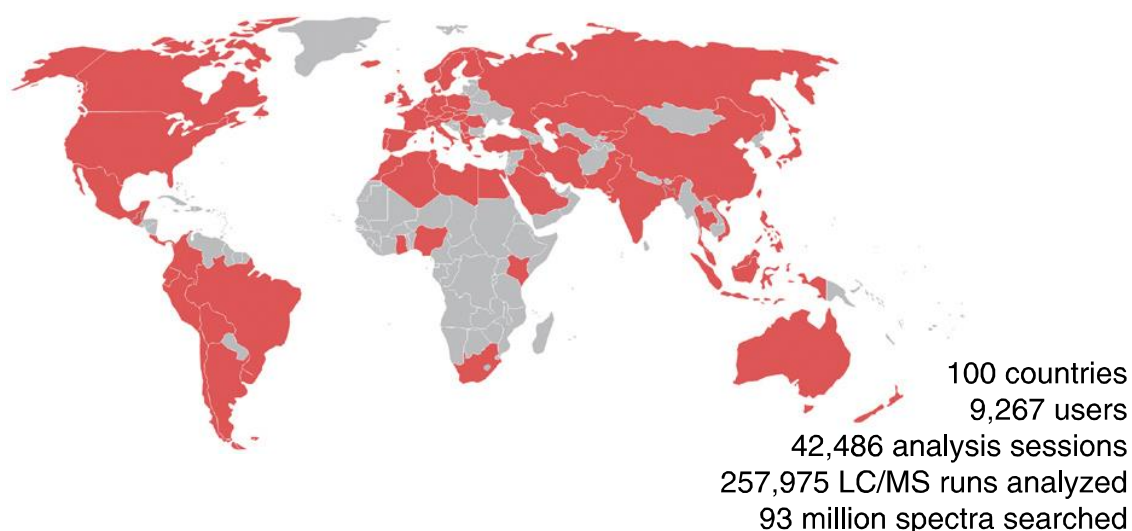


Figure 36. Chiffres sur l'année 2014-2015 de l'utilisation de GNPS dans le monde.[301]

Les réseaux moléculaires ont été utilisés pour répondre à plusieurs problématiques scientifiques.[301] Concernant les produits naturels, ils ont été à ce jour principalement appliqués à l'étude métabolomique et génomique⁶³ des micro-organismes (terrestres ou marins)[308–310] et d'espèces marines. [311–313] Cependant, jusqu'en 2016, seulement deux études intègrent le recours aux réseaux moléculaires pour traiter de la composition chimique

⁶³ La **génomique** est la science qui étudie le fonctionnement d'un organisme, d'un organe, d'un cancer, etc. à l'échelle du génome.

et/ou de l'activité biologique d'extraits de plantes supérieures avec de la dérégulation d'analogues.

Une première étude consacrée à une espèce du genre *Euphorbia* à l'aide de réseaux moléculaires a été réalisée en 2015 au cours du doctorat de L-F Nothias.[314] Dans ces travaux, la recherche d'esters diterpéniques actifs contre la réplication du CHIKV a été menée en utilisant la chromatographie en phase fluide supercritique, une méthode séparative permettant des conditions expérimentales s'inscrivant dans le mouvement de la « chimie verte⁶⁴ ». Une première série d'investigations par fractionnement bio-guidé de l'extrait d'*Euphorbia semiperfoliata* a permis l'isolement de 12 esters de jatrophone. L'évaluation de l'activité anti-CHIKV de ces derniers a indiqué la présence d'un seul composé actif pour cet ensemble d'analogues structuraux.[315] Les réseaux moléculaires générés à partir de données issues de l'analyse par SFC⁶⁵-MS/MS des fractions [314] ont permis de visualiser un réseau principal regroupant les esters de jatrophone (Figure 37). Ces derniers se divisent en trois sous-groupes (JE⁶⁶-A, JE-B et JE-C) en accord avec les voies de fragmentations correspondantes aux différents dérivés (327, 309, 299 ; 313, 295, 285 ; 311, 293, 283 ; respectivement). Par ailleurs, l'analyse LC-MS/MS ciblée des diterpènes de types phorboïdes – connus pour leur pouvoir anti-CHIKV nettement supérieur à celui des esters de jatrophone – a permis de détecter leurs présences dans les fractions anti-CHIKV les plus actives.[282] Trois esters de 4-déoxyphorbol (4-dPE⁶⁷), préalablement visualisés au sein du MN dans un réseau indépendant des esters de jatrophone (Figure 37), ont ensuite été isolés par SFC-semipréparative. Ils ont montré une puissante inhibition de la réplication virale du CHIKV. Dans ce travail, les réseaux moléculaires ont permis d'annoter les esters de jatrophone isolés lors d'une investigation préliminaire de la plante et ainsi de détecter la présence de leurs analogues structuraux. De plus, l'étude préalable des voies de fragmentations des phorboïdes a permis de détecter la présence de nouveaux diterpènes potentiellement responsables de l'activité antivirale des fractions.

⁶⁴ La **chimie verte** implique des produits ou des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation ou la synthèse de substances dangereuses.

⁶⁵ **SFC** : **S**upercritical **F**luid **C**hromatography.

⁶⁶ **JE** : *Jatrophone Esters*.

⁶⁷ **4-dPE** : *4-DeoxyPhorbol Esters*.

Synthèse bibliographique

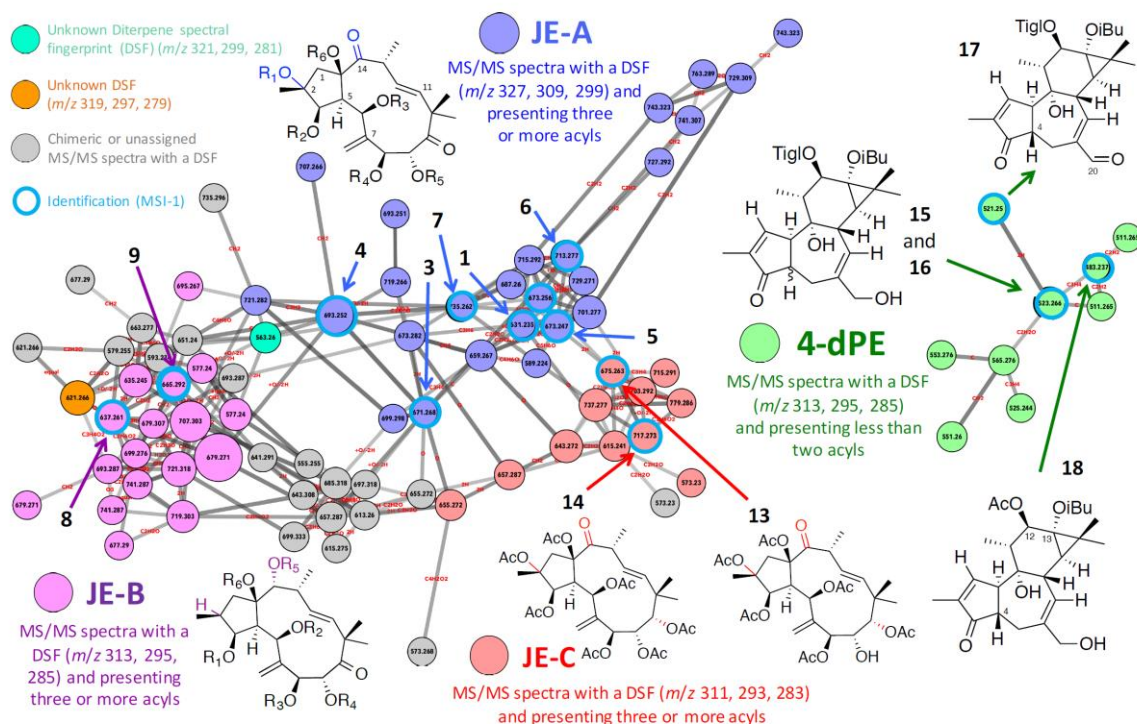


Figure 37. Les réseaux moléculaires de l'extrait d'*Euphorbia semiperfoliata* annotés par les esters de jatrophane (JE-A, JE-B et JE-C) et de 4-déoxyphorbol (4-dPE).[314]

Fort de ces premiers résultats, une collaboration entre le Dr Litaudon et l'équipe du Dr Wolfender s'est nouée en vue de combiner les réseaux moléculaires et une comparaison des spectres MS/MS expérimentaux avec des données théoriques (fragmentation MS/MS simulée). Cette approche propose d'étendre l'annotation des nœuds aux composés présents dans des banques de composés, grâce aux spectres expérimentaux. Cette méthode est illustrée par deux exemples, incluant des extraits à l'acétate d'éthyle (AcOEt) issu d'un mélange de plantes de la famille des *Macaranga* (Figure 38), ainsi qu'un extrait d'espèces de *Penicillium*. [316]

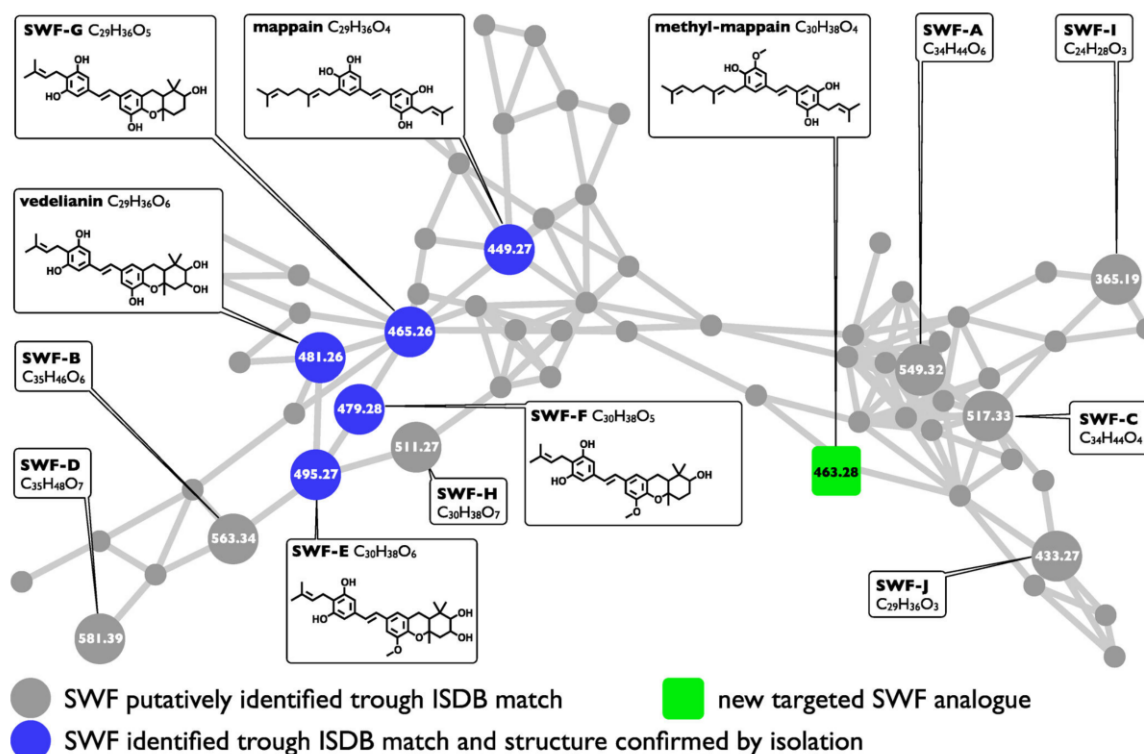


Figure 38. Constellation des composés de la famille des schweinfurthins (SWF), issue des réseaux moléculaires générés à partir d'analyses des extraits de plusieurs espèces de *Macaranga*. [316]

L'application des réseaux moléculaires à la caractérisation des extraits végétaux permet d'obtenir des informations sur la composition chimique du mélange par l'obtention d'une représentation graphique. Cependant, un certain nombre des limites actuelles de cette approche doivent être évoquées, en particulier: (i) le rassemblement usuel des isomères dans un même spectre MS/MS consensus (un seul nœud est observé dans le MN alors qu'il peut s'agir de plusieurs constituants) ; (ii) l'annotation des analogues structuraux ou encore des groupes pour lesquels aucune référence de spectre, voir de structure chimique, ne sont connues ; (iii) l'incapacité à établir l'abondance relative des molécules détectées. En 2014, l'équipe de Dorrestein a introduit la notion de quantification aux réseaux moléculaires via l'étude du métabolome d'une cyanobactérie marine. [317] L'évolution actuelle et les futurs développements de l'outil « réseaux moléculaires » visent à répondre d'une part à ces problématiques, mais aussi à permettre une annotation fiable et automatisée en ligne, qui faciliteront l'interprétation des données.

RÉFÉRENCES

- [1] D. J. Newman, G. M. Cragg, CHAPTER 1 Bioactive Macrocycles from Nature, (2014) 1–36.
- [2] G.M. Cragg, D.J. Newman, Natural products: a continuing source of novel drug leads, *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* 1830 (2013) 3670–3695.
- [3] D.J. Newman, L.-A. Giddings, Natural products as leads to antitumor drugs, *Phytochem. Rev.* 13 (2014) 123–137.
- [4] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 311–335.
- [5] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461–477.
- [6] D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002, *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 1022–1037.
- [7] G.M. Cragg, D.J. Newman, K.M. Snader, Natural Products in Drug Discovery and Development, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 52–60.
- [8] W. Sneader, *Drug prototypes and their exploitation*, J. Wiley and sons, 1996.
- [9] A. Harvey, Natural products in drug discovery, *Drug Discov. Today.* 13 (2008) 894–901.
- [10] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 629–661.
- [11] M. Wang, J.J. Carver, V.V. Phelan, L.M. Sanchez, N. Garg, Y. Peng, D.D. Nguyen, J. Watrous, C.A. Kapon, T. Luzzatto-Knaan, C. Porto, A. Bouslimani, A.V. Melnik, M.J. Meehan, W.-T. Liu, M. Crüsemann, P.D. Boudreau, E. Esquenazi, M. Sandoval-Calderón, R.D. Kersten, L.A. Pace, R.A. Quinn, K.R. Duncan, C.-C. Hsu, D.J. Floros, R.G. Gavilan, K. Kleigrew, T. Northen, R.J. Dutton, D. Parrot, E.E. Carlson, B. Aigle, C.F. Michelsen, L. Jelsbak, C. Sohlenkamp, P. Pevzner, A. Edlund, J. McLean, J. Piel, B.T. Murphy, L. Gerwick, C.-C. Liaw, Y.-L. Yang, H.-U. Humpf, M. Maansson, R.A. Keyzers, A.C. Sims, A.R. Johnson, A.M. Sidebottom, B.E. Sedio, A. Klitgaard, C.B. Larson, C.A. Boya P, D. Torres-Mendoza, D.J. Gonzalez, D.B. Silva, L.M. Marques, D.P. Demarque, E. Pociute, E.C. O’Neill, E. Briand, E.J.N. Helfrich, E.A. Granatosky, E. Glukhov, F. Ryffel, H. Houson, H. Mohimani, J.J. Kharbush, Y. Zeng, J.A. Vorholt, K.L. Kurita, P. Charusanti, K.L. McPhail, K.F. Nielsen, L. Vuong, M. Elfeki, M.F. Traxler, N. Engene, N. Koyama, O.B. Vining, R. Baric, R.R. Silva, S.J. Mascuch, S. Tomasi, S. Jenkins, V. Macherla, T. Hoffman, V. Agarwal, P.G. Williams, J. Dai, R. Neupane, J. Gurr, A.M.C. Rodríguez, A. Lamsa, C. Zhang, K. Dorrestein, B.M. Duggan, J. Almaliti, P.-M. Allard, P. Phapale, L.-F. Nothias, T. Alexandrov, M. Litaudon, J.-L. Wolfender, J.E. Kyle, T.O. Metz, T. Peryea, D.-T. Nguyen, D. VanLeer, P. Shinn, A. Jadhav, R. Müller, K.M. Waters, W. Shi, X. Liu, L. Zhang, R. Knight, P.R. Jensen, B.Ø. Palsson, K. Pogliano, R.G. Linington, M. Gutiérrez, N.P. Lopes, W.H. Gerwick, B.S. Moore, P.C. Dorrestein, N. Bandeira, Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking, *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 828–837.
- [12] G.L. Webster, Classification of the Euphorbiaceae, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81 (1994) 33–144.
- [13] R. Govaerts, D.G. Frodin, A. Radcliffe-Smith, S. Carter, *World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)*, Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.
- [14] H.A. Thakur, D.A. Patil, Taxonomic and Phylogenetic Assessment of the Euphorbiaceae: A Review, *J. Exp. Sci.* 2 (2011). <http://jexpscienc.com/article/view/6187>.

- [15] J.T. Mwine, P. Van Damme, Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal, *J. Med. Plants Res.* 5 (2011) 652–662.
- [16] M. Wink, Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores, *Theor. Appl. Genet.* 75 (1988) 225–233.
- [17] K. Kotaro, Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein, *Phytochemistry.* 72 (2011) 1510–1530.
- [18] G.L. Webster, The saga of the spurges: a review of classification and relationships in the Euphorbiales, *Bot. J. Linn. Soc.* 94 (1987) 3–46.
- [19] J.W. Horn, Z. Xi, R. Riina, J.A. Peirson, Y. Yang, B.L. Dorsey, P.E. Berry, C.C. Davis, K.J. Wurdack, Evolutionary bursts in Euphorbia (Euphorbiaceae) are linked with photosynthetic pathway, *Evolution.* 68 (2014) 3485–3504.
- [20] F. Halle, R.A.A. Oldeman, P.B. Tomlinson, *Tropical Trees and Forests: An Architectural Analysis*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [21] Y. Salmaki, S. Zarre, H.-J. Esser, G. Heubl, Seed and gland morphology in Euphorbia (Euphorbiaceae) with focus on their systematic and phylogenetic importance, a case study in Iranian highlands, *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants.* 206 (2011) 957–973.
- [22] P.V. Bruyns, R.J. Mapaya, T.J. Hedderson, A new subgeneric classification for Euphorbia (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and psbA-trnH sequence data, *Taxon.* 55 (2006) 397–420.
- [23] K.-R. Park, R.K. Jansen, A Phylogeny of Euphorbiae Subtribe Euphorbiinae (Euphorbiaceae) Based on Molecular Data, *J. Plant Biol.* 50 (2007) 644–649.
- [24] N.F.A. Zimmermann, C.M. Ritz, F.H. Hellwig, Further support for the phylogenetic relationships within Euphorbia L. (Euphorbiaceae) from nrITS and trnL–trnF IGS sequence data, *Plant Syst. Evol.* 286 (2010) 39–58.
- [25] V.W. Steinmann, J.M. Porter, Phylogenetic Relationships in Euphorbiae (Euphorbiaceae) Based on ITS and ndhF Sequence Data, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 89 (2002) 453–490.
- [26] J. Molero, T. Garnatje, A. Rovira, N. Garcia-Jacas, A. Susanna, Karyological evolution and molecular phylogeny in Macaronesian dendroid spurges (Euphorbia subsect. Pachycladae), *Plant Syst. Evol.* 231 (2002) 109–132.
- [27] L. Barres, R. Vilatersana, J. Molero, A. Susanna, M. Galbany-Casals, Molecular phylogeny of Euphorbia subg. Esula sect. Aphyllis (Euphorbiaceae) inferred from nrDNA and cpDNA markers with biogeographic insights, *Taxon.* 60 (2011) 705–720.
- [28] S. Carter, A Preliminary Classification of Euphorbia Subgenus Euphorbia, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81 (1994) 368–379.
- [29] T. Haevermans, P. Hoffmann, P.P. Lowry, J.-N. Labat, E. Randrianjohany, Phylogenetic Analysis of the Madagascan Euphorbia Subgenus Lacanthis Based on ITS Sequence Data, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 91 (2004) 247–259.
- [30] G.L. Webster, THE GENERA OF EUPHORBIACEAE IN THE SOUTHEASTERN UNITED STATES, *J. Arnold Arbor.* 48 (1967) 363–430.
- [31] G.L. Webster, Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae, *Taxon.* (1975) 593–601.
- [32] V.W. Steinmann, La inclusión de Pedilanthus en Euphorbia (Euphorbiaceae), *Acta Bot. Mex.* (2003) 45–50.
- [33] V.W. Steinmann, B. Van Ee, P.E. Berry, J. Gutiérrez, The systematic position of Cubanthus and other shrubby endemic species of Euphorbia (Euphorbiaceae) in Cuba, in: *An. Jardín Botánico Madr., Real Jardín Botánico*, 2007: pp. 123–133.

- [34] J.W. Horn, B.W. van Ee, J.J. Morawetz, R. Riina, V.W. Steinmann, P.E. Berry, K.J. Wurdack, Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae), *Mol. Phylogenet. Evol.* 63 (2012) 305–326.
- [35] M. Ernst, O.M. Grace, C.H. Saslis-Lagoudakis, N. Nilsson, H.T. Simonsen, N. Rønsted, Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae), *J. Ethnopharmacol.* 176 (2015) 90–101.
- [36] J. Daléchamps, J.D. Moulins, *Histoire générale des plantes, chez les heritiers Guillaume Rouille*, 1615.
- [37] C. Eichberger, *Euphorbia dendroides* (Euphorbiaceae): a monographic view 00 a Mediterraneo species, (2003).
- [38] D. Jeanmonod, J. Gamsans, *Flora Corsica*, Edisud 921, Aix-en-Provence, 2007.
- [39] Dioscorides Pedanius, *De Materia Medica*, IBIDIS, Johannesburg, South Africa, 2000.
- [40] P. Mattioli, *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.*
- [41] T. von Heldreich, 1822-1902, *Flore de l'île de Cephalonie, ou Catalogue des plantes qui croissent naturellement et se cultivent le plus frequemment dans cette ile*, 1882.
- [42] I. Camarda, F. Valsecchi, *Alberi e arbusti spontanei della Sardegna*, Università di Sassari. Istituto di Botanica, 1983.
- [43] H. Azaizeh, B. Saad, K. Khalil, O. Said, The State of the Art of Traditional Arab Herbal Medicine in the Eastern Region of the Mediterranean: A Review, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 3 (2006) 229–235.
- [44] L. Conti, M. Marchetti, M. Usai, C. Botteghi, Whole-plant oils from two *Euphorbia* species growing in sardinia, *Phytochemistry.* 27 (1988) 791–794.
- [45] N. Fokialakis, E. Melliou, P. Magiatis, C. Harvala, S. Mitaku, Composition of the steam volatiles of six *Euphorbia* spp. from Greece, *Flavour Fragr. J.* 18 (2003) 39–42.
- [46] G. Corea, E. Fattorusso, V. Lanzotti, O. Taglialatela-Scafati, G. Appendino, M. Ballero, P.-N. Simon, C. Dumontet, A. Di Pietro, Modified jatrophone diterpenes as modulators of multidrug resistance from *Euphorbia dendroides* L., *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 5221–5227.
- [47] G. Corea, E. Fattorusso, V. Lanzotti, O. Taglialatela-Scafati, G. Appendino, M. Ballero, P.-N. Simon, C. Dumontet, A. Di Pietro, Jatrophone Diterpenes as P-Glycoprotein Inhibitors. First Insights of Structure–Activity Relationships and Discovery of a New, Powerful Lead, *J Med Chem.* 46 (2003) 3395–3402.
- [48] 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.
- [49] I.S. Aljančić, M. Pešić, S.M. Milosavljević, N.M. Todorović, M. Jadranin, G. Milosavljević, D. Povrenović, J. Banković, N. Tanić, I.D. Marković, S. Ruždijić, V.E. Vajs, V.V. Tešević, Isolation and Biological Evaluation of Jatrophone Diterpenoids from *Euphorbia dendroides*, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 1613–1620.
- [50] M. Pešić, J. Banković, I.S. Aljančić, N.M. Todorović, M. Jadranin, V.E. Vajs, V.V. Tešević, I. Vučković, M. Momčilović, I.D. Marković, N. Tanić, S. Ruždijić, New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 3165–3173.

- [51] M. Jadranin, M. Pešić, I.S. Aljančić, S.M. Milosavljević, N.M. Todorović, A. Podolski-Renić, J. Banković, N. Tanić, I. Marković, V.E. Vajs, V.V. Tešević, Jatrophone diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines, *Phytochemistry*. 86 (2013) 208–217.
- [52] La Liste rouge des espèces menacées en France - Comité français de l'UICN, (2015). <http://www.uicn.fr/liste-rouge-france>.
- [53] F. Valsecchi, Le piante endemiche della Sardegna: 80-83, *Boll. Della Soc. Sarda Sci. Nat.* 19 (1980) 323–342.
- [54] Colloquis X i XI: X, Genètica : XI, Lògica i conflicte en àrees de superposició de metodologies diverses, Institut d'Estudis Catalans, 1978.
- [55] G. Appendino, E. Belloro, G.C. Tron, J. Jakupovic, M. Ballero, Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 1399–1404.
- [56] T.M. Lewinsohn, The geographical distribution of plant latex, *CHEMOECOLOGY*. 2 (1991) 64–68.
- [57] G. Prenner, P.J. Rudall, Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (*Euphorbiaceae*) and its allies: exploring the organ–flower–inflorescence boundary, *Am. J. Bot.* 94 (2007) 1612–1629.
- [58] A. Vasas, D. Rédei, D. Csupor, J. Molnár, J. Hohmann, Diterpenes from European *Euphorbia* Species Serving as Prototypes for Natural-Product-Based Drug Discovery, *Eur. J. Org. Chem.* (2012) 8579–8612.
- [59] Q.-W. Shi, X.-H. Su, H. Kiyota, Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*, *Chem Rev.* 108 (2008) 4295–4327.
- [60] A. Vasas, J. Hohmann, *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012), *Chem. Rev.* 114 (2014) 8579–8612.
- [61] D. Lu, Y. Liu, H.A. Aisa, Jatrophone diterpenoid esters from *Euphorbia sororia* serving as multidrug resistance reversal agents, *Fitoterapia*. 92 (2014) 244–251.
- [62] C. Liu, Z. Liao, S. Liu, Y. Qu, H. Wang, Two new diterpene derivatives from *Euphorbia lunulata* Bge and their anti-proliferative activities, *Fitoterapia*. 96 (2014) 33–38.
- [63] M.K. Rawal, Y. Shokoohinia, G. Chianese, B. Zolfaghari, G. Appendino, O. Tagliatela-Scafati, R. Prasad, A. Di Pietro, Jatrophanes from *Euphorbia squamosa* as Potent Inhibitors of *Candida albicans* Multidrug Transporters, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 2700–2706.
- [64] S. Shadi, H. Saeidi, M. Ghanadian, M.R. Rahimnejad, M. Aghaei, S.M. Ayatollahi, M.I. Choudhary, New macrocyclic diterpenes from *Euphorbia connata* Boiss. with cytotoxic activities on human breast cancer cell lines, *Nat. Prod. Res.* 0 (2014) 1–8.
- [65] H. Chen, H. Wang, B. Yang, D.-Q. Jin, S. Yang, M. Wang, J. Xu, Y. Ohizumi, Y. Guo, Diterpenes inhibiting NO production from *Euphorbia helioscopia*, *Fitoterapia*. 95 (2014) 133–138.
- [66] L.-F. Nothias-Scaglia, P. Retailleau, J. Paolini, C. Pannecouque, J. Neyts, V. Dumontet, F. Roussi, P. Leyssen, J. Costa, M. Litaudon, Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 1505–1512.
- [67] M. Ghanadian, H. Saeidi, M. Aghaei, M.R. Rahiminejad, E. Ahmadi, S.M. Ayatollahi, M.I. Choudhary, B. Bahmani, New jatrophone diterpenes from *Euphorbia osyridea* with proapoptotic effects on ovarian cancer cells, *Phytochem. Lett.* 12 (2015) 302–307.
- [68] V. Lanzotti, E. Barile, G. Scambia, C. Ferlini, Cyparissins A and B, jatrophone diterpenes from *Euphorbia cyparissias* as Pgp inhibitors and cytotoxic agents against ovarian cancer cell lines, *Fitoterapia*. 104 (2015) 75–79.

- [69] J.W. Lee, Q. Jin, H. Jang, D. Lee, S.B. Han, Y. Kim, J.T. Hong, M.K. Lee, B.Y. Hwang, Jatrophone and ingenane-type diterpenoids from *Euphorbia kansui* inhibit the LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 3351–3354.
- [70] B. Zhou, Y. Wu, S. Dalal, M.B. Cassera, J.-M. Yue, Euphorbesulins A–P, Structurally Diverse Diterpenoids from *Euphorbia esula*, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 1952–1961.
- [71] J. Lu, G. Li, J. Huang, C. Zhang, L. Zhang, K. Zhang, P. Li, R. Lin, J. Wang, Lathyrane-type diterpenoids from the seeds of *Euphorbia lathyris*, *Phytochemistry*. 104 (2014) 79–88.
- [72] C. Vieira, N. Duarte, M.A. Reis, G. Spengler, A.M. Madureira, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, Improving the MDR reversal activity of 6, 17-epoxylathyrane diterpenes, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6392–6400.
- [73] Z.-X. Zhang, F.-M. Qi, H.-H. Li, L.-L. Dong, Y. Hai, G.-X. Fan, D.-Q. Fei, A New Lathyrane Diterpenoid from the Whole Plant of *Euphorbia altotibetica*, *Notes*. 35 (2014) 641.
- [74] L. Wang, Y.-T. Ma, Q.-Y. Sun, X.-N. Li, Y. Yan, J. Yang, F.-M. Yang, F.-Y. Liu, Z. Zang, X.-H. Wu, S.-X. Huang, Y. Zhao, Structurally diversified diterpenoids from *Euphorbia dracunculoides*, *Tetrahedron*. 71 (2015) 5484–5493.
- [75] J. Gao, Q.-B. Chen, Y.-Q. Liu, X.-L. Xin, A. Yili, H.A. Aisa, Diterpenoid constituents of *Euphorbia macrorrhiza*, *Phytochemistry*. 122 (2016) 246–253.
- [76] E. Barile, M. Borriello, A.D. Pietro, A. Doreau, C. Fattorusso, E. Fattorusso, V. Lanzotti, Discovery of a new series of jatrophone and lathyrane diterpenes as potent and specific P-glycoprotein modulators, *Org. Biomol. Chem.* 6 (2008) 1756–1762.
- [77] S.-G. Liao, Z.-J. Zhan, S.-P. Yang, J.-M. Yue, Lathyranoic Acid A: First Secolathyrane Diterpenoid in Nature from *Euphorbia lathyris*, *Org. Lett.* 7 (2005) 1379–1382.
- [78] S. Gao, H.-Y. Liu, Y.-H. Wang, H.-P. He, J.-S. Wang, Y.-T. Di, C.-S. Li, X. Fang, X.-J. Hao, Lathyrane A: A Diterpenoid Possessing an Unprecedented Skeleton from *Euphorbia lathyris*, *Org. Lett.* 9 (2007) 3453–3455.
- [79] S.M. Zarei, A.M. Ayatollahi, M. Ghanadian, F. Kobarfard, M. Aghaei, M.I. Choudhary, F. Fallahian, Unusual ingenoids from *Euphorbia erythradenia* Bioss. with pro-apoptotic effects, *Fitoterapia*. 91 (2013) 87–94.
- [80] J.-X. Zhao, C.-P. Liu, W.-Y. Qi, M.-L. Han, Y.-S. Han, M.A. Wainberg, J.-M. Yue, Eurifoloids A–R, Structurally Diverse Diterpenoids from *Euphorbia neriifolia*, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 2224–2233.
- [81] M.J. Durán-Peña, J.M.B. Ares, I.G. Collado, R. Hernández-Galán, Biologically active diterpenes containing a gem-dimethylcyclopropane subunit: an intriguing source of PKC modulators, *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014) 940–952.
- [82] G. Vogg, E. Mattes, J. Rothenburger, N. Hertkorn, S. Achatz, H. Sandermann Jr., Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L., *Phytochemistry*. 51 (1999) 289–295.
- [83] P. Forgo, D. Rédei, Z. Hajdu, P. Szabó, L. Szabó, J. Hohmann, Unusual Tigliane Diterpenes from *Euphorbia grandicornis*, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 639–643.
- [84] H.-B. Wang, W.-J. Chu, Y. Wang, P. Ji, Y.-B. Wang, Q. Yu, G.-W. Qin, Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*, *J. Asian Nat. Prod. Res.* 12 (2010) 1038–1043.
- [85] P. Forgo, D. Rédei, Z. Hajdu, P. Szabó, L. Szabó, J. Hohmann, Unusual Tigliane Diterpenes from *Euphorbia grandicornis*, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 639–643.
- [86] Y.-B. Wang, R. Huang, H.-B. Wang, H.-Z. Jin, L.-G. Lou, G.-W. Qin, Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia fischeriana*, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 967–970.

- [87] Y. Shokoohinia, S.-E. Sajjadi, B. Zolfaghari, G. Chianese, G. Appendino, O. Tagliatalata-Scafati, Diterpenoid (poly)esters and a ring A-seco-phorboid from the aerial parts of *Euphorbia macroclada* Boiss, *Fitoterapia*. 81 (2010) 884–890.
- [88] J. Xu, D. Jin, P. Guo, C. Xie, L. Fang, Y. Guo, Three New Myrsinol Diterpenes from *Euphorbia prolifera* and Their Neuroprotective Activities, *Molecules*. 17 (2012) 9520–9528.
- [89] B. Zolfaghari, Z. Yazdiniapour, M. Ghanadian, V. Lanzotti, Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia sogdiana* Popov, *Tetrahedron*. 72 (2016) 5394–5401.
- [90] B. Zolfaghari, Z. Yazdiniapour, M. Ghanadian, V. Lanzotti, Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia sogdiana* Popov, *Tetrahedron*. 72 (2016) 5394–5401.
- [91] S.M. Ghanadian, A.M. Ayatollahi, S. Afsharypuor, S.H. Javanmard, N. Dana, New mirsinane-type diterpenes from *Euphorbia microsciadia* Boiss. with inhibitory effect on VEGF-induced angiogenesis, *J. Nat. Med.* 67 (2013) 327–332..
- [92] J. Jakupovic, F. Jeske, T. Morgenstern, F. Tschritzis, J.A. Marco, W. Berendsohn, Diterpenes from *Euphorbia segetalis*, *Phytochemistry*. 47 (1998) 1583–1600.
- [93] J.-G. Shi, Z.-J. Jia, Diterpenoids from *Euphorbia micractina*, *Phytochemistry*. 38 (1995) 1445–1447.
- [94] A. Vasas, J. Hohmann, P. Forgo, P. Szabó, New tri- and tetracyclic diterpenes from *Euphorbia villosa*, *Tetrahedron*. 60 (2004) 5025–5030.
- [95] M. Daoubi, N. Marquez, N. Mazoir, A. Benharref, R. Hernández-Galán, E. Muñoz, I.G. Collado, Isolation of new phenylacetylglucoside derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 4577–4584.
- [96] M. Wiese, I.K. Pajeva, Structure-Activity Relationships of Multidrug Resistance Reversers, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 685–713.
- [97] G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 219–234.
- [98] C. Avendano, J. Menendez, Inhibitors of Multidrug Resistance to Antitumor Agents (MDR), *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 159–193..
- [99] E. Teodori, S. Dei, C. Martelli, S. Scapecchi, F. Gualtieri, The Functions and Structure of ABC Transporters: Implications for the Design of New Inhibitors of Pgp and MRP1 to Control Multidrug Resistance (MDR), *Curr. Drug Targets*. 7 (2006) 893–909.
- [100] R. Perez-Tomas, Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1859–1876.
- [101] J. Robert, C. Jarry, Multidrug Resistance Reversal Agents, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 4805–4817.
- [102] K. Takara, T. Sakaeda, K. Okumura, An Update on Overcoming MDR1-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 273–286.
- [103] T.W. Loo, D.M. Clarke, Recent Progress in Understanding the Mechanism of P-Glycoprotein-mediated Drug Efflux, *J. Membr. Biol.* 206 (2005) 173–185.
- [104] C. Avendano, J. Menendez, Inhibitors of Multidrug Resistance to Antitumor Agents (MDR), *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 159–193.
- [105] M. Wiese, I.K. Pajeva, Structure-Activity Relationships of Multidrug Resistance Reversers, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 685–713.
- [106] J. Hohmann, F. Evanics, G. Dombi, J. Molnár, P. Szabó, Euphosalicin, a new diterpene polyester with multidrug resistance reversing activity from *Euphorbia salicifolia*, *Tetrahedron*. 57 (2001) 211–215.

- [107] J. Hohmann, J. Molnár, D. Rédei, F. Evanics, P. Forgo, A. Kálmán, G. Argay, P. Szabó, Discovery and Biological Evaluation of a New Family of Potent Modulators of Multidrug Resistance: Reversal of Multidrug Resistance of Mouse Lymphoma Cells by New Natural Jatrophone Diterpenoids Isolated from Euphorbia Species, *J Med Chem.* 45 (2002) 2425–2431.
- [108] J. Hohmann, D. Rédei, P. Forgo, J. Molnár, G. Dombi, T. Zorig, Jatrophone Diterpenoids from Euphorbia mongolica as Modulators of the Multidrug Resistance of L5128 Mouse Lymphoma Cells, *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 976–979.
- [109] G. Corea, E. Fattorusso, V. Lanzotti, R. Motti, P.-N. Simon, C. Dumontet, A. Di Pietro, Jatrophone Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance. Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of the Potent Lead Pepluanin A, *J Med Chem.* 47 (2004) 988–992..
- [110] D. Lu, Y. Liu, H.A. Aisa, Jatrophone diterpenoid esters from Euphorbia sororia serving as multidrug resistance reversal agents, *Fitoterapia.* 92 (2014) 244–251.
- [111] J.A. Marco, J.F. Sanz-Cervera, A. Yuste, J. Jakupovic, J. Lex, Terracinolides A and B, Two Bishomoditerpene Lactones with a Novel Carbon Framework from Euphorbia terracina†, *J Org Chem.* 61 (1996) 1707–1709.
- [112] J. Alberto Marco, J.F. Sanz-Cervera, A. Yuste, J. Jakupovic, F. Jeske, Jatrophone derivatives and a rearranged jatrophone from Euphorbia terracina, *Phytochemistry.* 47 (1998) 1621–1630.
- [113] J.A. Marco, J.F. Sanz-Cervera, A. Yuste, J. Jakupovic, Isoterracinolides A and B, Novel Bishomoditerpene Lactones from Euphorbia terracina, *J Nat Prod.* 62 (1998) 110–113.
- [114] G. Corea, E. Fattorusso, V. Lanzotti, R. Motti, P.-N. Simon, C. Dumontet, A. Di Pietro, Structure-Activity Relationships for Euphocharacins A - L, a New Series of Jatrophone Diterpenes, as Inhibitors of Cancer Cell P-Glycoprotein, *Planta Med.* 70 (2004) 657,665.
- [115] A. Vasas, E. Sulyok, D. Rédei, P. Forgo, P. Szabó, I. Zupkó, A. Berényi, J. Molnár, J. Hohmann, Jatrophone Diterpenes from Euphorbia esula as Antiproliferative Agents and Potent Chemosensitizers to Overcome Multidrug Resistance, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 1453–1461.
- [116] M.K. Rawal, Y. Shokoohinia, G. Chianese, B. Zolfaghari, G. Appendino, O. Tagliatela-Scafati, R. Prasad, A. Di Pietro, Jatrophanes from Euphorbia squamosa as Potent Inhibitors of Candida albicans Multidrug Transporters, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 2700–2706.
- [117] P. Mohan, K. Koushik, M.J. Fuertes, Efforts toward the total synthesis of a jatrophone diterpene, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 2730–2732.
- [118] R. Fürst, C. Lentsch, U. Rinner, Towards the Total Synthesis of Pl-3: Preparation of the Eastern Fragment through a Diastereoselective SmI₂-Mediated Reformatsky Reaction, *Eur. J. Org. Chem.* 2013 (2013) 2293–2297.
- [119] R. Fürst, U. Rinner, Synthesis of an Advanced Intermediate of the Jatrophone Diterpene Pl-4: A Dibromide Coupling Approach, *J. Org. Chem.* 78 (2013) 8748–8758.
- [120] P. Mohan, K. Koushik, M.J. Fuertes, Synthetic studies directed toward the total synthesis of a jatrophone diterpene, *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 61–65.
- [121] U. Rinner, Progress in the Preparation of Jatrophone Diterpenes, *Eur. J. Org. Chem.* 2015 (2015) 3197–3219.
- [122] A.B. Smith III, M.A. Guaciaro, S.R. Schow, P.M. Wovkulich, B.H. Toder, T.W. Hall, A strategy for the total synthesis of jatrophone: synthesis of normethyljatrophone, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 219–222.
- [123] A.B. Smith III, A.T. Lupo Jr, M. Ohba, K. Chen, Total synthesis of (+)-hydroxyjatrophone A and (+)-hydroxyjatrophone B, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 6648–6656.

- [124] A.C. Gyorkos, J.K. Stille, L.S. Hegedus, The total synthesis of (+-)-epi-jatrophone and (+-)-jatrophone using palladium-catalyzed carbonylative coupling of vinyl triflates with vinyl stannanes as the macrocycle-forming step, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8465–8472.
- [125] Q. Han, D.F. Wiemer, Total synthesis of (+)-jatrophone., *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 7692–7697.
- [126] L. Butt, C. Schnabel, M. Hiersemann, Toward a Synthetic Access to Jatropa-5, 12-dienes by Ring-Closing Metathesis: Detours and Dead-Ends, *Synthesis*. 47 (2015) 1922–1936.
- [127] C. Schnabel, M. Hiersemann, Total synthesis of jatrophane diterpenes from *Euphorbia characias*, *Org. Lett.* 11 (2009) 2555–2558.
- [128] C. Schnabel, K. Sterz, H. Müller, J. Rehbein, M. Wiese, M. Hiersemann, Total Synthesis of Natural and Non-Natural $\Delta^5,6\Delta^{12,13}$ -Jatrophane Diterpenes and Their Evaluation as MDR Modulators, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 512–522.
- [129] J. Zhu, R. Wang, L. Lou, W. Li, G. Tang, X. Bu, S. Yin, Jatrophane Diterpenoids as Modulators of P-Glycoprotein-Dependent Multidrug Resistance (MDR): Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of Promising MDR Reversal Agents, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 6353–6369.
- [130] D. Baltimore, Expression of animal virus genomes, *Bacteriol. Rev.* 35 (1971) 235–241.
- [131] L. Lambrechts, T.W. Scott, D.J. Gubler, Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission, *PLoS Negl Trop Dis.* 4 (2010) e646.
- [132] L.P. Campbell, C. Luther, D. Moo-Llanes, J.M. Ramsey, R. Danis-Lozano, A.T. Peterson, Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370 (2015) 0135–0144.
- [133] WHO, Chikungunya, WHO. (2015). http://www.who.int/denguecontrol/arboviral/other_arboviral_chikungunya/en/2015.
- [134] H.-L. Chen, R.-B. Tang, Why Zika virus infection has become a public health concern?, *J. Chin. Med. Assoc.* 79 (2016) 174–178.
- [135] O. Schwartz, M.L. Albert, Biology and pathogenesis of chikungunya virus, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 491–500.
- [136] B. Queyriaux, F. Simon, M. Grandadam, R. Michel, H. Tolou, J.-P. Boutin, Clinical burden of chikungunya virus infection, *Lancet Infect. Dis.* 8 (2008) 2–3.
- [137] W.H.R. Lumsden, An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 49 (1955) 33–57..
- [138] M.-C. Jaffar-Bandjee, Étude de la physiopathologie de l'infection Chikungunya en phase aiguë et chronique chez l'homme, Thèse, Université de la Réunion, 2010.
- [139] C.M. De Ranitz, R.M. Myers, M.J. Varkey, Z.H. Isaac, D.E. Carey, Clinical impressions of chikungunya in Vellore gained from study of adult patients, *Indian J. Med. Res.* 53 (1965) 756–763.
- [140] S. Nimmannitya, S.B. Halstead, S.N. Cohen, M.R. Margiotta, Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18 (1969) 954–971.
- [141] J.J. Deller, P.K. Russell, Chikungunya disease, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17 (1968) 107–111.
- [142] W. Suharyono, Outbreak of Chikungunya virus in Indonesia 1982-1985, *Virus Inf. Exch. Newsl.* 3 (1986) 91.

- [143] P. Renault, E. Balleydier, E. D’Ortenzio, M. Bâville, L. Filleul, Epidemiology of chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries, *Médecine Mal. Infect.* 42 (2012) 93–101.
- [144] D. Cecilia, Current status of dengue and chikungunya in India, 2014.
- [145] C. for D.C. and P. (CDC, Chikungunya fever diagnosed among international travelers--United States, 2005-2006.
- [146] M. Pfeffer, T. Löscher, Cases of chikungunya imported into Europe, *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 11 (2006) E060316. 2.
- [147] G. Rezza, L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, A.C. Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, C. Fortuna, S. Boros, F. Magurano, others, Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region, *The Lancet.* 370 (2007) 1840–1846.
- [148] M. Grandadam, V. Caro, S. Plumet, J.-M. Thiberge, Y. Souarès, A.-B. Failloux, Chikungunya Virus, Southeastern France-Volume 17, Number 5—May 2011-Emerging Infectious Disease journal-CDC, 17 (2011) 910–913.
- [149] E. Delisle, C. Rousseau, B. Broche, I. Leparç-Goffart, G. L’ambert, A. Cochet, C. Prat, V. Foulongne, J.B. Ferre, O. Catelinois, others, chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014, *Euro Surveill.* 20 (2015) 21108.
- [150] J.-M. Mansuy, E. Grouteau, C. Mengelle, I. Claudet, J. Izopet, Chikungunya in the Caribbean—Threat for Europe, *Emerg. Infect. Dis.* 20 (2014) 1423–1425.
- [151] D. Fischer, S.M. Thomas, J.E. Suk, B. Sudre, A. Hess, N.B. Tjaden, C. Beierkuhnlein, J.C. Semenza, Climate change effects on Chikungunya transmission in Europe: geospatial analysis of vector’s climatic suitability and virus’ temperature requirements, *Int J Health Geogr.* 12 (2013) 51.
- [152] 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.
- [153] M. Segondy, Arboviroses à risque de transmission autochtone en France métropolitaine, *Rev. Francoph. Lab.* 2016 (2016) 35–46.
- [154] Y. Proestos, G.K. Christophides, K. Ergüler, M. Tanarhte, J. Waldock, J. Lelieveld, 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.* 370 (2015) 20130554.
- [155] S.R. Hadinegoro, J.L. Arredondo-García, M.R. Capeding, C. Deseda, T. Chotpitayasunondh, R. Dietze, H.I. Hj Muhammad Ismail, H. Reynales, K. Limkittikul, D.M. Rivera-Medina, H.N. Tran, A. Bouckenooghe, D. Chansinghakul, M. Cortés, K. Fanouillere, R. Forrat, C. Frago, S. Gailhardou, N. Jackson, F. Noriega, E. Plennevaux, T.A. Wartel, B. Zambrano, M. Saville, Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1195–1206.
- [156] A.A. Rashad, S. Mahalingam, P.A. Keller, Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* 57 (2013) 1147–1166.
- [157] P. Kaur, J.J.H. Chu, Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges, *Drug Discov. Today.* 18 (2013) 969–983.
- [158] D. Parashar, S. Cherian, Antiviral Perspectives for Chikungunya Virus, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) e631642.
- [159] S.S. Jadav, P. Korupolu, B.N. Sinha, V. Jayaprakash, Chikungunya epidemiological survey and Current available inhibitors, *J. Pharm. Chem.* 1 (2014) 59–67.
- [160] R. Abdelnabi, S.N. Amrun, L.F.P. Ng, P. Leyssen, J. Neyts, L. Delang, Protein kinases C as potential host targets for the inhibition of chikungunya virus replication, *Antiviral Res.* 139 (2017) 79–87.

- [161] Y. Takai, A. Kishimoto, M. Inoue, Y. Nishizuka, Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 7603–7609.
- [162] P.J. Parker, L. Coussens, N. Totty, L. Rhee, S. Young, E. Chen, S. Stabel, M.D. Waterfield, The complete primary structure of protein kinase C - the major phorbol ester receptor, *Science*. 233 (1986) 853–860.
- [163] F. Bornancin, Phosphorylation et régulation de la protéine-kinase C, *Médecine/Sciences*. 14 (1998) 322–5.
- [164] D. Breitkreutz, L. Braiman-Wiksmann, N. Daum, M.F. Denning, T. Tennenbaum, Protein kinase C family: On the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133 (2007) 793–808.
- [165] L.N. McKernan, D. Momjian, J. Kulkosky, Protein Kinase C: One Pathway towards the Eradication of Latent HIV-1 Reservoirs, *Adv. Virol.* 2012 (2012) e805347.
- [166] S. Corbalán-García, J.C. Gómez-Fernández, Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1761 (2006) 633–654.
- [167] S.F. Steinberg, Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 1341–1378.
- [168] K.R. Gustafson, J.H. Cardellina, J.B. McMahon, R.J. Gulakowski, J. Ishitoya, Z. Szallasi, N.E. Lewin, P.M. Blumberg, O.S. Weislow, A nonpromoting phorbol from the Samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1, *J. Med. Chem.* 35 (1992) 1978–1986.
- [169] A.R. Cashmore, R.N. Seelye, B.F. Cain, H. Mack, R. Schmidt, E. Hecker, The structure of prostratin: A toxic tetracyclic diterpene ester from *Pimelea prostrata*, *Tetrahedron Lett.* 17 (1976) 1737–1738.
- [170] M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, Y. Nishizuka, Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters., *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7847–7851.
- [171] B.L.V. Duuren, A. Sivak, A. Segal, I. Seidman, C. Katz, Dose-Response Studies with a Pure Tumor-promoting Agent, Phorbol Myristate Acetate, *Cancer Res.* 33 (1973) 2166–2172.
- [172] Z. Szallasi, K.W. Krausz, P.M. Blumberg, 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.* 13 (1992) 2161–2167.
- [173] Z. Szallasi, L. Krsmanovic, P.M. Blumberg, Nonpromoting 12-deoxyphorbol 13-esters inhibit phorbol 12-myristate 13-acetate induced tumor promotion in CD-1 mouse skin, *Cancer Res.* 53 (1993) 2507–2512.
- [174] M. Hezareh, Prostratin as a new therapeutic agent targeting HIV viral reservoirs, *Drug News Perspect.* 18 (2005) 496–500.
- [175] AIDS Research Alliance: About Prostratin, (2015). <http://aidsresearch.org/cure-research/prostratin>.
- [176] AIDS Research Alliance, Preparing to Test Prostratin on Human Reservoir Cells, (2014). <http://aidsresearch.org/news-events/news/getting-ready-to-test-prostratin-on-the-reservoir-cells>.
- [177] M. Bourjot, L. Delang, V.H. Nguyen, J. Neyts, F. Guéritte, P. Leyssen, M. Litaudon, Prostratin and 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Are Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 2183–2187.

- [178] S.A. Trushin, G.D. Bren, S. Asin, K.N. Pennington, C.V. Paya, A.D. Badley, Human Immunodeficiency Virus Reactivation by Phorbol Esters or T-Cell Receptor Ligation Requires both PKC α and PKC θ , *J. Virol.* 79 (2005) 9821–9830.
- [179] F.J. Evans, C.J. Soper, The tigliane, daphnane and ingenane diterpenes, their chemistry, distribution and biological activities. A review, *Lloydia.* 41 (1978) 193–233.
- [180] M. Bourjot, P. Leyssen, J. Neyts, V. Dumontet, M. Litaudon, Trigocherrierin A, a Potent Inhibitor of Chikungunya Virus Replication, *Molecules.* 19 (2014) 3617–3627.
- [181] 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, Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*, *Phytochemistry.* 84 (2012) 160–168.
- [182] P.-M. Allard, M.-T. Martin, M.-E. Tran Huu Dau, P. Leyssen, F. Guéritte, M. Litaudon, Trigocherrin A, the First Natural Chlorinated Daphnane Diterpene Orthoester from *Trigonostemon cherrieri*, *Org. Lett.* 14 (2012) 342–345.
- [183] N. Corlay, L. Delang, E. Girard-Valenciennes, J. Neyts, P. Clerc, J. Smadja, F. Guéritte, P. Leyssen, M. Litaudon, Tigliane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of chikungunya virus replication, *Fitoterapia.* 97 (2014) 87–91.
- [184] F. Olivon, H. Palenzuela, E. Girard-Valenciennes, J. Neyts, C. Pannecouque, F. Roussi, I. Grondin, P. Leyssen, M. Litaudon, Antiviral Activity of Flexibilane and Tigliane Diterpenoids from *Stillingia lineata*, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1119–1128.
- [185] L.-F. Nothias-Scaglia, C. Pannecouque, F. Renucci, L. Delang, J. Neyts, F. Roussi, J. Costa, P. Leyssen, M. Litaudon, J. Paolini, Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1277–1283.
- [186] R.W. Alder, S.P. East, In/out isomerism, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2097–2112.
- [187] J.D. Winkler, K.E. Henegar, P.G. Williard, Inside-outside stereoisomerism. II. Synthesis of the carbocyclic ring system of the ingenane diterpenes via the intramolecular dioxolenone photocycloaddition, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2850–2851.
- [188] R.L. Funk, T.A. Olmstead, M. Parvez, A solution to the in, out-bicyclo [4.4. 1] undecan-7-one problem inherent in ingenane total synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 3298–3300.
- [189] R.L. Funk, T.A. Olmstead, M. Parvez, J.B. Stallman, Stereoselective construction of the complete ingenane ring system, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 5873–5875.
- [190] C.Z. Nkosi, A.R. Opoku, S.E. Terblanche, In Vitro antioxidative activity of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate and its In Vivo effect on alanine transaminase and aspartate transaminase in acetaminophen-induced liver injury in low protein fed rats, *Phytother. Res.* 20 (2006) 780–783.
- [191] J.H. Rigby, N.M. Niyaz, K. Short, M.J. Heeg, A Unified Entry into the Ingenane, Tigliane, and Taxane Ring Systems, *J. Org. Chem.* 60 (1995) 7720–7721.
- [192] L.A. Paquette, R.J. Ross, J.P. Springer, Stereocontrolled construction of an ingenol prototype having a complete array of oxygenated and unsaturated centers, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 6192–6204.
- [193] J.H. Rigby, S.V. Cuisiat, Synthetic studies on the ingenane diterpenes. Construction of a tetracyclic 8-isoingenane model, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 6286–6291.
- [194] M. Harmata, S. Elahmad, C.L. Barnes, Intramolecular 4+3 cycloadditions. Model studies toward the synthesis of ingenanes, *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 1397–1400.
- [195] H. Tang, N. Yusuff, J.L. Wood, Progress toward the Total Synthesis of Ingenol: Construction of the Complete Carbocyclic Skeleton, *Org. Lett.* 3 (2001) 1563–1566.
- [196] J.D. Winkler, M.B. Rouse, M.F. Greaney, S.J. Harrison, Y.T. Jeon, The First Total Synthesis of (\pm)-Ingenol, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 9726–9728.

- [197] K. Tanino, K. Onuki, K. Asano, M. Miyashita, T. Nakamura, Y. Takahashi, I. Kuwajima, Total Synthesis of Ingenol, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1498–1500.
- [198] A. Nickel, T. Maruyama, H. Tang, P.D. Murphy, B. Greene, N. Yusuff, J.L. Wood, Total Synthesis of Ingenol, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 16300–16301.
- [199] T. Ohyoshi, S. Funakubo, Y. Miyazawa, K. Niida, I. Hayakawa, H. Kigoshi, Total Synthesis of (–)-13-Oxyingenol and its Natural Derivative, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 4972–4975.
- [200] S. Kim, J.D. Winkler, Approaches to the synthesis of ingenol, *Chem. Soc. Rev.* 26 (1997) 387–399.
- [201] I. Kuwajima, K. Tanino, Total Synthesis of Ingenol, *Chem. Rev.* 105 (2005) 4661–4670.
- [202] J.K. Cha, O.L. Epstein, Synthetic approaches to ingenol, *Tetrahedron.* 62 (2006) 1329–1343.
- [203] L. Jørgensen, S.J. McKerrall, C.A. Kuttruff, F. Ungeheuer, J. Felding, P.S. Baran, 14-step synthesis of (+)-ingenol from (+)-3-carene, *Science.* 341 (2013) 878–882.
- [204] S.J. McKerrall, L. Jørgensen, C.A. Kuttruff, F. Ungeheuer, P.S. Baran, Development of a Concise Synthesis of (+)-Ingenol, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 5799–5810.
- [205] J. Guerra-Bubb, R. Croteau, R.M. Williams, The early stages of taxol biosynthesis: An interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites, *Nat. Prod. Rep.* 29 (2012) 683–696.
- [206] C.M. Hasler, G. Acs, P.M. Blumberg, Specific Binding to Protein Kinase C by Ingenol and Its Induction of Biological Responses, *Cancer Res.* 52 (1992) 202–208.
- [207] S.M. Ogbourne, A. Suhrbier, B. Jones, S.-J. Cozzi, G.M. Boyle, M. Morris, D. McAlpine, J. Johns, T.M. Scott, K.P. Sutherland, J.M. Gardner, T.T.T. Le, A. Lenarczyk, J.H. Aylward, P.G. Parsons, Antitumor Activity of 3-Inganyl Angelate, *Cancer Res.* 64 (2004) 2833–2839.
- [208] M. Fujiwara, K. Ijichi, K. Tokuhisa, K. Katsuura, S. Shigeta, K. Konno, G.Y. Wang, D. Uemura, T. Yokota, M. Baba, Mechanism of selective inhibition of human immunodeficiency virus by ingenol triacetate., *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 271–273.
- [209] E. Hecker, Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae, *Cancer Res.* 28 (1968) 2338–2348.
- [210] N. Kedei, D.J. Lundberg, A. Toth, P. Welburn, S.H. Garfield, P.M. Blumberg, Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C, *Cancer Res.* 64 (2004) 3243–3255.
- [211] G. Siller, K. Gebauer, P. Welburn, J. Katsamas, S.M. Ogbourne, PEP005 (ingenol mebutate) gel, a novel agent for the treatment of actinic keratosis: Results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled, multicentre, phase IIa study, *Australas. J. Dermatol.* 50 (2009) 16–22..
- [212] E. Ersvaer, A.O. Kittang, P. Hampson, K. Sand, B.T. Gjertsen, J.M. Lord, Ø. Bruserud, The Protein Kinase C Agonist PEP005 (Ingenol 3-Angelate) in the Treatment of Human Cancer: A Balance between Efficacy and Toxicity, *Toxins.* 2 (2010) 174–194.
- [213] A. Vasas, D. Rédei, D. Csupor, J. Molnár, J. Hohmann, Diterpenes from European Euphorbia Species Serving as Prototypes for Natural-Product-Based Drug Discovery, *Eur. J. Org. Chem.* 2012 (2012) 5115–5130.
- [214] S.M. Ogbourne, P.G. Parsons, The value of nature's natural product library for the discovery of New Chemical Entities: The discovery of ingenol mebutate, *Fitoterapia.* 98 (2014) 36–44..
- [215] G. Siller, R. Rosen, M. Freeman, P. Welburn, J. Katsamas, S.M. Ogbourne, PEP005 (ingenol mebutate) gel for the topical treatment of superficial basal cell carcinoma: Results of a randomized phase IIa trial, *Australas. J. Dermatol.* 51 (2010) 99–105.

- [216] A.M. Jeffrey, R.M. Liskamp, Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters: rationale for the activity of phorbol esters, teleocidin B, and aplysiatoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 (1986) 241–245.
- [217] P.A. Wender, C.M. Cribbs, K.F. Koehler, N.A. Sharkey, C.L. Herald, Y. Kamano, G.R. Pettit, P.M. Blumberg, Modeling of the bryostatins to the phorbol ester pharmacophore on protein kinase C, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988) 7197–7201.
- [218] A. Itai, Y. Kato, N. Tomioka, Y. Iitaka, Y. Endo, M. Hasegawa, K. Shudo, H. Fujiki, S. Sakai, A receptor model for tumor promoters: rational superposition of teleocidins and phorbol esters, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988) 3688–3692.
- [219] Cuthbertson, Alastair F., and Colin Thomson. "Electrostatic potentials of tumour promoters." *Journal of Molecular Graphics* 5.2 (1987): 92-96.
- [220] C. Thomson, J. Wilkie, The conformations and electrostatic potential maps of phorbol esters, teleocidins and ingenols, *Carcinogenesis*. 10 (1989) 531–540.
- [221] H. Nakamura, Y. Kishi, M.A. Pajares, R.R. Rando, Structural basis of protein kinase C activation by tumor promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 9672–9676.
- [222] D. Bradshaw, C.H. Hill, J.S. Nixon, S.E. Wilkinson, Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors, *Agents Actions*. 38 (1993) 135–147.
- [223] J.D. Winkler, B.-C. Hong, S. Kim, N.E. Lewin, P.M. Blumberg, On the Protein Kinase C Pharmacophore: Synthesis and Biological Activity of 4-Hydroxylated Analogs of Ingenol, *Synlett*. 1995 (1995) 533–535.
- [224] T. Nakamura, T. Matsui, K. Tanino, I. Kuwajima, A new approach for ingenol synthesis, *J. Org. Chem.* 62 (1997) 3032–3033.
- [225] J.H. Rigby, V. de Sainte Claire, S.V. Cuisiat, M.J. Heeg, Synthetic studies on the ingenane diterpenes. Direct conversion of the out, out-Bicyclo [4.4. 1] undecane system into a highly strained in, out stereoisomer, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 7992–7993.
- [226] J.D. Winkler, K.E. Henegar, B.-C. Hong, P.G. Williard, others, Inside-Outside Stereoisomerism. 6. Synthesis of Trans-Bicyclo (4.4. 1) Undecan-11-One and-The First Stereoselective Construction of the Tricyclic Nucleus of the Ring-System of the Ingenane Diterpenes, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 4183–4188.
- [227] J.D. Winkler, C.M. Bowen, F. Liotta, [2+ 2] photocycloaddition/fragmentation strategies for the synthesis of natural and unnatural products, *Chem. Rev.* 95 (1995) 2003–2020.
- [228] J.D. Winkler, B.-C. Hong, A. Bahador, M.G. Kazanietz, P.M. Blumberg, Synthesis of ingenol analogs with affinity for protein kinase C, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3 (1993) 577–580.
- [229] J.D. Winkler, S. Kim, S. Harrison, N.E. Lewin, P.M. Blumberg, Synthesis and Biological Evaluation of Highly Functionalized Analogues of Ingenol, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 296–300.
- [230] G. Appendino, G.C. Tron, G. Cravotto, G. Palmisano, R. Annunziata, G. Baj, N. Surico, Synthesis of Modified Ingenol Esters, *Eur. J. Org. Chem.* 1999 (1999) 3413–3420.
- [231] Y. Jin, C.-H. Yeh, C.A. Kuttruff, L. Jørgensen, G. Dünstl, J. Felding, S.R. Natarajan, P.S. Baran, C-H Oxidation of Ingenanes Enables Potent and Selective Protein Kinase C Isoform Activation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 14044–14048.
- [232] P.A. Wender, H. Kogen, H.Y. Lee, J.D. Munger Jr, R.S. Wilhelm, P.D. Williams, Studies on tumor promoters. 8. The synthesis of phorbol, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 8957–8958.
- [233] P.A. Wender, F.E. McDonald, Studies on tumor promoters. 9. A second-generation synthesis of phorbol, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 4956–4958.
- [234] P.A. Wender, K.D. Rice, M.E. Schnute, The first formal asymmetric synthesis of phorbol, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 7897–7898.

- [235] K. Sugita, C.F. Neville, M. Sodeoka, H. Sasai, M. Shibasaki, Stereocontrolled syntheses of phorbol analogs and evaluation of their binding affinity to PKC, *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 1067–1070.
- [236] K. Lee, J.K. Cha, Formal Synthesis of (+)-Phorbol1, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 5590–5591.
- [237] P.A. Wender, C.L. Hillemann, M.J. Szymonifka, An approach to the tiglianes, daphnanes, and ingenanes via the divinylcyclopropane rearrangement, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 2205–2208.
- [238] K. Sugita, K. Shigeno, C.F. Neville, H. Sasai, M. Shibasaki, Synthetic Studies towards Phorbols: Synthesis of B or C Ring Substituted Phorbol Skeletons in the Naturally Occurring Form, *Synlett.* 1994 (1994) 325–329.
- [239] 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.
- [240] S.J. McKerrall, L. Jørgensen, C.A. Kuttruff, F. Ungeheuer, P.S. Baran, Development of a concise synthesis of (+)-ingenol, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 5799–5810.
- [241] S. Kawamura, H. Chu, J. Felding, P.S. Baran, Nineteen-step total synthesis of (+)-phorbol, *Nature.* 532 (2016) 90–93.
- [242] D. Urabe, T. Asaba, M. Inoue, Asymmetric Total Synthesis of Crotophorbolone: Construction of the 5/7/6-Fused Ring System via an α -Alkoxy Bridgehead Radical Reaction, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 89 (2016) 1137–1144.
- [243] B. Flaschenträger, F.F. von Falkenhausen, Über den Giftstoff im Krotonöl. II. Zur Konstitution von Krotophorbolon, *Eur. J. Org. Chem.* 514 (1934) 252–260.
- [244] H.W. Thielmann, E. Hecker, Zur Chemie des Phorbols, XIV Die Flaschenträger-Reaktion, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 728 (1969) 158–183.
- [245] P.A. Wender, J.-M. Kee, J.M. Warrington, Practical Synthesis of Prostratin, DPP, and Their Analogs, Adjuvant Leads Against Latent HIV, *Science.* 320 (2008) 649–652.
- [246] P.C. Bulman Page, D.C. Jennens, H. McFarland, An IMDA approach to tigliane and daphnane diterpenoids: Generation of the tetracyclic ring system of the tiglianes, *Tetrahedron Lett.* 38 (1997) 6913–6916.
- [247] S.R. Jackson, M.G. Johnson, M. Mikami, S. Shiokawa, E.M. Carreira, Rearrangement of a Tricyclic 2,5-Cyclohexadienone: Towards a General Synthetic Route to the Daphnanes and (+)-Resiniferatoxin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 2694–2697.
- [248] P.A. Wender, F.C. Bi, N. Buschmann, F. Gosselin, C. Kan, J.-M. Kee, H. Ohmura, Studies on Oxidopyrylium [5 + 2] Cycloadditions: Toward a General Synthetic Route to the C12-Hydroxy Daphnetoxins, *Org. Lett.* 8 (2006) 5373–5376.
- [249] S.-G. Liao, H.-D. Chen, J.-M. Yue, Plant Orthoesters, *Chem. Rev.* 109 (2009) 1092–1140.
- [250] P.A. Wender, C.D. Jesudason, H. Nakahira, N. Tamura, A.L. Tebbe, Y. Ueno, The First Synthesis of a Daphnane Diterpene: The Enantiocontrolled Total Synthesis of (+)-Resiniferatoxin, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 12976–12977.
- [251] 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.
- [252] R.J. Schmidt, F.J. Evans, A new aromatic ester diterpene from *Euphorbia poisonii*, *Phytochemistry.* 15 (1976) 1778–1779.
- [253] S.-G. Liao, H.-D. Chen, J.-M. Yue, Plant Orthoesters, *Chem. Rev.* 109 (2009) 1092–1140.
- [254] E.J. Beans, D. Fournogerakis, C. Gauntlett, L.V. Heumann, R. Kramer, M.D. Marsden, D. Murray, T.-W. Chun, J.A. Zack, P.A. Wender, Highly potent, synthetically accessible

- prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 11698–11703.
- [255] P.A. Wender, N. Buschmann, N.B. Cardin, L.R. Jones, C. Kan, J.-M. Kee, J.A. Kowalski, K.E. Longcore, Gateway synthesis of daphnane congeners and their protein kinase C affinities and cell-growth activities, *Nat. Chem.* 3 (2011) 615–619.
- [256] M.I. Tyler, M.E.H. Howden, Synthesis and Structure-Activity Studies of Potential Antitumor Agents Derived From Esters of Phorbol, *Aust. J. Chem.* 40 (1987) 193–200.
- [257] E. Hecker, R. Schmidt, Phorbol esters – the Irritants and Cocarcinogens of Croton Tiglium L., in: W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby (Eds.), *Fortschritte Chem. Org. Naturstoffe Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, Springer Vienna, 1974: pp. 377–467.
- [258] P.-L. Boudreault, J.K. Mattler, P.A. Wender, Studies on the regio- and diastereo-selective epoxidation of daphnanes and tiglanes, *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 3423–3427.
- [259] L.D. Roberts, A.L. Souza, R.E. Gerszten, C.B. Clish, Targeted metabolomics, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* (2012) 30–2.
- [260] K.U. Bindseil, J. Jakupovic, D. Wolf, J. Lavayre, J. Leboul, D. van der Pyl, Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery, *Drug Discov. Today.* 6 (2001) 840–847.
- [261] P.-M. Allard, G. Genta-Jouve, J.-L. Wolfender, Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 36 (2017) 40–49.
- [262] J.-L. Wolfender, HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue, *Planta Med.* 75 (2009) 719–734.
- [263] D. Corradini, *Handbook of HPLC*, Second Edition, CRC Press, 2010.
- [264] M.W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*, John Wiley & Sons, 2006.
- [265] J. Bordas-Nagy, K.R. Jennings, Collision-induced decomposition of ions, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 100 (1990) 105–131.
- [266] R.E. Lovins, S.R. Ellis, G.D. Tolbert, C.R. McKinney, Liquid chromatography-mass spectrometry. Coupling of a liquid chromatograph to a mass spectrometer, *Anal. Chem.* 45 (1973) 1553–1556.
- [267] M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, Direct chemical ionization of relatively involatile samples. Application to underivatized oligopeptides, *Org. Mass Spectrom.* 7 (1973) 1353–1356.
- [268] T. Hoffmann, D. Krug, S. Hüttel, R. Müller, Improving Natural Products Identification through Targeted LC-MS/MS in an Untargeted Secondary Metabolomics Workflow, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10780–10788.
- [269] P.-M. Allard, T. Péresse, J. Bisson, K. Gindro, L. Marcourt, V.C. Pham, F. Roussi, M. Litaudon, J.-L. Wolfender, Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication, *Anal. Chem.* 88 (2016) 3317–3323.
- [270] J.-L. Wolfender, G. Marti, A. Thomas, S. Bertrand, Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts, *J. Chromatogr. A.* 1382 (2015) 136–164.
- [271] C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, *Anal. Chem.* 57 (1985) 675–679.
- [272] J. Schappler, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling UHPLC with MS: The Needs, Challenges, and Applications, in: *Ultra-High Perform. Liq. Chromatogr. Its Appl.*, John Wiley & Sons, 2013: pp. 95–132.
- [273] H.G. Gika, G.A. Theodoridis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 12–25.

- [274] E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Interfaces for the HPLC/MS Analysis of Pesticides, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5441–5449.
- [275] S. Banerjee, S. Mazumdar, 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.
- [276] G. Vogt, S. Achatz, A. Kettrup, H. Sandermann Jr., Fast, sensitive and selective liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of tumor-promoting diterpene esters, *J. Chromatogr. A.* 855 (1999) 563–573.
- [277] K. Ichihashi, D. Yuki, H. Kurokawa, A. Igarashi, T. Yajima, M. Fujiwara, K. Maeno, S. Sekiguchi, M. Iwata, H. Nishino, Dynamic Analysis of Phorbol Esters in the Manufacturing Process of Fatty Acid Methyl Esters from *Jatropha curcas* Seed Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (2011) 851–861.
- [278] M. Baldini, C. Ferfuaia, R. Bortolomeazzi, G. Verardo, J. Pascali, E. Piasentier, L. Franceschi, 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.* 59 (2014) 268–276.
- [279] B. Xia, K. Xu, X. Liu, Y. Chai, C. Sun, Y. Gu, L. Ding, Y. Zhou, Tandem mass spectrometric analysis and density functional theory calculations on the fragmentation behavior of two tetradecanoylingenol regioisomers from *Euphorbia wallichii*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 2502–2508.
- [280] M. Yang, Z. Lu, K. Yu, Q. Wang, X. Chen, Y. Li, X. Liu, W. Wu, D. Guo, 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.* 323–324 (2012) 55–62.
- [281] W. Jiao, D.-M. Fang, Z.-J. Wu, J.-Z. Chen, H.-W. Shao, G.-L. Zhang, Analysis of lathyrane diterpenes using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: Letter to the Editor, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 276–280.
- [282] L.-F. Nothias-Scaglia, I. Schmitz-Afonso, F. Renucci, F. Roussi, D. Touboul, J. Costa, M. Litaudon, J. Paolini, Insights on profiling of phorbol, deoxyphorbol, ingenol and jatropane diterpene esters by high performance liquid chromatography coupled to multiple stage mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1422 (2015) 128–139.
- [283] W. Lu, B.D. Bennett, J.D. Rabinowitz, Analytical strategies for LC–MS-based targeted metabolomics, *J. Chromatogr. B.* 871 (2008) 236–242.
- [284] R.C. De Vos, S. Moco, A. Lommen, J.J. Keurentjes, R.J. Bino, R.D. Hall, Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 778–791.
- [285] J. Hubert, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?, *Phytochem. Rev.* 16 (2017) 55–95..
- [286] 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, MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences, *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 703–714.
- [287] J.W. Blunt, M.H.G. Munro, MarinLit, Database Lit. Mar. Nat. Prod. Use Macintosh Comput. Prep. Maint. Mar. Chem. Group Dep. Chem. Univ. Canterb. Canterb. N. Z. 2003.
- [288] mzCloud – Advanced Mass Spectral Database, (n.d.). <https://www.mzcloud.org>.

- [289] Y. Sawada, R. Nakabayashi, Y. Yamada, M. Suzuki, M. Sato, A. Sakata, K. Akiyama, T. Sakurai, F. Matsuda, T. Aoki, M.Y. Hirai, K. Saito, RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database, *Phytochemistry*. 82 (2012) 38–45.
- [290] 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.
- [291] J.-H. Wang, Y.-J. Zhou, X. Bai, P. He, Jolkinolide B from *Euphorbia fischeriana* Steud induces apoptosis in human leukemic U937 cells through PI3K/Akt and XIAP pathways, *Mol. Cells*. 32 (2011) 451–457.
- [292] 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.
- [293] L. Zhang, X. Shu, A. Ding, L. Yu, Y. Tang, J. Duan, E. Shang, X. Shen, LC–DAD–ESI–MS–MS Separation and Chemical Characterization of the Inflammatory Fraction of the Roots of *Euphorbia kansui*, *Chromatographia*. 70 (2009) 805–810.
- [294] G. Lang, N.A. Mayhudin, M.I. Mitova, L. Sun, S. van der Sar, J.W. Blunt, A.L.J. Cole, G. Ellis, H. Laatsch, M.H.G. Munro, Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts, *J. Nat. Prod*. 71 (2008) 1595–1599.
- [295] T. Ito, M. Masubuchi, Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies, *J. Antibiot. (Tokyo)*. 67 (2014) 353–360.
- [296] J.L. Little, A.J. Williams, A. Pshenichnov, V. Tkachenko, Identification of “Known Unknowns” Utilizing Accurate Mass Data and ChemSpider, *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 23 (2012) 179–185.
- [297] J. Watrous, P. Roach, T. Alexandrov, B.S. Heath, J.Y. Yang, R.D. Kersten, M. van der Voort, K. Pogliano, H. Gross, J.M. Raaijmakers, B.S. Moore, J. Laskin, N. Bandeira, P.C. Dorrestein, Mass spectral molecular networking of living microbial colonies, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 109 (2012) E1743–E1752.
- [298] A. Guthals, J.D. Watrous, P.C. Dorrestein, N. Bandeira, The spectral networks paradigm in high throughput mass spectrometry, *Mol. Biosyst*. 8 (2012) 2535–2544.
- [299] M.F. Traxler, R. Kolter, A massively spectacular view of the chemical lives of microbes, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 109 (2012) 10128–10129.
- [300] A.M. Frank, M.E. Monroe, A.R. Shah, J.J. Carver, N. Bandeira, R.J. Moore, G.A. Anderson, R.D. Smith, P.A. Pevzner, Spectral archives: extending spectral libraries to analyze both identified and unidentified spectra, *Nat. Methods*. 8 (2011) 587–591.
- [301] R.A. Quinn, L.-F. Nothias, O. Vining, M. Meehan, E. Esquenazi, P.C. Dorrestein, Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy, *Trends Pharmacol. Sci*. 38 (2017) 143–154.
- [302] D.D. Nguyen, C.-H. Wu, W.J. Moree, A. Lamsa, M.H. Medema, X. Zhao, R.G. Gavilan, M. Aparicio, L. Atencio, C. Jackson, J. Ballesteros, J. Sanchez, J.D. Watrous, V.V. Phelan, C. van de Wiel, R.D. Kersten, S. Mehnaz, R.D. Mot, E.A. Shank, P. Charusanti, H. Nagarajan, B.M. Duggan, B.S. Moore, N. Bandeira, B.Ø. Palsson, K. Pogliano, M. Gutiérrez, P.C. Dorrestein, MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 110 (2013) E2611–E2620.
- [303] M.E. Smoot, K. Ono, J. Ruschinski, P.-L. Wang, T. Ideker, Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization, *Bioinformatics*. 27 (2011) 431–432.
- [304] Cytoscape: An Open Source Platform for Complex Network Analysis and Visualization. <http://www.cytoscape.org>.

- [305] A.M. Frank, N. Bandeira, Z. Shen, S. Tanner, S.P. Briggs, R.D. Smith, P.A. Pevzner, Clustering Millions of Tandem Mass Spectra, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 113–122.
- [306] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.* 13 (2003) 2498–2504.
- [307] L.-F. Nothias-Scaglia, M. Esposito, J. Costa, J. Paolini, D. Touboul, M. Litaudon, Molecular networks, a bioinformatic tool for tandem mass spectrometry data interpretation, *Spectra Anal.* 307 (2015) 73–78.
- [308] K. Kleigrew, J. Almaliti, I.Y. Tian, R.B. Kinnel, A. Korobeynikov, E.A. Monroe, B.M. Duggan, V. Di Marzo, D.H. Sherman, P.C. Dorrestein, L. Gerwick, W.H. Gerwick, Combining Mass Spectrometric Metabolic Profiling with Genomic Analysis: A Powerful Approach for Discovering Natural Products from Cyanobacteria, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1671–1682.
- [309] K.R. Duncan, M. Crüsemann, A. Lechner, A. Sarkar, J. Li, N. Ziemert, M. Wang, N. Bandeira, B.S. Moore, P.C. Dorrestein, P.R. Jensen, Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species, *Chem. Biol.* 22 (2015) 460–471.
- [310] B.K. Okada, Y. Wu, D. Mao, L.B. Bushin, M.R. Seyedsayamdost, Mapping the Trimethoprim-Induced Secondary Metabolome of *Burkholderia thailandensis*, *ACS Chem. Biol.* 11 (2016) 2124–2130.
- [311] C.-C. Liaw, P.-C. Chen, C.-J. Shih, S.-P. Tseng, Y.-M. Lai, C.-H. Hsu, P.C. Dorrestein, Y.-L. Yang, Vitroprocines, new antibiotics against *Acinetobacter baumannii*, discovered from marine *Vibrio* sp. QWI-06 using mass-spectrometry-based metabolomics approach, *Sci. Rep.* 5 (2015) 12856.
- [312] M.J. Bertin, S.L. Schwartz, J. Lee, A. Korobeynikov, P.C. Dorrestein, L. Gerwick, W.H. Gerwick, Spongosine Production by a *Vibrio harveyi* Strain Associated with the Sponge *Tectitethya crypta*, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 493–499.
- [313] W.-T. Liu, A. Lamsa, W.R. Wong, P.D. Boudreau, R. Kersten, Y. Peng, W.J. Moree, B.M. Duggan, B.S. Moore, W.H. Gerwick, R.G. Linington, K. Pogliano, P.C. Dorrestein, MS/MS-based networking and peptidogenomics guided genome mining revealed the stenothricin gene cluster in *Streptomyces roseosporus*, *J. Antibiot. (Tokyo)*. 67 (2014) 99–104.
- [314] L.-F. Nothias-Scaglia, Etude de l'activité antivirale d'extraits d'*Euphorbia* de Corse: recherche de nouveaux diterpènes d'intérêt biologique, Université de Corse-Pascal Paoli, 2015.
- [315] L.-F. Nothias-Scaglia, P. Retailleau, J. Paolini, C. Pannecouque, J. Neyts, V. Dumontet, F. Roussi, P. Leyssen, J. Costa, M. Litaudon, Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 1505–1512.
- [316] P.-M. Allard, T. Péresse, J. Bisson, K. Gindro, L. Marcourt, V.C. Pham, F. Roussi, M. Litaudon, J.-L. Wolfender, Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication, *Anal. Chem.* 88 (2016) 3317–3323.
- [317] GNPS Trinity workflow - Confluence, (2017). <https://bix-lab.ucsd.edu/display/Public/GNPS+Trinity+workflow>.
- [318] J.R. Winnikoff, E. Glukhov, J. Watrous, P.C. Dorrestein, W.H. Gerwick, Quantitative molecular networking to profile marine cyanobacterial metabolomes, *J. Antibiot.* 67 (2014) 105–112.

II. RÉSULTATS

A. ARTICLE N°1

Les informations complémentaires sont disponibles en annexe du présent manuscrit pour les **Figures 1–5, 51, 52, 66, 67** et à l'adresse internet suivante :

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00644>



Figure 39. *Euphorbia dendroides* ; Piana. Photo : M. L.

Euphorbia dendroides Latex as a Source of Jatrophane Esters: Isolation, Structural Analysis, Conformational Study, and Anti-CHIKV Activity

Mélissa Esposito,^{†,‡,⊥} Louis-F elix Nothias,^{†,‡,⊥} Hirsto Nedev,[‡] Jean-François Gallard,[‡] Pieter Leyssen,[§] Pascal Retailleau,[‡] Jean Costa,[†] Fanny Roussi,[‡] Bogdan I. Iorga,^{*,‡} Julien Paolini,[†] and Marc Litaudon^{*,‡}

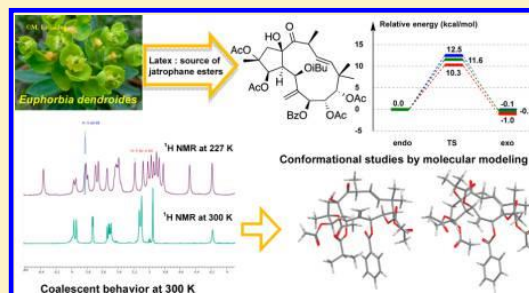
[†]Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, CNRS, UMR SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France

[‡]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, ICSN UPR 2301, University of Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette, France

[§]Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Supporting Information

ABSTRACT: An efficient process was used to isolate six new jatrophane esters, euphodendroidins J (3), K (5), L (6), M, (8), N (10), and O (11), along with seven known diterpenoid esters, namely, euphodendroidins A (4), B (9), E (1), and F (2), jatrophane ester (7), and 3 α -hydroxyterracinolides G and B (12 and 13), and terracinolides J and C (14 and 15) from the latex of *Euphorbia dendroides*. Their 2D structures and relative configurations were established by extensive NMR spectroscopic analysis. The absolute configurations of compounds 1, 11, and 15 were determined by X-ray diffraction analysis. Euphodendroidin F (2) was obtained in 18% yield from the diterpenoid ester-enriched extract after two consecutive flash chromatography steps, making it an interesting starting material for chemical synthesis. Euphodendroidins K and L (5 and 6) showed an unprecedented NMR spectroscopic behavior, which was investigated by variable-temperature NMR experiments and molecular modeling. The structure–conformation relationships study of compounds 1, 5, and 6, using DFT–NMR calculations, indicated the prominent role of the acylation pattern in governing the conformational behavior of these jatrophane esters. The antiviral activity of compounds 1–15 was evaluated against Chikungunya virus (CHIKV) replication.



Phytochemical investigation of various *Euphorbia* species has led to the isolation of a large number of bioactive and structurally diverse classes of secondary metabolites.^{1–3} In particular, a broad diversity of lower diterpenoids were found to possess protein kinase C (PKC) modulation activity;^{4,5} others proved to be potent inhibitors of P-glycoprotein (P-gp) involved in cancer cells multidrug resistance (MDR).⁶ Among them, macrocyclic diterpenoid esters of the jatrophane type were found to be among the most potent modulators of P-gp.⁶ They have a unique *trans*-bicyclo[10.3.0]pentadecane scaffold, commonly found in species of the genera *Euphorbia* and *Jatropha*. In contrast with some macrocyclic diterpenoid esters of the lathyrane-type, such as Euphorbia factor L₁ and jolkinol D isolated in multigram amounts from *Euphorbia lathyris*⁷ and *E. piscatorialis*,⁸ respectively, jatrophane esters are generally isolated in smaller amounts. No reliable biological source for efficient isolation of a large amount of jatrophane esters is known. In this context, efforts toward their synthesis are of particular interest. However, because jatrophane esters possess numerous oxygen functionalities and multiple stereocenters, their efficient partial or total synthesis remained an ambitious challenge.⁹ One consequence is the inability to fully explore the

biological potential of these molecules and to exploit their built-in reactivity to generate chemical diversity.

Our current interest in bioactive diterpenoids from *Euphorbia* spp.^{10–12} led to a search for an abundant source of jatrophane esters among the 33 taxa growing wild in Corsica Island.^{13,14} All *Euphorbia* species are known to produce more or less abundantly a white irritant milky sap (latex), which is exuded by specialized cells (lactifer). This plant matrix contains different metabolites such as proteins¹⁵ and terpenoids,^{1,3,16} which act as a chemical defense when the plant is wounded.¹⁷ *Euphorbia* latex extracts exhibit various biological activities,¹ such as cytotoxicity, molluscicidal activity, peripheral analgesic effect, and anti-inflammatory and anti-arthritic effects,¹ or were found to exhibit potent anti-HIV activity¹⁸ or anti-CHIKV activity.¹¹

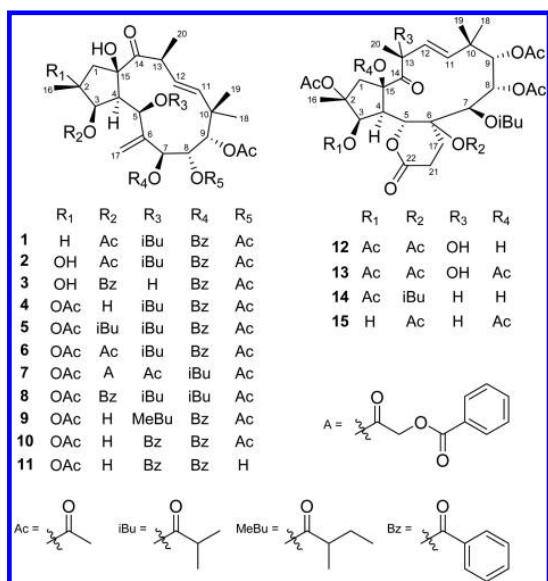
In the present study, latex of the species *Euphorbia dendroides* L., endemic to the coastal region of the western Mediterranean area, was selected for in-depth chemical investigation. This species is a tree-like spurge that offers the opportunity to harvest a significant amount of latex, making this biomass an

Received: July 11, 2016

Published: October 27, 2016

attractive source of diterpenoid esters.^{19,20} Several previous studies have dealt with the phytochemical composition of *E. dendroides*. From a Sardinian latex sample, Corea and collaborators reported the isolation of 21 diterpenoid esters including nine jatrophone esters, euphodendroidin A–I,¹⁹ 10 terracinolides, and two abejatrophanes.²⁰ Euphodendroidin D was found to be one of the most potent inhibitors of P-gp.^{6,19} From the aerial parts of the same species collected in Montenegro, 19 jatrophone esters, euphodendrophanes A–S, and one tiglane were isolated.^{21–23} Euphodendrophanes A and B are potent MDR modulators and were found not to be toxic to peripheral blood mononuclear cells.²²

In this paper, six new jatrophone-type diterpenoid esters, euphodendroids J (3), K (5), L (6), M (8), N (10), and O (11), and the known euphodendroids A (4), B (9), E (1), and F (2), jatrophone ester (7), 13 α -hydroxyterracinolides G and B (12 and 13), and terracinolides J and C (14 and 15) were isolated from the latex extract of *E. dendroides* L. Euphodendroidin F (2) was isolated in high yield through the use of a rapid and efficient process allowing the preparation of a diterpenoid ester-enriched extract from the starting plant material. The structures of isolated compounds were elucidated based on NMR, MS, and X-ray data. Euphodendroids 5 and 6 displayed an unusual conformational behavior that was solved by extensive NMR spectroscopic analysis and a molecular modeling study. The antiviral activity of compounds 1–15 was performed in a virus-cell-based assay for the CHIK virus.



RESULTS AND DISCUSSION

The latex extract of *E. dendroides* was partitioned by liquid–liquid extraction, and the MeCN diterpenoid ester-enriched extract was investigated for its jatrophone ester content. The LC-MSⁿ (liquid chromatography coupled to multiple stage mass spectrometry) analysis of the MeCN extract in a data-dependent mode, using ESI positive ion mode, showed a prominent peak at 13.8 min from the base peak chromatogram (Figure S1, Supporting Information). Inspection of the HRESIMS spectrum of the peak at 13.8 min showed base peak in-source ions at m/z 723.2976 and 683.3058,

corresponding to a sodium adduct ion $[M + Na]^+$ and $[M - H_2O + H]^+$, respectively. Considering the molecular formula, C₃₇H₄₈O₁₃, and the HRESIMSⁿ spectrum analysis (Figures S2–S5, Supporting Information), the peak at 13.8 min was annotated as euphodendroidin A or euphodendroidin F (4 and/or 2), two compounds previously isolated from *E. dendroides*.²⁰

The diterpenoid ester-enriched MeCN extract was subjected to normal-phase chromatography to give 19 fractions, of which ¹H NMR spectra of fractions F9–F14 showed signals attributable to the presence of jatrophone esters. From the analysis of the ¹H NMR spectrum of F13 (1.6 g), it was apparent that this fraction contained a major jatrophone ester (Figure S6, Supporting Information). Subsequent flash chromatographic steps afforded 804 mg of euphodendroidin F (2), accounting for 17.9% of the MeCN extract and 3.4% of the EtOAc latex extract.

Fractions F9–F12 and F14 were purified by semipreparative HPLC to yield the new jatrophone esters euphodendroids J (3), K (5), L (6), M (8), N (10), and O (11), along with euphodendroids A (4), B (9), E (1), and F (2), jatrophone ester (7), 13 α -hydroxyterracinolides G and B (12 and 13), and terracinolides J and C (14 and 15). The structure elucidation of compounds 3, 5, 6, 8, 10, and 11 was performed using extensive NMR and MS data analysis. Jatrophone esters 1, 2, 4, 7, and 9 and terracinolides 12–15 were identified through comparison with reported data.^{20,24–26} The absolute configurations of compounds 1, 11, and 15 were determined by X-ray diffraction analysis, thus also permitting assignment of the absolute configurations of the other analogues.

Euphodendroidin O (11) was obtained as colorless crystal from a concentrated Et₂O solution in tubes saturated with hexane vapors. Its HRESIMS showed a molecular ion at m/z 693.2866 $[M + H]^+$, corresponding to the molecular formula C₃₈H₄₄O₁₂, indicating 17 indices of hydrogen deficiency. From this formula and its ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (CDCl₃, Tables 1 and 2), closely comparable to those of the known euphodendroids A (4), B (9), E (1), and F (2), it was apparent that 11 had a similar structure. Analysis of its NMR data revealed the presence of one keto carbonyl (δ_C 211.9), four ester carbonyls (δ_C 173.1, 170.8, 165.4, 164.8), which were assigned to two acetoxy groups (δ_C 170.8/22.8 and 173.1/20.6; δ_H 2.26 and 1.57), and two benzoate groups [δ_C 165.4, 129.9, 128.7, and 133.4; 164.8, 129.7, 128.9, and 133.8; δ_H 8.02, 7.58, and 7.46; 7.99, 7.52, and 7.39]. Examination of HSQC and ¹H and ¹³C NMR spectra of compound 11 showed the presence of four methyl groups, one methylene group, five oxymethines, one quaternary carbon, two oxygenated tertiary carbon atoms, and four olefinic signals attributable to a *trans*-disubstituted double bond, [δ_C 137.6 (C-11), 129.5 (C-12) and δ_H 6.03 (d, J = 15.7 Hz, H-11), 5.52 (dd, J = 15.7 and 9.6 Hz, H-12)] and a vicinal-disubstituted double bond [δ_C 112.2 and δ_H 5.41 and 5.23 (H-17a and H-17b, respectively)] (Figure S44, Supporting Information). Furthermore, the presence of three hydroxy groups at δ_H 3.54, 3.60, and 4.35 in the structure of compound 11 was deduced from the molecular formula and the absence of cross-peaks for these signals in the HSQC spectrum. Among 17 indices of hydrogen deficiency, 15 were attributed to two acetyl groups, two benzoyl groups, one carbonyl, and two double bonds, and thus two additional rings had to be assumed. Taking into account previous observations, it can be deduced that this compound is a trihydroxylated tetraesterified macrocyclic oxojatrophone diterpenoid. Examination of the COSY spectrum

Table 1. ¹H NMR Data for Jatrophane Esters **3**, **8** (500 MHz), **10** (300 MHz), and **11** (600 MHz) in CDCl₃ at 300 K, δ_H in ppm, J in Hz

pos	3	8	10	11
1α	2.91, d (15.1)	2.86, d (15.2)	2.81, d (15.5)	2.79, d (15.4)
1β	2.16, d (15.1)	2.12, d (15.2)	2.06, d (15.5)	2.07, d (15.4)
3	5.68, d (3.0)	5.91, d (4.8)	4.50, dd (10.0, 4.1)	4.53, dd (10.2, 3.9)
4	3.75, dd (3.0, 1.9)	3.46, dd (4.8, 2.6)	3.32, d (4.1)	3.26, d (3.9)
5	4.25, br d (1.9)	5.28, br d (2.6)	5.62, br s	5.53, br s
7	5.64, br s	5.66, br s	5.81, br s	5.43, br s
8	4.97, br s	5.08, br s	5.24, br s	4.11, br s
9	4.93, br s	4.93, br s	5.02, br s	4.75, br s
11	5.98, d (15.6)	6.00, d (15.9)	6.03, d (15.8)	6.03, d (15.7)
12	5.37, dd (15.6, 9.6)	5.49, dd (15.9, 9.4)	5.58, dd (15.8, 9.4)	5.52, dd (15.7, 9.6)
13	4.26, dq (9.6, 6.5)	3.89, dq (9.4, 6.7)	3.84, dq (9.4, 6.6)	3.83, dq (9.6, 6.6)
16	1.38, s	1.57, br s	1.74, s	1.74, s
17a	5.16, br s	4.98, br s	5.39, br s	5.41, br s
17b	5.14, br s	4.87, br s	5.22, br s	5.23, br s
18	0.89, s	0.93, s	0.94, s	1.03, s
19	1.20, s	1.27, s	1.39, s	1.32, s
20	1.31, d (6.5)	1.26, d (6.7)	1.29, d (6.6)	1.27, d (6.6)
OR ₁₋₂	H 2.13, br s	Ac 2.19, s	Ac 2.27, s	Ac 2.26, s
OR ₂₋₃	Bz 8.11, d (7.5) 7.48, br t (7.5) 7.61, br t (7.5)	Bz 8.16, d (7.4) 7.41, br t (7.4) 7.54, br t (7.4)	H 3.50, d (10.0)	H 3.60, d (10.2)
OR ₃₋₅	H 4.64, br s	iBu 2.13, hept (7.0) 0.95, d (7.0) 0.81, d (7.0)	Bz 8.05, d (7.8) 7.45, br t (7.8) 7.58, br t (7.8)	Bz 8.02, d (7.5) 7.46, br t (7.5) 7.58, br t (7.5)
OR ₄₋₇	Bz 8.03, d (7.5) 7.39, br t (7.5) 7.51, br t (7.5)	iBu 2.62, hept (6.9) 1.28, d (6.9) 1.21, d (6.9)	Bz 8.00, d (7.5) 7.37, br t (7.5) 7.50, br t (7.5)	Bz 7.99, d (7.6) 7.39, br t (7.6) 7.52, br t (7.6)
OR ₅₋₈	Ac 2.07, s	Ac 2.02, s	Ac 2.06, s	H 3.54, br s
OAc-9	1.49, s	1.96, s	1.52, s	1.57, s
OH-15	5.17, br s	4.17, br s	4.35, br s	4.35, br s

of compound **11** revealed three spin systems (from H-3 to H-5, H-7 to H-9, and H-11 to H-20) (Figure S43, Supporting Information). The first system is represented by two oxymethines [δ_H 4.53 (dd, J = 10.2 and 3.9 Hz, H-3) and 5.53 (br s, H-5)] connected through the methine at δ_H 3.26 (br s, H-4) and a proton of the exomethylene group at δ_H 5.41 (H-17a). In turn, the second proton of the exomethylene group at δ_H 5.23 (H-17b) is correlated to the oxymethine at δ_H 5.43 (br s, H-7), which is connected to two adjacent oxymethine protons [δ_H 4.11 (br s, H-8) and 4.75 (br s, H-9)], allowing the attachment of two spin systems. The third spin system can be constructed from a *trans*-disubstituted double bond (C-11–C-12) connected to a methyl group at δ_H 1.27 (d, J = 6.6 Hz, H₃-20) via a deshielded allylic methine at δ_H 3.83 (dq, J = 9.6 and 6.6 Hz, H-13). These two spin systems can be interconnected through a *gem*-dimethyl group as deduced by correlations from H₃-18 and H₃-19 (δ_H 1.04, s and 1.32, s) to C-9 and C-11 observed in the HMBC spectrum. The locations of the acyl and hydroxy groups were established by inspection of COSY, HMBC, and ROESY cross-peaks as depicted in Figure 1. The relative configuration and the conformation of compound **11** were established via analysis of the ROESY spectrum and the comparison of NMR data with reported data. The X-ray diffraction analysis

permitted the absolute configuration and structure of compound **11** to be assigned as (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-2,9-diacetoxy-3,8,15-trihydroxy-5,7-dibenzoyloxy-14-oxo-jatropha-6(17),11*E*-diene (ORTEP view is shown in Figure 2).

Jatropha esters can adopt one of two possible conformations depending on the esterification pattern: the *endo*-type, with the exomethylene orthogonal to the main plane, and the *exo*-type, with the exomethylene parallel to the plane.^{24,25} Molecular modeling studies showed that euphodenoidin I adopts preferentially an *exo*-type conformation.²⁷ The observation of a small ³J_{H-4/H-5} value together with ROE effects between H-4/H-7 and H-5/H-8 showed that compound **11** displayed also an *exo*-type conformation.

The same general approach was used to elucidate the structures of jatrophane esters **3**, **8**, and **10**. Their spectrometric and spectroscopic data are indicated in the Experimental Section and in Tables 1 and 2. Compounds **3**, **8**, and **10** possess the same jatrophane skeleton as compound **11** but differ in acylation pattern. The acylation patterns were solved using HMBC and ROESY experiments (Figures S10/S11, S32/S33, S38/S39, Supporting Information). The coupling constants and ROESY correlations of compounds **3**, **8**, **10**, and **11** were all similar, indicating that they all have the same relative

Table 2. ^{13}C NMR Data for Jatrophane Esters **3**, **8** (125 MHz), **10** (75 MHz), and **11** (150 MHz) (CDCl_3 at 300 K, δ_{C} in ppm)

pos	3	8	10	11
1	52.1	51.6	51.5	51.6
2	79.9	89.2	90.1	90.2
3	80.7	77.2	78.5	78.4
4	48.3	48.0	47.9	48.0
5	68.8	67.4	69.4	69.6
6	144.7	144.9	144.2	144.0
7	69.5	67.8	68.6	70.2
8	70.4	70.9	70.7	69.8
9	80.4	80.4	80.5	86.6
10	41.0	40.9	40.9	40.2
11	137.4	138.0	137.9	137.6
12	129.9	129.6	129.6	129.5
13	43.8	44.2	44.3	44.3
14	213.3	212.1	211.8	211.9
15	88.6	87.8	88.4	88.8
16	23.3	20.9	20.6	20.9
17	112.5	112.8	112.7	112.2
18	26.2	26.4	26.4	27.0
19	23.1	23.6	23.4	23.5
20	19.9	19.6	20.2	20.0
OR ₁ -2	H	Ac	Ac	Ac
		170.5	170.7	170.8
		22.6	22.8	22.8
OR ₂ -3	Bz	Bz	H	H
1	165.7	165.2		
2/6	130.0	130.3		
3/5	128.9	128.5		
4	134.0	133.8		
OR ₃ -5	H	iBu	Bz	Bz
1		175.6	165.0	165.4
2/6		33.9	130.0	129.9
3/5		18.6	128.9	128.7
4		18.5	133.3	133.4
OR ₄ -7	Bz	iBu	Bz	Bz
1	165.6	175.8	164.8	164.8
2/6	129.9	34.0	129.8	129.7
3/5	128.6	18.8	128.6	128.9
4	133.2	18.5	133.0	133.8
OR ₅ -8	Ac	Ac	Ac	H
	170.4	170.0	170.2	
	20.9	20.7	20.9	
OAc-9				
	169.9	169.8	170.0	173.1
	20.6	20.1	20.5	20.6

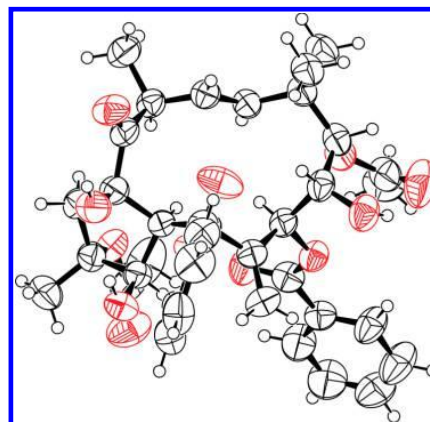


Figure 2. ORTEP view of the X-ray structure of compound **11**.

and **11** (Figures S48 and S49, Supporting Information) have been established by single-crystal X-ray diffraction analysis, it can be proposed that jatrophane esters **3**, **8**, and **10** all have the same absolute configuration.

The HRESIMS data of compound **5** showed a protonated molecular ion at m/z 771.3592 $[\text{M} + \text{H}]^+$ suggesting a molecular formula of $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{O}_{14}$ (calcd 770.3514). The ^1H and ^{13}C NMR (300 K, CDCl_3 , Tables 3 and 4) data of compound **5** showed signals that are reminiscent of euphodendroidin structures (Figure S67, Supporting Information). However, the proton and carbon resonances of the exomethylene group (two singlets at ca. δ_{H} 5.0 and two carbon signals at ca. δ_{C} 110.0 and 144.0), of the two oxymethine groups at C-5 and C-7 (singlet at ca. δ_{H} 5.0 and carbon signals at ca. δ_{C} 70.0), and of the C-15 oxygenated tertiary carbon (at ca. δ_{C} 88.0) were missing when compared to the typical NMR spectra of jatrophane esters (Figure S13, Supporting Information). Only 32 carbons can be accounted for in the ^{13}C NMR spectrum. This observation led to the postulation that some signals might not be visible because of their broadness. Such phenomena could be caused by intra- or intermolecular chemical exchange or conformational exchange, inducing variation in the magnetic environment of nuclei between conformers and variation in conformational equilibrium.²⁸ Typical intermolecular exchange can include protonation/deprotonation equilibria of ionizable groups or an exchange process of labile protons with the solvent. Regarding intramolecular chemical exchange, keto-enol tautomerization and/or conformational equilibrium could be involved. As it has been indicated above, conformational studies on jatrophane esters showed that they can adopt an *endo*- or an *exo*-type conformation.^{25,27,29,30} NMR data of jatrophane esters obtained at room temperature were reported only for *exo*- or *endo*-type conformers undergoing fast equilibrium. In the present study, compound **5** displayed an unprecedented conformational behavior suggesting a slower interconformational exchange rate. To explore this hypothesis, compound **5** was subjected to 1D and 2D NMR experiments at 227 K in CDCl_3 by using an NMR instrument equipped with a cooling device. Under these conditions, ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound **5** showed that all signals were duplicated (Figures S14 and S15, Supporting Information). In addition, signals attributed to the exomethylene and oxymethine groups were clearly observable (also duplicated). Taking into account that the keto carbonyl signal was duplicated, it was deduced

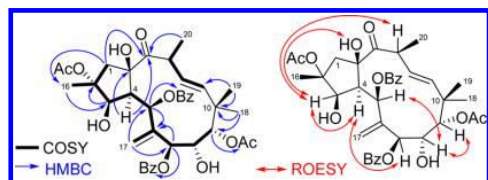


Figure 1. Key COSY (bold, left), HMBC (blue arrows, left), and ROESY (red arrows, right) correlations of compound **11**.

configuration and adopt preferentially the *exo*-type conformation. On the basis of biogenetic considerations¹² and taking into account that the absolute configurations of compounds **1**

Table 3. ^1H NMR Data for Euphodendroids K (5) and L (6) at 300 K (500 MHz in CDCl_3) and for Conformers A and B at 227 K (600 MHz in CDCl_3 , δ_{H} in ppm, J in Hz)

pos	euphodendroidin K (5)			euphodendroidin L (6)		
	5 (300 K)	5A	5B	6 (300 K)	6A	6B
1 α	2.99, d (15.5)	2.83, d (15.0)	3.02, d (15.7)	2.92, d (15.5)	2.80, d (15.0)	2.99, d (15.0)
1 β	2.04, d (15.5)	2.02, d (15.0)	2.07, d (15.7)	2.06, d (15.5)	2.01, d (15.0)	2.07, d (15.0)
3	5.73, d (4.5)	5.71, d (4.2)	5.58, br d (4.0)	5.73, d (4.5)	5.69, br d (4.4)	5.54, br d (3.4)
4	3.63, m	3.43, br d (4.2)	3.83, dd (10.8, 4.0)	3.59, m	3.36, br d (4.1)	3.82, dd (11.1, 3.4)
5	n.o. ^a	5.27, br s	5.79, d (10.8)	n.o.	5.18, br s	5.83 d (11.1)
7	n.o.	5.65, br s	6.39, br s	n.o.	5.65, br s	6.37, br s
8	5.11, br s	5.02, br s	5.04, br s	5.11, br s	4.97, br s	5.02, br s
9	4.95, br s	4.93, br s	4.84, br s	4.95, br s	4.91, br s	4.82, br s
11	5.95, d (15.9)	6.00, d (14.8)	5.83, d (15.0)	5.95, d (15.9)	5.96, d (15.4)	5.80, d (15.4)
12	5.53, dd (15.9, 9.5)	5.46, dd (14.8, 10.4)	5.46, dd (15.0, 10.6)	5.51, dd (15.9, 9.5)	5.43, dd (15.4, 8.3)	5.43, dd (15.4, 8.3)
13	3.86, dq (9.5, 6.8)	3.85, dq (10.4, 6.0)	3.68, dq (10.6, 5.6)	3.84, dq (9.5, 6.8)	3.81, dq (8.3, 6.6)	3.66, dq (8.3, 6.6)
16	1.55, br s	1.50, br s	1.50, br s	1.55, s	1.50, br s	1.50, br s
17a	n.o.	5.09, br s	4.97, br s	n.o.	5.08, br s	5.39, br s
17b	n.o.	4.86, br s	5.43, br s	n.o.	4.87, br s	4.94, br s
18	0.90, s	0.86, s	0.83, s	0.90, s	0.83, s	0.84, s
19	1.28, s	1.26, s	1.21, s	1.27, s	1.22, s	1.18, s
20	1.29, d (6.8)	1.23, d (6.0)	1.29, d (5.6)	1.29, d (6.8)	1.22, d (6.6)	1.27, d (6.6)
OAc-2	2.17, s	2.32, s	2.25, s	2.26, s	2.24, s	2.10, s
OR ₂ -3	-iBu	-iBu	-iBu	-Ac	-Ac	-Ac
	2.55, hept (7.0)	2.58, hept (6.9)	2.46, hept (7.0)	2.05, s	2.08, s	2.05, s
	1.17, d (7.0)	1.11, d (6.9)	1.16, d (7.0)			
	1.12, d (7.0)	1.09, d (6.9)	1.14, d (7.0)			
OiBu-5	n.o.	2.46, hept (7.0)	1.37, hept (7.0)	n.o.	2.44, hept (6.2)	1.36, hept (6.2)
	n.o.	1.08, d (7.0)	0.53, d (7.0)	1.00, br d (7.0)	1.10, d (6.2)	0.53, d (6.2)
	n.o.	1.01, d (7.0)	0.54, d (7.0)	0.96, br d (7.0)	1.07, d (6.2)	0.49, d (6.2)
OBz-7	8.06, d (7.6)	8.03, d (6.9)	8.03, d (7.0)	8.06, d (7.4)	8.01, d (6.8)	7.55, d (6.8)
	7.44, t (7.6)	7.44, t (6.9)	7.40, d (7.0)	7.44, t (7.4)	7.39, t (6.8)	7.42, t (6.8)
	7.58, t (7.6)	7.58, t (6.9)	7.54, t (7.0)	7.57, t (7.4)	7.52, t (6.8)	7.42, t (6.8)
OAc-8	2.07, s	2.07, s	2.14, s	2.07, s	2.27, s	2.05, s
OAc-9	1.45, s	1.47, s	1.28, s	1.45, s	1.94, s	1.43, s
OH-15	n.o.	4.08, br s	4.43, br s	n.o.	4.19, br s	4.48, br s

^an.o.: signals not observed at 300 K.

that compound **5** does not undergo keto–enol tautomerism. Such a duplication phenomenon had been reported previously for esulatin F, for which ^1H NMR spectra were acquired by gradually decreasing the temperature from 260 K, leading to a slower interconformational exchange rate.²⁹ However, in the ^1H NMR spectrum of esulatin F recorded in CDCl_3 at room temperature, the signals of the C-3/C-7 moiety including the exomethylene group were clearly observable although broader, which is not the case for compound **5**.

Through a detailed 1D and 2D NMR spectroscopic data analysis performed at 227 K in CDCl_3 (Tables 3 and 4), it was established that compound **5** was observed as a mixture of two conformers (**5A** and **5B**) of a hexa-esterified 3,5,7,8,9,15-heptahydroxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (euphodendroidin scaffold). The duplicated signals in its ^1H NMR spectrum obtained at 227 K in CDCl_3 (Figure S14, Supporting Information) were well resolved and could be readily integrated separately with a 1:1 ratio, indicating that both conformers possess similar internal energies. The structure of euphodendroidin K (**5**) differs from the structure of compound **4** by the presence of an additional isobutyryloxy group at C-3 instead of a hydroxy group in the structure of compound **4**. On the basis of the analysis of the coupling constant pattern observed in the ^1H NMR spectrum and ROESY correlations for both **5A/5B**, the configurations of the stereocenters of **5** were found to be

identical to all other euphodendroidin derivatives. An extended discussion on the conformation exchange observed is presented in the Supporting Information.

Compound **6** possessed a similar conformational behavior, and its structural elucidation required the same methodology. The structure of compound **6** (euphodendroidin L) differs from the structure of **5** by the presence of an acetoxy group at C-3 instead of an isobutyryloxy group for **5**. In the ^1H NMR spectrum of compound **6** recorded in CDCl_3 at 227 K (Figure S22, Supporting Information), a conformer ratio of 7:3 (**6A/6B**) was observed, suggesting that the *exo*-type conformer of **6** was slightly more stable than for **5**.

Compounds **5** and **6** shared similar NMR features, such as (i) the lack of proton and carbon NMR resonance frequencies of the C-5–C-6(C-17)–C-7 fragment, observed in ^1H and ^{13}C NMR spectra recorded at 300 K in CDCl_3 , and (ii) large variations in the ^1H and ^{13}C chemical shifts observed between conformers A and B for protons and carbons of the same fragment and the OiBu-5 group, and H-3 and H-4 in the NMR spectra performed at 227 K in CDCl_3 (Tables 3 and 4). The strong variations in anisotropic effects observed between conformers A and B are probably due to changes in the magnetic environment of these atoms in relation to the nearby C-7 benzoate group. Yet, the ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts appeared to be relatively constant for all other atoms,

Table 4. ^{13}C NMR Data for Euphodendroidins **5** and **6** at 300 K (125 MHz in CDCl_3) and for Conformers **A** and **B** at 227 K (150 MHz in CDCl_3 , δ_{C} in ppm)

pos	5			6		
	5 (300 K)	5A	5B	6 (300 K)	6A	6B
1	51.0	50.5	50.0	50.8	50.4	50.0
2	88.8	87.6	87.9	88.8	87.3	84.2
3	78.1	77.5	78.2	78.3	77.5	72.7
4	47.5	47.4	46.4	47.6	47.4	46.4
5	n.o. ^a	67.1	72.9	n.o.	67.0	78.8
6	n.o.	143.9	136.8	n.o.	143.7	137.5
7	n.o.	68.0	66.2	n.o.	67.9	66.2
8	70.5	70.2	69.5	70.5	70.1	69.4
9	80.9	80.0	81.4	80.8	79.9	81.3
10	40.6	40.5	40.0	40.6	40.5	39.9
11	137.3	137.4	135.9	137.4	136.9	136.0
12	129.7	129.2	129.0	129.6	128.9	129.2
13	44.0	44.0	43.6	44.0	43.8	43.6
14	211.2	212.0	213.6	212.4	211.9	213.4
15	n.o.	88.9	84.0	n.o.	88.5	87.9
16	n.o.	18.7	20.7	20.1	20.3	20.5
17	n.o.	111.8	123.8	n.o.	112.0	123.6
18	25.9	26.1	24.8	25.9	26.0	24.8
19	23.6	23.1	23.6	23.6	23.1	23.5
20	20.5	20.2	20.5	20.7	20.2	20.6
OAc-2						
	170.3	171.0	170.7	170.3	170.7	170.7
	22.6	22.8	22.8	22.6	22.7	21.0
OR ₂ -3	—iBu	—iBu	—iBu	—Ac	—Ac	—Ac
1	175.7	176.2	175.8	169.8	169.9	170.3
2	34.3	34.1	33.9	21.3	21.5	21.2
3	19.4	18.7	19.6			
4	18.8	18.4	18.9			
OiBu-5						
1	n.o.	175.6	175.5	175.4	175.2	175.9
2	n.o.	33.8	33.3	n.o.	33.9	33.3
3	n.o.	18.6	18.5	18.9	18.6	18.6
4	n.o.	19.2	18.1	18.7	18.9	18.3
OBz-7						
1	165.0	164.5	165.3	165.0	164.5	165.3
2/6	129.9	130.3	129.6	129.9	129.6	129.1
3/5	128.8	128.8	128.7	128.8	128.8	128.7
4	133.6	133.9	133.6	133.6	133.7	133.6
OAc-8						
	170.2	170.4	170.3	170.2	170.5	170.9
	21.0	21.0	21.6	20.9	22.7	21.8
OAc-9						
	170.2	170.4	170.8	169.2	170.3	170.6
	20.2	20.7	22.0	20.5	21.4	20.2

^an.o.: signals not observed at 300 K.

suggesting only partial modification of the magnetic environment between the conformers. Moreover, comparison of $^3J_{\text{H-4/H-5}}$ coupling constants of conformers **A** and **B** of compounds **5** and **6** suggested an important modification of the dihedral angle between H-4 and H-5. Indeed, homonuclear vicinal coupling constants $^3J_{\text{H-4/H-5}}$ for **5A** (1–2 Hz) indicated an orthogonal disposition, whereas a large $^3J_{\text{H-4/H-5}}$ value (10.8 Hz) for **5B** indicated an *anti*-arrangement. A similar feature was observed for **6A** ($^3J_{\text{H-4/H-5}} = 0\text{--}2$ Hz) and **6B** ($^3J_{\text{H-4/H-5}} = 8.8$ Hz).

The *exo*- and *endo*-type conformations of the jatrophane-6(17),11-diene skeleton are related to the presence of double bonds, carbonyl group(s), the five-membered ring, and predominantly the spatial orientation of the various ester substituents.^{25,27,30,31} The coupling constant between H-4 and H-5 has been considered to be a good indicator to establish the spatial arrangement of the exocyclic methylene group in various jatrophane esters.^{25,30} Small coupling constants $^3J_{\text{H-4/H-5}}$ for conformers **5A** and **6A** would advocate for an *exo*-type conformation, whereas large coupling constants $^3J_{\text{H-4/H-5}}$ for conformers **5B** and **6B** could indicate an *endo*-type conformation. ROESY or NOESY correlations may also be used to deduce the preferential conformer of the jatrophane ester. However, examination of ROESY spectra in CDCl_3 at 227 K of compounds **5** and **6** showed that ROE correlations were similar for both conformers (**5A/5B** and **6A/6B**) and thus were not discriminating (Figures S19 and S27, Supporting Information).

To further investigate the conformational behavior of representative compounds from this series, compounds **1**, **5**, and **6** were selected to undertake molecular modeling studies. Indeed, **1** and **6** differ only by the presence of an additional acetoxy substituent at C-2 in **6** and showed different NMR behaviors. In addition, suitable crystals of compound **1** were obtained, allowing an X-ray diffraction analysis. The results of this analysis showed that **1** preferentially adopts an *endo*-type conformation in the crystal state, while an *exo*-type conformation was observed in solution. The crystal structure of compound **1** was selected as a model of *endo*-type conformation for the conformational study of these euphodendroidins (Figure S49, Supporting Information). Conformational search calculations followed by geometry optimization showed that compounds **1**, **5**, and **6** may adopt two preferential conformations (Figures 3 and 4, and Figure S52, Supporting Information), which are in agreement with the *exo*- and *endo*-type described in previous conformational studies on similar jatrophane esters.^{25,27,30} Conformers **1A**, **5A**, and **6A** corresponded to *exo*-type conformers, whereas **1B**, **5B**, and **6B** to *endo*-type conformers. In all cases, *exo*-type conformers were found to be more stable than their *endo*-type counterparts, with relative energy differences ranging from 0.1 to 1.0 kcal/mol (Figure S52, Supporting Information).

To further characterize the interconversion between conformers **A** and **B**, the corresponding transition states (TSs) were calculated (Figure S52, Supporting Information). The activation barriers obtained for conformer interconversions are slightly higher for **5A/5B** (11.6 kcal/mol) and **6A/6B** (12.5 kcal/mol) compared with **1A/1B** (10.3 kcal/mol), which is in agreement with a slower conformational exchange rate determined in the first two cases. As no particular direct intramolecular interaction between substituents could be evidenced to explain this unexpected behavior, differences in conformer interconversion rates are probably due to subtle changes in the rigidity of the ring system induced by the particular combination of the C-2 and C-3 substituents, as shown by small differences in predicted energy barriers.

The 3D structures of conformers predicted by molecular modeling were in good agreement with NMR data. The calculated *endo*- and *exo*-type conformers of compound **6** were consistent with the coupling constants for **6A** ($^3J_{\text{H-4/H-5}} = 0\text{--}2$ Hz) and for **6B** ($^3J_{\text{H-4/H-5}} = 8.8$ Hz). Furthermore, the important variation in chemical shifts of atoms of the C-5–C-6(C-17)–C-7–C-8 fragment and the OiBu-5 group observed

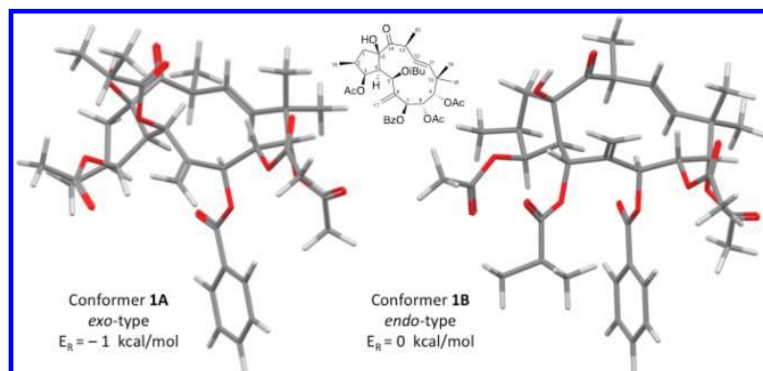


Figure 3. Calculated conformers for euphodendroidin E (1): *exo*-type (1A, left) and *endo*-type (1B, right).

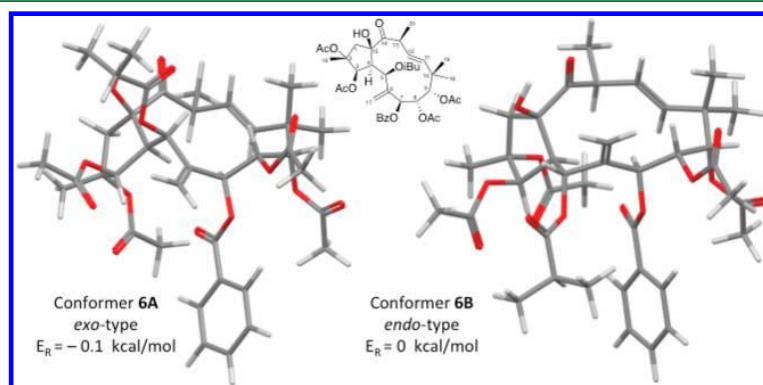


Figure 4. Calculated conformers for euphodendroidin L (6): *exo*-type (6A, left) and *endo*-type (6B, right).

in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of **6A** and **6B** may be explained by the relative position of the C-5 isobutyryloxy group inducing an overall conformational change. Considering conformer **6A**, the OiBu-5 group is above the mean plane of the macrocycle, whereas for conformer **6B**, the OiBu-5 group is beneath the mean plane of the macrocycle, in close proximity to the OBz group. This difference explained the strong anisotropic deshielding effect observed for the OiBu-5 group in conformer **6B** when compared to **6A**. To confirm the above interpretations, ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts and ^1H – ^1H coupling constants were determined by using DFT quantum calculations based on the protocol described by Tantillo and colleagues.³² The summary of these DFT-NMR calculations and their comparisons with experimental values is presented in Tables S54 and S55 in the [Supporting Information](#), and correlation coefficients are indicated in [Table 5](#). These results indicated that the molecular models calculated for **5A/5B** and **6A/6B** were consistent with the observed conformers. Furthermore, calculated ^1H NMR coupling constant (J_{calc}) values were consistent with experimental values (J_{exp}) ([Table S56](#), [Supporting Information](#)).

Compounds **5** and **6** are the first examples of jatrophane esters displaying such unusual conformational behavior at 300 K. The conformational aspects of these flexible compounds were not systematically examined in papers describing their structural elucidation.³⁰ Nonetheless, a preferential conformation of the *exo*-type was found more frequently than the *endo*-type.^{1,3} Concerning euphodendroids and euphodendrophanes, they were found to adopt an *exo*-type conforma-

Table 5. Statistical Parameters Determined from Comparisons of DFT-NMR Chemical Shift Calculations (δ_{calc}) with Experimental Values (δ_{exp}) for Conformers A and B of Euphodendroids K (**5**) and L (**6**)^a

	5A	5B	6A	6B
	δ_{exp} vs δ_{calc} (^1H NMR)			
r	0.997	0.994	0.996	0.992
r^2	0.993	0.989	0.993	0.985
MAE	0.14	0.18	0.15	0.22
MaxErr	0.42	0.88	0.42	0.86
CMAE	0.13	0.17	0.15	0.23
CMaxErr	0.38	0.87	0.42	0.87
	δ_{exp} vs δ_{calc} (^{13}C NMR)			
r	0.999	0.998	0.998	0.998
r^2	0.997	0.997	0.997	0.996
MAE	2.72	3.14	2.89	3.12
MaxErr	7.9	7.25	8.32	11.06
CMAE	2.69	3.12	2.86	3.1
CMaxErr	7.8	7.21	8.25	10.99

^a 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.

tion.^{19,21} Amygdaloidins²⁷ are one of the few examples^{23,33} of jatrophane esters displaying mainly an *endo*-type conformation in solution. Their structures differ mainly from euphodendroids K and L (**5** and **6**) by the presence of an OH-13

group, which can form an intramolecular hydrogen bond with OH-15 due to their spatial proximity.²⁷

Structure–conformation relationships confirmed the prominent role of the acylation pattern in governing the conformational behavior of euphodendroids, and an extended discussion is available in the Supporting Information. Other phenomena, such as intermolecular interaction with the solvent,^{27,29,34} could also influence the molecular constraints of these diterpenoid conformers and their exchange rate. Thus, to explore this aspect, compound **6** was analyzed in pyridine-*d*₅ at various temperatures. The results, which showed that **6** underwent a faster exchange rate in pyridine-*d*₅ than in CDCl₃ at 303 K (Figure S53, Supporting Information), are discussed in the Supporting Information.

Since compounds **1–15** are structurally related to jatrophone esters with proven anti-CHIKV activity,¹⁰ they were evaluated in a CHIKV virus-cell-based assay using the methodology described previously. The results (Figure S66, Supporting Information) showed that compounds **7** and **14** exhibited anti-CHIKV activities with EC₅₀ values of 5.5 ± 1.7 and 15.0 ± 3.8 μM, respectively, and caused a significant antimetabolic effect only at concentrations of 17.7 ± 8.4 and 36 ± 3.1 μM, allowing the calculation of selectivity index (SI) of 3.2 and 2.4, respectively. Other compounds exhibited no or very weak antiviral activities, and compounds **9–11** showed moderate antimetabolic effects on Vero cells.

In conclusion, an efficient protocol based on liquid–liquid extraction and flash chromatography fractionations was used to concentrate and isolate diterpenoid esters from the latex of *E. dendroides*. The chemical investigation of the latex extract led to the isolation of 15 jatrophone esters (**1–15**), including six new compounds (**3**, **5**, **6**, **8**, **10**, and **11**), and nine known compounds, of which euphodendroidin F (**2**) was obtained in large amount. Thus, *E. dendroides* may be regarded as a unique source of jatrophone esters for further studies of their chemical reactivity and biological properties. Euphodendroids K and L (**5** and **6**) showed an unprecedented NMR behavior, which was extensively investigated by molecular modeling.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. See Supporting Information for details (S67).

Plant Material. The latex of *E. dendroides* was collected by L.-F.N. in August 2012 on 20 specimens at Ficaghjola Beach (Piana) in the western region of Corsica. Botanical identification was performed by L.-F.N., and a voucher specimen (LF-026) was deposited at the Herbarium of the University of Corsica (Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Corte).

Extraction and Isolation. Latex was collected from knife incisions on the main stem of *E. dendroides* and soaked on cotton pieces washed previously with *n*-heptane, EtOAc, and MeOH. Pieces of cotton were air-dried for 48 h, and solid–liquid extraction (3 × 500 mL) was performed to give an EtOAc extract (24 g) and a MeOH extract (2.4 g). Further liquid–liquid extraction of the EtOAc extract with pentane and MeCN gave two fractions (19.5 and 4.5 g, respectively). The MeCN fraction (4.5 g) was mixed with Celite (5 g) and subjected to flash chromatography on a prepacked silica column (GraceResolv 20–40 μm, 80 g). The column was eluted with *n*-heptane/EtOAc/MeOH (90:10:0 to 0:80:20 in 100 min), to afford 18 fractions. Analysis by ¹H NMR of fractions showed the presence of jatrophone esters in fractions F9–F14. These were selected for further separation by reversed-phase semipreparative HPLC. See Supporting Information for purification details of **1–15** (S67).

HPLC-HRMSⁿ Analysis. 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. See Supporting Information for experimental details (S67). The LC-MSⁿ analysis of the MeCN latex extract, the fractions of *E. dendroides*, and the reference MS/MS spectra were deposited on GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>), under the reference MassIVE MSV000079385.

Euphodendroidin J, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-8,9-Diacetoxy-2,5,15-trihydroxy-3,7-dibenzoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (**3**): amorphous powder; [α]_D²⁵ +54 (c 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 200 (3.80), 232 (3.53); for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 693.2910 [M + H]⁺ (calcd for C₃₈H₄₅O₁₂, 693.2911).

Euphodendroidin K, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-2,8,9-Triacetoxy-15-hydroxy-7-benzoyloxy-3,5-diisobutyroyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (**5**): amorphous powder; [α]_D²⁵ +60 (c 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 275 (4.29), 282 (4.23) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 3 and 4; HRESIMS *m/z* 793.3412 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₁H₅₅O₁₄Na, 793.3411).

Euphodendroidin L, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-2,3,8,9-Tetracetoxy-15-hydroxy-7-benzoyloxy-5-isobutyroyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (**6**): amorphous powder; [α]_D²⁵ +19 (c 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 275 (4.17), 282 (4.10) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 3 and 4; HRESIMS *m/z* 765.3099 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₉H₅₀O₁₄Na, 765.3098).

Euphodendroidin M, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-2,8,9-Triacetoxy-15-hydroxy-3-benzoyloxy-5,7-diisobutyroyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (**8**): amorphous powder; [α]_D²⁵ +30 (c 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 201 (3.61) nm; IR ν_{max} 3455, 2974, 1733, 1452, 1372, 1319, 1224, 1152, 1111, 1038, 716 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 771.3593 [M + H]⁺ (calcd for C₄₁H₅₅O₁₄, 771.3592).

Euphodendroidin N, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-2,8,9-Triacetoxy-3,15-dihydroxy-5,7-dibenzoyloxy-4-oxojatropha-6(17),11E-diene (**10**): amorphous powder; [α]_D²⁵ +8 (c 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 274 (4.37), 282 (4.29) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 757.2832 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₀H₄₆O₁₃Na, 757.2836).

Euphodendroidin O, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-2,9-Diacetoxy-3,8,15-trihydroxy-5,7-dibenzoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (**11**): colorless crystals; mp 265–270 °C; [α]_D²⁵ +65 (c 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 200 (3.73), 229 (3.46) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 715.2729 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₈H₄₄O₁₂Na, 715.2730).

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 CMF optics and a Rapid II curved image plate. See S48 in the Supporting Information for crystal data of euphodendroidin O (**11**). Crystallographic data for **1**, **11**, and **15** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (deposit numbers CCDC 1036813–5). 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. Vero (African green monkey kidney) cells and the Chikungunya virus strain 899 were used in all the experiments. Serial dilutions of the initial plant extracts, fractions, or compounds, as well as the reference compound, chloroquine, were prepared in assay medium [MEM Reg3 (cat. no. 19993013; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL of 200 mM L-glutamine, and 5 mL of 7.5% sodium bicarbonate] and were added to empty wells of a 96-well microtiter plate (Falcon, BD). Subsequently, 50 μL of a 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 Reg3 supplemented with 10% FCS, 5 mL of L-glutamine, and 5 mL of NaHCO₃) at a ratio of 1:4 and grown for 7 days in 150 cm² tissue culture flasks (Techno Plastic Products). The assay plates were returned to the incubator for 6–7 days (37 °C, 5% CO₂, 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 μ 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 EC₅₀ (50% effective concentration, or concentration that is calculated to inhibit virus-induced cell death by 50%) and CC₅₀ (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.

Molecular Modeling. The conformational analysis was carried out using MacroModel v9.8, as implemented in the Schrödinger Suite.³⁵ Default values were used except for 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 geometries of all conformers were optimized in the gas phase using the Gaussian 09 package³⁶ with Becke’s three-parameter hybrid exchange functional (B3LYP)^{37,38} 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 colleagues,^{32,39} using the Gaussian09 package.³⁶ The analysis of results was performed using an in-house-developed script. PDF3D files were generated using CACTVS Chemoinformatics Toolkit (www.xemistry.com). Statistical analysis was performed with the Excel Microsoft Office 2011 program (French, MacOS X), using =CORREL for Pearson product-moment calculation (*r*). The results of DFT-NMR had been statistically compared to NMR data by linear regression analysis of the calculated chemical shifts (δ_{calcd}) vs the experimental ones (δ_{expt}).^{40,41} The results were 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). δ_{fit} is the chemical shift calculated from the linear fit. $\text{MAE} = (\sum_i |\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{expt}}|/n)$ and $\text{MaxErr} = \max(|\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{expt}}|)$. $\text{CMAE} = (\sum_i |\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{fit}}|/n)$, and $\text{CMaxErr} = \max(|\delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{fit}}|)$. $\delta_{\text{fit}} = (\delta_{\text{expt}} - a)/b$, 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.6b00644.

HRESIMS data, ¹H, ¹³C, and 2D NMR spectra for **3**, **5**, **6**, **8**, **10**, and **11**, except COSY spectra for **3**, **8**, and **10**; ORTEP views and a detailed discussion on X-ray structure determination for **1**, **11**, and **15**; PDF3D representations of conformers A and B and of the transition state for conformational interconversions, for compounds **1**, **5**, and **6** (PDF)

Crystallographic information files for **1**, **11**, and **15** (CIF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Tel: +33 1 69 82 30 94. Fax: +33 1 69 07 72 47. E-mail: bogdan.iorga@cnrs.fr.

*Tel: +33 1 69 82 30 85. Fax: +33 1 69 07 72 47. E-mail: marc.litaudon@cnrs.fr.

Author Contributions

¹M. Esposito and L.-F. Nothias contributed equally to this work.

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-LABEX-25-01). We are grateful to Dr. I. Schmitz-Afonso for LC/MS analysis.

■ REFERENCES

- (1) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4295–4327.
- (2) Mwine, J. T.; Van Damme, P. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 652–662.
- (3) Vasas, A.; Hohmann, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8579.
- (4) Ersvaer, E.; Kittang, A. O.; Hampson, P.; Sand, K.; Gjertsen, B. T.; Lord, J. M.; Bruserud, Ø. *Toxins* **2010**, *2*, 174–194.
- (5) Durán-Peña, M. J.; Ares, J. M. B.; Collado, I. G.; Hernández-Galán, R. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 940.
- (6) Corea, G.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 431–447.
- (7) Appendino, G.; Tron, G. C.; Cravotto, G.; Palmisano, G.; Jakupovic, J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 76–79.
- (8) Reis, M.; Ferreira, R. J.; Santos, M. M. M.; dos Santos, D. J. V. A.; Molnár, J.; Ferreira, M.-J. U. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 748–760.
- (9) Rinner, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 3197–3219.
- (10) Nothias-Scaglia, L.-F.; Retaillieu, 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) Nothias-Scaglia, L.-F.; Dumontet, V.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 202–209.
- (12) 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.
- (13) Smith, A. R.; Tutin, T. G. *Euphorbia L.; Flora Europaea*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1968.
- (14) Jeanmonod, D.; Gamsans, J. *Flora Corsica*, Edisud 921; Aix-En-Provence, 2007; Vol. 1.
- (15) Villanueva, J.; Quirós, L. M.; Castañón, S. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 689–695.
- (16) Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatela-Scafati, O.; Tron, G. C.; Appendino, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 71–78.
- (17) Kotaro, K. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1510–1530.
- (18) 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.
- (19) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatela-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3395–3402.
- (20) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatela-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5221–5227.
- (21) Aljančić, I. S.; Pešić, M.; Milosavljević, S. M.; Todorović, N. M.; Jadranić, M.; Milosavljević, G.; Povrenović, D.; Banković, J.; Tanić, N.; Marković, I. D.; Ruždijić, S.; Vajs, V. E.; Tešević, V. V. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1613–1620.
- (22) Pešić, M.; Banković, J.; Aljančić, I. S.; Todorović, N. M.; Jadranić, M.; Vajs, V. E.; Tešević, V. V.; Vučković, I.; Momčilović, M.; Marković, I. D.; Tanić, N.; Ruždijić, S. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 3165–3173.
- (23) Jadranić, M.; Pešić, M.; Aljančić, I. S.; Milosavljević, S. M.; Todorović, N. M.; Podolski-Renić, A.; Banković, J.; Tanić, N.

- Marković, I.; Vajs, V. E.; Tešević, V. V. *Phytochemistry* **2013**, *86*, 208–217.
- (24) Alberto Marco, J.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 137–140.
- (25) Alberto Marco, J.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J.; Jeske, F. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1621–1630.
- (26) Marco, J. A.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, *62*, 110–113.
- (27) Corea, G.; Fattorusso, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4485–4494.
- (28) Bain, A. D. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *43*, 63–103.
- (29) Günther, G.; Martinek, T.; Dombi, G.; Hohmann, J.; Vasas, A. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 365–370.
- (30) Jeske, F. *Naturstoffe aus Euphorbiaceen: Studien zum Konformativen Verhalten von Jatrophanen*; Techn. Univ. Berlin, 1996.
- (31) Appendino, G.; Jakupovic, S.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Milon, V.; Ballero, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 749–756.
- (32) Lodewyk, M. W.; Siebert, M. R.; Tantillo, D. J. *Chem. Rev.* **2011**, *112*, 1839–1862.
- (33) Jakupovic, J.; Jeske, F.; Morgenstern, T.; Tschritzis, F.; Marco, J. A.; Berendsohn, W. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1583–1600.
- (34) Bain, A. D. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *43*, 63–103.
- (35) *MacroModel* v. 9.1; Schrödinger LLC: New York, NY, USA.
- (36) 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.
- (37) Lee, Y. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 785–789.
- (38) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (39) CHESHIRE Chemical Shift Repository <http://cheshirenmr.info/> (accessed Sep 21, 2015).
- (40) Powder-George, Y.; Frank, J.; Ramsewak, R. S.; Reynolds, W. F. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 274–277.
- (41) Balacco, G. J. *Chem. Inf. Model.* **1996**, *36*, 885–887.

B. ARTICLE N°2

Les informations complémentaires sont disponibles à l'adresse internet suivante :

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00990>



Figure 40. Cyathium d'*Euphorbia dendroides*. Photo : M. L.

Evaluation of Jatrophone Esters from *Euphorbia* spp. as Modulators of *Candida albicans* Multidrug Transporters

Mélissa Esposito,^{†,‡,||} Shweta Nim,^{§,||} Louis-Félix Nothias,^{*,†,‡,‡} Jean-François Gallard,[†] Manpreet Kaur Rawal,^{†,§} Jean Costa,[‡] Fanny Roussi,[†] Rajendra Prasad,[§] Attilio Di Pietro,[⊥] Julien Paolini,[‡] and Marc Litaudon^{*,†,Ⓜ}

[†]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, ICSN UPR 2301, University of Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette, France

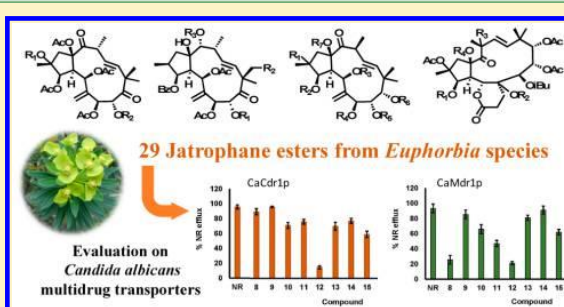
[‡]Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, CNRS, UMR SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France

[§]School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, 110067, New Delhi, India

[⊥]MMSB, UMR 5086 CNRS-University of Lyon, Institute of Protein Biology and Chemistry, 69367, Lyon, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Twenty-nine jatrophone esters (1–10, 12–30) and one lathyranone (11) diterpenoid ester isolated from *Euphorbia* species were evaluated for their capacity to inhibit drug-efflux activities of the primary ABC transporter CaCdr1p and the secondary MFS transporter CaMdr1p of *Candida albicans*, in yeast strains overexpressing the corresponding transporter. These diterpenoid esters were obtained from *Euphorbia semiperfoliata* (1–10), *E. insularis* (11), and *E. dendroides* (12–30) and included five new compounds, euphodendroidins P–T (26–30). The jatrophone esters 12 and 23 were found to inhibit the efflux of Nile Red (NR) mediated by the two multidrug transporters, at 85–64% for CaCdr1p and 79–65% for CaMdr1p. In contrast, compound 21 was selective for CaCdr1p and induced a strong inhibition (92%), whereas compound 8 was selective for CaMdr1p, with a 74% inhibition. It was demonstrated further that potency and selectivity are sensitive to the substitution pattern on the jatrophone skeleton. However, these compounds were not transported and showed no synergism with fluconazole cytotoxicity.



Over the past few years, the increasing number of immunodeficient patients exposed to morbid fungal infections while undergoing immunosuppressive therapy for cancer treatment or as transplant recipients constitutes a major therapeutic challenge. With the emergence of human immunodeficiency virus (HIV) infection associated with bacterial and fungal infections in the 1980s, resistance to drugs has become a major therapeutic issue. The currently available antifungal drugs are often ineffective against new or re-emerging fungi, or can induce a rapid development of resistance, and have undesirable side effects.¹ Consequently, the need for new antifungal agents is urgent. The morbidity and mortality induced by fungal infections are indeed significant, as generally caused by *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* species.^{2,3} *Candida albicans* accounts for approximately 50–60% of candidiasis, and its resistance to antifungals has increased considerably.⁴ Yeast infections by *Candida* species are usually preceded by harmless colonization of the gastrointestinal tract, skin, and mucosal surfaces.² ABC transporters are involved in the multidrug resistance (MDR) of human cancer cells,⁵ mainly through overexpression of P-glycoprotein (P-gp) and the breast cancer resistance protein ABCG2.⁶ Various human ABC transporter modulators, such as taxanes,

anthracyclines, camptothecins, and *Catharanthus* alkaloids, have been used in cancer chemotherapy for many years.⁷ In previous studies, CaCdr1p and CaCdr2p were identified as major antifungal-efflux transporters of *C. albicans* belonging to the class of ATP-binding cassette (ABC) proteins, together with the CaMdr1p transporter belonging to major facilitator superfamily (MFS).^{8–11} Modulators of MDR pump proteins in pathogenic yeasts have been scarcely identified and hence are only partly characterized. Potent modulators of the multidrug transporter CaCdr1p, such as the immunosuppressant FK520 and FK506, the sesquiterpene farnesol, the diarylheptanoid curcumin, and other compounds such as disulfiram, milbemycin, synthetic-D-octapeptides, cyclosporine, ibuprofen, and unarmicins, induce fungicidal synergism with the azoles and other drugs and have been displayed to prevent drug extrusion from the fungal cells.^{12,13}

Various diterpenoid esters from *Euphorbia* spp. were shown to be able to reverse resistance to cytotoxic drugs by modulating P-gp activity.^{14–17} In particular, jatrophone esters from *Euphorbia dendroides* restored paclitaxel and doxorubicin

Received: October 28, 2016

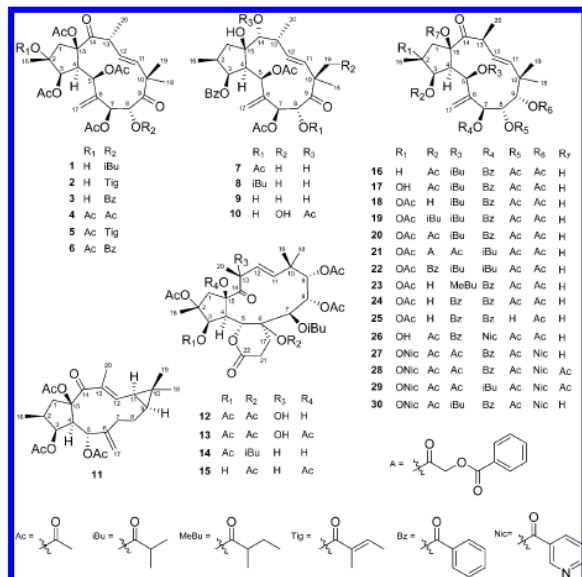
Published: January 20, 2017

cytotoxicity upon P-gp modulation in human drug-selected cancer cells overexpressing P-gp.^{18–21} Recently, jatrophone esters isolated from *E. squamosa* were found to constitute a new class of potent inhibitors of the CaCdr1p and CaMdr1p efflux pumps of *C. albicans*.²² These compounds showed promising efficiency to reverse the resistance to fluconazole of a multidrug-resistant strain of *C. albicans* by blocking the efflux of antifungal drugs. Similarly, some new macrocyclic diterpenes of the jatrophone and lathyrene types, from *Euphorbia* species, were reported to inhibit the drug efflux pumps of *C. albicans* by 4- to 8-fold, reducing the concentration of the antifungal azole in an azole-resistant clinical isolate.²³

In the present investigation, five new jatrophone esters, euphodendroidins P–T (26–30), were isolated from the latex extract of *Euphorbia dendroides* L. The structures of isolated compounds were elucidated based on NMR and MS data. All of these compounds displayed an unusual conformational behavior, involving slow or intermediate exchanges between two conformers as previously reported for other jatrophone esters.²⁴ The ability of these compounds and 24 other known compounds of two types previously isolated from the whole plant of *E. semiperfoliata* (1–10)^{25–27} and the latex of *E. dendroides* (12–25)^{24,28–32} and one lathyrene ester isolated from the latex of *E. insularis* (11)³³ to modulate drug efflux by multidrug transporters of *C. albicans* was assessed in a yeast strain overexpressing either the primary ABC transporter CaCdr1p or the secondary MFS transporter CaMdr1p.

RESULTS AND DISCUSSION

Compound Isolation and Structural Elucidation. In a previous study,²⁴ the diterpenoid ester-enriched MeCN extract



of *E. dendroides* latex was subjected to normal-phase chromatography to give 19 fractions, of which the ¹H NMR spectrum of fraction F17 showed signals attributable to the presence of a jatrophone ester bearing nicotinoyl ester groups (δ_{H} between 7 and 10 ppm) (Figure S1, Supporting Information). Subsequent preparative HPLC steps afforded euphodendroidins P–T (26–30). The structure elucidation steps of these compounds were performed via extensive NMR

and MS data analysis. In particular, it was observed that euphodendroidins P–T (26–30) displayed an atypical conformational behavior as was previously highlighted for euphodendroidins K and L (19 and 20),²⁴ suggesting a slow interconformational exchange rate between *exo* and *endo* type at ambient temperature.

Euphodendroidin T (30) was obtained as an amorphous and colorless solid. From HRESIMS analysis, the molecular formula C₄₇H₅₂N₂O₁₄ was deduced from the proton adduct at *m/z* 869.3506 [M + H]⁺, indicating 23 indices of hydrogen deficiency. The ¹H NMR spectrum of compound 30 showed broadened signals between C-5 and C-7 at 295 K in CDCl₃ (Figure S21, Supporting Information),²⁴ impeding further analysis. Thus, ¹H NMR spectra were measured at various temperature steps in pyridine-*d*₅ (Figure S22, Supporting Information), and a temperature of 343 K was selected for 2D NMR experiments. From its elemental formula and the ¹H and ¹³C NMR data recorded in pyridine-*d*₅ at 343 K (Tables 1 and 2), which were closely comparable to those of the known euphodendroidins K–O (19, 20, 22, 24, and 25), it was apparent that 30 has a similar structure. Analysis of the ¹³C and ¹H NMR data revealed the presence of one keto carbonyl and six ester carbonyl signals (δ_{C} 212.4, 175.8, 170.5, 170.2, 166.2, 165.3, and 165.1), which were assigned to two acetoxy groups (δ_{C} 170.5, 20.7 and 170.2, 21.4; δ_{H} 2.15 and 2.23), an isobutyrate group (δ_{C} 175.8, 34.7, 19.1, and 19.2; δ_{H} 2.49, 1.20, and 1.13), a benzoate group [δ_{C} 166.2, 130.3, 128.9, and 133.7; δ_{H} 8.01, 7.22, and 7.37], and two nicotinate groups [δ_{C} 165.3, 151.5, 154.2, 137.6, 124.0 and 165.1, 152.2, 154.5, 137.9, 124.2; δ_{H} 9.29, 8.66, 8.25, 7.21 and 9.96, 9.01, 8.82, 7.68]. The ¹J_{C–H} HSQC correlation studies and carbon chemical shifts of compound 30 indicated the presence of four methyl groups, a methylene group, five oxymethines, along with four olefinic signals attributable to a *trans*-disubstituted double bond, and a vicinal-disubstituted double bond. The absence of ¹J_{C–H} correlations in the HSQC spectrum supported the presence of a hydroxy group resonance at δ_{H} 5.39. Compound 30 corresponded to a monohydroxylated hexa-esterified macrocyclic oxojatrophone diterpenoid. Three spin systems (from H-3 to H-5, from H-6 to H-9, and from H-11 to H-20) were deduced from COSY correlations as depicted in Figure 1. The first system was characterized by two oxymethines [δ_{H} 6.50 (d, *J* = 5.2 Hz, H-3) and 6.18 (d, *J* = 4.7 Hz, H-5)] linked by the methine at δ_{H} 4.24 (dd, *J* = 5.2, 4.7 Hz, H-4). Two protons of the exomethylene group at δ_{H} 5.52 and 5.50 (H-17a and H-17b) were associated with two oxymethines, H-5 and one at δ_{H} 6.43 (br s, H-7), which was coupled to two adjacent oxymethine protons [δ_{H} 5.69 (br s, H-8) and 5.60 (br s, H-9)], allowing the two spin systems to be connected. The last system enclosed a *trans*-disubstituted double bond (C-11–C-12) connected to an allylic methine at δ_{H} 4.25 (dq, *J* = 9.3 and 6.6 Hz, H-13) linked to a methyl group at δ_{H} 1.36 (d, *J* = 6.6 Hz, H₃-20). The observation of cross-peaks to C-9 and C-11 in the HMBC spectrum showed the connectivity between two spin systems through a *gem*-dimethyl group CH₃-18 and CH₃-19 (δ_{H} 1.04, s and 1.47, s). HMBC correlations from H-1 to C-14 and C-16 and from H-3 to C-15 confirmed that compound 30 is a 14-oxojatrophone diterpenoid belonging to the 14-oxojatropha-6(17)-11*E*-diene ester series. The HMBC cross-peaks of oxymethine protons with ester carbonyl carbons permitted the attachment of acetoxy groups at C-3 and C-8, an isobutyrate group at C-5, a benzoate group at C-7, and a nicotinate group at C-9 (Figure 1). The deshielded carbon at

Table 1. ¹H NMR Data for Compounds **26** (CDCl₃ at 323 K), **28** and **29** (CDCl₃ at 300 K), **27** (Pyridine-*d*₅ at 333 K), and **30** (Pyridine-*d*₅ at 343 K) at 500 MHz (δ_H in ppm, *J* in Hz)

position	26	27	28	29	30
1α	2.42, d (14.9)	3.64, d (16.0)	3.73, d (17.6)	3.41, d (17.1)	3.61, d (15.5)
1β	2.02, d (14.9)	2.65, d (16.0)	2.71, d (17.6)	2.92, d (17.1)	2.63, d (15.5)
3	5.52, d (3.4)	6.41, d (4.0)	5.81, br s	5.88, d (4.2)	6.50, d (5.2)
4	3.92, t (3.4)	4.32, br s	3.96, br s	3.54, t (4.2)	4.24, dd (5.2, 4.7)
5	5.78, br s	6.31, br s	5.83, br s	5.45, br s	6.18, d (4.7)
7	6.03, br s	6.65, br s	6.28, br s	5.68, br s	6.43, br s
8	5.18, br s	5.67, br s	5.19, br s	5.14, br s	5.69, br s
9	4.95, br s	5.56, br s	5.07, br s	5.15, br s	5.60, br s
11	5.99, d (15.3)	6.07, d (15.7)	5.41, d (16.5)	5.73, d (15.7)	6.23, d (15.6)
12	5.53, dd (15.3, 10.6)	5.83, dd (15.7, 9.4)	5.55, dd (16.5, 9.5)	5.60, dd (15.7, 9.4)	5.88, dd (15.6, 9.3)
13	4.25, dq (10.6, 6.5)	4.11, dq (9.4, 7.6)	3.37, dq (9.5, 6.6)	3.60, dq (9.4, 6.6)	4.25, dq (9.3, 6.6)
16	1.36, s	1.99, s	1.71, br s	1.66, s	2.01, s
17a	5.27, br s	5.65, br s	5.35, br s	5.10, br s	5.52, br s
17b	5.22, br s	5.50, br s	5.13, br s	5.01, br s	5.50, br s
18	0.92, s	1.01, s	0.80, s	0.87, s	1.04, s
19	1.30, s	1.42, s	1.25, s	1.30, s	1.47, s
20	1.31, d (6.5)	1.35, d (6.7)	1.20, d (6.6)	1.21, d (6.6)	1.36, d (6.6)
R ₁ -2	—OH 4.30, br s	—ONic 10.04, br d (1.4) 9.04, dd (4.8, 1.4) 8.87, dt (7.9, 1.4) 7.76, dd (7.9, 4.8)	—ONic 8.88, d (2.8) 8.50, dd (5.3, 2.8) 8.15, d (6.5, 2.8) 7.21, m	—ONic 9.15, br s 8.83, br s 8.29, br t (7.6, 1.9) 7.47, br dd (7.6, 4.9)	—ONic 9.96, br s 9.01, dd (4.9, 1.8) 8.82, dt (7.8, 1.8) 7.68, dd (7.8, 4.9)
OAc-3	1.47, s	2.16, s	1.96, s	2.08, s	2.23, s
R ₃ -5	—OBz 7.98, d (7.2) 7.35, br t (7.2) 7.50, br t (7.2)	—OAc 1.65, br s	—OAc 1.88, br s	—OAc 2.12, br s	—OiBu 2.49, m 1.20, br d (7.0) 1.13, br d (7.0)
R ₄ -7	—ONic 9.09, br s 8.59, br s 8.05, br s 7.10, br m	—OBz 8.01, d (7.3) 7.21, br t (7.3) 7.35, br t (7.3)	—OBz 7.64, d (7.7) 7.14, t (7.7) 7.33, t (7.7)	—OiBu 1.90, m 0.88, d (6.5) 0.58, d (6.5)	—OBz 8.01, d (7.1) 7.22, br t (7.1) 7.37, br t (7.1)
OAc-8	1.97, s	2.16, s	2.20, s	2.06, s	2.15, s
R ₆ -9	—OAc 2.06, s	—ONic 9.31, d (1.5) 8.70, dd (4.7, 1.5) 8.32, dt (8.0, 1.5) 7.28, dd (8.0, 4.7)	—ONic 9.81, br d (1.9) 8.89, dd (5.1, 1.9) 8.75, dt (7.9, 1.9) 7.73, dd (7.9, 5.1)	—ONic 9.52, br s 8.88, br s 8.64, br dt (7.5, 2.1) 7.62, br dd (7.6, 4.6)	—ONic 9.29, d (1.7) 8.66, dd (4.7, 1.7) 8.25, dt (8.0, 1.7) 7.21, dd (8.0, 4.7)
R ₇ -15	—OH 5.50, br s	—OH 5.74, br s	—OAc 2.16, s	—OAc 2.01, s	—OH 5.39, br s

C-2 (δ_C 88.2) suggested that the remaining nicotinate group was located at C-2, and thus a hydroxy group at C-15 had to be assumed. The ROE cross-peaks between protons of the macrocyclic core and methyl groups and the small coupling constants at *J*_{H-4/H-5}, *J*_{H-7/H-8}, and *J*_{H-8/H-9}, suggesting an orthogonal relationship, permitted the relative configuration of the stereogenic centers to be assigned as depicted in Figure 1. Accordingly, euphodendroidin T (**30**) was assigned as (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,7*R*,8*R*,9*R*,13*S*,15*R*)-3,8-diacetoxy-7-benzoyloxy-15-hydroxy-5-isobutyryloxy-2,9-nicotinoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11*E*-diene.

The structural elucidation of compounds **26–29** was determined using the same approach as for euphodendroidin T (**30**). Euphodendroidin P (**26**) was assigned a molecular formula of C₃₉H₄₅NO₁₃ as deduced by HRESIMS analysis ([*M* + *H*]⁺ at *m/z* 736.2969), the same as euphodendroidin C.³² The 1D and 2D NMR spectroscopic data (300 K, CDCl₃) were closely comparable to those of euphodendroidin C,³² indicating

that **26** is also an euphodendroidin analogue. In particular, it can be observed that compound **26** and euphodendroidin C both possess the same ester groups, namely, three acetate groups, a benzoate group, and a nicotinate group. The locations of the acetoxy groups at C-3, C-8, and C-9 were deduced from HMBC correlations from H-3, H-8, and H-9 to their respective carbonyl ester groups. The locations of the nicotinate group at C-7 and the benzoate group at C-5 in compound **26**, opposite those of euphodendroidin C, were based on the different chemical shifts observed for CH-5 and CH-7 in compound **26** and euphodendroidin C (δ_{H/C} 5.78/70.9 and 6.04/68.3, and 5.68/68.7 and 5.83/69.9, respectively). Taking into account the remaining atoms from the molecular formula, it was established that the oxygenated tertiary carbons C-2 and C-15 are both hydroxylated, according to the deshielded ¹³C NMR resonances at δ_C 79.7 and 86.0, respectively.

The HRESIMS of euphodendroidin Q (**27**) showed a protonated molecular ion peak at *m/z* 841.3185 [*M* + *H*]⁺,

Table 2. ^{13}C NMR Data for Compounds **26** (CDCl_3 at 323 K), **28** and **29** (CDCl_3 at 300 K), **27** (Pyridine- d_5 at 333 K), and **30** (Pyridine- d_5 at 343 K) at 125 MHz (δ_{C} in ppm)

position	26	27	28	29	30
1	52.7	51.2	47.2	47.5	51.4
2	79.7	86.9	90.4	90.1	88.2
3	81.4	80.0	78.9	77.6	79.8
4	47.1	48.5	46.5	47.3	48.7
5	70.9	71.6	72.2	68.8	69.8
6	142.6	142.0	144.7	142.4	144.2
7	68.3	68.8	66.7	67.6	69.8
8	70.4	71.4	70.4	70.4	71.7
9	81.0	82.9	83.1	81.9	82.6
10	40.7	41.2	40.4	41.0	41.5
11	137.0	137.2	134.6	135.7	137.5
12	130.2	131.1	131.2	131.1	131.4
13	43.5	44.9	44.1	44.5	45.1
14	213.1	212.7	203.9	203.5	212.4
15	86.0	91.2	89.5	92.8	91.7
16	23.7	20.1	19.0	20.1	20.8
17	118.3	114.3	115.4	115.6	115.5
18	25.9	26.2	25.6	26.1	26.5
19	23.6	23.9	23.8	23.9	23.8
20	20.7	21.2	20.1	19.7	20.5
R ₁ -2	—OH	—ONic	—ONic	—ONic	—ONic
		165.2	164.0	163.8	165.1
		151.7	154.0	150.9	152.2
		154.2	151.8	153.7	154.5
		137.7	139.0	138.0	137.9
		124.0	123.8	124.0	124.2
OAc-3	170.3	170.3	169.3	169.2	170.2
	21.0	21.0	20.9	21.1	21.4
R ₃ -5	—OBz	—OAc	—OAc	—OAc	—OiBu
	165.5	169.5	169.6	169.7	175.8
	129.8	21.0	20.6	21.6	34.7
	129.9				19.1
	128.9				19.2
	133.8				
R ₄ -7	—ONic	—OBz	—OBz	—OiBu	—OBz
	164.0	166.4	165.7	176.0	166.2
	152.5	129.9	129.9	33.8	130.3
	150.5	128.9	128.4	18.7	128.9
	137.8	133.7	133.4	17.9	133.7
	123.3				
OAc-8	170.3	170.8	170.7	170.1	170.5
	21.3	21.1	21.5	20.9	20.7
R ₆ -9	—OAc	—ONic	—ONic	—ONic	—ONic
	170.1	165.2	164.1	164.1	165.3
	20.4	152.2	151.4	150.6	151.5
		154.8	149.8	152.7	154.2
		137.0	138	138.6	137.6
		124.3	124.0	124.0	124.0
R ₇ -15	—OH	—OH	—OAc	—OAc	—OH
			169.7	168.4	
			21.3	21.1	

corresponding to the molecular formula $\text{C}_{45}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_{14}$. Its NMR data were found to be closely comparable to those of compound **30**, but with an acetoxy group at C-5 in **27** instead of an isobutyrate group in compound **30**. Indeed, inspection of the ^1H NMR spectrum run at 333 K in pyridine- d_5 (the same solvent as used for compound **30**) revealed that the two

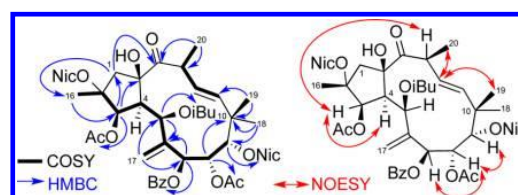


Figure 1. Key COSY (bold, left), HMBC (blue arrows, left), and ROESY (red arrows, right) correlations of compound **30**.

jatrophone esters **27** and **30** mainly differ in the signal resonances of H-5 and H-7 (Figure S30, Supporting Information). When compared to H-7 (δ_{H} 6.65), the upfield shift of H-5 (δ_{H} 6.21) allowed the acetoxy and benzoate groups to be located at C-5 and C-7, respectively, as reported in the literature.³⁴ The other esters were located at the same positions as in compound **30**.

The HRESIMS of euphodendroidin R (**28**) showed a protonated molecular ion peak at m/z 883.3285 $[\text{M} + \text{H}]^+$, corresponding to the molecular formula $\text{C}_{47}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{15}$. This formula and analysis of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data of **28** indicated the presence of an additional acetyl group when compared to compound **27**. This acetyl group was located at C-15 since a strong positive anisotropic effect on H-1 α and H-1 β was observed in the ^1H NMR spectrum of **28** when recorded in pyridine- d_5 at 333 K (Figure S31, Supporting Information).

The HRESIMS of euphodendroidin S (**29**) showed a protonated molecular ion at m/z 849.3436 $[\text{M} + \text{H}]^+$, corresponding to the molecular formula $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{15}$. Its ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data were closely comparable to those of jatrophone ester **28**, but with an isobutyrate group at C-7, instead of a benzoate group in compound **28**. The locations of two acetoxy groups at C-3 and C-8, an isobutyrate group at C-7, and a nicotinate group at C-9 were deduced from HMBC correlations, while the positions of two acetoxy groups at C-5 and C-15 were deduced from ROE correlations between the methyl protons and H-17 α and H-1 β , respectively. The last nicotinate group was placed at the remaining C-2 position.

Inhibition of *Candida albicans* Multidrug Transporters. The strategy used to assess the potency of *Euphorbia* extracts and diterpenoid esters (**1–30**) involved two consecutive bioassays. First, the plant extracts and diterpenoid esters were screened for inhibition of the multidrug transporters, CaCdr1p and CaMdr1p, of *C. albicans* using a *Saccharomyces cerevisiae* strain overexpressing either CaCdr1p or CaMdr1p that was deleted previously from its own multidrug transporters. In the second bioassay, the diterpenoid esters showing inhibition of the transporters were evaluated on a *C. albicans* MDR strain, by assessing their cytotoxicity along with their ability to sensitize yeast growth through synergistic interaction with fluconazole.

The EtOAc extract of the whole plant of *E. semiperfoliata* and the MeCN extract of the latex of *E. insularis* showed no inhibition on CaCdr1p (3.7% and 6.7%, respectively), but they inhibited CaMdr1p (55.4% and 42.5%, respectively). In contrast, the MeCN extract of the latex of *E. dendroides* exhibited a strong CaCdr1p inhibition (93%) but a low inhibition of CaMdr1p (24%). The evaluation of the 29 jatrophone esters (**1–10**, **12–30**) and lathyrene ester **11** showed that jatrophone ester **21** induced a strong Nile Red (NR) accumulation (92%) through inhibition of CaCdr1p-mediated efflux, and compound **8** inhibited the CaMdr1p-

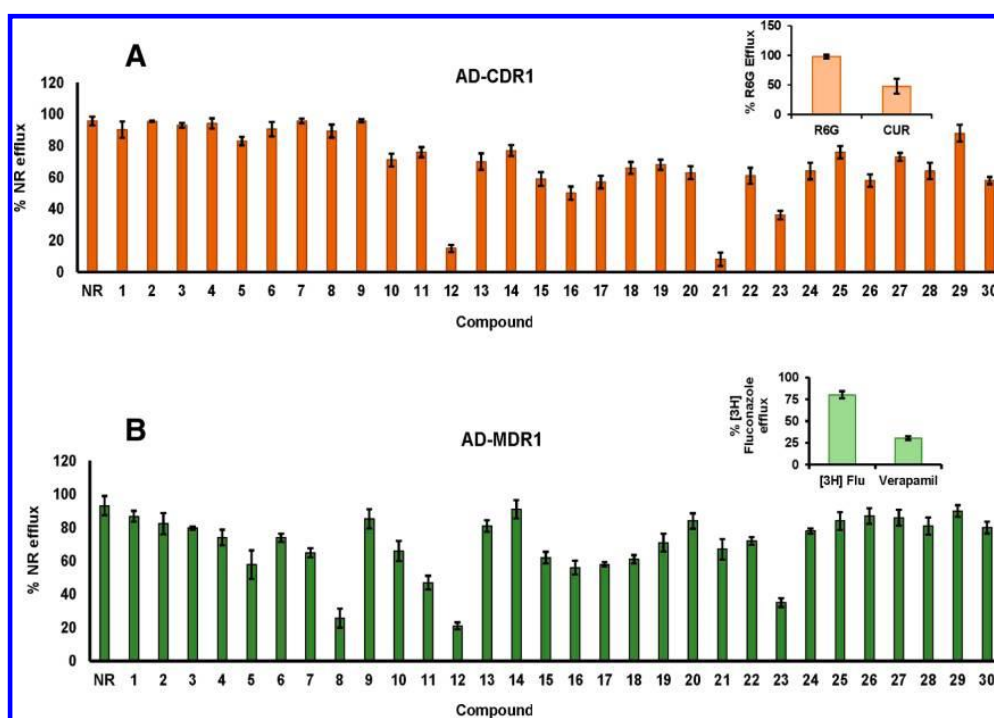


Figure 2. Effects of jatrophone esters compounds (1–30) on Nile Red efflux in *S. cerevisiae* cells overexpressing the *Candida albicans* transporter Cdr1p ABC transporter (AD-CDR1, panel A) or the Mdr1p MFS transporter (AD-MDR1, panel B). “NR” indicates the Nile Red efflux activity of the respective transporters in the absence of any inhibitor. A 7 μ M aliquot of NR was used as the substrate concentration, whereas each inhibitor was used at 10 \times concentration over the substrate (70 μ M). Inhibition of rhodamine 6G (R6G) efflux by 70 μ M curcumin (CUR) was taken as a positive control for Cdr1p inhibition, and inhibition of the efflux of [3 H]fluconazole ([3 H]Flu) by 90 μ M verapamil was taken as a positive control for CaMdr1p inhibition. Values are the means \pm standard deviations (error bars) for three independent experiments.

mediated efflux leading to 74% NR accumulation (Figure 2). Furthermore, the jatrophone esters 12 and 23 were able to inhibit both multidrug transporters, producing CaCdr1p-dependent 85% and 64% NR accumulation and CaMdr1p-dependent 79% and 65% NR accumulation, respectively. All other compounds produced no or only low inhibition.

Previous studies showed that hydrophobicity and an electron acceptor moiety are essential features for recognition of diterpene esters with P-gp multidrug transporters in human cancer cell lines.³⁵ To get an insight on structure–activity relationships, the chemical space of diterpenoid esters, classified into A to D groups [group A: esters of 9,14-dioxojatropha-6(17),11E-diene (1–6), group B: esters of 9-oxojatropha-6(17),11E-diene (7–10), group C: esters of 14-oxojatropha-6(17),11E-diene (16–30), and group D: esters of 17-bis-homojatrophone (12–15)], and the lathyrene ester (11) was plotted using ChemGPS-NP.³⁶ This tool calculates chemical properties of each compound using three principal components (PCs) referring to size and shape (PC1), aromatic- and conjugation-related properties (PC2), and hydrophobicity, polarity, and H-bond capacity (PC3). The results accounting for 84.9% of the data set variance (PC1: 50.4%, PC2: 24.5%, and PC3: 10.0%) (Figure 3) indicated that the modulation of CaMdr1p and CaCdr1p multidrug transporters in *S. cerevisiae* by 8, 12, 21, and 23 could not be explained by the hydrophobicity or by other chemical properties used in this PCA analysis. For instance, the bioactive compounds 8 and 23 on AD-MDR1 are plotted in the same chemical space (similar

chemical properties) as the inactive compounds 7 and 16–18. In a similar way, the two inhibitors 12 and 21 of AD-CDR1 were not included in the same cluster.

Since compound 8 differs from compounds 7 and 9 only by the acylation pattern on the jatrophone skeleton from group B, the presence of an isobutyrate group at C-8 in compound 8, instead of an acetoxy group or hydroxy group in compounds 7 and 9, respectively, appears to play an important role for a strong inhibition of the CaMdr1p multidrug transporter. Regarding jatrophone esters of group C, the comparison of compound 23 with compounds 18 and 24 indicated that the presence of a methylbutyrate group at C-5, instead of either an isobutyrate group or a benzoate group, respectively, had a significant contribution to the inhibition of CaCdr1p activity. Regarding group D, since compound 13 was much less active than compound 12, it can be deduced that the acetoxy group at C-15 was deleterious for inhibiting drug-efflux activities of both CaCdr1p and CaMdr1p transporters. Taking into account that macrocyclic jatrophone esters possess a complex conformational behavior depending on their esterification pattern,^{24,37} the present results led to the postulation that the modulation of CaMdr1p and CaCdr1p multidrug transporters by jatrophone esters could depend on their conformational characteristics.

The inhibition of cell growth was measured to probe the cytotoxicity of jatrophone ester compounds showing a significant modulation of CaMdr1p and/or CaCdr1p. Increasing concentrations of compounds 8, 12, 21, and 23 were tested against the control yeast cells (AD1-8u⁻) and transporter-

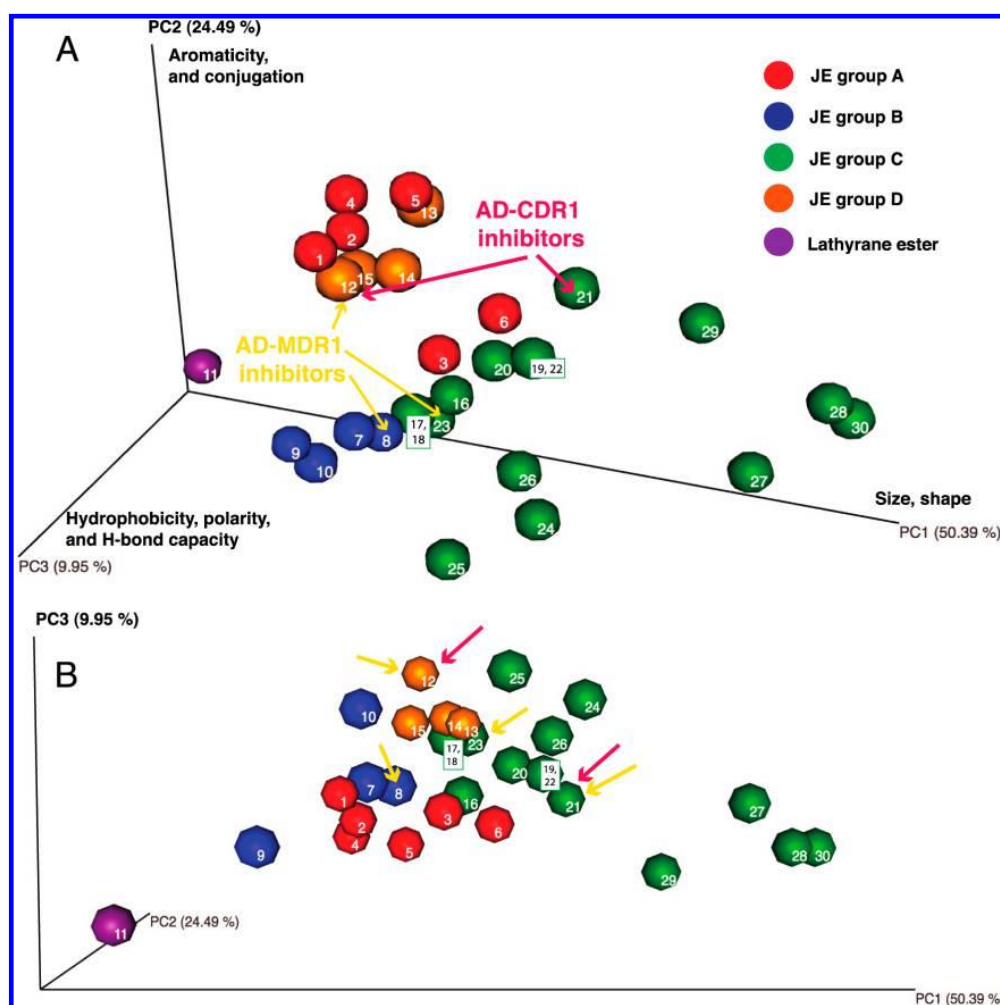


Figure 3. Principal component analysis of the chemical properties of compounds 1–30 using ChemGPS-NP.³⁶ Different views are presented in A and B. Principal component (PC) 1 is linked to size and shape (PC 1); PC 2 to aromatic- and conjugation-related properties; and PC 3 to hydrophobicity, polarity, and H-bond capacity.

Table 3. Cytotoxicity of the Best Inhibitors of the MDR Transporters Cdr1p and Mdr1p: Compounds 8, 12, 21, and 23^a

yeast strain	8		12		21		23	
	MIC ₈₀ (μM)	RI	MIC ₈₀ (μM)	RI	MIC ₈₀ (μM)	RI	MIC ₈₀ (μM)	RI
AD1-8u ⁻	792 ± 50	1	682 ± 23	1	324 ± 39	1	719 ± 32	1
AD-CDR1	710 ± 38	0.9	711 ± 41	1.04	416 ± 49	1.2	681 ± 46	0.9
AMDR1	679 ± 70	0.85	691 ± 39	1.01	411 ± 51	1.2	629 ± 49	0.87

^aThe MIC₈₀ values of the test compounds were determined by measuring the optical density at 600 nm of each strain in the absence and the presence of a range of concentrations of the different compounds. Yeast growth in the absence of inhibitor was considered as 100%, and the concentration where the growth was decreased by 80% was taken as MIC₈₀. The values are the means ± standard deviations of three independent experiments. The resistance index (RI) was calculated as the ratio between the MIC₈₀ values determined for the strain overexpressing the transporter relative to that of the control strain (AD1-8u⁻).

overexpressing cells (CaCDR1 and CaMDR1), which were exposed for 48 h. The results were shown as the concentrations causing 80% of cell growth inhibition (MIC₈₀) (Table 3). The different compounds displayed a low intrinsic cytotoxicity, with IC₈₀ values ranging from 324 ± 39 to 792 ± 50 μM for both sensitive control cells (AD1-8u⁻) and strains overexpressing CaCdr1p or CaMdr1p (Table 3), thus giving a minimal

resistance index (RI) of 1. This suggested that the compounds were not significantly transported by either of the two transporters.

The ability of the compounds showing potent inhibition of the MDR transporters Cdr1p and Mdr1p (8, 12, 21, and 23) to sensitize yeast growth to the antifungal agent fluconazole was evaluated by the checkerboard method.³⁸ The values

determined as fractional inhibitory index (FICI) were obtained when the control (AD1-8u⁻) cells and the CaCdr1p- and CaMdr1p-overexpressing cells were grown in the presence of fluconazole either alone or combined with the inhibitory compounds (Table 4). An FICI value of ≤0.5 indicates a

Table 4. Ability of Compounds 8, 12, 21, and 23 to Sensitize Yeast Growth to Fluconazole Cytotoxicity^a

strain	inhibitor	FIC of FLC (μM)	FIC of inhibitor (μM)	FICI
AD1-8u ⁻	8	1 (1.5/1.5)	1 (792/792)	2 (1 + 1)
	12	1 (1.5/1.5)	1 (682/682)	2 (1 + 1)
	21	1 (1.5/1.5)	1 (324/324)	2 (1 + 1)
	23	1 (1.5/1.5)	1 (719/719)	2 (1 + 1)
AD-CDR1	8	1 (209/209)	1 (710/710)	2 (1 + 1)
	12	1 (209/209)	1 (711/711)	2 (1 + 1)
	21	0.2 (39/209)	1 (416/416)	1.2 (0.2 + 1)
AD-MDR1	23	1 (209/209)	0.5 (340/681)	1.5 (1 + 0.5)
	8	1 (65/65)	1 (679/679)	2 (1 + 1)
	12	0.5 (32/65)	0.5 (345/691)	1 (0.5 + 0.5)
	21	1 (65/65)	1 (411/411)	2 (1 + 1)
AD-MDR1	23	1 (65/65)	1 (629/629)	2 (1 + 1)

^aThe ability to sensitize yeast growth was evaluated by the degree of synergistic interaction between the compound and fluconazole, using the checkerboard method. Values are expressed as the fractional inhibitory concentration (FIC) values in the μM range for the fluconazole (= MIC80 of fluconazole in combination/MIC80 of fluconazole alone) and each compound (= MIC80 of compound in combination/MIC80 of compound alone). An FIC index (FICI) value of ≤0.5 indicates synergistic interaction between the compound and fluconazole.

synergistic chemosensitization of the fungal growth by the evaluated compound and the fluconazole. The evaluation of compounds 8, 12, 21, and 23 indicated high FICI values (≥1 μM), revealing that, despite their ability to inhibit *C. albicans* MDR transporters expressed in yeast strains, they are not inducing sensitization to fluconazole of *C. albicans*-resistant strain growth.

Some recent results have shown that several jatrophone esters were found to be selective or dual inhibitors against the yeast MDR transporters CaCdr1p and CaMdr1p, but only deacetylserrulatin B and euphosquamosin C isolated from *E. squamosa* and euphomelliferene B and euphomelliferine obtained from *E. mellifera* were able to sensitize the *C. albicans* MDR strain to fluconazole.^{22,23} Despite an apparent close structural similarity of the jatrophone esters described in this study with the latter substance, no compound exhibited a similar biological activity profile, suggesting that the capacity of the inhibitors to sensitize yeast growth to the antifungal activity of fluconazole is highly dependent on the number, nature, and position of functional groups on the macrocyclic core.

Macrocyclic diterpene esters of the lathyrene and jatrophone types are considered as promising candidates for the development of P-gp modulators to tackle MDR human cancer cell lines.^{14–17} In particular, terracinolide J (14) and 13α-hydroxyterracinolide G (12) from group C and euphoden-droids A (18), B (23), and E (16) from group D were shown to be effective inhibitors against human P-gp and were able to significantly potentiate cancer cell lines to daunomycin.^{15,31,32} These results suggest that macrocyclic diterpenoid esters, which are able to reverse the MDR of cancer cell lines overexpressing P-gp transporters, are not necessarily capable of chemosensitiz-

ing *C. albicans* MDR strains (CaCDR1 and CaMDR1), revealing a possibly different binding mode.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. An MCP 300 Anton Paar polarimeter was used for optical rotation measurements at 24 °C in EtOH with the sodium D line using a monochromatic light source. IR spectra were recorded using a PerkinElmer Spectrum BX FT-IR system. The spectrophotometer Varian Cary 100 scan was used for recorded UV spectra, and samples were measured in a 1 cm quartz tank in EtOH. The 1D (¹H and ¹³C) and 2D (COSY, HSQC, HMBC, and ROESY) NMR spectra of compounds 26, 28, and 29 were recorded in CDCl₃ at 300 or 323 K and in pyridine-*d*₅ at 333 and 343 K, respectively, for compounds 27 and 30, on a Bruker Avance 500 MHz instrument. HPLC analyses were carried out on 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 using an analytical C₁₈ column (Kromasil, 250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, Thermo Scientific). Semipreparative HPLC separations were carried out on a Dionex system equipped with a sample manager (Gilson 215 liquid handler), a column fluidics organizer, a binary pump (Dionex HPG-3200BX), a UV-vis diode array detector (190–600 nm, Dionex UVD340U), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector, using a semipreparative C₁₈ column (Kromasil, 250 × 10 mm; i.d. 5 μm). LC-HRESIMS data were acquired on an Acquity Waters UPLC Waters system coupled with an LCT Premier XE time-of-flight mass spectrometer. This instrument was fitted with an ESI source operating in the positive-ion mode in the range *m/z* 80–1500. The UPLC system was also equipped with a Waters Acquity PDA detector. A BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) was used for HPLC analysis at a flow rate of 0.6 mL/min. Elution was conducted with a H₂O–CH₃CN + 0.1% formic acid gradient as follows: 95:5 to 0:100 in 5.5 min.

Plant Material, Extraction, and Isolation. Compounds 1–10 were isolated from *Euphorbia semiperfoliata* Viv. as previously described.²⁷ The latex from *Euphorbia insularis* Boiss. was collected and extracted using the methodology described previously,³⁹ leading to 400 mg of acetonitrile extract. The latter was further purified by flash chromatography (Grace, 12 g, SiO₂, *n*-heptanes–acetone–methanol gradient), affording 70 mg of the lathyrene ester 11 (fraction 3) and nine other fractions.

Compounds 12–25 were isolated from the latex extract of *Euphorbia dendroides* L. as previously described.²⁴ Compounds 26 (2.2 mg), 27 (3.0 mg), 28 (3.4 mg), 29 (3.5 mg), and 30 (12.4 mg) were obtained from fraction 17 (F17: 90 mg) by semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, gradient H₂O–CH₃CN + 0.1% formic acid, 40:60 to 30:70 in 20 min). An additional HPLC step using a PFP column with an elution gradient constituted of H₂O–CH₃CN + 0.1% formic acid, 50:50 to 0:100 in 30 min, was carried out for the purification of compounds 27 and 29 (*t*_R at 10.30 and 11.10 min, respectively).

Euphoden-droidin P (2R,3R,4S,5R,7R,8R,9R,13S,15R)-3,8,9-triacetoxy-5-benzyloxy-2,15-dihydroxy-7-nicotinoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (26): amorphous powder; [α]_D²⁵ +30.5 (c 2, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 264 (3.76), 226 (4.31) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 736.2969 [M + H]⁺ (calcd for C₃₉H₄₆NO₁₃, 736.2969).

Euphoden-droidin Q (2R,3R,4S,5R,7R,8R,9R,13S,15R)-3,5,8-triacetoxy-7-benzyloxy-15-hydroxy-2,9-dinicotinoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (27): amorphous powder; [α]_D²⁵ –21 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 256 (4.27), 250 (4.25), 225 (4.22) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 841.3185 [M + H]⁺ (calcd for C₄₅H₄₉N₅O₁₄, 841.3184).

Euphoden-droidin R (2R,3R,4S,5R,7R,8R,9R,13S,15R)-3,5,8,15-tetracetoxy-7-benzyloxy-2,9-dinicotinoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (28): amorphous powder; [α]_D²⁵ –24 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 264 (3.85), 224 (4.35) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 883.3285 [M + H]⁺ (calcd for C₄₇H₅₁N₅O₁₅, 883.3289).

Euphodendroidin S (2R,3R,4S,5R,7R,8R,9R,13S,15R)-3,5,8,15-tetracetoxy-7-isobutyroxyloxy-2,9-dinicotinoyloxy-14-oxojatropha-6-(17),11E-diene (**29**): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +1.5$ (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 263 (3.56), 220 (4.10) nm; for 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS m/z 849.3436 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{44}H_{53}N_2O_{15}$, 849.3446).

Euphodendroidin T (2R,3R,4S,5R,7R,8R,9R,13S,15R)-2,8-diacetoxy-7-benzyloxy-15-hydroxy-5-isobutyroxyloxy-2,9-dinicotinoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11E-diene (**30**): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -17.3$ (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 223 (3.34) nm; IR ν_{max} 3335, 2973, 1720, 1371, 1266, 1246, 1087, 1046, 880, 710 cm^{-1} ; for 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS m/z 869.3506 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{47}H_{53}N_2O_{14}$, 869.3497).

Yeast Strains and Growth Media. The yeast strains used in this study are listed in Table 3. All strains were cultured in yeast extract peptone-dextrose (YEPD) broth (BIO101; Biomedical Life Systems, Inc., Vista, CA, USA) at 30 °C. For agar plates, 2.5% (w/v) Bacto agar (Difco, BD Biosciences, Franklin, NJ, USA) was added to the medium. All strains were stored as frozen stocks with 15% glycerol at -80 °C. Before each experiment, cells were freshly revived on YEPD plates from the stock.

Reagents and Media. Chemicals such as fluconazole were obtained from HiMedia (Mumbai, India). Agar medium was purchased from Difco, BD Biosciences. Nile Red and other molecular-grade chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All routine chemicals were obtained from Qualigens (Mumbai, India) and were of analytical grade.

Statistical Analysis. Data are the means \pm SD from duplicate samples of at least three independent experiments. Differences between the mean values were analyzed by Student's *t* test, and results were considered significant when $p < 0.05$.

Transport Assays. Transport assays were done by monitoring Nile Red accumulation in cells overexpressing Cdr1p (AD-CDR1) or Mdr1p (AD-MDR1). It was measured by flow cytometry with a FACSort flow cytometer (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems). Briefly, cells with an OD_{600} of 0.1 were inoculated and allowed to grow at 30 °C with shaking, until the OD_{600} reached 0.25. The cells were then harvested and resuspended as a 5% cell suspension in diluted medium (containing one part of YEPD and two parts of water). NR was added to a final concentration of 7 μM , and the cells were incubated at 30 °C for 30 min in the absence or presence of each inhibitor at a concentration 10-fold higher than substrate (70 μM). The cells were then harvested, and 10 000 cells were analyzed in the acquisition. The analysis was performed using the CellQuest software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

Cytotoxicity and Sensitization to Fluconazole. Yeast cells (10^4) were seeded into 96-well plates in either the absence or presence of varying concentrations of inhibitors (0.15–80 μM) and were grown for 48 h at 30 °C. The IC_{50} values of cytotoxicity were determined by measuring the optical density of each strain. Growth in the absence of any inhibitor was considered as 100%, and the concentration producing 50% growth was taken as the IC_{50} value; the resistance index was calculated as the ratio between the IC_{50} values determined for the strain overexpressing either Cdr1p (AD-CDR1) or Mdr1p (AD-MDR1) relative to that of the control strain (AD1-8u⁻). The interaction of the respective inhibitors with FLC was evaluated by the checkerboard method recommended by the CLSI (formerly NCCLS) and was expressed as the fractional inhibitory concentration index. Ranges of concentrations were used: 0.15–800 μM for fluconazole and 0.15–800 μM of the respective inhibitors. FICI values were calculated as the sum of the FICs of each agent (FLC and inhibitors). The FIC of each agent was calculated as the MIC of the agent in combination divided by the MIC of the agent alone.

ChemGPS-NP. Chemical properties of all structures were calculated using the ChemGPS-NP online Web service.³⁶ The principal component analysis of principal components 1–3 was generated using the Plot3D package (v. 1.0-2) in R software⁴⁰ (R. Core Team) via the RCmdr graphical interface.⁴¹

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00990.

HRESIMS data, 1H , ^{13}C , HMBC, and ROESY spectra for euphodendroids P–T (**26–30**), and COSY and HSQC spectra for compound **30** (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: lnothiasscaglia@ucsd.edu.

*Tel: + 33 1 69 82 30 85. Fax: + 33 1 69 07 72 47. E-mail: marc.litaudon@cnsr.fr.

ORCID

Marc Litaudon: 0000-0002-0877-8234

Author Contributions

^{||}M. Esposito and S. Nim contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Prof. G. Appendino (Università degli Studi del Piemonte Orientale, Italy) for his valuable comments and suggestions. This work has benefited from an "Investissement d'Avenir" grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ANR-10-LABEX-25-01).

■ REFERENCES

- (1) White, T. C.; Marr, K. A.; Bowden, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 382–402.
- (2) Richardson, M. D. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, i5–i11.
- (3) Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133–163.
- (4) Prasad, R.; Sharma, M.; Rawal, M. K. *J. Amino Acids* **2011**, *2011*, e531412.
- (5) Rees, D. C.; Johnson, E.; Lewinson, O. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 218–227.
- (6) Chufan, E. E.; Sim, H.-M.; Ambudkar, S. V. In *Advances in Cancer Research*; Schuetz, J. D.; Ishikawa, T., Eds.; Academic Press: San Diego, 2015; Vol. 125, pp 71–96.
- (7) Wu, C.-P.; Ohnuma, S.; Ambudkar, S. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 609–620.
- (8) Prasad, R.; Wergifosse, P. D.; Goffeau, A.; Balzi, E. *Curr. Genet.* **1995**, *27*, 320–329.
- (9) Sanglard, D.; Ischer, F.; Monod, M.; Bille, J. *Microbiology* **1997**, *143*, 405–416.
- (10) Pastroja, R.; Banerjee, D.; Prasad, R. *Eukaryotic Cell* **2007**, *6*, 443–453.
- (11) Prasad, R.; Lata Panwar, S.; Smriti, B.-A. *Adv. Microb. Physiol.* **2002**, *46*, 155–201.
- (12) Nim, S.; Rawal, M. K.; Prasad, R. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 624–632.
- (13) Prasad, R.; Banerjee, A.; Khandelwal, N. K.; Dhamgaye, S. *Eukaryotic Cell* **2015**, *14*, 1154–1164.
- (14) Hohmann, J.; Molnár, J.; Rédei, D.; Evanics, F.; Forgo, P.; Kálmán, A.; Argay, G.; Szabó, P. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2425–2431.
- (15) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Motti, R.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 988–992.
- (16) Corea, G.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 431–447.
- (17) Vasas, A.; Sulyok, E.; Rédei, D.; Forgo, P.; Szabó, P.; Zupkó, I.; Berényi, A.; Molnár, J.; Hohmann, J. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1453–1461.

- (18) Aljančić, I. S.; Pešić, M.; Milosavljević, S. M.; Todorović, N. M.; Jadranin, M.; Milosavljević, G.; Povrenović, D.; Banković, J.; Tanić, N.; Marković, I. D.; Ruždijić, S.; Vajs, V. E.; Tešević, V. V. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1613–1620.
- (19) Pešić, M.; Banković, J.; Aljančić, I. S.; Todorović, N. M.; Jadranin, M.; Vajs, V. E.; Tešević, V. V.; Vučković, I.; Momčilović, M.; Marković, I. D.; Tanić, N.; Ruždijić, S. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 3165–3173.
- (20) Jadranin, M.; Pešić, M.; Aljančić, I. S.; Milosavljević, S. M.; Todorović, N. M.; Podolski-Renić, A.; Banković, J.; Tanić, N.; Marković, I.; Vajs, V. E.; Tešević, V. V. *Phytochemistry* **2013**, *86*, 208–217.
- (21) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3395–3402.
- (22) Rawal, M. K.; Shokoohinia, Y.; Chianese, G.; Zolfaghari, B.; Appendino, G.; Tagliatalata-Scafati, O.; Prasad, R.; Di Pietro, A. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2700–2706.
- (23) Nim, S.; Mónico, A.; Rawal, M. K.; Duarte, N.; Prasad, R.; Di Pietro, A.; Ferreira, M.-J. U. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1180–1185.
- (24) Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Nedev, H.; Gallard, J.-F.; Leussen, P.; Retailleau, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Iorga, B.; Paolini, J.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2873–2882.
- (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) 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.
- (28) Alberto Marco, J.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 137–140.
- (29) Alberto Marco, J.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J.; Jeske, F. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1621–1630.
- (30) Marco, J. A.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, *62*, 110–113.
- (31) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5221–5227.
- (32) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3395–3402.
- (33) Ferreira, A. M. V. D.; Carvalho, L. H. M.; Carvalho, M. J. M.; Sequeira, M. M.; Silva, A. M. S. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 373–377.
- (34) Zhou, B.; Wu, Y.; Dalal, S.; Cassera, M. B.; Yue, J.-M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1952–1961.
- (35) Ferreira, R. J.; dos Santos, D. J. V. A.; Ferreira, M.-J. U.; Guedes, R. C. J. *Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1315–1324.
- (36) Rosen, J.; Gottfries, J.; Muresan, S.; Backlund, A.; Oprea, T. I. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1953–1962.
- (37) Günther, G.; Hohmann, J.; Vasas, A.; Máthé, I.; Dombi, G.; Jerkovich, G. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1309–1313.
- (38) White, R. L.; Burgess, D. S.; Manduru, M.; Bosso, J. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1914–1918.
- (39) Nothias-Scaglia, L.-F.; Dumontet, V.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 202–209.
- (40) R. Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, 2014.
- (41) Fox, J. *J. Stat. Softw.* **2005**, *14*, 1–42.

C. ARTICLE N° 3

Les informations complémentaires sont disponibles en annexe ; **Figure S1–S26.**



Figure 41. Latex d'*Euphorbia dendroides* ; Photo de M. L.



Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation

Louis-Félix Nothias,^{†,‡,§,||} MéliSSa Nothias-Esposito,^{§,||,¶} Ricardo da Silva,^{†,‡} Mingxun Wang,^{†,‡} Ivan Protsyuk,[⊥] Zheng Zhang,^{†,‡} Abi Sarvepalli,^{†,‡} Pieter Leyssen,[▽] David Touboul,[§] Jean Costa,^{||} Julien Paolini,^{||} Theodore Alexandrov,^{‡,⊥} Marc Litaudon,[§] and Pieter C. Dorrestein^{*,†,‡,||}

[†]Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093, United States

[‡]Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093, United States

[§]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, ICSN UPR 2301, Université Paris-Sud, 91198, Gif-sur-Yvette, France

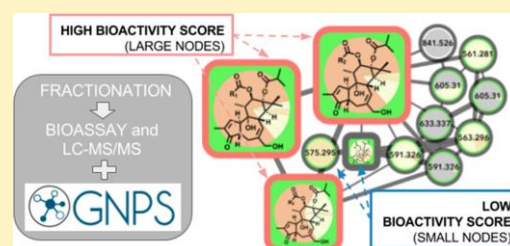
^{||}Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, CNRS, UMR SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France

[⊥]European Molecular Biology Laboratory, EMBL, Heidelberg, Germany

[▽]Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Supporting Information

ABSTRACT: It is a common problem in natural product therapeutic lead discovery programs that despite good bioassay results in the initial extract, the active compound(s) may not be isolated during subsequent bioassay-guided purification. Herein, we present the concept of *bioactive molecular networking* to find candidate active molecules directly from fractionated bioactive extracts. By employing tandem mass spectrometry, it is possible to accelerate the dereplication of molecules using molecular networking prior to subsequent isolation of the compounds, and it is also possible to expose potentially bioactive molecules using bioactivity score prediction. Indeed, bioactivity score prediction can be calculated with the relative abundance of a molecule in fractions and the bioactivity level of each fraction. For that reason, we have developed a bioinformatic workflow able to map bioactivity score in molecular networks and applied it for discovery of antiviral compounds from a previously investigated extract of *Euphorbia dendroides* where the bioactive candidate molecules were not discovered following a classical bioassay-guided fractionation procedure. It can be expected that this approach will be implemented as a systematic strategy, not only in current and future bioactive lead discovery from natural extract collections but also for the reinvestigation of the untapped reservoir of bioactive analogues in previous bioassay-guided fractionation efforts.



Nature has inspired the discovery of numerous therapeutics from organisms such as microbes, plants, and insects.¹ The discovery of new bioactive natural products as leads for therapeutic development can be inspired by ethnopharmacological knowledge or achieved by screening a collection of extracts for bioactivity,^{1–3} using in vitro, in cellulo, and even in vivo assays.⁴ When a natural extract is found to be bioactive, a bioassay-guided fractionation is usually carried out and is generally comprised of the following steps: (i) extraction of metabolites from the biomass using solvents, (ii) fractionation of the resulting extract by chromatography, (iii) bioassay screening of each fraction, (iv) isolation of the molecule(s) from bioactive fractions, and (v) identification of the isolated molecules and evaluation of their bioactivity.^{1,5,6} Although the bioassay-guided fractionation method seems to have been in use by chemists, pharmacologists, and toxicologists since the early 1900s,⁷ it was formally conceptualized after the 1950s^{7,8} and is still used today for the discovery of therapeutic leads by

researchers in academia, government, and industrial laboratories worldwide.

Loss of activity or failure in isolating the bioactive compounds during the bioassay-guided fractionation workflow is a very common and costly pitfall in natural products isolation attempts. Generally, the unsuccessful outcome of these efforts are simply not published or are finally reported as investigations aiming at characterizing the chemical components. Some of the reasons for these pitfalls are (1) the bioactive compounds were degraded during the purification process, (2) the bioactive compounds were present in too low concentrations to be efficiently isolated, and (3) the bioactivity was due to synergistic effects between multiple compounds. It is therefore important to detect candidate bioactive molecules early in the

Received: August 28, 2017

purification scheme in order to rationalize the isolation procedure applied toward these substances.

In addition, the application of bioassay-guided fractionation procedures in the last decades has resulted in the repeated isolation of molecules already described. To avoid the isolation of those known molecules, researchers have long used a preliminary structural assessment step called “dereplication”. Dereplication aims at detecting known and bioactive compounds in natural product extracts and ideally prior to the start of in-depth investigation. In practice, dereplication is often performed when the molecule is at least partially, if not fully, purified.^{9,10} Dereplication is generally achieved by first separating the molecular constituents using chromatography and then by looking at their spectral signatures obtained from mass spectrometry,^{11–13} nuclear magnetic resonance,¹⁴ or UV–vis spectroscopy, and then searching for compounds having identical properties (such as the molecular formula or core chromophores) in natural product databases¹³ or in dedicated open source cheminformatics tools.¹⁵ Some of the most commonly used natural product dereplication databases are “MarineLit”,¹⁶ “Antibase”,¹⁷ and the “Dictionary of Natural Products”.¹⁸ The use of untargeted tandem mass spectrometry to dereplicate known natural products has gained popularity, thanks to the introduction of a public spectral library and new bioinformatic tools.^{13,19–22} The recent introduction of the Global Natural Product Social molecular networking (GNPS) Web-platform (<http://gnps.ucsd.edu>) enables the automatic spectral mining of large experiments with up to thousands of samples in a few hours.²² In addition to the annotation of the molecules with reference MS/MS spectra publicly available on GNPS, it is also possible to propagate an annotation to an unknown molecule using the “analogues search mode” and MS/MS molecular networking, which expand and accelerate dereplication capabilities to similar structures.^{22–25} Annotation can then be propagated using differences in molecular formulas of features. For example, a difference of 14 Da between two precursor ions would suggest a putative CH₂ increment, a difference of 16 Da on oxygenation, while a difference of 34 Da in the substitution of proton by a chlorine atom. Careful interpretation of the mass defects and the fragmentation patterns observed may even enable an investigator to decipher the part of the molecule that is modified. For this reason, GNPS and molecular networking have been used to prioritize biomass in in-depth investigations based on the observation of known and unknown analogues or of unique clusters of MS/MS spectra referred to as “molecular families”.^{22,24–27} However, because molecular networking on GNPS was designed for MS/MS spectral comparisons, this approach alone does not consider the relative abundance of the molecules between samples, which is crucial for downstream statistical analysis of data.

Bioactivity screening and LC-MS (i.e., without MS/MS acquisition) have been employed in order to (i) prioritize biomass selection²⁸ and (ii) speed up the isolation process for the discovery of bioactive molecules.^{29–31} These studies used statistical approaches to estimate a bioactivity score, defined as the probability of a molecule as being bioactive. For each molecule, a bioactivity score can be calculated using its relative abundance between samples and the quantitative result of a bioassay for those same samples.²⁸ Multivariate statistical models can be used to identify bioactive compounds from LC-MS data.²⁹ Especially, partial least squares (PLS) regression has been shown to be an effective method to detect the

association between the spectral data of a molecule and the result of a bioassay.²⁹ However, although the above-mentioned approaches can provide the molecular formula of the predicted bioactive moieties, they are unable to provide the high-throughput annotation that GNPS and molecular networking offer. Recently, molecular networking was introduced for the prioritization of bioactive natural extracts in large collections^{26,32,33} and for the annotation of bioactive fractions.^{34–36}

In the present work, this gap is bridged by providing a workflow procedure, named “*bioactive molecular networking*”, which integrates MS/MS molecular networking and bioactivity scoring to assist in bioassay-guided fractionation. By highlighting molecular families and putative bioactive candidate molecules, prior to undertaking a time-consuming isolation step, the use of bioactivity scoring and molecular networking can accelerate natural-products-based drug discovery.²⁴ Herein, we demonstrate the utility of bioactive molecular networking by reinvestigating the data obtained in our previous study.³⁷ In this previous study, the chromatographic bioactive fractions from *Euphorbia dendroides* L. (Euphorbiaceae) latex, a Mediterranean tree spurge, were investigated to elucidate the components responsible for the potent and selective inhibition of the initial extract against chikungunya virus (CHIKV) replication. Despite a phytochemical effort that led to the isolation and the identification of nearly 20 molecules from the most bioactive fractions, no compound with selective and significant inhibition activity against CHIKV replication was found. By reinvestigating *E. dendroides* samples using bioactive molecular networking, it was possible to better capture the untapped nature of molecules associated with the bioactivity. The findings were validated by conducting a mass spectrometry targeted purification, and it was demonstrated that the new diterpene esters isolated in trace amounts (isolation yield from the extract ranging from 0.04% to 0.28%) were indeed active against the CHIKV replication in a cell-based bioassay. The workflow we have developed relies on a combination of open bioinformatic tools, including MZmine2³⁸ and Optimus workflow³⁹ (using OpenMS⁴⁰), and the GNPS Web-platform. The approach can be readily adopted by researchers in the field of natural products drug discovery and also adapted to metabolomics and chemical ecology applications with other quantitative variables instead of the bioactivity level.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of the Workflow Procedure. In the context of a bioassay-guided fractionation study, the employment of the bioactive molecular networking workflow procedure (Figure 1) required first the performance of an untargeted LC-MS/MS analysis and the evaluation of the bioactivity level for each chromatographic fraction. The bioactivity molecular networking consisted of three steps (I–III). The first step (I) was LC-MS/MS spectral data processing with the Optimus workflow,⁴¹ based on OpenMS algorithms,⁴⁰ or with the MZmine2 toolbox.³⁸ This step allowed the detection and relative quantification of LC-MS/MS spectral features (ions) across the chromatographic fractions. The second step (II) consisted in the calculation of a bioactivity score using the Pearson correlation between feature intensity across samples and the bioactivity level associated with each sample. The needed script was prepared as a Jupyter notebook using R language.⁴² Jupyter notebook (<http://jupyter.org/>)⁴³ is an open-source Web application that facilitates reproducibility and does not require advanced computational skills to be

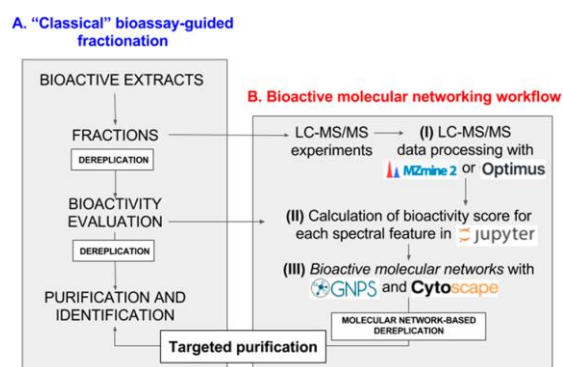


Figure 1. Bioactive natural products discovery pipelines. Workflow procedure (A) for the classical bioassay-guided fractionation approach and (B) by integrating bioactive molecular networking.

reemployed. The third and final step (III) was achieved by analyzing MS/MS data on the GNPS Web-platform²² and visualizing the corresponding molecular networks in CytoScape.⁴⁴ GNPS is a Web-platform that serves both as a data repository and a data analysis infrastructure with molecular networking and spectral library search capabilities. In recent years, this crowd-sourced platform has become an essential toolbox for both the natural products and metabolomics scientific communities. Indeed, public spectral libraries facilitate

the dereplication of known molecules, and molecular networks allow annotation propagation to unknown related molecules. The objective of the last step of this workflow procedure was to annotate detected molecules using both spectral library annotations and the network topology, in particular those molecules with significant predicted bioactivity scores. For this purpose, the data curation relied on two complementary approaches. First a targeted approach, where prior knowledge can be used, such as chemotaxonomic information and the set of previously described bioactive molecules. Second, an untargeted approach can be undertaken by looking for consistent patterns of bioactive candidates in the networks, such as clusters with a high frequency of bioactive candidates, which could translate to the presence of a bioactive pharmacophore.

Evaluation of the Workflow Procedure. To evaluate the efficiency of bioactive molecular networking, an extract of *Euphorbia dendroides* latex was reinvestigated. This plant has documented ethnobotanical and ethnopharmacological uses to treat warts since the days of Ancient Rome.^{37,45} Previous bioactivity screening of a Corsican specimen of *E. dendroides* showed that the latex extract displayed potent antiviral activity against CHIKV replication in a cell-based assay (Vero cells, green monkey kidney).^{46,47} However, none of the compounds isolated during subsequent bioassay-guided fractionation of this *E. dendroides* extract showed selective antiviral activity against CHIKV.^{37,48} Some of its fractions (F12, F13, and F17) exhibited a selective inhibition of CHIKV replication with an

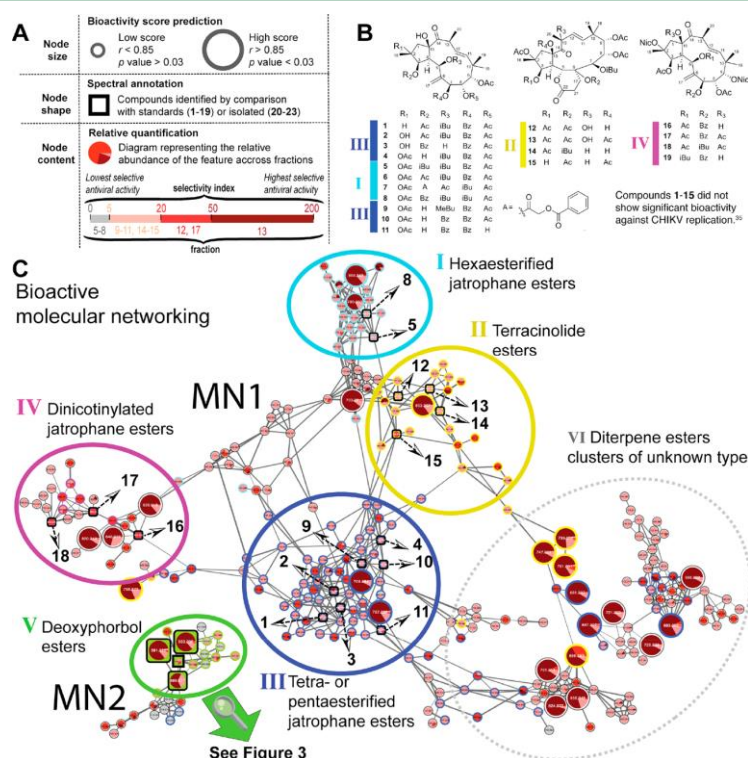


Figure 2. Bioactive molecular networking of bioassay-guided fractionation of *Euphorbia dendroides* latex extract. (A) Legend of bioactive molecular networks. (B) Previously isolated molecules (1–19). (C) Bioactive molecular network 1 (MN1) and 2 (MN2) of *E. dendroides* latex extract and cluster annotations (I–V). See Figure 3 for a detailed view for the cluster V of molecular network 2 (MN2).

effective concentration (EC_{50}) below 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($EC_{50} = 0.27$, 0.17, and 1.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) and high selectivity indices of 41, 140, and 57, respectively. (EC_{50} is defined as the concentration that reduces the replication of the CHIKV by 50%, and the SI as the ratio EC_{50}/CC_{50} where CC_{50} is the cytotoxic concentration of the compound to reduce natural growth of host cells by 50%.) Nineteen diterpenoid jatrophone esters (1–19), including four terracinolides (12–15), were isolated from these bioactive fractions, but none of these molecules showed significant selective inhibition of CHIKV replication.³⁷ Thus, the nature of the compounds responsible for antiviral activity has not yet been elucidated. The assumption was made that the bioactive molecule(s) either occurred in trace amounts or were degraded, or that multiple molecules were required for activity (synergistic activity). To find the molecules with anti-CHIKV replication inhibition property, the extract and fractions were analyzed by LC-MS/MS and the presently described workflow was applied.

A crucial factor to predict a significant bioactivity score is to have multiple samples of known concentration that could have different, but related, molecular profiles with corresponding associated bioactivity levels. These could be chromatographic fractions of a single extract or multiple extracts from different but related sources. In this study, 18 fractions were obtained from a chromatographic separation of the extract of *E. dendroides* latex (F1–F18), and these fractions were subjected to LC-MS/MS and anti-CHIKV bioassays. Their mass spectrometric data, along with the results of their selective inhibition of CHIKV replication, were then processed with our procedure using the Optimus workflow, and bioactive molecular networks were generated in order to prioritize candidate molecules responsible for such bioactivity.

The bioactive molecular networks for the bioassay-guided fractionation of *E. dendroides* fractions are represented in Figures 2 and 3. As depicted in the legend (Figure 2A), the

result of bioactivity scoring is visualized directly in the molecular network with the node size proportionally representing the molecule predicted bioactivity score. The bioactivity score was defined herein as the Pearson correlation coefficient (r) between the molecule relative abundance derived from the LC-MS peak (area under the curve) and the selectivity index (SI) value obtained from the evaluation of fraction antiviral activity. The largest nodes represent molecules with statistically significant bioactivity score [strong Pearson correlation value ($r > 0.85$) and a significance (FDR corrected, p value < 0.03) after Bonferroni correction]. In addition, the relative abundance of detected molecule in each fraction can be visualized in each node with a pie chart diagram [colors correspond to the fraction bioactivity level]. In total, 8.4% (24/285) of molecules were predicted as having a statistically significant bioactivity score. These bioactive candidates represented 10.7% (3/28) of the nodes in MN1 and 8.2% (21/257) of the nodes in MN2.

A detailed examination of the molecular networks allowed the annotation of two main molecular families (Figure 2C). The first molecular family (MN1) was composed of the known diterpene esters (1–15), including jatrophone esters (1–11) belonging to the 14-oxojatropha-6(17),11E-diene type and terracinolides (12–15). These molecules did not show strong anti-CHIKV activity in a previous study⁴⁹ and were readily annotated (square node in the molecular networks) because their spectral data were available in the GNPS public spectral library. We also observed that the aggregation of reference compounds in clusters I–IV was based on two main structural features: first, the number of esters such as hexa-esterified jatrophone derivatives (cluster I) versus penta- and tetra-esterified jatrophone derivatives (clusters III) or the presence of specific esters such as nicotinoyl esters (cluster IV) and the presence of a lactone for the terracinolides (cluster II).

In addition, it was possible to expand the annotation of MN1 to unknown related molecules using the “analogues search function” available on GNPS. Compounds that were annotated as analogues are represented with a circular colored node, with the color being representative of diterpene-type matching. Interestingly, it was observed that analogues were mostly found in the same clusters as the reference matching spectra. Reference compounds belonging to each cluster of MN1 (I–IV) were previously evaluated against CHIKV replication,^{37,48} and none of them showed inhibition activity. For the above reasons, it was assumed that the analogues present in clusters I–V were not the most promising bioactive candidates, and subsequent efforts were focused on MN2, for which no candidate was previously isolated.

The molecular network 2 contained three spectral features with significant bioactivity score at m/z 591.326 (20), 589.311 (21), and 563.296 (23) and at the retention times 1626 s, 1520 s, and 1291 s, respectively. Still, no spectral annotation could be retrieved from public spectral libraries on GNPS, including using analogue searching. An available in silico annotation tool for molecular networking was used.⁵⁰ The results indicated heterogeneous candidate structures, including many unlikely candidates from a chemotaxonomic standpoint, which were not considered further. Examination of spectra showed that the ion at m/z 591.326 was a sodium adduct corresponding to a molecular formula of $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_7$ (m/z_{calc} 591.3298, $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $\Delta m/z = 3.0$ ppm). This observation explained the result of the in silico annotation tool, which considers all ions to be protonated adducts.⁵⁰ A search for molecules with the same

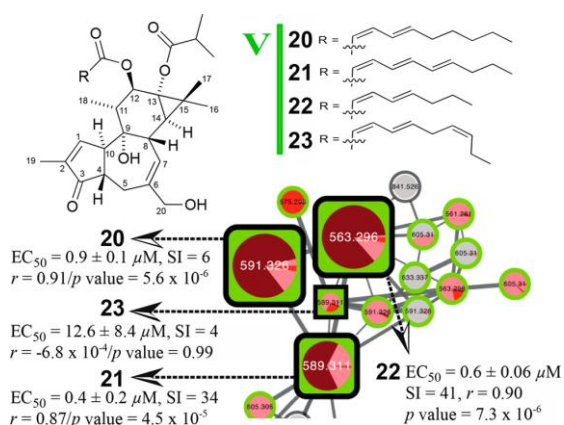


Figure 3. View of bioactive molecular networking results for the cluster V of molecular network 2 (MN2). The molecules 20–22 with significant bioactivity scores (large nodes, see legend) were annotated as deoxyphorbol ester derivatives and isolated in the present study. Evaluation of the biological activity indicated that 21 and 22 are selective inhibitors of chikungunya virus replication in the submicromolar range. The deoxyphorbol ester 23 was also isolated and found to have a lower selective antiviral activity in comparison to compounds 20–22.

molecular formula was carried out in the Dictionary of Natural Products¹⁸ and indicated a diterpene diester isolated from *Euphorbia prolifera*⁵¹ named Euphorbia factor Pr4 [12-*O*-(2,4-decadienyl)-13-*O*-(2-methylpropanoyl)-4-deoxyphorbol]. The examination of the MS/MS fragmentation pattern of this diterpenoid (Figure S3, Supporting Information) showed two neutral losses of 88 Da [M – 88 + Na]⁺ and 168 Da [M – 168 + Na]⁺, indicating that the detected molecules possessed a C₄H₇O acyl (potentially an isobutyryl or a butyryl) and a C₁₀H₁₇O acyl moiety (potentially a decadienyl). Moreover, the observations of characteristic diterpene backbone fragment ions at *m/z* 313, 295, and 285 were supportive of this molecule being indeed of the phorboid diterpene ester, of either deoxyphorbol or ingenol type.⁴⁷

The annotation of these diagnostic bioactive Euphorbiaceae diterpenoids^{52–54} was of significance, as some phorboid derivatives are well-known inhibitors of human immunodeficiency virus replication,^{46,55} and recently also against CHIKV,^{56,57} due to their protein kinase C (PKC) modulatory ability. Thus, based on (i) the significant bioactivity score in MN2 for the nodes at *m/z* 591.326, 589.311, and 563.296 (compounds 20–22, with respectively retention times at 1630, 1523, and 1289 s, an *r* value of 0.91, 0.87, and 0.90, and *p* values of 5 × 10^{–6}, 4.5 × 10^{–5}, and 7.3 × 10^{–6}) and (ii) the molecular network-based annotation indicating that they were likely phorboid diterpene esters, it was decided to perform a targeted isolation of these putative bioactive molecules. Inspection of the pie-chart diagram showed that the concentration of compounds 20–22 was higher in F13, and this fraction was hence selected for targeted isolation. In addition, it was proposed to isolate compound 23 (*m/z* 589.31, with a retention time 1609 s), because it was likely a positional isomer of compound 21 with low predicted bioactivity score (*r* ≈ 0 and *p* value 0.99), and it was thus valuable to test the approach.

The residual sample from the previous bioassay-guided fractionation of F13 (sub-F13) was fractionated by preparative HPLC using the UV trace as a proxy to the LC-MS/MS analysis. The targeted compounds 20–23 were purified using preparative HPLC and were then identified by 1D- and 2D-NMR data analysis (Tables 1 and 2). As suggested by molecular networking analysis (Figure 3), these four new compounds were indeed 4β-deoxyphorbol esters (20–23) (4-dPEs). The absolute configuration of each stereocenter was assumed based on prior studies on diterpenes of *Euphorbia* species (X-ray diffraction and total synthesis).^{54,58} Following their identification, the reference MS/MS spectra of compound 20–23 were uploaded to the GNPS library and an analogue search was performed on molecular network MN2. Figure 3 showed that MN2 was essentially composed of deoxyphorbol ester analogues (nodes colored in green). The four isolated 4-dPEs (20–23) were evaluated for antiviral activity against CHIKV replication (Table S26, Supporting Information), and compounds 21 and 22 were found to be the most potent and selective CHIKV replication inhibitors with EC₅₀ values of 0.40 ± 0.02 μM and 0.60 ± 0.06 μM, and SI = 34 and 41, respectively. The low SI values for compounds 20 and 23 indicated that they are associated with high host-cell cytotoxicity (SI = 6 and 4, respectively). These four 4β-deoxyphorbol esters possess the same isobutyrate group at C-13, but differ in the nature of the C-12 acyl moiety. Compound 20 has a 2*Z*,4*E*-decadienyl group at position C-12, while compound 22 has a 2*Z*,4*E*-octadienyl group. The two compounds 21 and 23 are indeed isobaric compounds with a

Table 1. ¹H NMR Spectroscopic Data for Compounds 20–22 (300 MHz) and 23 (500 MHz) in CDCl₃ at 300 K (δ_H in ppm, *J* in Hz)

position	20	21	22	23
1	7.54 br t (1.7)	7.54 br t (1.7)	7.54 br t (1.7)	7.54 br t (1.7)
4	2.44 td (9.5, 4.5)	2.44 td (9.5, 4.5)	2.44 td (9.5, 4.5)	2.46 td (9.5, 4.5)
5α	2.82 dd (18.0, 10.0)	2.82 dd (17.7, 9.6)	2.82 dd (18.0, 10.0)	2.82 dd (18.0, 10.0)
5β	2.12 dd (18.0, 10.0)	2.12 dd (17.7, 8.1)	2.12 dd (18.0, 10.0)	2.13 dd (18.0, 10.0)
7	5.52 d (5.4)	5.52 d (5.4)	5.52 d (5.4)	5.52 d (5.4)
8	2.35 t (5.4)	2.35 t (5.4)	2.35 t (5.4)	2.35 t (5.4)
10	3.23 m	3.23 m	3.23 m	3.24 m
11	1.56 m	1.56 m	1.56 m	1.58 m
12	5.43 d (9.8)	5.44 d (9.6)	5.43 d (9.8)	5.43 d (9.8)
14	1.01 d (5.4)	1.01 d (5.4)	1.01 d (5.4)	1.01 d (5.4)
16	1.18 s	1.18 s	1.18 s	1.21 s
17	1.18 s	1.18 s	1.18 s	1.20 s
18	0.91 d (6.4)	0.91 d (6.4)	0.91 d (6.4)	0.90 d (6.4)
19	1.70 dd (2.4, 1.2)	1.70 dd (2.4, 1.2)	1.70 dd (2.4, 1.2)	1.70 dd (2.4, 1.2)
20	4.01 b rs	4.01 dd (19.5, 13.3)	4.01 br s	4.00 br s
OH-9	5.81 br s	5.81 br s	5.81 br s	5.85 br s
OH-20	5.27 br s	3.46 br s	5.27 br s	5.28 br s
OR-14				
1'	5.52 d (11.3)	5.56 d (11.1)	5.52 d (11.3)	5.53 d (11.3)
2'	6.56 t (11.3)	6.59 t (11.1)	6.56 t (11.3)	6.57 t (11.3)
3'	7.29 dd (15.6, 11.5)	7.35 dd (15.1, 11.1)	7.29 dd (15.6, 11.5)	7.31 dd (15.6, 11.5)
4'	6.07 ddd (15.6, 7.1, 6.8)	6.46 dd (14.8, 10.8)	6.07 ddd (15.6, 7.1, 6.8)	6.04 ddd (15.6, 7.1, 6.8)
5'	2.15 dd (13.6, 7.1)	6.20 dd (14.8, 10.8)	2.16 dd (14.9, 7.1)	2.92 m
6'	1.41 m	5.92 ddd (14.8, 7.1, 6.8)	1.45 dd (14.9, 7.4)	5.33 dd (11.2, 5.7)
7'	1.27 m	2.11 dd (14.6, 6.8)	0.90 t (7.4)	5.46 dd (11.2, 8.0)
8'	1.28 m	1.42 dd (14.6, 7.5)		2.02 m
9'	0.87 t (6.9)	0.90 t (7.5)		0.94 t (6.9)
OiBu-13				
2''	2.57 q (7.0)	2.57 q (7.0)	2.57 q (7.0)	2.57 q (7.0)
Me-3''	1.18 d (7.0)	1.18 d (7.0)	1.18 d (7.0)	1.18 d (7.0)
Me-4''	1.15 d (7.0)	1.15 d (7.0)	1.15 d (7.0)	1.15 d (7.0)

12-acyl substituent of deca-2*Z*,4*E*,6*E*-trienoyl and deca-2*Z*,4*E*,7*Z*-trienoyl, respectively. While being closely related to compounds 20–22, compound 23 had a lower selectivity index against chikungunya virus replication (EC₅₀ = 12.6 ± 8.4 μM, SI = 4), in agreement with the prediction of the bioactivity scoring. This result was consistent with previously described structure–activity relationships for phorbol esters,⁵⁹ showing that the nature of the acyl chain residue modulates the antiviral activity. It was remarkable to observe that the bioactive molecules 20 and 22 had also isobaric counterparts at *m/z* 591.33 and 563.296 with low bioactivity scores predicted. These isobaric counterparts had almost identical MS/MS spectra but showed different retention times (1707, 1607, and 1406 s). They were annotated as positional isomers, or epimers, of compounds 20, 21, and 22, as commonly found in the Euphorbiaceae.^{54,60,61} In the context of bioactivity score prediction, it was observed that despite the isobaric counter-

Table 2. ¹³C NMR Spectroscopic Data for Compounds 20–22 (75 MHz) and 23 (125 MHz) in CDCl₃ at 300 K (δ_c in ppm, *J* in Hz)

position	20	21	22	23
1	160.1	160.1	160.1	160.1
2	136.5	136.5	136.5	136.5
3	210.1	210.1	210.1	210.1
4	44.4	44.4	44.4	44.4
5	29.8	29.8	29.8	29.8
6	142.1	142.1	142.1	142.1
7	126.7	126.7	126.7	126.7
8	42.2	42.2	42.2	42.2
9	77.9	77.9	77.9	77.9
10	54.4	54.4	54.4	54.4
11	42.7	42.7	42.7	42.7
12	76.2	76.2	76.2	76.2
13	65.1	65.1	65.1	65.1
14	35.8	35.8	35.8	35.8
15	26.1	26.1	26.1	26.1
16	23.9	23.9	23.9	23.9
17	16.9	16.9	16.9	16.9
18	15.2	15.2	15.2	15.2
19	10.4	10.4	10.4	10.4
20	67.7	67.7	67.7	67.7
OR-12	166.1	166.1	166.1	166.2
1'	115	113.4	115	115.0
2'	146.3	143.5	146.3	146.3
3'	127	128.1	127	127.0
4'	146.6	140.4	146.6	144.0
5'	33.2	124.2	35.4	31.1
6'	28.6	138.6	22.1	124.7
7'	31.6	32.8	13.8	134.1
8'	22.7	19.7		20.6
9'	14.2	11.3		14.2
OiBu-13				
1"	179.7	179.7	179.7	179.7
2"	34.4	34.4	34.4	34.4
Me-3"	18.8	18.8	18.8	18.8
Me-4"	18.7	18.7	18.7	18.6

parts being abundant (9.2E7, 3.0E8, and 1.2E8 vs 6.5E7, 1.9E8, and 6.7E7 for compounds 20–22, respectively, in the latex extract), they did not have a significant bioactivity score.

Bioactive molecular networks have permitted the detection of bioactive molecules from an antiviral fraction of *E. dendroides* latex, for which bioactive constituents were unknown despite the carrying out of a previous bioassay-guided fractionation procedure.⁴⁹ The present work showed that bioactive molecular networking can accelerate dereplication and a rationalized isolation procedure in bioassay-based drug discovery. It has been shown that, prior to any time-consuming isolation procedure, bioactive molecular networking is able to (i) narrow down the number of bioactive candidates by 10; (ii) speed up spectral annotation with MS/MS molecular networking, and (iii) discriminate even isomers as a result of LC-MS feature detection tools. The workflow procedure can be readily implemented and adapted for any bioassay-guided fractionation with LC-MS/MS data associated. The approach can be easily reproduced since it relies on open tools (Optimus or MZmine2), the GNPS Web-platform, and a Jupyter notebook. Yet, like any other statistical approach, the accuracy and utility of a bioactive molecular network depends on (i) the

reproducibility of the bioassay procedure and (ii) the number of samples included in the data set. Furthermore, the annotation capability of MS/MS spectra depends on public MS/MS spectral libraries, which are expanding rapidly as a result of contributions from the scientific community.

Herein is presented the concept of bioactive molecular networking, and it can be adopted as a systematic strategy for the annotation of bioactive molecules in a complex plant extract. It was applied to the discovery of antiviral diterpenoids in a *E. dendroides* latex extract, an extract on which a classical bioassay-guided effort was previously unsuccessful. From bioactive molecular networking, two bioactive compounds (21 and 22) were isolated. Compounds 21 and 22 were found to be active against CHIKV replication at submicromolar concentrations. Chikungunya virus is an emerging virus that is causing massive outbreaks (1 million estimated cases in South America and in the Caribbean region in 2014)⁶² and associated with high morbidity and for which no antiviral chemotherapy is available. The present results demonstrate that bioactive molecular networking can speed up the process of drug-lead discovery by revealing bioactive candidates and facilitating their dereplication and/or annotation at the very first step of any bioassay-guided purification procedure. For this reason, we expect that bioactive molecular networking can be a cornerstone concept/methodology for the discovery of bioactive molecules from natural product extracts.

To facilitate its acceptance by various communities, the bioactive molecular networking workflow is freely available (https://github.com/DorresteinLaboratory/Bioactive_Molecular_Networks) and can be readily applied or adapted without the need for advanced computational skills, as it relies on popular LC-MS feature detection (MZmine2 or Optimus),^{38,39} accessible bioinformatics tools (Jupyter notebook),⁶³ and the crowd-sourced GNPS Web-platform (<http://gnps.ucsd.edu>).²² Moreover, the workflow will directly benefit from the development of new modules and bioinformatics tools, in particular those for improved LC-MS feature detection^{38,40} or spectral⁶⁴ and in silico annotation.^{65–67}

Bioactive molecular networking has the retroactive potential to reinvestigate successful bioassay-guided fractionation or those where investigators failed to find the active components, as long as corresponding MS/MS data were acquired or can still be generated. Currently, while 352 studies mentioned “bioassay-guided” and “MS/MS” for the year 2016,⁶⁸ none have deposited MS/MS data in public repositories such as MetaboLights (<http://www.ebi.ac.uk/metabolights/>)⁶⁹ or GNPS-MassIVE (<http://massive.ucsd.edu>). Therefore, as the scientific community pushes toward transparency⁷⁰ and as mandated by many funding agencies, the availability of all MS/MS data in public repositories will increase (similar to genomic efforts decades ago) and will enable both the detection of a presently untapped reservoir of bioactive analogues and the optimization of bioactivity scoring.

Finally, since bioactive molecular networking is agnostic to the nature of the quantitative variable employed (here the value of the bioassay results), any other quantitative outcome parameters can be employed instead. Thus, the workflow described herein can be adapted for applications outside of natural products research. Among the potential use of the current workflow, it could be employed in microbial ecology to annotate compounds impacted by an environmental variable (such as the pH), or perhaps it could be used in exposomics to

annotate biomarkers associated with a level of exposure to a chemical contaminant.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations ($[\alpha]_D$) were measured with the sodium D line monochromatic light source in EtOH at 24 °C. The instrument used was an MCP 300 Anton Paar polarimeter. A PerkinElmer Spectrum BX FT-IR system was used to record IR spectra. UV spectra were measured in a 1 cm quartz tank using a Varian Cary 100 scan spectrophotometer. The 1D (^1H and ^{13}C) and 2D (COSY, HSQC, HMBC, and ROESY) NMR spectra were obtained in CDCl_3 for compounds **20–22** on a Bruker Avance 300 MHz instrument, and for compound **23** on a 500 MHz instrument, using a 1.7 mm microprobe. HPLC separation was performed on analytical C_{18} columns (Kromasil, 250×4.6 mm i.d., $5 \mu\text{m}$, Thermo Scientific) and on semipreparative C_{18} columns for fractionation. 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 ELS Polymer Laboratory detector was used. Preparative HPLC separation was performed on a semipreparative C_{18} column (Kromasil, 250×10 mm; i.d. $5 \mu\text{m}$). A Dionex autopurification system equipped with a binary pump (P580), a UV–vis array detector (200–600 nm, Dionex UVD340U), and a PL-ELS 1000 ELS Polymer Laboratory detector was used. A hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer (LTQ-XL Orbitrap, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) was used for LC-MS/MS analysis. An ESI source operating in positive ionization mode was used. 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 mass spectra and at 15 000 for tandem mass spectra. The data-dependent MSⁿ mode was used to monitor the one to three most intense ions with an exclusion duration of 40 s after eight repetitions. Instrumental parameters were set as follows: 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 silica gel column (Sunfire, 150×2.1 mm \times $3.5 \mu\text{m}$; Waters, Guyancourt, France), equipped with a guard column. The column oven temperature was set at 25 °C. Elution was conducted with a mobile phase consisting of water + 0.1% formic acid (A) and CH_3CN + 0.1% formic acid (B), following the gradient 5% to 95% B in 40 min, then maintaining 100% B for 10 min at a flow rate of 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. To enable the semiquantification of the detected ions, the samples were prepared at a concentration of 2.5 mg/mL in MeOH, and the injection volume was fixed at 10 μL . The LC-MSⁿ analysis of the CH_3CN latex extract, the fractions of *E. dendroides*, and the reference MS/MS spectra were deposited on GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>), under the reference number MSV000079385.

Plant Material. The latex of *Euphorbia dendroides* was collected by L.-F.N. in August 2012 on 20 specimens at Ficaghjola Beach (Piana) in the western region of Corsica. Botanical identification was performed by L.-F.N., and a voucher specimen (LF-026) was deposited at the Herbarium of the University of Corsica (Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Corte).

Extraction and Isolation. The latex extract of *E. dendroides* (4.5 g) was subjected to a bioassay-guided fractionation protocol as described in a previous publication,⁵⁷ suggesting that F13 (1600 mg) contains phorboid diterpenes with significant bioactivity score predictions. The previous bioassay-guided isolation procedure on fraction F13 ($\text{EC}_{50} = 0.17 \mu\text{g}/\text{mL}$, $\text{SI} = 140$) allowed the isolation of euphodendroidin E (804 mg, with an isolation yield of 17% from the extract) and of the subfraction sub-F13 (486 mg). This subfraction was analyzed by LC-MS/MS, and ions of interest were annotated and compounds present purified by preparative HPLC (Kromasil C_{18} , isocratic $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (5/5) + 0.1% formic acid, 8:92 in 40 min) using the UV–vis

detector as a reference between chromatographic gradients. This purification procedure afforded four new compounds, compound **20** (12.8 mg), **21** (5.0 mg), **22** (5.1 mg), and compound **23** (1.8 mg), with isolation yields from the extract of 0.28%, 0.11%, 0.11%, and 0.04%, respectively.

12 β -O-[Deca-2Z,4E-dienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol (20): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -2$ (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 262 (4.32), 207 (4.08) nm; IR ν_{max} 2925, 1706, 1634, 1164, 1131, 1082, 780 cm^{-1} ; ^1H (300 MHz) and ^{13}C (75 MHz) NMR data, see Tables 1 and 2; HRESIMS m/z 591.3272 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_7\text{Na}$, 591.3298) deposited in the GNPS spectral library, <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000840337#%7B%7D>.

12 β -O-[Deca-2Z,4E,6E-trienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol (21): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +5$ (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 301 (4.04), 262 (4.10), 208 (4.10) nm; for ^1H (300 MHz) and ^{13}C NMR data, see Tables 1 and 2; HRESIMS m/z 589.3127 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_7\text{Na}$, 589.3141); deposited in the GNPS spectral library, <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000840338#%7B%7D>.

12 β -O-[Octa-2Z,4E-dienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol (22): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -1$ (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 262 (4.10), 207 (3.90) nm; for ^1H (300 MHz) and ^{13}C NMR data, see Tables 1 and 2; HRESIMS m/z 563.3010 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{Na}$, 563.2985); deposited in the GNPS spectral library, <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000840336#%7B%7D>.

12 β -O-[Deca-2Z,4E,7Z-trienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol (23): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +3$ (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 261 (3.79), 206 (3.76) nm; for ^1H and ^{13}C NMR data, see Tables 1 and 2; HRESIMS m/z 589.3167 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_7\text{Na}$, 589.3141); deposited in the GNPS spectral library, <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000840339#%7B%7D>.

Spectral Feature Detection. This step was performed with the Optimus workflow for feature detection, integration, filtering, and visualization (<https://github.com/MolecularCartography>),³⁹ based on using OpenMS algorithms.⁴⁰ The Optimus workflow was executed with the KNIME Analytics Platform version 3.2.1 on macOS 10.12. The workflow must be run with the option “Presence of MS/MS”. The .MGF file generated by the Optimus workflow (version 1.2.0) that contains MS/MS spectra (*spectral_data_MS2.mgf*) for each feature was uploaded on GNPS, and a Data Analysis was performed as described below. The CSV table generated by Optimus (*feature_quantification_matrix.csv*) was used for both the calculation of the bioactivity score and the visualization of the relative abundance into the molecular networks. More details on parameters used for Optimus and OpenMS are provided in the Supporting Information. Note that alternatively the popular MZmine2 toolbox (release 2.30) can be used for the LC-MS feature detection step. The Dorrestein laboratory implemented the needed features in MZmine2.^{38,71} See the release of MZmine 2.28 in July 2017 and the corresponding online documentation on GitHub (https://github.com/DorresteinLaboratory/Bioactive_Molecular_Networks). MZmine2 can now output similar files to those outputted by the Optimus workflow thanks to the option named “filter MS/MS for GNPS” and “Reset the peak number ID” in the peak list rows filter module and the MGF export module “Export for GNPS”. The CSV table with relative quantitative information is exported using the CSV export module. Note that an offline multisoftware workflow procedure was recently developed for the integration of MZmine2 and molecular networking.⁷² While the use of this workflow is theoretically compatible with the present bioactivity molecular networking workflow procedure, it has not been tested.

Molecular Networking. Tandem mass spectrometry molecular networks were created using the GNPS platform (<http://gnps.ucsd.edu>).²² Data were first converted to the mzML format with MS-Convert.⁷³ The spectral information (MGF file) was generated by Optimus and uploaded on GNPS. This file was used to generate an

MS/MS molecular network using the GNPS Data Analysis workflow, with the MS-Cluster deactivated. The precursor ion mass tolerance was set to 0.01 Da and to a product ion tolerance of 0.0075 Da (allowing a maximum error of 25 ppm at m/z 300 and 12 ppm at m/z 600). The fragment ions below 10 counts were removed from the MS/MS spectra. MNs networks were generated using 12 minimum matched peaks and a cosine score of 0.7. Data were open and visualized using Cytoscape 3.4.0 software.⁴⁴ A force-directed layout modulated by cosine score factor was used for data visualizations. Data of LC-MS/MS analysis were deposited in the MassIVE Public GNPS data set (<http://massive.ucsd.edu>, MSV000079856). The molecular networking job on GNPS can be found at <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=169c80d3192d4c29a6399729cdc8c9a4> and with analogue search <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ce2a564dbd704c0595494e04798b0233>. The corresponding Cytoscape file is available as Supporting Information. The annotated MS/MS spectra were deposited in the GNPS spectral library under references CCMSLIB00000840337, CCMSLIB00000840338, CCMSLIB00000840336, and CCMSLIB00000840339 for compounds 20–23, respectively.

Prediction of Bioactivity Score Significance and Mapping onto the Molecular Networks. An R-based Jupyter notebook, called Bioactive Molecular Networks, was created and is available on GitHub, https://github.com/DorresteinLaboratory/Bioactive_Molecular_Networks, along with a step-by-step tutorial and the representative input/output files needed. The table of spectral features' intensity (CSV format) obtained with Optimus workflow was used in the analysis. Note that to enable LC-MS-based semiquantitation, and thus a reliable prediction of the bioactivity score, each sample has to be analyzed at a known concentration. If the concentration differs between samples, a normalization has to be applied prior to using the workflow. The bioactive molecular networks Jupyter notebook is composed of three steps: scaling samples by normalizing the intensity to the TIC,⁷⁴ calculating the Pearson correlation score (r) and its significance (r_{pval}) between each feature and the bioactivity value, as well as the multiple hypothesis testing correction (the Bonferroni correction), and outputting the node attribute table. This table is conveniently formatted for import into the Cytoscape software to map back the bioactivity score onto the corresponding MS/MS molecular network. For the visualization of bioactive molecular networks in Cytoscape, the *Select* function in Cytoscape was used to filter nodes based on their r and the FDR corrected p value. The style of these nodes is then bypassed with a larger node size. In the current study, only molecules having a bioactivity score above $r > 0.85$ and p value of < 0.03 were represented as having a large node in the bioactive molecular networks.

Virus-Cell-Based Antialphavirus Assay. The protocol used was described in a previous publication.⁴⁹

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00737.

Results of bioassays against CHIKV replication and 1D and 2D NMR spectra (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: 858-534-6607. Fax: 858-822-0041. E-mail: pdorrestein@ucsd.edu.

ORCID

Louis-Félix Nothias: 0000-0001-6711-6719

David Touboul: 0000-0003-2751-774X

Julien Paolini: 0000-0002-3109-1430

Marc Litaudon: 0000-0002-0877-8234

Pieter C. Dorrestein: 0000-0002-3003-1030

Author Contributions

[¶]L.-F. Nothias and M. Nothias-Esposito contributed equally to this article.

Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): P. C. Dorrestein is an advisor for Sirenas, a company that employs molecular networking for the discovery of bioactive natural products from marine resources. The work in that company does not overlap with the work presented in this paper.

Reference MS/MS spectra of isolated compounds were deposited in the GNPS public spectral library (CCMSLIB00000840316 to CCMSLIB00000840340). LC-MS data have been deposited in the MassIVE repository <http://gnps.ucsd.edu> under accession number MSV000079856. The MS/MS molecular networks can be consulted at <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ce2a564dbd704c0595494e04798b0233>. The corresponding Cytoscape file of the molecular networks and the code for bioactive molecular network Jupyter notebook are available at https://github.com/DorresteinLaboratory/Bioactive_Molecular_Networks.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank J.-F. Gallard (CNRS) for help with the NMR acquisition and I. Schmitz-Afonso (CNRS) for the LC-MS/MS analysis. We thank the NIH for supporting this work under NIH-UCSD Center for Computational Mass Spectrometry P41 GM103484 and the NIH grant on reuse of metabolomics data R03 CA211211. This work was also supported by an “Investissement d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ANR-10-LABX-25-01). D.T. was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-16-CE29-0002-01 CAP-SFC-MS). This project benefited from European Commission funding (Horizon 2020 Research and Innovation Program) from the Marie Skłodowska-Curie Action MSCA-IF-2016, 3D-Plant2-Cells, No. 704786 (to L.F.N.), and from the grant agreement No. 634402 (to T.A. and I.P.).

■ REFERENCES

- (1) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
- (2) Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2010**, *74*, 496–511.
- (3) Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 69–75.
- (4) Potterat, O.; Hamburger, M. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 546–564.
- (5) Colegate, S. M.; Molyneux, R. J. *Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1993.
- (6) Bucar, F.; Wube, A.; Schmid, M. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 525–545.
- (7) Weller, M. G. *Sensors* **2012**, *12*, 9181–9209.
- (8) Schneider, H. G.; Tener, G. M.; Strong, F. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1952**, *37*, 147–157.
- (9) Wolfender, J.-L.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1382*, 136–164.
- (10) Gaudêncio, S. P.; Pereira, F. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 779–810.
- (11) Henke, M. T.; Kelleher, N. L. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 942–950.
- (12) Covington, B. C.; McLean, J. A.; Bachmann, B. O. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 6–24.
- (13) Kind, T.; Fiehn, O. *Phytochem. Lett.* **2017**, *21*, 313–319.

H

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00737
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

- (14) Williams, R. B.; O'Neil-Johnson, M.; Williams, A. J.; Wheeler, P.; Pol, R.; Moser, A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9957–9962.
- (15) Zani, C. L.; Carroll, A. R. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1758–1766.
- (16) Munro, M.; Blunt, J. W. MarineLit <http://pubs.rsc.org/marinlit/> (accessed 2016).
- (17) Laatsch, H. *AntiBase, a Database for Rapid Dereplication and Structure Determination of Microbial Natural Products*; Wiley-VCH, 2010.
- (18) Buckingham, J. *Dictionary of Natural Products, Supplement 4*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- (19) Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 703–714.
- (20) Smith, C. A.; O'Maille, G.; Want, E. J.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Brandon, T. R.; Custodio, D. E.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. *Ther. Drug Monit.* **2005**, *27*, 747–751.
- (21) Gowda, H.; Ivanisevic, J.; Johnson, C. H.; Kurczy, M. E.; Benton, H. P.; Rinehart, D.; Nguyen, T.; Ray, J.; Kuehl, J.; Arevalo, B.; Westenskow, P. D.; Wang, J.; Arkin, A. P.; Deutschbauer, A. M.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6931–6939.
- (22) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapon, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrew, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; Boya, P. C. A.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffmann, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Linington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837.
- (23) Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Heath, B. S.; Yang, J. Y.; Kersten, R. D.; van der Voort, M.; Pogliano, K.; Gross, H.; Raaijmakers, J. M.; Moore, B. S.; Laskin, J.; Bandeira, N.; Dorrestein, P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, E1743–E1752.
- (24) Quinn, R. A.; Nothias, L.-F.; Vining, O.; Meehan, M.; Esquenazi, E.; Dorrestein, P. C. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 143–154.
- (25) Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, C. M.; Liu, X.; Boudreau, P. D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; Wong, W. R.; Linington, R. G.; Zhang, L.; Debonsi, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1686–1699.
- (26) Winnikoff, J. R.; Glukhov, E.; Watrous, J.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, W. H. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 105–112.
- (27) Nguyen, D. D.; Wu, C.-H.; Moree, W. J.; Lamsa, A.; Medema, M. H.; Zhao, X.; Gavilan, R. G.; Aparicio, M.; Atencio, L.; Jackson, C.; Ballesteros, J.; Sanchez, J.; Watrous, J. D.; Phelan, V. V.; van de Wiel, C.; Kersten, R. D.; Mehnaz, S.; De Mot, R.; Shank, E. A.; Charusanti, P.; Nagarajan, H.; Duggan, B. M.; Moore, B. S.; Bandeira, N.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Gutiérrez, M.; Dorrestein, P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, E2611–E2620.
- (28) Kurita, K. L.; Glassey, E.; Linington, R. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 11999–12004.
- (29) Kellogg, J. J.; Todd, D. A.; Egan, J. M.; Raja, H. A.; Oberlies, N. H.; Kvalheim, O. M.; Cech, N. B. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 376–386.
- (30) Bertrand, S.; Azzollini, A.; Nievergelt, A.; Boccard, J.; Rudaz, S.; Cuendet, M.; Wolfender, J.-L. *Molecules* **2016**, *21*, 259.
- (31) Aligiannis, N.; Halabalaki, M.; Chaita, E.; Kouloura, E.; Argyropoulou, A.; Benaki, D.; Kalpoutzakias, E.; Angelis, A.; Stathopoulou, K.; Antoniou, S.; Sani, M.; Krauth, V.; Werz, O.; Schütz, B.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Mikros, E.; Skaltsounis, L. A. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 2531–2535.
- (32) Olivon, F.; Allard, P.-M.; Koval, A.; Righi, D.; Genta-Jouve, G.; Neyts, J.; Apel, C.; Pannecouque, C.; Nothias, L.-F.; Cachet, X.; Marcourt, L.; Roussi, F.; Katanaev, V. L.; Touboul, D.; Wolfender, J.-L.; Litaudon, M. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2644–2651.
- (33) Brito, Á.; Gaifem, J.; Ramos, V.; Glukhov, E.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, W. H.; Vasconcelos, V. M.; Mendes, M. V.; Tamagnini, P. *Algal Res.* **2015**, *9*, 218–226.
- (34) Naman, C. B.; Rattan, R.; Nikoulina, S. E.; Lee, J.; Miller, B. W.; Moss, N. A.; Armstrong, L.; Boudreau, P. D.; Debonsi, H. M.; Valeriote, F. A.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 625–633.
- (35) Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Retaillieu, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Touboul, D.; Litaudon, M.; Paolini, J. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2051–2059.
- (36) Nothias, L.-F.; Boutet-Mercey, S.; Cachet, X.; De La Torre, E.; Laboureur, L.; Gallard, J.-F.; Retaillieu, P.; Brunelle, A.; Dorrestein, P. C.; Costa, J.; Bedoya, L. M.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Alami, J.; Paolini, J.; Litaudon, M.; Touboul, D. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2620–2629.
- (37) Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Nedev, H.; Gallard, J.-F.; Leyssen, P.; Retaillieu, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2873–2882.
- (38) Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. *BMC Bioinf.* **2010**, *11*, 395.
- (39) Protsyuk, I.; Melnik, A. M.; Nothias, L.-F.; Rappet, L.; Phapale, P.; Akse, A. A.; Bouslimani, A.; Ryazanov, S.; Dorrestein, P. C.; Alexandrov, T. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 134–154.
- (40) Röst, H. L.; Sachsenberg, T.; Aiche, S.; Bielow, C.; Weissner, H.; Aichele, F.; Andreatti, S.; Ehrlich, H.-C.; Gutenbrunner, P.; Kenar, E.; Liang, X.; Nahnsen, S.; Nilse, L.; Pfeuffer, J.; Rosenberger, G.; Rurik, M.; Schmitt, U.; Veit, J.; Walzer, M.; Wojnar, D.; Wolski, W. E.; Schilling, O.; Choudhary, J. S.; Malmström, L.; Aebersold, R.; Reinert, K.; Kohlbacher, O. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 741–748.
- (41) Optimus <https://github.com/MolecularCartography/Optimus> (accessed May 24, 2017).
- (42) Ihaka, R.; Gentleman, R. J. *Comput. Graph. Stat.* **1996**, *5*, 299–314.
- (43) Perez, F. Project Jupyter, 2015 <http://jupyter.org/about.html>.
- (44) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504.
- (45) Appendino, G.; Szallasi, A. *Life Sci.* **1997**, *60*, 681–696.
- (46) Nothias-Scaglia, L.-F.; Dumontet, V.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 202–209.
- (47) Nothias-Scaglia, L.-F.; Schmitz-Afonso, I.; Renucci, F.; Roussi, F.; Touboul, D.; Costa, J.; Litaudon, M.; Paolini, J. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1422*, 128–139.
- (48) Esposito, M.; Nim, S.; Nothias, L.-F.; Gallard, J.-F.; Rawal, M. K.; Costa, J.; Roussi, F.; Prasad, R.; Di Pietro, A.; Paolini, J.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 479–487.
- (49) Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Nedev, H.; Gallard, J.-F.; Leyssen, P.; Retaillieu, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2873–2882.
- (50) Allard, P.-M.; Péresse, T.; Bisson, J.; Gindro, K.; Marcourt, L.; Pham, V. C.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3317–3323.

- (51) Wu, D.; Sorg, B.; Hecker, E. *Phytother. Res.* **1994**, *8*, 95–99.
- (52) Evans, F. J.; Kinghorn, A. D. *J. Chromatogr. A* **1973**, *87*, 443–448.
- (53) Evans, F. J.; Kinghorn, A. D. *Bot. J. Linn. Soc.* **1977**, *74*, 23–35.
- (54) Appendino, G. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2016**, *102*, 1–90.
- (55) Gulakowski, R. J.; McMahon, J. B.; Buckheit, R. W., Jr.; Gustafson, K. R.; Boyd, M. R. *Antiviral Res.* **1997**, *33*, 87–97.
- (56) Abdelnabi, R.; Staveness, D.; Near, K. E.; Wender, P. A.; Delang, L.; Neyts, J.; Leyssen, P. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *120*, 15–21.
- (57) Abdelnabi, R.; Amrun, S. N.; Ng, L. F. P.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Delang, L. *Antiviral Res.* **2017**, *139*, 79–87.
- (58) Vasas, A.; Hohmann, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8579–8612.
- (59) 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.
- (60) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4295–4327.
- (61) Vasas, A.; Rédei, D.; Csupor, D.; Molnár, J.; Hohmann, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 5115–5130.
- (62) Powers, A. *Res. Rep. Trop. Med.* **2015**, *6*, 11–19.
- (63) Project Jupyter website, 2018, <http://jupyter.org/install>.
- (64) Scheubert, K.; Hufsky, F.; Petras, D.; Wang, M.; Nothias, L.-F.; Dührkop, K.; Bandeira, N.; Dorrestein, P. C.; Böcker, S. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1494.
- (65) Gerlich, M.; Neumann, S. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 291–298.
- (66) Hufsky, F.; Scheubert, K.; Böcker, S. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 807.
- (67) Dührkop, K.; Shen, H.; Meusel, M.; Rousu, J.; Böcker, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 12580–12585.
- (68) “bioassay-guided” MS/MS - Google Scholar https://scholar.google.com/scholar?q=%22bioassay-guided%22+MS%2FMS&hl=en&as_sdt=0%2C5&as_ylo=2016&as_yhi=2016 (accessed May 31, 2017).
- (69) Haug, K.; Salek, R. M.; Conesa, P.; Hastings, J.; de Matos, P.; Rijnbeek, M.; Mahendraker, T.; Williams, M.; Neumann, S.; Rocca-Serra, P.; Maguire, E.; González-Beltrán, A.; Sansone, S.-A.; Griffin, J. L.; Steinbeck, C. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D781–D786.
- (70) Spicer, R. A.; Steinbeck, C. *Metabolomics* **2018**, *14*, 16.
- (71) Katajamaa, M.; Miettinen, J.; Oresic, M. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 634–636.
- (72) Olivon, F.; Grelier, G.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Touboul, D. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 7836–7840.
- (73) Chambers, M. C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D. L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; Hoff, K.; Kessner, D.; Tasman, N.; Shulman, N.; Frewen, B.; Baker, T. A.; Brusniak, M.-Y.; Paulse, C.; Creasy, D.; Flashner, L.; Kani, K.; Moulding, C.; Seymour, S. L.; Nuwaysir, L. M.; Lefebvre, B.; Kuhlmann, F.; Roark, J.; Rainer, P.; Detlev, S.; Hemenway, T.; Huhmer, A.; Langridge, J.; Connolly, B.; Chadick, T.; Holly, K.; Eckels, J.; Deutsch, E. W.; Moritz, R. L.; Katz, J. E.; Agus, D. B.; MacCoss, M.; Tabb, D. L.; Mallick, P. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 918–920.
- (74) van den Berg, R. A.; Hoefslot, H. C. J.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. *BMC Genomics* **2006**, *7*, 142.

D. ARTICLE N°4

Les informations complémentaires sont disponibles en annexe du présent manuscrit pour les **Figures S1–S6** et à l'adresse internet suivante :

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jnatprod.7b00233>



Figure 42. *Euphorbia pithyusa*. Photo : M. E.

Isolation of Premyrsinane, Myrsinane, and Tigliane Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* Using a Chikungunya Virus Cell-Based Assay and Analogue Annotation by Molecular Networking

Mélissa Esposito,^{†,‡} Louis-Félix Nothias,[‡] Pascal Retailleau,[‡] Jean Costa,[†] Fanny Roussi,^{‡, } Johan Neyts,[ ] Pieter Leyssen,[ ] David Touboul,[ ] Marc Litaudon,^{*,‡, } and Julien Paolini^{*,†, }

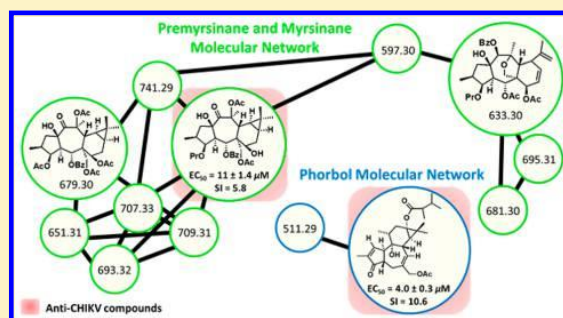
[†]Laboratory of Natural Products Chemistry, UMR CNRS SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France

[‡]Institute of Natural Substances Chemistry, CNRS UPR 2301, University of Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette, France

[ ]Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Supporting Information

ABSTRACT: Six new premyrsinol esters (1–6) and one new myrsinol ester (8) were isolated from an aerial parts extract of *Euphorbia pithyusa*, together with a known premyrsinol (7) and two known dideoxyphorbol esters (9 and 10), following a bioactivity-guided purification procedure using a chikungunya virus (CHIKV) cell-based assay. The structures of the new diterpene esters (1–6 and 8) were elucidated by MS and NMR spectroscopic data interpretation. Compounds 1–10 were evaluated against CHIKV replication, and results showed that the 4β-dideoxyphorbol ester 10 was the most active compound, with an EC₅₀ value of 4.0 ± 0.3 μM and a selectivity index of 10.6. To gain more insight into the structural diversity of diterpenoids produced by *E. pithyusa*, the initial extract and chromatographic fractions were analyzed by LC-MS/MS. The



generated data were annotated using a molecular networking procedure and revealed that dozens of unknown premyrsinane, myrsinane, and tigliane analogues were present.

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthropod-borne alphavirus that caused massive epidemics of chikungunya fever in India and Southeast Asia in the 1960s.^{1,2} Chikungunya disease is characterized by an abrupt onset of fever, headache, arthralgia, and lower back pain.³ Enhanced by globalization and global warming, its main vectors, *Aedes albopictus* and *A. aegypti*, are currently spreading worldwide,⁴ leading to new outbreaks in the Caribbean Islands,⁵ Central and South America,⁶ and the Pacific Islands.⁷ There is no specific antiviral therapy or vaccine available for the treatment or prevention of CHIKV infection, which is associated with severe morbidity.^{8,9} Review articles have highlighted efforts toward understanding the CHIKV replication mechanism. Recent studies have shown a PKC-independent pathway for salicylate-derived bryostatin analogues,^{10–13} while the anti-CHIKV activity of protractin results from PKC activation.¹⁴ Daphnane, tiglianes, and jatrophane diterpene esters, having potent anti-CHIKV activity, have been isolated using bioactivity-guided purification procedures from Euphorbiaceae species belonging to the genera *Trigonostemon*,^{15–17} *Croton*,¹⁸ *Stillingia*,¹⁹ and *Euphorbia*.^{20,21} Interestingly, phytochemical investigations on various *Euphorbia* species have led to the isolation of a large number of bioactive metabolites,^{22–24} in particular, a wide range of diterpenoids with PKC modulatory activities.^{16,20,25}

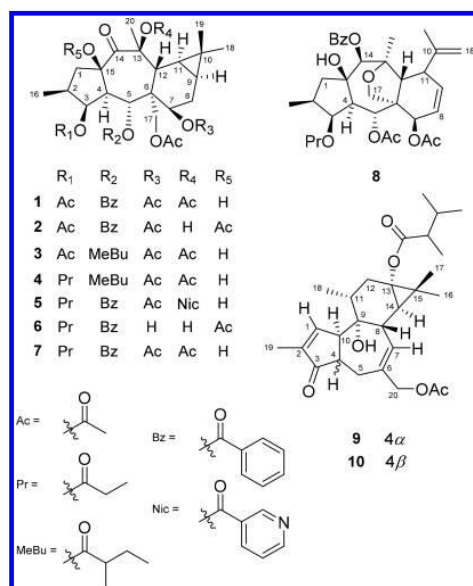
The genus *Euphorbia* is the largest of the Euphorbiaceae family, consisting of about 2000 species,^{26,27} and is represented by 33 taxa in Corsica. Among them is *Euphorbia pithyusa* L., a perennial plant, with limited distribution in the Balearic Islands, the Tuscan Archipelago, Sardinia, Sicily, Provence, and Corsica, near the coastal strip.²⁸ Its latex and seeds have been reported to have skin-irritant properties since antiquity.²⁹ One study has reported that an AcOEt extract of *E. pithyusa* collected in Corsica exhibited significant and selective antiviral activity against CHIKV replication [EC₅₀ CHIKV < 0.8 μg/mL (SI > 24)].³⁰ The aerial parts of *E. pithyusa* ssp. *cupanii* collected in Sardinia were investigated by Appendino et al., leading to the isolation of 16 diterpenoids belonging to the lathyrane, premyrsinane, and tigliane types.³¹ The myrsinane diterpenoids, with a 5/7/6 ring carbon framework, are derived from lathyrane via premyrsinane, which has a tetracyclic 5/7/6/3 ring system.^{31,32} Many premyrsinane and myrsinane derivatives contain a 13,17-epoxy ring or a hemiacetal ring.³³ In the last 20 years, more than 100 premyrsinane and myrsinane derivatives have been isolated from extracts of 30 *Euphorbia* species.^{23,33} Earlier studies reported that these diterpenoids show several different types of activity, including modulation of multidrug

Received: March 17, 2017

Published: July 3, 2017

resistance,^{25,34} neuroprotective activity,³⁵ and inhibition of potassium ion channels.³⁶

The aim of the present investigation was to search for new antiviral diterpenoids by means of a bioassay-guided purification procedure from an EtOAc extract of *E. pithyusa* aerial parts. To gain more insight in the structural diversity of the diterpenoid content of *E. pithyusa*, extract and fractions were analyzed by an LC-MS/MS-based molecular network protocol.



RESULTS AND DISCUSSION

The EtOAc extract from the aerial parts of *E. pithyusa* was partitioned by successive liquid–liquid extractions using first water and then heptane, allowing removal of the most hydrophilic and lipophilic compounds. The resulting diterpene ester-enriched EtOAc extract was subjected to normal-phase flash chromatography, yielding 11 fractions (F1–F11). On the basis of their strong anti-CHIKV activity [EC₅₀ = 0.7 ± 0.2 µg/mL (SI = 4), F4; EC₅₀ < 0.5 µg/mL (SI > 6), F5 and F6], fractions F4–F6 were selected for semipreparative RP-HPLC and yielded one known (7)³¹ and six new premyrsinol esters (1–6), a new myrsinol ester (8), and two known dideoxyphorbol esters (9 and 10).^{31,37} The structure elucidation of compounds 1–6 and 8 was conducted by NMR spectroscopic data interpretation (Tables 1–3) and from the MS values, while the known diterpene esters (7, 9, and 10) were identified through comparison of their spectroscopic data with data reported in the literature.^{31,37}

Compound 1 was obtained in crystalline form. Its HRESIMS showed a sodiated molecular ion at *m/z* 679.2747 [M + Na]⁺, corresponding to the molecular formula C₃₅H₄₄O₁₂, indicating 14 degrees of unsaturation. The ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (CDCl₃, Tables 1 and 2) of this compound were comparable with those of previously isolated premyrsinane diterpenoids.³¹ Analysis of its ¹³C and ¹H NMR spectra revealed the presence of one ketone carbonyl (δ_C 204.3) and five ester carbonyls, which were assigned to four acetyl groups (δ_C 170.4, 170.6, and 2 × 170.9; δ_H 2.14, 1.92, 1.43, and 2.09,

respectively) and a benzoyl group [δ_C 165.3, 130.0, 129.8, 133.3, 128.5; δ_H 7.85, 7.48, 7.34]. Examination of ¹J_{C–H} correlations observed in the HSQC spectrum and the ¹³C NMR chemical shifts of compound 1 indicated the presence of four methyl groups (δ_C 14.1, 29.6, 15.0, 25.1; δ_H 0.84, 1.02, 0.92, 1.68, respectively) and four quaternary carbons (δ_C 18.5, 47.9, 85.9, 84.3). A proton signal at δ_H 4.42 without any ¹J_{C–H} correlations in the HSQC spectrum was assigned to a hydroxy group. From the COSY spectrum, two spin systems were assigned from H-1 to H-5 [δ_H 3.14 (dd, *J* = 13.6, 7.9 Hz, H-1α), δ_H 1.62 (d, *J* = 13.6 Hz, H-1β), 1.83 (m, H-2), two oxymethines at δ_H 5.32 (t, *J* = 3.4 Hz H-3) and δ_H 6.37 (d, *J* = 11.5 Hz, H-5) linked by H-4 at δ_H 2.36 (dd, *J* = 11.5, 3.4 Hz)] and from H-7 to H-12, as depicted in Figure 1. A second spin system included an oxymethine at δ_H 4.76 (d, *J* = 6.5 Hz, H-7) connected to a methylene group at δ_H 2.07 (m, H-8α) and 1.82 (d, *J* = 16.7 Hz, H-8β), which was coupled to three adjacent protons at δ_H 0.71 (m, H-9), 0.70 (m, H-11), and 3.48 (m, H-12). The signals at δ_C 15.0 and 29.6, associated with resonances at δ_H 1.02 and 0.92, were characteristic of a *gem*-dimethyl group (H₃-18 and H₃-19), and HMBC correlations with H-8 and H-11 indicated the presence of a *gem*-dimethyl-substituted cyclopropane ring. As shown in Figure 1, the HMBC correlations from H-4, H-8, and H-12 to C-6 (δ_C 47.9); H-12 and H-1β to C-14 (δ_C 204.3); H-4 to C-15 (δ_C 84.3); and H-8β to the *gem*-dimethyl group confirmed that compound 1 is a 14-oxopremyrsinane diterpenoid. In the HMBC spectrum, the observation of cross-peaks between four oxymethines and ester carbonyl carbons supported the attachment of three acetate groups at C-3, C-7, and C-17 and a benzoate group at C-5. The last acetate group was attached to C-13, as suggested by the ROE correlation between the methyl protons of this acetate group at δ_H 2.09 and H₃-19 (δ_H 0.92), while a cross-peak between H-12 and the hydroxy group proton at δ_H 4.42 permitted the hydroxy group to be located at C-15. ROE correlations between H-2, H-3, H-4, H-17, and H₃-20 indicated that they all are α-oriented, while correlations between H-5, H-12, OH-15, and H₃-19 supported their β-orientation, as represented in Figure 1. All the above evidence confirmed that compound 1 is 3β,7β,13β,17-*O*-tetraacetyl-5α-*O*-benzoyl-14-oxopremyrsinol. The relative configuration of this compound was confirmed by X-ray diffraction analysis (Figure 2), but unfortunately, the absolute configuration could not be established.

The same general approach was used to elucidate the structures of the new premyrsinol esters 2–6. Indeed, comparison of their NMR and HRESIMS data with data of the premyrsinol esters 1 and 7³¹ supported 2–6 as also possessing a premyrsinane skeleton but with different acylation patterns (Tables 1 and 2). Their substitution patterns were solved by HMBC and ROESY spectroscopic data analyses. The ¹H NMR spectrum of compound 2 was similar to that of premyrsinol ester 1, which shared the same molecular formula, C₃₅H₄₄O₁₂. The ROE correlation between the hydroxy group proton at δ_H 3.68 and H₃-20 at δ_H 1.55 permitted this group to be located at C-13. In addition, HMBC correlations from the oxymethine protons H-3, H-5, H-7, and the methylene protons H₂-17 to their respective ester carbonyl carbons indicated that three acetyl groups and a benzoyl group were located at C-3, C-17, C-7, and C-5, respectively. The last acetyl group was necessarily located at C-15. Compound 3 was assigned a molecular formula of C₃₃H₄₈O₁₂, on the basis of its 1D NMR and HRESIMS data. From this formula and its spectroscopic

Table 1. ^1H NMR Spectroscopic Data for Compounds **2**, **4**, **6** (500 MHz) and **1**, **3**, **5** (600 MHz) in CDCl_3 at 300 K (δ_{H} in ppm, J in Hz)

position	1	2	3	4	5	6
1 α	3.14, dd (13.6, 7.9)	2.63, dd (14.4, 9.8)	3.13, dd (13.9, 7.9)	3.14, dd (13.2, 7.7)	3.16, dd (13.6, 7.7)	2.71, dd (15.0, 11.1)
1 β	1.62, d (13.6)	1.85, dd (14.4, 6.4)	1.70, dd (13.9, 9.7)	1.60, d (13.2)	1.65, t (13.6)	1.76, dd (15.0, 7.0)
2	1.83, m	2.40, m	1.80, m	1.81, m	1.87, m	2.38, m
3	5.32, t (3.4)	5.49, t (5.1)	5.21, t (3.0)	5.24, t (3.3)	5.38, t (3.6)	5.55, t (4.3)
4	2.36, dd (11.5, 3.4)	2.98, dd (11.2, 5.1)	2.31, dd (11.0, 3.0)	2.31, dd (11.0, 3.3)	2.42, dd (11.8, 3.6)	2.93, dd (10.6, 4.3)
5	6.37, d (11.5)	6.03, d (11.2)	6.19, d (11.5)	6.18, d (11.0)	6.43, d (11.8)	5.98, d (10.6)
7	4.76, d (6.5)	4.69, d (6.9)	4.47, d (7.0)	4.48, d (6.9)	4.96, d (6.6)	4.83, dd (6.0, 3.4)
8 α	2.07, m	2.16, m	2.07, m	2.07, m	2.20, m	2.10, m
8 β	1.82, d (16.7)	1.74, m	1.77, d (17.2)	1.78, br d (17.2)	1.91, d (17.5)	1.61, td (3.4, 16.5)
9	0.71, m	0.86, m	0.70, m	0.71, m	0.76, m	0.82, m
11	0.70, m	0.86, m	0.70, m	0.71, m	0.77, m	0.88, m
12	3.48, m	2.71, d (7.1)	3.34, m	3.37, m	3.58, m	2.26, d (7.7)
16	0.84, d (6.5)	0.94, d (6.9)	0.87, d (6.6)	0.87, d (6.7)	0.85, d (6.5)	0.93, d (7.0)
17 α	4.66, d (11.7)	4.92, d (11.0)	4.38, d (11.8)	4.39, d (11.8)	5.03, d (11.4)	4.89, d (12.0)
17 β	4.20, d (11.7)	4.37, d (11.0)	4.31, d (11.8)	4.32, d (11.8)	4.54, d (11.4)	4.32, d (12.0)
18	1.02, s	1.04, s	1.02, s	1.03, s	1.05, s	1.06, s
19	0.92, s	1.01, s	0.89, s	0.90, s	0.96, s	0.96, s
20	1.68, s	1.55, s	1.67, s	1.67, s	1.75, s	1.53, s
OR ₁₋₃	1.92, s	1.74, s	2.02, s	2.33, m	2.23, m	2.17, dd (7.7, 3.1)
	1.07, t (7.7)	0.91, t (7.5)	0.86, t (7.7)			
OR ₂₋₅	7.85, d (7.5)	7.80, d (7.6)	2.15, m	2.16, m	7.67, d (7.3)	7.85, d (7.5)
	7.34, t (7.5)	7.36, t (7.6)	1.33, m	1.34, m	7.00, t (7.3)	7.37, t (7.5)
	7.48, t (7.5)	7.51, t (7.6)	1.27, m	1.69, m	7.14, t (7.3)	7.51, t (7.5)
	1.05, d (6.9)	1.10, d (7.5)				
	0.88, t (6.9)	0.89, t (7.5)				
OAc-17	1.43, s	1.74, s	2.09, s	2.05, s	2.15, s	1.89, s
OR ₃₋₇	2.14, s	2.18, s	2.05, s	2.08, s	2.11, s	4.07, s
OR ₄₋₁₃	2.09, s	3.68, br s	2.09, s	2.08, s	8.82, br s	3.44, s
		8.52, br s				
		7.60, br s				
		6.99, br s				
OR ₅₋₁₅	4.42, s	2.10, s	4.55, s	4.42, br s	4.46, br s	1.84, s

data, closely comparable with those of **1**, it was apparent that **3** has a 2-methylbutyrate group located at C-5, instead of a benzoate group as in compound **1**. The structure of compound **4** differed from the structure of premyrsinol ester **3** only by the presence of a propionate group at C-3 instead of an acetate group in compound **3**. Compound **5** showed a sodiated molecular ion at m/z 756.2999 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, corresponding to the molecular formula $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{NO}_{17}$, by HRESIMS. Its NMR and HRESIMS spectroscopic data interpretation suggested the presence of a nicotinate group located at C-13. A propionate group, a benzoate group, and two acetate groups were assigned at C-3, C-5, C-7, and C-17, as displayed by HMBC cross-peaks. A hydroxy group could be located at C-15 on the basis of protons H-1 α and H-2 resonances. Indeed, when compared with compounds **1** and **3–5**, the presence of an acetate group at C-15 in compounds **2** and **6** induced an upfield shift of the H-1 α resonance and a downfield shift of the H-2 resonance. The 1D and 2D spectroscopic data recorded for compound **6** indicated the presence of four ester groups, of which a propionate group, a benzoate group, and an acetate group could be assigned at C-3, C-5, and C-17, respectively, from analysis of the HMBC cross-peaks between H-3, H-5, and H₂-17 with the respective ester carbonyl carbons. The last acetate was located at C-15 according to the ^1H NMR resonances at δ_{H} 2.71 for H-1 α and δ_{H} 2.38 for H-2, similar to those of compound **2**. Finally, a COSY correlation between H-7 and a

hydroxy group proton permitted the latter to be located at C-7. The downfield shift of the C-13 carbon resonance at δ_{C} 79.9 indicated its substitution by a second hydroxy group. Careful analysis of the ROESY spectra of premyrsinol esters **2–6** indicated that they all possess the same relative configuration as compound **1**.

The HRESIMS of compound **8** showed a sodiated molecular ion at m/z 633.2689 for $[\text{M} + \text{Na}]^+$, corresponding to the molecular formula $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_{10}$, indicating 14 indices of hydrogen deficiency. The spectroscopic data (CDCl_3 , Table 3) of compound **8** were quite different from those of the previously isolated premyrsinol esters **1–7**. These compounds share the same spin system from H-1 to H-5, but compound **8** differed in terms of the H-7 to H-12 moiety. Indeed, the characteristic proton and carbon resonances for the *gem*-dimethyl-substituted cyclopropane ring were missing. It was considered that compound **8** has a 14-deoxomyrsinol skeleton similar to those of diterpenoids previously isolated from *Euphorbia myrsinites*,³² *E. seguieriana*,³⁸ and *E. prolifera*.³⁹ From the HSQC spectrum and COSY correlations, a *cis*-disubstituted double bond [δ_{C} 123.8 (C-8), 133.7 (C-9) and δ_{H} 6.17 (ddd, $J = 9.7, 6.6, 1.5$ Hz, H-8), 5.88 (dd, $J = 9.7, 5.8$ Hz, H-9)], a methine [δ_{C} 41.5 (C-11) and δ_{H} 3.17 (m, H-11)], and a methylene group [δ_{C} 111.8 (C-18) and δ_{H} 4.89 and 4.77 (s, H-18a and H-18b, respectively)] were established for the H-7 to H-12 moiety, as shown in Figure 3. The interconnection of

Table 2. ^{13}C NMR Spectroscopic Data for Compounds **2**, **4**, **6** (125 MHz) and **1**, **3**, **5** (150 MHz) (CDCl_3 at 300 K, δ_{C} in ppm)

position	1	2	3	4	5	6
1	42.9	44.5	42.6	42.8	42.5	46.6
2	37.4	35.2	37.3	37.4	36.9	35.9
3	78.6	76.7	78.5	78.3	77.9	78.4
4	50.4	50.5	50.1	50.3	49.9	51.2
5	70.0	68.9	68.6	68.6	69.4	69.3
6	47.9	48.1	43.3	47.2	47.6	47.7
7	70.8	70.0	70.5	70.6	70.1	70.8
8	22.2	22.9	22.0	22.1	21.9	23.1
9	19.6	18.9	18.6	18.9	18.5	20.4
10	18.5	18.8	18.1	18.9	18.0	19.4
11	24.0	23.8	23.7	23.8	23.3	22.9
12	35.2	39.5	34.5	34.5	34.8	42.1
13	85.9	80.4	85.4	86.2	85.4	79.9
14	204.3	207.2	204.4	203.8	203.3	209.9
15	84.3	87.4	84.1	84.1	83.8	84.6
16	14.1	15.2	14.1	14.0	13.4	15.5
17	63.0	62.1	63.7	63.5	63.4	61.8
18	29.6	29.2	29.5	29.5	29.3	28.7
19	15.0	15.3	14.1	15.0	14.5	15.6
20	25.1	25.1	24.5	24.5	24.8	22.1
OR ₁ -3	170.6	170.3	171.2	174.8	173.3	172.8
	21.1	20.8	21.3	27.5	27.2	27.5
				9.0	8.7	8.8
OR ₂ -5	165.3	165.2	174.8	174.6	164.6	165.2
	130.0	129.5	40.8	40.3	127.7	129.8
	129.8	129.8	25.7	25.7	129.1	129.9
	128.5	128.5	15.0	14.9	127.8	128.6
	133.3	133.5	11.7	7.5	132.5	133.5
OA ₁ -17	170.9	171.0	170.4	170.2	170.2	179.9
	20.6	21.3	21.4	21.3	21.0	21.2
OR ₃ -7	170.4	170.4	170.0	169.9	169.4	
	21.6	21.7	21.0	21.3	20.9	
OR ₄ -13	170.9		170.8	170.2	n.o. ^a	
	21.4		21.4	21.3	n.o.	
					n.o.	
					136.3	
					132.8	
OR ₅ -15		170.0				170.3
		21.7				21.5

^an.o., signals not observed.

this moiety was established by the HMBC correlations between H-5/C-6/H-7, H-11/C-10/H-19, and H-12/C-13/H-14/C-15/H-1. The locations of two acetate groups at C-5 and C-7, a propionate group at C-3, and a benzoate group at C-14 were deduced from HMBC correlations. ROE correlations between H-2, H-3, H-4, H-7, H-14, H₂-17, and H₃-20 indicated that they all are α -oriented, while correlations between H-5 and H-12 supported their β -orientation, allowing the relative configuration to be determined as depicted in Figure 3. Compound **8** was assigned as 5 α ,7 β -O-diacetyl-14 β -O-benzoyl-3 β -O-propionylmyrsinol.

The anti-CHIKV potential of compounds **1–10** was evaluated against CHIKV replication on Vero cells (Table 4). Compounds **6** and **10** showed significant inhibiting activities with EC₅₀ values of 11 ± 1.4 μM (SI = 5.8) and 4.0 ± 0.3 μM (SI = 10.6), respectively. The other premyrsinol esters **1–5** and **7** and myrsinol ester **8** were not active (EC₅₀ ≥ 50 μM and SI <

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopic Data for Compound **8** (500 MHz) in CDCl_3 (δ_{H} and δ_{C} in ppm, J in Hz)

position	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	position	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1 α	51.4	2.64, dd (10.5, 4.5)	17 β		3.55, dd (9.0, 1.4)
1 β		1.54, dd (14.9, 10.5)	18 α	111.8	4.89, s
2	36.2	2.20, m	18 β		4.77, s
3	78.8	5.33, t (3.6)	19	21.3	1.99, br s
4	51.3	2.99, dd (11.3, 3.6)	20	14.8	1.33, s
5	69.7	5.82, dd (11.3, 1.5)	3-OPr	173.8	
6	54.7			28.1	2.35, m
7	64.0	4.87, t (6.6)		9.3	2.45, m
8	123.8	6.17, ddd (9.7, 6.6, 1.5)			1.18, t (7.4)
9	133.7	5.88, dd (9.7, 5.8)	5-OAc	169.7	
10	147.3			21.5	1.99, s
11	41.5	3.17, m	7-OAc	170.9	
12	39.5	3.80, d (3.0)		21.1	1.98, s
13	89.5		14-OBz	166.4	
14	82.5	5.20, br s		130.1	8.11, d (7.6)
15	80.6			128.8	7.49, t (7.6)
16	14.8	0.89, d (6.7)		133.6	7.62, t (7.6)
17 α	69.3	4.03, d (9.0)	15-OH		n.o. ^a

^an.o., signals not observed.

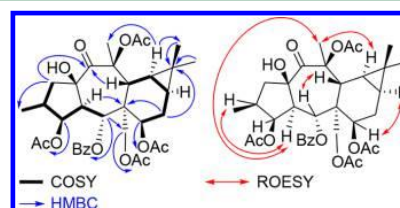


Figure 1. Key COSY (bold, left), HMBC (blue arrows, left), and ROESY (red arrows, right) correlations of compound **1**.

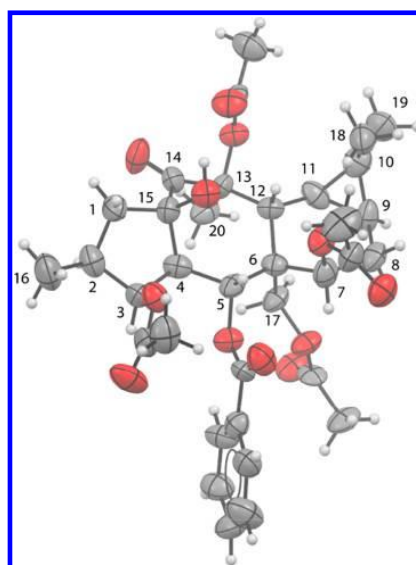


Figure 2. ORTEP view of the X-ray structure of compound **1**.

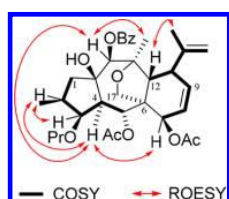


Figure 3. Key COSY (bold) and ROESY (red arrows) correlations of compound **8**.

Table 4. Antiviral Activities of Compounds 1–10 against CHIKV in Vero Cells^a

compound	EC ₅₀ CHIKV	CC ₅₀ Vero	SI ^b
1	78	171	2.2
2	>152	n.d. ^c	n.d.
3	>50	>157	<5
4	107	153	2.2
5	>107	>159	<2.4
6	11 ± 1.4	63.5 ± 16.8	5.8
7	>144	n.d.	n.d.
8	84	158	1.9
9	>11	n.d.	n.d.
10	4.0 ± 0.3	42.7 ± 6.4	10.6
chloroquine	11 ± 7	89 ± 28	8.1

^aData in μM . Values are the median \pm median absolute deviation calculated from at least three independent assays. ^bSI or window for antiviral selectivity calculated as CC₅₀ Vero/EC₅₀ CHIKV. ^cn.d., not determined.

5). Although it is difficult to infer any detailed structure–activity relationship information concerning the premyrsinol series, a deleterious effect of the acetate group at C-7 was noted, since all compounds except compound **6** possess an ester group at this position. The important role of the spatial configuration of H-4 can be deduced from the comparison of

the EC₅₀ values of the epimers **9** and **10**; it is preferably β -oriented for a strong anti-CHIKV activity. This result is consistent with previous studies showing a strong anti-CHIKV effect for 4 β -deoxyphorbol derivatives.²⁰ Compound **10** showed similar anti-CHIKV activity to prostratin (EC₅₀ = 2.7 \pm 1.2 μM , SI = 22.8)¹⁶ and other phorbol esters devoid of any acyl carbon chain at C-13 (EC₅₀ values ranging from 1 to 4 μM and SI between 5 and 15).²⁰

The initial chromatographic fractions F1–F11 were analyzed by untargeted LC-MS/MS, and the corresponding data were investigated using molecular networking available on the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) Web platform (Figure S1, Supporting Information).⁴⁰ First, the MS/MS spectra of isolated diterpene esters (**1–10**) were deposited on GNPS spectral libraries, allowing their visualization in the molecular networks (Figure 4).

The premyrsinane (**1–7**) and myrsinane (**8**) diterpenoids were found in the largest molecular network 1 (MN1), whereas the two phorbol esters (**9** and **10**) were located in a separate molecular network (MN2). Examination of the MS/MS spectra of the premyrsinol and myrsinol esters allowed characteristic fragment ions to be established. The premyrsinane esters **1–7** showed consistent fragment ions at m/z 295, 277, 267, and 149 (Figure S2, Supporting Information). The difference of 27.99 Da between the fragment ions at m/z 295.1693 ($[\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_2]^+$, $\Delta_{m/z} = 1.71$ ppm) and m/z 267.1742 ($[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}]^+$, $\Delta_{m/z} = 2.58$ ppm) corresponded to the neutral loss of CO. The MS/MS spectrum of the myrsinol ester **8** showed fragment ions at m/z 295.1700 ($[\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_2]^+$, $\Delta_{m/z} = 0.66$ ppm), 277.1580 ($[\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}]^+$, $\Delta_{m/z} = 4.47$ ppm), 265.1595 ($[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}]^+$, $\Delta_{m/z} = 0.98$ ppm), and 247.1483 ($[\text{C}_{19}\text{H}_{19}]^+$, $\Delta_{m/z} = 1.52$ ppm) for the diterpene backbone (Figure S3, Supporting Information).⁴¹ The study of the myrsinane fragmentation behavior revealed the occurrence of two potential neutral losses of CH_2O (30.01 Da, for m/z 295 \rightarrow 265 and m/z 277 \rightarrow 247),

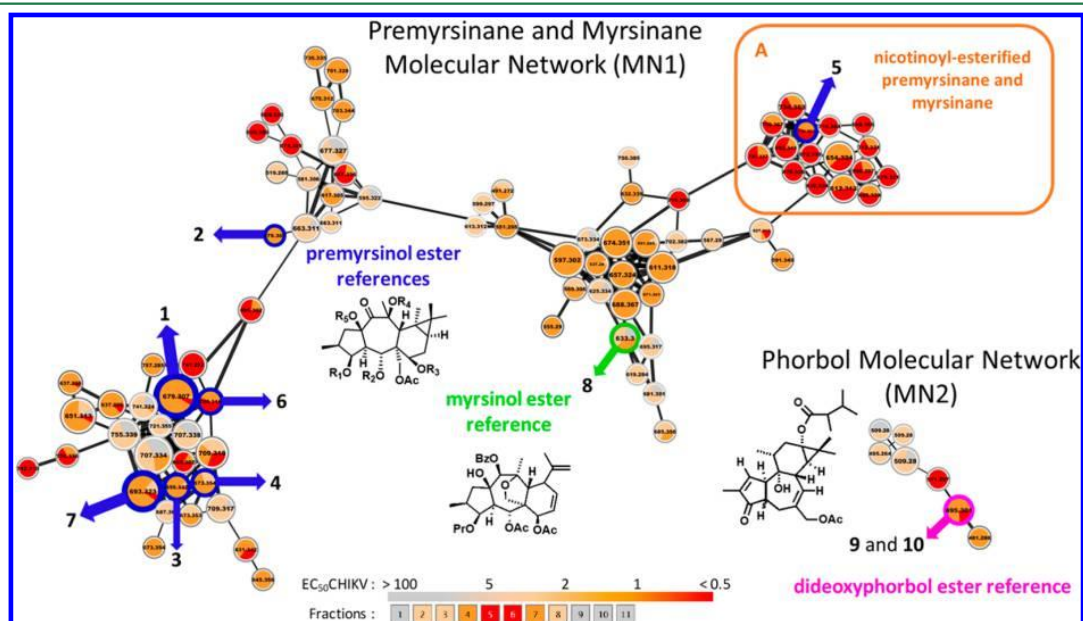


Figure 4. Annotated molecular networks 1 (MN1) and 2 (MN2) from the LC-MS/MS analysis of fractions of *E. pithyusa* extract.

resulting from two possible cleavages for the ether link between C-17 and C-13 present in 13,17-epoxy derivatives.

As depicted in Figure 4, inspection of MN1 showed that the neighboring nodes for the reference compounds 1–8 were diterpene ester analogues related to either premyrsinol or myrsinol diterpenoids (Figure 4). These nodes have a strong spectral similarity score (cosine score with reference >0.7) and share the same MS/MS fragmentation pattern, including neutral losses of the ester groups and the characteristic backbone fragment ions of either premyrsinanes 1–7 or myrsinane 8. Hence, these nodes were annotated as premyrsinol and myrsinol esters bearing various acyl substitutions. Interestingly, a separated cluster enclosing the nicotinoyl-premyrsinol ester 5 was found to contain several nicotinoyl-esterified analogues, as indicated by the even value of the precursor ion mass and their strong spectral similarity scores with the reference compounds 1–8. The MS/MS spectrum of compound 5 showed an intense ion fragment at m/z 124.0486, corresponding to the protonated nicotinic acid (Figure S4, Supporting Information). Inspection of the fragment ions, especially in the m/z range 250–350, showed that these MS/MS spectra were produced by premyrsinol and myrsinol esters.

In MN2, the dideoxyphorbol ester epimers 9 and 10 were detected in the same node due to the MS clustering algorithm employed to reduce redundancy in GNPS molecular networks.^{42,43} Examination of the MS/MS spectra belonging to MN2 showed the presence of fragment ions at m/z 335.1716, 307.1743, 295.1806, and 277.1685 (Figure S5, Supporting Information), which differ from those previously described for the phorbol and deoxyphorbol esters.⁴⁴

To explore the relationship between antiviral activity of fractions and the presence of myrsinane, premyrsinane, and tiglane types, the molecular networks were visualized using a “fraction layout”. The latter suggested that several ions, belonging to both MN1 and MN2, were apparently over-represented in the most potent antiviral fractions F5 and F6 (red nodes in Figure 4). In particular, one node at m/z 511.297, related to the antiviral dideoxyphorbol ester 10 in MN2, was found only in the most active fractions F5 and F6. The corresponding compound differed from 10 by the presence of an additional oxygen in the molecular formula (difference 15.99 Da). The MS/MS spectrum of this compound at m/z 511 showed the same neutral losses of compound 10 (116.153 and 60.020 Da), corresponding to the presence of a 2,3-dimethylbutyrate and an acetate substituent, respectively. Finally, the observation of the backbone fragment ions at m/z 335.1716, 307.1743, 295.1806, and 277.1685 (Figure S6, Supporting Information) in the MS/MS spectrum of the compound at m/z 511 confirmed that it was an oxygenated derivative of the dideoxyphorbol ester 9 or 10.⁴⁵ On the basis of the anti-CHIKV activity of the dideoxyphorbol ester 10 and the antiviral activity of the deoxyphorbol ester previously described,²⁰ this compound found in the most active fractions F5 and F6 could contribute to the strong antiviral activity of fractions F5 and F6, although this compound was not purified and characterized in the present investigation.

The present results show the capability of MS/MS molecular networking⁴³ for efficient annotation of *Euphorbia* diterpene esters, allowing the diversity of diterpene esters produced by *E. pithyusa* to be visualized.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a MCP 300 Anton Paar polarimeter at 24 °C, with MeOH used as solvent. UV spectra were recorded on a Varian Cary 100 scan spectrophotometer and measured in a 1 cm quartz cell. IR spectra were recorded on a PerkinElmer Spectrum BX FT-IR spectrometer. The 1D (¹H and ¹³C) and 2D (COSY, HSQC, HMBC, and ROESY) NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 300 K on a Bruker Avance 600 MHz instrument using a 1.7 mm microprobe for compounds 3, 5, 9, and 10, on a Bruker Avance 500 MHz instrument for compounds 2, 4, 6, and 8, and on a Bruker Avance 300 MHz instrument for compounds 1 and 7. The data processing software was NMRnotebook (<http://www.nmrtec.com/>). A Waters Acquity UPLC system coupled with an LCT Premier XE time-of-flight mass spectrometer was used to acquire LC-ESIMS/HRMS data. The mass spectrometer was fitted with an ESI source operating in the positive-ion mode in the range m/z 80–1500. MS/MS data were deposited in the MassIVE Public GNPS data set (<http://gnps.ucsd.edu>, MSV000080965), and compounds 1–10 were deposited in the GNPS spectral library (CCMSLIB00000840340–CCMSLIB00000840348). The UPLC system comprised a Waters Acquity PDA detector and a BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm i.d., 1.7 μm). The flow rate was 0.6 mL/min. Elution was carried out with a H₂O–acetonitrile (MeCN) + 0.1% formic acid gradient as follows: 95:5 to 0:100 in 5.5 min. The data were treated with Masslynx software. The following instrumentation was used for HRMS analysis: analytical C₁₈ columns (Kromasil, 250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, Thermo Scientific) for HPLC separation on a Waters autopurification system, equipped with a binary pump (Waters 2525); a UV–vis diode array detector (190–600 nm, Waters 2996); and a Polymer Laboratories PL-ELS 1000 ELSD detector. This unit was controlled with Masslynx software. A semipreparative C₁₈ column (Kromasil, 250 × 10 mm; i.d., 5 μm) was used for semipreparative HPLC separation, using a Dionex autopurification system equipped with a binary pump (P580), a UV–vis array detector (200–600 nm, Dionex UVD340U), and a Polymer Laboratories PL-ELS 1000 ELSD detector. This unit was controlled with Chromeleon software. Prepacked silica cartridges were used for flash chromatography, using a CombiFlash Companion apparatus (Serlabo). The visualization reagent used for analytical TLC plates (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) was sulfuric acid–molybdate; it was prepared by dissolving ammonium dimolybdate (50 g) in water (450 mL) and slowly adding concentrated sulfuric acid (50 mL) in ambient conditions. The plates were observed under UV light at 254 and 366 nm. GraceResolv silica cartridges and VersaFlash C₁₈ spherical silica were used for flash chromatography. A CombiFlash Companion (RF-200, Teledyne Isco) and UV detector were used. All other chemicals and solvents were purchased from SDS (Peypin, France).

Plant Material. The aerial parts of *Euphorbia pithyusa* were collected in September 2012 at Macinaggio (Corsica). The plant material was collected and identified by one of the authors (L.-F.N.). A voucher specimen (LF-004) was deposited at the Herbarium of the University of Corsica (Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Corte).

Extraction and Isolation. Dried aerial parts of *E. pithyusa* ground to a coarse powder (661 g) were exhaustively extracted with EtOAc in an ultrasonic bath at 313 K, using a mechanical agitator, over a period of 3 days. The EtOAc extract was filtered through a Buchner funnel, followed by water extraction, to afford two different extracts, a water extract (42.5 g) and an EtOAc extract (21.4 g). Subsequent liquid–liquid extraction of the latter with heptane and MeCN afforded two fractions (7.0 and 7.5 g, respectively). The MeCN fraction (7.5 g) was solubilized in 600 mL of EtOH, to which 6.5 g of Pb(Ac)₂ in 200 mL of water was added. This solution was stirred for 3 h, then filtered over Celite.³¹ The filtrate was concentrated in vacuo, with a diterpenoid-rich extract (3.4 g) being obtained. The latter was mixed with Celite (5 g), then separated by flash chromatography on a prepacked silica column (GraceResolv, 120 g) to obtain 11 fractions (F1–F11). The gradient used was heptane–CHCl₃ (40:60 to 0:100 in 40 min), then CHCl₃–MeOH (100:0 to 80:20 in 60 min). Based on the anti-CHIKV

activity of the fractions, fractions F4–F6 were selected for further separations.

The fraction F4 (479 mg) was previously mixed with 300 mg of Celite, then separated by flash chromatography on a VersaFlash C₁₈ column (spherical silica, 23 × 53 mm, 20–45 μm, 30 g) to obtain four subfractions (F4–1–F4–4). The gradient used was H₂O–MeCN + 0.1% formic acid (40:60 to 0:100 in 130 min). Purification of F4–2 (163 mg) by semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, gradient H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 40:60 to 30:70 in 40 min) afforded diterpenoids **1** (21.2 mg), **2** (1.5 mg), and **8** (1.9 mg), and the previously isolated compound **7** (21.6 mg). Under the same conditions, F4–3 (68.8 mg) was purified to afford the compounds **3** (1.0 mg) and **4** (1.5 mg). The compounds **5** (0.8 mg) and **6** (2.3 mg) were isolated from F5 (138 mg) by semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–ACN + 0.1% formic acid, 30:70 in 45 min). Semipreparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 20:80 in 45 min) of F6 (256 mg) was used for the isolation of the two previously isolated dideoxyphorbol esters, **9** (2.0 mg) and **10** (2.7 mg).

3β,7β,13β,17-O-Tetraacetyl-5α-O-benzoyl-14-oxopremyrinsinol (1): crystals; [α]_D²⁵ –50.0 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 230 (4.33) 205 (3.96) nm; IR ν_{max} 1719, 1706, 1266, 1246, 1229, 1177, 1114, 1026, 711 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 679.2747 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₄₄O₁₂Na, 679.2730).

X-ray crystallographic data of 1: orthorhombic space group, P2₁2₁2₁, *a* = 15.7364(10) Å, *b* = 19.8524 (13) Å, *c* = 11.4540(7) Å, *V* = 3578.3(4) Å³, *Z* = 4, *D_x* = 1.219 mg/m³, μ(Cu Kα) = 0.763 mm⁻¹, and *F*(000) = 1400 e⁻. Crystal dimensions: 0.18 × 0.09 × 0.02 mm³. A total of 8774 reflections were measured with 3975 independent reflections (*R*_{int} = 0.0855). Final *R*₁ = 0.0604, *wR*₂ = 0.0566 for 1366 *I* > 2σ(*I*). Crystallographic data have been deposited in the Cambridge Crystallographic Data Center as entry 1053879 and can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Rd., Cambridge CB21EZ, U.K. [fax, + 44(0)-1233-336033; e-mail, deposit@ccdc.cam.ac.uk].

3β,7β,15β,17-O-Tetraacetyl-5α-O-benzoyl-14-oxopremyrinsinol (2): amorphous powder; [α]_D²⁵ –55.0 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 231 (4.19) 205 (3.67) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 657.2932 [M + H]⁺ (calcd for C₃₅H₄₅O₁₂, 657.2911).

3β,7β,13β,17-O-Tetraacetyl-5α-O-(2-methylbutyryl)-14-oxopremyrinsinol (3): amorphous powder; [α]_D²⁵ –23.5 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 229 (3.96) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 659.3018 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₃H₄₈O₁₂Na, 659.3043).

7β,13β,17-O-Triacetyl-5α-O-(2-methylbutyryl)-3β-O-propanoyl-14-oxopremyrinsinol (4): amorphous powder; [α]_D²⁵ –28.0 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 229 (3.78) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 651.3381 [M + H]⁺ (calcd for C₃₃H₅₃O₁₂, 651.3381).

7β,17-O-Diacetyl-5α-O-benzoyl-13β-nicotinyl-3β-O-propanoyl-14-oxopremyrinsinol (5): amorphous powder; [α]_D²⁵ –32.5 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 230 (4.25) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 756.2999 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₁NO₁₂Na, 756.3055).

13β,17-O-Diacetyl-5α-O-benzoyl-7β-hydroxy-3β-O-propanoyl-14-oxopremyrinsinol (6): amorphous powder; [α]_D²⁵ –19.5 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 230 (4.21) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 709.2837 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₄₆O₁₃Na, 709.2836).

5α,7β-O-Diacetyl-14β-O-benzoyl-3β-O-propanoylmyrsinol (8): amorphous powder; [α]_D²⁵ –15.0 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 229 (3.98), 207 (3.88) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 3; HRESIMS *m/z* 633.2689 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₄H₄₂O₁₀Na, 633.2676).

MS/MS Analysis. LC-ESIMS/HRMS analysis was performed using an HPLC system (U3000, Dionex) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent 6540 Q-TOF, Agilent Technologies) equipped with an ESI source operating in positive mode. A column

with solid-core particles (Accucore C₁₈, 150 mm × 2.1 mm × 2.7 μm, ThermoFisher Scientific) was used to optimize the peak widths and thus the sensitivity of the chromatographic method. The elution gradient was optimized using water and 0.1% formic acid as solvent A, and acetonitrile and 0.1% formic acid as solvent B. The optimal gradient was the following: 0–25 min linear gradient from 20% to 100% solvent B, 25–28 min isocratic plateau at 100% solvent B, 29–34 min re-equilibration at 20% solvent B, at a constant flow rate of 300 μL/min. ESI source parameters were set as follows: gas temperature 325 °C, drying gas 11 L/min, nebulizer 30 psig, capillary voltage 3500 V, and fragmentor voltage 110 V. Acquisitions were achieved using the “extended dynamic range” mode allowing a mass resolution of 20 000 at *m/z* 922 and a dynamic range over five decades.

Untargeted MS/MS analyses were performed using an optimized data-dependent acquisition (DDA) mode consisting of a full MS scan from *m/z* 100 to *m/z* 1700 (scan time: 100 ms), followed by DDA of MS/MS spectra of the five most intense ions (top five, 200 ms each) from *m/z* 200 to *m/z* 900, with a minimum intensity of 2500 counts. No exclusion rule was used for the number of scans as pseudoquantitative proxy in MN2MS. Collision energy was fixed at 35 eV according to the optimized collision-induced dissociation conditions.

Molecular Networking. Molecular networking permits the visualization of related molecules based on comparison of their MS/MS data.^{40,46} Acquisition files were converted to mzML format using the MSConvert part of the ProteoWizard suite.⁴⁷ The molecular networks were generated using Global Natural Products Social Molecular Networking (<http://gnps.ucsd.edu>).⁴⁸ For the clustering of consensus MS/MS data, parameters were set with a precursor ion mass tolerance of 0.1 Da and a fragment ion mass tolerance of 0.05 Da. The fragment ions below 10 counts were removed from MS/MS spectra. MNs were generated using 10 minimum matched peaks and a cosine score of 0.7. The minimum matched peaks for library matching were set to 6, with a score threshold at 0.5. The precursor window was filtered in a 25 Da range. Data were visualized using Cytoscape 3.4.0 software.⁴⁹ A force-directed layout modulated by cosine score was used for data visualizations. Relative distribution of the MS/MS spectra was estimated by representing the size of the node by the sum of precursor ion intensities and by mapping the sum of precursor ion intensities from each fraction into a pie chart diagram.

Virus Cell-Based Anti-Chikungunya Assay. Vero (African green monkey kidney) cells and the Chikungunya virus strain 899 were used in all the experiments. See Supporting Information for details (S44).

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00233.

¹H NMR spectra for compounds **7** and **9–11**; ¹H, ¹³C, HMBC, ROESY, and HRESIMS data for compounds **1–6** and **8**; MS/MS spectra of compounds **1, 5, 8, and 10** (PDF)

Crystallographic data (CIF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Tel: + 33 1 69 82 30 85. Fax: + 33 1 69 07 72 47. E-mail: marc.litaudon@cncrs.fr.

*Tel: + 33 4 95 45 01 87. E-mail: paolini@univ-corse.fr.

ORCID

Fanny Roussi: 0000-0002-5941-9901

David Touboul: 0000-0003-2751-774X

Marc Litaudon: 0000-0002-0877-8234

Julien Paolini: 0000-0002-3109-1430

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by an “Investissement d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ANR-10-LABX-25-01). The authors are grateful to C. Collard, N. Verstraeten, and C. Vanderheydt from the Laboratory for Virology and Experimental Chemotherapy at the Rega Institute for Medical Research in Leuven, for the evaluation of antiviral activity.

REFERENCES

(1) Burt, F. J.; Rolph, M. S.; Rulli, N. E.; Mahalingam, S.; Heise, M. T. *Lancet* **2012**, *379*, 662–671.
 (2) Devaux, C. A. *World J. Virol.* **2012**, *1*, 11–22.
 (3) Caglioti, C.; Lalle, E.; Castilletti, C.; Carletti, F.; Capobianchi, M. R.; Bordi, L. *New Microbiol.* **2013**, *36*, 211–227.
 (4) Charrel, R. N.; Leparç-Goffart, I.; Gallian, P.; de Lamballerie, X. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 662–663.
 (5) Olowokure, B.; Francis, L.; Polson-Edwards, K.; Nasci, R.; Quénel, P.; Aldighieri, S.; Rousset, D.; Gutierrez, C.; Ramon-Pardo, P.; dos Santos, T.; Hospedales, C. J. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 1039–1040.
 (6) Bajak, A. *Nature* **2014**, *512*, 124–125.
 (7) Roth, A.; Mercier, A.; Lepers, C.; Hoy, D.; Duituturaga, S.; Benyon, E.; Guillaumot, L.; Souarès, Y. *Euro. Surveill.* **2014**, *19*, 20929.
 (8) Singh, P.; Chhabra, M.; Mittal, V.; Sharma, P.; Rizvi, M. A.; Chauhan, L.; Rai, A. *Vaccine: Dev. Ther.* **2013**, *35*–46.
 (9) Hoke, C. H., Jr.; Pace-Templeton, J.; Pittman, P.; Malinoski, F. J.; Gibbs, P.; Ulderich, T.; Mathers, M.; Fogtman, B.; Glass, P.; Vaughn, D. W. *Vaccine* **2012**, *30*, 6713–6720.
 (10) Kaur, P.; Chu, J. J. H. *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 969–983.
 (11) Rashad, A. A.; Mahalingam, S.; Keller, P. A. *J. Med. Chem.* **2013**, *57*, 1147–1166.
 (12) Staveness, D.; Abdelnabi, R.; Near, K. E.; Nakagawa, Y.; Neyts, J.; Delang, L.; Leyssen, P.; Wender, P. A. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 680–684.
 (13) Staveness, D.; Abdelnabi, R.; Schrier, A. J.; Loy, B. A.; Verma, V. A.; DeChristopher, B. A.; Near, K. E.; Neyts, J.; Delang, L.; Leyssen, P.; Wender, P. A. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 675–679.
 (14) Abdelnabi, R.; Amrun, S. N.; Ng, L. F. P.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Delang, L. *Antiviral Res.* **2017**, *139*, 79–87.
 (15) 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.
 (16) Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2183–2187.
 (17) Bourjot, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Litaudon, M. *Molecules* **2014**, *19*, 3617–3627.
 (18) Corlay, N.; Delang, L.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Clerc, P.; Smadja, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *Fitoterapia* **2014**, *97*, 87–91.
 (19) Olivon, F.; Palenzuela, H.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Roussi, F.; Grondin, I.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1119–1128.
 (20) 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.
 (21) 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.
 (22) Mwine, J. T.; Van Damme, P. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 652–662.
 (23) Vasas, A.; Hohmann, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8579–8612.
 (24) Rosen, R. H.; Gupta, A. K.; Tyring, S. K. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *66*, 486–493.

(25) Durán-Peña, M. J.; Ares, J. M. B.; Collado, I. G.; Hernández-Galán, R. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 940–952.
 (26) Webster, G. L. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94*, 3–46.
 (27) Horn, J. W.; Xi, Z.; Riina, R.; Peirson, J. A.; Yang, Y.; Dorsey, B. L.; Berry, P. E.; Davis, C. C.; Wurdack, K. J. *Evolution* **2014**, *68*, 3485–3504.
 (28) Jeanmonod, D.; Gamisans, J. *Flora Corsica*; Edisud 921: Aix-en-Provence, France, 2007; Vol. 1.
 (29) Dioscorides Pedanius. *De Materia Medica*; IBIDIS: Johannesburg, South Africa, 2000.
 (30) Nothias-Scaglia, L.-F.; Dumontet, V.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 202–209.
 (31) Appendino, G.; Belloro, E.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Ballero, M. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1399–1404.
 (32) Öksüz, S.; Gürek, F.; Gil, R. R.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1457–1462.
 (33) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4295–4327.
 (34) Vasas, A.; Sulyok, E.; Martins, A.; Rédei, D.; Forgo, P.; Kele, Z.; Zupkó, I.; Molnár, J.; Pinke, G.; Hohmann, J. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1280–1285.
 (35) Xu, J.; Guo, Y.; Xie, C.; Li, Y.; Gao, J.; Zhang, T.; Hou, W.; Fang, L.; Gui, L. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2224–2230.
 (36) Vasas, A.; Forgo, P.; Orvos, P.; Tälösi, L.; Csorba, A.; Pinke, G.; Hohmann, J. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1990–2004.
 (37) Shokoohinia, Y.; Taghialatela-Scafati, O.; Sajjadi, S.; Zolfaghari, B.; Appendino, G. *Planta Med.* **2010**, *76*, 148.
 (38) Jeske, F.; Jakupovic, J.; Berendsohn, W. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1743–1750.
 (39) Xu, J.; Guo, Y.; Xie, C.; Li, Y.; Gao, J.; Zhang, T.; Hou, W.; Fang, L.; Gui, L. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2224–2230.
 (40) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapon, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrew, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; Boya, P. C. A.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O’Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Lington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837.
 (41) Patiny, L.; Borel, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1223–1228.
 (42) Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Begger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L. *Metabolomics* **2007**, *3*, 211–221.
 (43) Quinn, R. A.; Nothias, L.-F.; Vining, O.; Meehan, M.; Esquenazi, E.; Dorrestein, P. C. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 143–154.
 (44) Nothias-Scaglia, L.-F.; Schmitz-Afonso, I.; Renucci, F.; Roussi, F.; Touboul, D.; Costa, J.; Litaudon, M.; Paolini, J. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1422*, 128–139.
 (45) Schmidt, R.; Hecker, E. *Cancer Res.* **1975**, *35*, 1375–1377.

(46) Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, C. M.; Liu, X.; Boudreau, P. D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; Wong, W. R.; Linington, R. G.; Zhang, L.; Debonsi, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1686–1699.

(47) ProteoWizard: MSCConvert for mzXML <http://proteowizard.sourceforge.net/downloads.shtml> (accessed Oct 27, 2014).

(48) GnPS: Global Natural Products Social Molecular Networking <http://gnps.ucsd.edu/> (accessed Nov 18, 2014).

(49) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504.

■ NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

This paper was published ASAP on July 3, 2017, with an incorrect description of ester 10 in the Abstract text. The corrected version was reposted on July 6, 2017.

E. MANUSCRIT N°5

Les informations complémentaires sont disponibles en annexe : **Figures S1–S84.**



Figure 43. Cyathium d'*Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*. Photo : M. E.

Chemotaxonomic Comparison of Two *Euphorbia* Sister-Species using Tandem Mass Spectrometry Based Molecular Networking

Mélissa Nothias-Esposito^{1,2}, Louis-Félix Nothias^{2,3,4}, Pascal Retailleau², Jean Costa¹, Fanny Roussi², David Touboul², Julien Paolini¹, Marc Litaudon²

¹*Laboratoire de Chimie de Produits Naturels, UMR CNRS SPE 6134, University of Corsica, 20250, Corte, France*

²*Institut de Chimie des Substances Naturelles ICSN-CNRS UPR 2301, Univ. Paris-Saclay, 1 avenue de la terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France*

³*Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center, and Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, 92093, California, USA*

⁴*Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California at San Diego, La Jolla, 92093, La Jolla, USA*

PREFACE

The manuscript presented herein is a draft under preparation which is welcoming any suggestions. Note that additional data analysis will be performed on the LC-MS/MS data with soon to be released latest bioinformatics tools.

Résultats

Abstract: The plant species *Euphorbia pithyusa* and *Euphorbia pithyusa* ssp. *cupanii* are two closely related Mediterranean spurges for which taxonomical relationships are still discussed. Herein, we investigated their diterpene esters profile using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and molecular networking. Thanks to reference MS/MS spectra of diterpenoids previously isolated from *E. pithyusa*, and their fragmentation pattern molecular networking enabled the annotation of numerous esters of dideoxyphorbol, premyrsinane and myrsinane type in both plants. Results showed that both extracts contained premyrsinane, myrsinane, and phorboids esters. Some specificities were observed, with a comparatively higher diversity of premyrsinane derivatives in *E. pithyusa* extracts, and of myrsinane esters in *E. pithyusa* ssp. *cupanii* extracts. The inspection of the MS/MS fragmentation suggested the presence of modified myrsinane derivatives observed in some fractions of *E. pithyusa* ssp. *cupanii*. A structure-guided purification procedure was carried out to characterize those compounds. In total, twenty diterpene esters belonging to premyrsinane, myrsinane and phorbol type were isolated from *E. pithyusa* ssp. *cupanii*, and identified by extensive NMR and X-ray diffraction crystallography. Those results showed that LC-MS/MS and molecular networking are powerful tools to compare and annotate *Euphorbia*'s diterpene esters, which pave the way of questioning the ecological role of those secondary metabolites.

Keywords: Chemotaxonomy, LC-MS/MS, Molecular Networking, Diterpenoids, Myrsinol, Premyrsinol, Phorbol.

1. Introduction

The taxonomic classification of *Euphorbia* species has been greatly discussed in scientific literature due to morphological diversification within the genus, and of frequent intra-specific polymorphism. Indeed, spurges can be prostrate annuals, trees of more than twenty meters, and even succulents having a cactiform aspect [1]. *Euphorbia* is one the largest genus with more than 2000 taxa widespread essentially in Africa and America, but also in temperate areas such as the Mediterranean basin [2,3]. The systematic classification of *Euphorbia* species has been typically achieved by morphological comparison, in particular of seeds and glands. For instance, Salmaki *et al.* have proposed a classification key based on the micro-morphological characteristics of the *Euphorbia* seeds [4]. Recent phylogenetic studies [5–11], showed that the *Euphorbia* genus is composed of four subgenus clades (*Rhizanthium*, *Esula*, *Euphorbia* and *Chamaesyce*) and established some of key intra-clades relationships. Those studies sequenced nuclear and/or chloroplast genes marker to establish the relatedness between species, but this method is not resolved enough to study closely related species or intra-specific variability. In those cases, sequencing the plant genome would offer the needed resolution. Nonetheless, the process of speciation and phenotypes formation are environmental adaptation that are also shaped by modulation of the genome transcriptional activity [12]. In particular, the transcription of stress-related genes, such as those coding for secondary metabolites, can undergo short and long-term change. For those reasons, transcriptomics and/or metabolomics-based approaches are well suited to functionally characterized variation in metabolite production which dictates species adaptation to its ecosystem [13]

The sister-species *Euphorbia pithyusa* L. and *Euphorbia pithyusa* ssp *cupanii* (Guss. ex Bertol; A.R. Sm) are perennial species distributed in Mediterranean areas. The species *E. pithyusa* L. has a limited distribution in the Balearic Islands, Provence, Corsica, Tuscan

Résultats

Archipelago, Sardinia, and Sicily, near the coastal strip, whereas *E. pithyusa* is an endemic taxa of Corsica, Sardinia, and Sicily found inland [14]. Botanists have discussed the relationship between these two taxa, and advocate for *E. pithyusa* ssp. *cupanii* to be classified as a separate species [*Euphorbia cupanii* Guss. ex Bertol] [14] based on distinctive morphological characters and different biotopes (**Table S1** and **Fig. S2**). Indeed, *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp. *cupanii* exhibited some different botanical. genetic characteristics, the preferred biotope (chamephyte and geophyte, respectively), and the number of chromosomes ($2n=28$ and $2n=36$, respectively) [14,15]. Nevertheless, some morphological similarities have been shown between these two species in some vegetative stages, particularly when *E. pithyusa* ssp. *cupanii* grows in humid environments [16].

The study of *E. pithyusa* ssp. *cupanii* aerial parts, collected in Sardinia, led to the discovery of eleven new diterpenoids belonging to the lathyrane, premyrsinane and tigliane types [17]. Recently, we investigated the aerial parts extract of *E. pithyusa* collected in Corsica and found seven premyrsinane, one myrsinane, and two tigliane diterpene esters [18]. In the present study, we performed a chemotaxonomical comparison of the diterpene ester profile of those two-sister species, collected in Corsica, using tandem mass spectrometry (MS/MS) based molecular networking [19]. Diterpene esters from *Euphorbia* are found in latex, which acts as a chemical defense against microbes, insects, and other herbivores vertebrates found in the environment [20–22]. Recently, Sedio [13] discussed the potential of molecular networking [23] to test the *Ehlich* and *Raven*'s seminal hypothesis [24], which postulated that the speciation in plants is driven by defense evolution against natural enemies. Herein, we showed that molecular networking can indeed capture rapidly both chemical similarity and divergence between related plant species. The findings were validated by isolating the MS/MS annotated molecules, and discussed implication in regard to Ehlich and Raven hypothesis.

Material and Methods

2.1 Plant material, extraction and isolation

The aerial parts of *Euphorbia pithyusa* ssp. *cupanii* were collected in October 2014 at Morosaglia in Corsica Island (France) by M. N.-E. and L.-F. N.. The plant identification was realized by M. N.-E., L.-F. N., and Marie-José Battesti, and a voucher specimen (ME-3-151-A) was deposited at the Herbarium of the University of Corsica (Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Corte). Dried aerial parts of *E. pithyusa* ssp. *cupanii* were grounded into a coarse powder (1204 mg) and were exhaustively extracted with EtOAc at 100 bar and 313 K using a high-pressure extractor (Zippertex). The EtOAc extract was filtered through a Buchner funnel, and a liquid-liquid extraction was achieved with water to afford an aqueous extract and an organic extract that were dried under vacuum (43.1 g, and 56.4 g, respectively). The organic extract was resuspended in MeCN and subsequent liquid-liquid extraction with heptane was performed to give two fractions that were dried under vacuum (25.7 g and 18.4 g respectively). The MeCN fraction (18.4 g) was solubilized in 250 ml of EtOH and 7.5 g of Pb(Ac)₂ in 250 ml of water was added for three hours [17]. The Pb-chlorophylls complex were removed by Buchner filtration in order to obtain a diterpenoids-rich extract (9.3 g). This latter extract was concentrated under vacuum and mixed with Celite (10 g), then separated by flash chromatography on a prepacked silica column (GraceResolv, 120 g) to obtain 14 fractions (F1–F14). The gradient used was heptane–CHCl₃ (40:60 to 0:100 in 40 minutes), then CHCl₃–MeOH (100:0 to 80:20 in 60 min). Based on molecular networks interpretation, F10 to F11 were selected for the isolation of targeted diterpenoids compounds. See supporting information for details on the experimental procedure used for compound isolation (S1).

2.2. General Experimental and Compound Isolation Procedures

Optical rotations $[\alpha]_D$ were measured on a polarimeter MCP 300 Anton Paar polarimeter at 24 °C. Monochromatic light source is the sodium D-lines. EtOH was used as solvent. IR spectra were obtained on a Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR system. UV spectra were recorded on a Varian Cary 100 scan spectrophotometer and they were measured in a 1 cm quartz cell. The 1D- (^1H and ^{13}C) and 2D- (COSY, HSQC, HMBC and ROESY) NMR analysis were recorded in CDCl_3 at 300 K on a Bruker Avance 600 MHz instrument using a 1.7 mm microprobe for compounds **16a–c** and **17**, on a Bruker Avance 500 MHz instrument for compounds, **11a**, **11h**, **15**, **14a**, **15a**, and **15b**, and on a Bruker Avance 300 MHz instrument for compounds **11b**, **11c**, **13**, **14b**, **14c**, and **15c**. The data processing software was NMRnotebook[®] (<http://www.nmrtec.com/>). Analytical C_{18} columns (Kromasil, 250×4.6 mm i.d., $5 \mu\text{m}$, Thermo Scientific) was used for HPLC separation on 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. This unit was controlled with Masslynx software. Semi-preparative C_{18} column (Kromasil, 250×10 mm; i.d. $5 \mu\text{m}$) was used for semi-preparative HPLC separation using a Dionex autopurification system equipped with a binary pump (P580), an UV–vis array detector (200–600 nm, Dionex UVD340U), and a PL-ELS 1000 ELSD detector Polymer Laboratory. This unit was controlled with Chromeleon software. The staining reagent used for analytical TLC plates (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) was the sulfuric molybdate, which was prepared by dissolving ammonium dimolybdate (50 g) in water (450 mL) and slowly adding concentrated sulfuric acid (50 mL) in cold conditions. The plates were observed at 254 nm and 366 nm UV-wavelength. GraceResolv silica cartridges and VersaFlash C_{18} spherical silica were used for flash chromatography using a Combiflash Companion (RF-200, Teledyne Isco) and UV detector. An Acquity Waters UPLC Waters system coupled with a LCT Premier XE time-of-flight mass

Résultats

spectrometer were used for acquired LC-HRESIMS data. This MS was fitted with an ESI source operating in positive ion mode in the range m/z 80-1500. UPLC system was composed of a Waters Acquity PDA detector, a BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) at a flow rate of 0.6 mL/min. Elution was conducted with a H₂O–acetonitrile (MeCN) + 0.1% formic acid gradient as follows: 95:5 to 0:100 in 5.5 min. The data were treated with Masslynx[®] software. All other chemicals and solvents were purchased from SDS (Peypin, France).

The fraction F10 (830 mg) was mixed with 900 mg of Celite and subjected to flash chromatography on a VersaFlash C₁₈ column (Spherical, 23 x 53 mm, 20-45 μm 30 g). The eluted system chose was H₂O–MeCN + 0.1% formic acid (40:60 to 0:100 in 50 minutes), leading to obtain 5 fractions, F10-1 to F10-5. The fraction F10-2 (449 mg) was fractionated by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 30:70 in 40 min) afforded three new compounds, compound **14a** (2.3 mg), **14b** (110 mg) and **14c** (117 mg). The fractionation of F10-3 (83.3 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 20:80 in 40 min) afforded the compound **11c** (4.9 mg). Then, the fraction F10-4 (32.6 mg) was prepared by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 15:85 in 40 min) afforded the compound **15c** (7.4 mg).

The Fraction F11 (2824 mg) was mixed with 3 g of Celite and subjected to flash chromatography on a pre-packed silica column (GraceResolv, 120 g). The eluted system chose was acetone-heptane (10:90 to 100:0 in 111 minutes), leading to obtain 10 fractions, F11-1 to F11-10. The fraction F11-2 (1254 mg) was fractionated by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 30:70 in 45 min) afforded two new compounds, **15a** (32.1 mg) and **11e** (4.7 mg). The fractionation of F11-3 (374.7 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 30:70 in 40 min) afforded two new compounds, **15b** (3.9 mg) and **11e** (11.8 mg), and one know compound **11d** (12.9), while the fractionation of F11-4 (383.8 mg) in the same conditions afforded two new compounds, **11a**

Résultats

(2.9 mg) and **12** (22.7 mg). Then, the fractionation of F11-5 (134.4 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 20:80 in 40 min) afforded two new compounds, **11h** (3.1 mg) and **13** (2.6 mg), and two known compounds, **11f** (6.4 mg) and **11g** (2.9 mg).

The fractionation of F12 (1075 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 15:85 in 45 min) afforded four new compounds, **16a** (0.8 mg), **16b** (1.2 mg), **16c** (0.5 mg), and **17** (1.7 mg).

3β,15β-O-diacetyl-7β-14β-O-dibenzoyl-5α-hydroxymyrsinol (11a): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -150.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 273 (3.74), 230 (4.54), 205 (4.32) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables S2 and S4; HRESIMS *m/z* 681.2698 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₈H₄₂O₁₀Na, 681.2676).

15β-O-acetyl-7β,14β-O-dibenzoyl-5α-hydroxy-3β-O-propanoylmyrsinol (11b): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -138.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 273 (3.47), 230 (4.48), 204 (4.25) nm; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables S2 and S4; HRESIMS *m/z* 695.2836 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₉H₄₄O₁₀Na, 695.2832).

3β,7β-O-diacetyl-5α,14β-O-dibenzoylmyrsinol (11c): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -6.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 274 (4.49), 231 (4.59), 204 (4.34) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables S2 and S4; HRESIMS *m/z* 681.2679 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₈H₄₂O₁₀Na, 681.2676).

5α,15β-O-diacetyl-14β-O-benzoyl-7β-O-nicotinyl-3β-O-propanoylmyrsinol (11h): crystal; $[\alpha]_D^{25}$ -42.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 263 (3.70), 226 (4.37), 204 (4.27) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables S2 and S4; HRESIMS *m/z* 738.2886 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₀H₄₅NO₁₁Na, 738.2890).

3β,5α,7β,10,15β-O-pentacetyl-14β-O-benzoyl-10,18-dehydromyrsinol (12): crystal; $[\alpha]_D^{25}$ -408.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 274 (3.18), 231 (4.21), 203 (3.85) nm; for ¹H and

Résultats

^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables S2 and S4; HRESIMS m/z 721.2843 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{O}_{13}\text{Na}$, 721.2836).

3 β ,5 α ,7 β ,10,15 β -O-pentacetyl-2 α -O-benzoyl-14-oxo-10,18-dehydromyrsinol (**13**): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -202.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 230 (4.30), 203 (4.14) nm; for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables S2 and S4; HRESIMS m/z 735.2649 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{O}_{14}$, 735.2653).

3 β ,7 β -O-diacetyl-5 α -O-benzoyl-17,13-oxy-14-oxopremyrsinol (**14a**): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -50.5 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 230 (4.29), 206 (3.95); for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables S3 and S4; HRESIMS m/z 577.2434 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_9\text{Na}$, 577.2414).

3 β ,7 β ,15 β -O-triacetyl-5 α -O-benzoyl-17,13-oxy-14-oxopremyrsinol (**14b**): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -11.2 (*c* 1, EtOH); IR ν_{max} 1721, 1370, 1266, 1227, 1097, 1070, 1024, 835, 710 cm^{-1} ; UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 231 (3.60) nm; for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables S3 and S4; HRESIMS m/z 619.2515 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{10}\text{Na}$, 619.2519).

7 β ,15 β -O-diacetyl-5 α -O-benzoyl-3 β -propanoyl-17,13-oxy-14-oxopremyrsinol (**14c**): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -6.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 231 (3.33) nm; for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables S3 and S4; HRESIMS m/z 633.2697 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_{10}\text{Na}$, 633.2676).

3 β ,7 β -O-diacetyl-5 α ,14 β -O-dibenzoyl-17,13-oxypremyrsinol (**15a**): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -6.5 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 231 (4.35), 202 (4.27) nm; for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables S3 and S4; HRESIMS m/z 683.2819 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{Na}$, 683.2832).

3 β ,14 β -O-diacetyl-5 α -7 β -O-dibenzoyl-17,13-oxypremyrsinol (**15b**): crystal; $[\alpha]_D^{25}$ -4.0 (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 230 (4.54), 205 (4.27) nm; for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic

Résultats

data, see Tables S3 and S4; HRESIMS m/z 683.2843 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{38}H_{44}O_{10}Na$, 683.2832).

7 β -O-acetyl-5 α ,14 β -O-dibenzoyl-3 β -propanoyl-17,13-oxypremyrinsinol (15c): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D$ -24.3 (c 1, EtOH); IR ν_{max} 3325, 2973, 2884, 1379, 1327, 1273, 1087, 1046, 879 cm^{-1} ; UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 274 (3.26), 231 (4.28), 204 (3.79) nm; for 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Tables S3 and S4; HRESIMS m/z 697.2983 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{39}H_{46}O_{10}Na$, 697.2989).

12 β -O-[deca-2E,4Z-dienoyl]-13 α -isobutyl-4 β -phorbol (16a): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D$ +0.6 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 264 (4.57), 205 (4.33) nm; For 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table S5; HRESIMS m/z 607.3246 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{34}H_{48}O_8Na$, 607.3247).

12 β -O-[deca-2E,4Z-dienoyl]-13 α -(2-methylbutyl)-4 β -phorbol (16b): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D$ +2.0 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 264 (4.23), 206 (3.97) nm; for 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table S5; HRESIMS m/z 621.3422 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{35}H_{50}O_8Na$, 621.3403).

12 β -O-[deca-2Z,4E-dienoyl]-13 α -isobutyl-4 β -phorbol (16c): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D$ +5.2 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 262 (3.93), 206 (3.75) nm; For 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table S5; HRESIMS m/z 607.3264 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{34}H_{48}O_8Na$, 607.3247).

12 β -O-[deca-2Z,4E-dienoyl]-13 α -isobutyl-5-ene-7-oxo-4 β -phorbol (17): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D$ +16.0 (c 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 261 (4.34) nm; for 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, see Table S5; HRESIMS m/z 621.3040 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{34}H_{46}O_9Na$, 621.3040).

2.3. X-ray structure determination

Colourless crystals suitable for single-crystal X-ray analysis were obtained after incubation of concentrated Et₂O solutions saturated with hexane vapours at low temperature for the five compounds (**11d**, **11f**, **11h**, **12**, and **15b**) analysed herein. All the data were collected on a Rigaku diffractometer constituted by a MM007 HF rotating-anode generator, equipped with Osmic CMF confocal optics, and a Rapid II curved Image Plate, operating with Cu-K α radiation ($\lambda = 1.54187 \text{ \AA}$). Samples were irradiated at room temperature. The crystal-to-detector distance was 127.40 mm, and in accordance with the IP detector area, allowed us to record 10°-oscillation frames in the range 6-136.5° 2 θ . ω -scan strategies by the *d*trek* program [25] based upon cell constants and matrix orientation derived from a preliminary scan of few 1°-oscillation images were chosen to optimize the best coverage of Friedel pairs for each sample. Data reduction and scaling were carried out with an empirical absorption correction, as well as a treatment for Lorentz and polarization effects using the program *Fs_Process* [26]. Completeness up to 2 θ max for all datasets was better than 97%. Compounds **11d**, **11f**, **11h** and **15b** were assigned to the space group P 2₁2₁2₁ (n° 19), and finally compound **12**, to the monoclinic space group P 2₁ (n° 4), based upon systematic absences, *E*-statistics, agreement factors for equivalent reflections, and successful solution and refinement of the corresponding structure. The structures were solved by phasing intrinsic methods (SHELXT) [27], and refined by full matrix least squares on *F*² using SHELXL-2014/7 [28]. Anisotropic thermal parameters were used for all non-hydrogen atoms and if most of the H atoms were located in residual maps they all were refined as riding and with *U*_{eq} values set at 1.2*U*_{eq} (parent atom) (1.5 for the methyl groups or hydroxyl oxygen atoms). RIGU rigid-bond restraints were used in SHELXL for the bonded atoms in the propenyl substituent at C12 in **11d** and for the atoms in the phenyl and pyridine groups in **11h** to make displacement ellipsoid plots chemically more reasonable.

In absence of strong anomalous scatterers, Bayesian-type analysis [29] of Bijvoet pairs of reflections as implemented within the PLATON [30] program was undertaken for each valuable sample to assign the correct absolute structure. Crystals **11d**, **11f** and **11h** appeared to be weak diffractors despite intense copper radiation and long exposure time (in the range of 60 - 120s per degree of oscillation), therefore the most reliable result that was obtained for **12** was applied to corroborate the other estimates of these family compounds. Hoof¹⁴ parameter [$y = -0.02$ (4)] and P2 or P3(true) = 1 reinforce the significance of the Flack [31] x and Parsons [32] z parameter estimates [$x = -0.04$ (5) and $z = 0.04$ (5)] from 3003 Friedel pairs (95% Friedel coverage) and 2310 quotients $[(I^+)-(I^-)]/[(I^+)+(I^-)]$. X-ray crystallography data collection parameters and structure refinement statistics are reported in **Table S3**, while the Ortep view of the compounds **11d**, **11f**, **11h**, **12**, and **15b** are reported in **Fig. S4**. Crystallographic data have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (deposit No. CCDC 1518590-1518594). 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).

2.4. Untargeted MS/MS analyses

LC-ESI-MS/HRMS analysis was performed on a HPLC system (U3000, Dionex) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent 6540 Q-TOF, Agilent Technologies) equipped with an ESI source operating in positive mode. A column with solid-core particles (Accucore C18, 150 mm \times 2.1 mm \times 2.7 μ m, ThermoFisher Scientific) was used. The mobile phase A was composed of 99.9 % water and 0.1% formic acid, and the mobile phase B of 99.9 % acetonitrile and 0.1% formic acid. The elution gradient was as following: 0-25 min linear gradient from 20 to 100% solvent B, 25-28 min isocratic plateau at 100% solvent B, 29-34 min reequilibration at 20% solvent B, at a constant flow rate of 300

Résultats

$\mu\text{L}/\text{min}$ and a column temperature of 40°C . The ESI source parameters were set as follow: gas temperature 325°C , drying gas $11\text{ L}/\text{min}$, nebulizer 30 psig , capillary voltage 3500 V , and fragmentor voltage 110 V . Acquisitions were achieved using the “extended dynamic range” mode allowing a mass resolution of $20\,000$ at $m/z\ 922$. Untargeted MS/MS analyses were performed in data-dependent acquisition (DDA) mode consisting of a full MS scan from $m/z\ 100$ to $m/z\ 1700$ (scan time: 100 ms), followed by DDA of MS/MS spectra of the five most intense ions (top five, 200 ms each) from $m/z\ 200$ to $m/z\ 900$, with a minimum intensity of 2500 counts. No exclusion rule was use, so that the number of scans per ion could be used as pseudo quantitative proxy in molecular networks. Collision energy was fixed at 35 eV according to the optimized collision-induced dissociation conditions.

2.5. Molecular networking

Molecular networking captures relatedness of MS/MS fragmentation pattern, and thus of similar molecules [33,34]. Acquisition files were converted to mzML format using MSConvert part of ProteoWizard suite. The molecular networks were generated using Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS at <http://gnps.ucsd.edu> web site) [34]. For the clustering of consensus MS/MS spectra, parameters were set to a precursor ion mass tolerance of 0.025 Da , a fragment ion mass tolerance of 0.025 Da . The fragment ions below 10 counts were removed from MS/MS spectra. Molecular networks were generated using 10 minimum matched peaks and a cosine score of 0.7 . The minimum matched peaks for library matching was set to 6 with a score threshold at 0.5 . The precursor window was filtered in a 25 Da range Data were visualized using Cytoscape 3.4.0 software [35]. A force-directed layout modulated by cosine score was used for data visualizations. Relative distribution of the MS/MS was estimated by representing the size of the node by the sum of MS/MS scans, and by mapping the sum of MS/MS scans for each fraction or group as a pie chart diagram.

3. Results and discussions

3.1. Comparing the diterpene ester profile of *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp *cupanii* by MS/MS molecular networking

The aerial parts of *E. pithyusa* ssp. *cupanii* were prepared and fractionated using the same experimental protocol employed previously for *E. pithyusa* [18]. The EtOAc extract was partitioned by successive liquid–liquid extractions, allowing the obtention of a diterpenoid-rich extract. This latter was subjected to normal-phase flash chromatography resulting in fourteen fractions.

In order to compare the diterpenoid profile of *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp *cupanii*, the chromatographic fractions from both *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp. *cupanii* diterpenoid-rich extracts were analyzed by untargeted LC-ESI-MS/MS analysis. The MS/MS data were uploaded to the GNPS web-platform [18] and molecular networks were generated. The **Fig. 1A** shows main molecular networks of *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp *cupanii* fractions. The relative abundance of each ion detected (number of scans) between taxa is visualized using node pie charts diagram. Molecular networks showed that, both shared ions and species-specific ions, were detected. The Venn's diagram of molecular networks (**Fig. 2A**) revealed that 45% of molecules specific to *E. pithyusa* and 38% to *E. pithyusa* ssp. *cupanii*, and that 17% were shared. Those preliminary results suggested that a chemical diversification might have occurred between these two-sister species. The *Ehlich* and *Raven's* seminal hypothesis [24] stated that the plant speciation is driven by defense evolution against natural enemies, and diterpene esters are central secondary metabolites in *Euphorbia* chemical arsenal [36,37]. To test *Ehlich* and *Raven's* hypothesis for those sister-species, we annotated diterpene ester networks and clusters, and used them as a proxy to qualified environmental adaptation strategy in *Euphorbia* species. This class annotation was performed by considering only nodes in the range m/z 400-900 (to exclude higher diterpenoids), and having a partial spectral library match

Résultats

(analogue search) to *Euphorbia* diterpene esters publicly available on GNPS. In addition, we manually curated those partial matches, by looking for the presence of a neutral loss in the MS/MS spectra indicating acyl functions. The Venn's diagram of the MS/MS spectra annotated as diterpene esters showed similar trend, with 28% and 38% of the annotated molecules specific to *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp. *cupanii* respectively, while 37% were shared (**Fig. 2B**).

Thanks to the reference MS/MS spectra of deoxyphorbol esters and premyrsinol esters (**1–10**) that were previously isolated from *E. pithyusa* [18] (**Fig. 1A** and **1B**), network topology was used to propagate the diterpene-type annotation to their connected components. As previously described for these type of diterpene esters, the examination of the diterpene backbone fragment ions showed consistent fragment ions at ions m/z 295, 277, 267, and 149 for the premyrsinane type (cluster II), while the dideoxyphorbol esters (cluster I) showed the presence of fragment ions at m/z 335, 307, 295, and 277 [18]. These premyrsinane and tiglane diterpenoids derivatives, were found predominantly in *E. pithyusa*, and in a lesser extend in *E. pithyusa* ssp. *cupanii*. Other clusters (III-VII) were found essentially in *E. pithyusa* ssp. *cupanii* fractions. A detailed examination of cluster V revealed that it possessed the diterpene backbone fragment ions of myrsinane skeleton that was previously described in *E. pithyusa* [18]. Inspection of the MS/MS spectra in cluster VI showed the same fragment ions for the diterpene backbone, and it suggested that they were somehow modified myrsinane esters derivatives. Regarding, the MS/MS spectra in clusters III, IV and VII, they possessed different diterpene backbone fingerprints and were initially annotated as unknown diterpene esters. With the objective of isolating and identifying these potentially new derivatives produced by *E. pithyusa* ssp. *cupanii*, molecular networks were visualized using a fraction layout (**Fig. 1C**).

The later suggested that several ions (brown and pink nodes), were apparently overrepresented in the fractions F9–12. Those fractions were selected for targeted isolation

Résultats

using flash chromatography and/or preparative HPLC, and allowed the isolation of twenty diterpene esters derivatives.

Résultats

Figure 1. Molecular networks of the two diterpenoids-rich extract and fractions from *E. pithyusa* (blue) and *E. pithyusa* ssp. *cupanii* (red).

(Fig. 1A) Cluster annotation (I–VII) in the molecular networks.

(Fig. 1B) Previously isolated compounds (1–10) from *E. pithyusa*.

(Fig. 1C) *E. pithyusa* ssp. *cupanii* fractions layout: four fractions (F9–F12) were interpreted as containing interesting analogues.

(Fig. 1D) Compounds from *E. pithyusa* ssp. *cupanii* isolated by structure-guided purification.

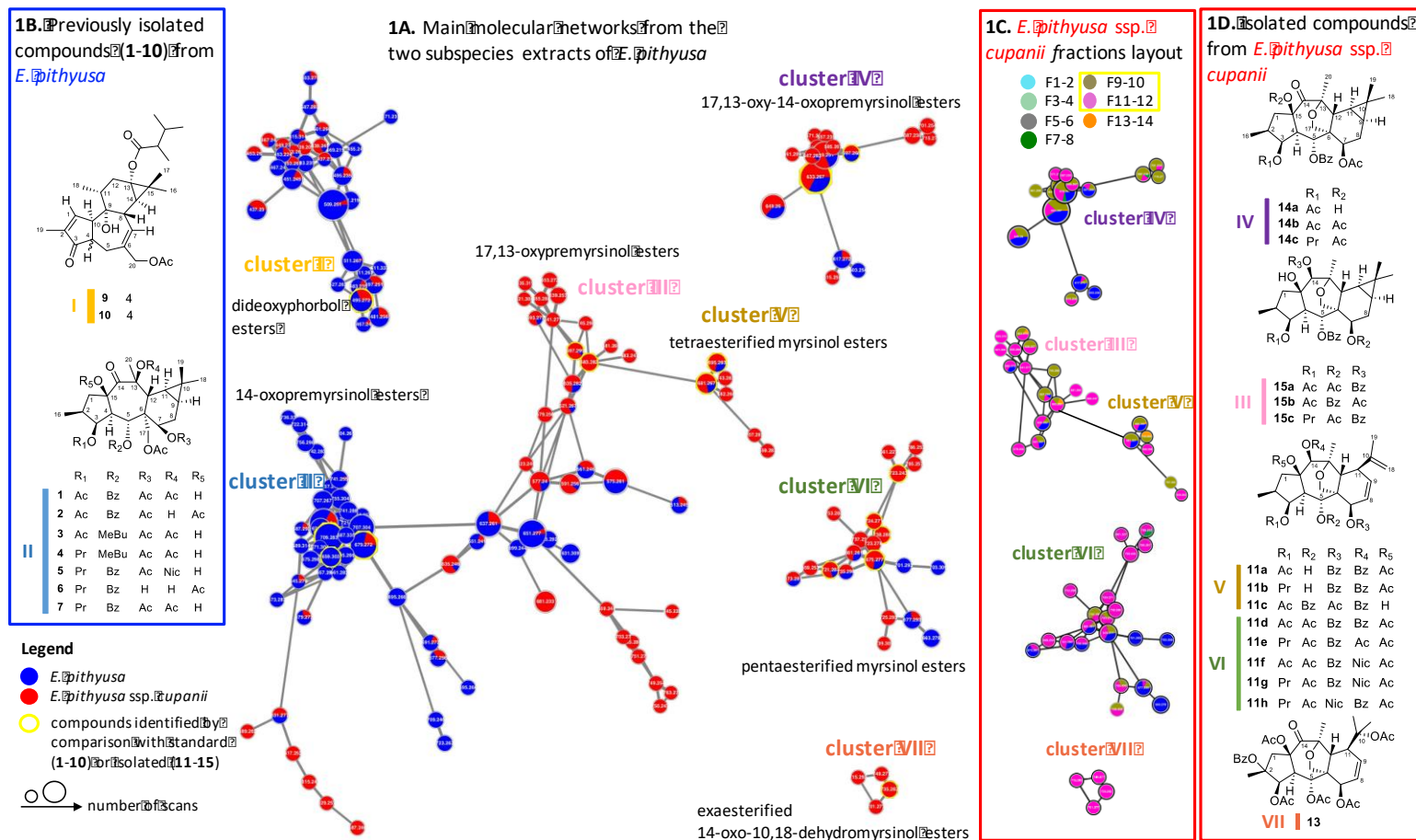


Figure 2. Venn's diagrams for *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp. *cupanii* molecular networks. A) Considering all MS/MS spectra, including single nodes. B) Considering only MS/MS spectra from networks and clusters annotated as diterpene esters.

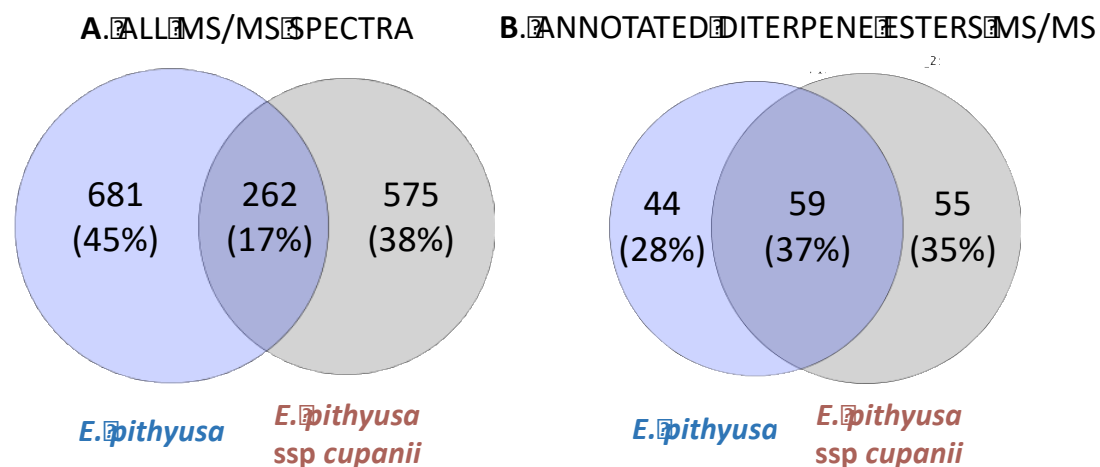
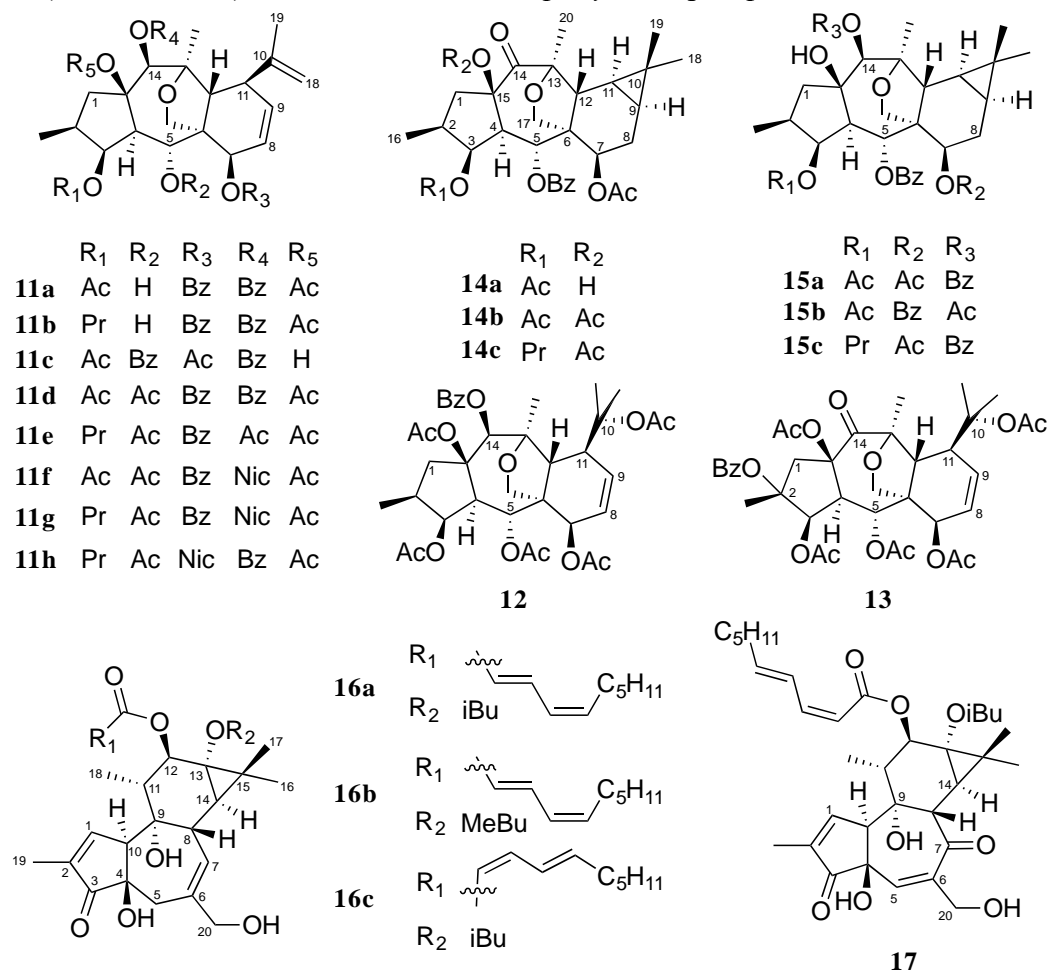


Figure 3. Structures of myrsinol (11a–h, 12, and 13), premysinol (14a–c and 15a–c) and phorbol (16a–c, and 17) esters isolated from *E. pithyusa* ssp. *cupanii*.



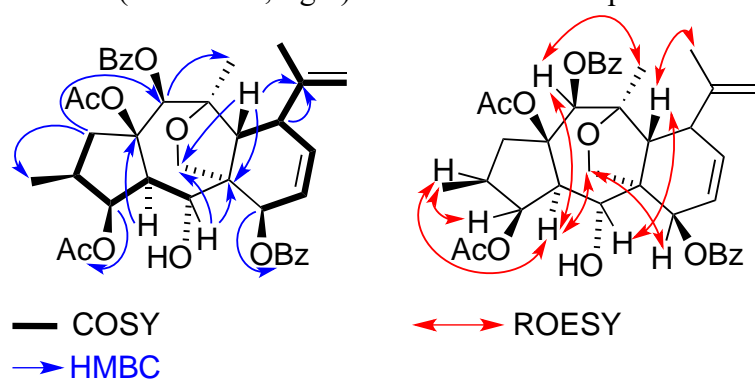
3.2 Identification of diterpene esters isolated from *E. pithyusa* ssp. *cupanii* extract

The comprehensive 1D- and 2D-NMR data analysis, mass spectrometry and the literature data were used to identify ten myrsinol (**11a–h**, **12**, and **13**), six premyrsinol (**14a–c** and **15a–c**) and four phorbol esters (**16a–c**, and **17**), as shown in **Fig. 3**. The HRESIMS of compound **11a** showed a molecular ion at m/z 681.2698 $[M + Na]^+$, corresponding to the molecular formula, $C_{38}H_{42}O_{10}$, indicating 18 degrees of unsaturation. From this formula and its spectroscopic 1H and ^{13}C NMR data ($CDCl_3$, **Tables S5** and **S7**), this compounds seems to be closely comparable to those characteristic myrsinol skeleton as previously isolated compounds in *Euphorbia myrsinites* [38], *E. seguieriana* [39], or *E. prolifera* [40]. The analysis of its ^{13}C and 1H NMR spectra revealed the presence of four ester carbonyls which were assigned to two acetate groups (δ_C 172.2 and 167.8; δ_H 1.69 and 2.02) and two benzoate groups [$(\delta_C$ 165.6, 132.6, 129.1, 128.9 and 128.1; δ_H 8.01, 7.53, 7.38) and (δ_C 165.7, 132.8, 130.3, 129.4 and 129.7; δ_H 7.94, 7.55, 7.41)]. Examination of $^1J_{C-H}$ correlations observed in the HSQC spectrum and the carbon chemical shifts of compound **11a** allowed the determination of three methyl groups, four oxymethines, and three quaternary carbons. One proton at δ_H 3.85 not depicted $^1J_{C-H}$ correlations in the HSQC spectrum, was assigned to a free hydroxyl at C-5 position as determinate by COSY correlation with the oxymethine H-5. From COSY spectrum, two spin systems were assigned from H1 to H5 [δ_H 2.96 (dd, $J = 16.2, 10.3$ Hz, H-1 α), δ_H 2.68 (dd, $J = 16.2, 9.2$ Hz, H-1 β), 1.23 (m, H-2), two methine at δ_H 5.25 (t, $J = 3.5$ Hz, H-3) and δ_H 4.23 (dd, $J = 10.1, 2.7$ Hz, H-5) linked by H-4 at δ_H 2.96 (dd, $J = 10.1, 3.5$ Hz)], and from H7 to H12, as depicted in **Fig. 4**. The second spin system begin by one oxymethine at δ_H 5.63 (d, $J = 6.6$ Hz, H-7) connected at one *cis*-disubstituted double bond at δ_H 6.21 (ddd, $J = 9.7, 6.6, 1.4$ Hz, H-8) and 5.84 (dd, $J = 9.7, 5.0$ Hz, H-9), which was coupled to two adjacent protons at δ_H 3.28 (dd, $J = 5.0, 4.1$ Hz, H-11), and 3.25 (d, $J = 4.1$ Hz, H-12). The HMBC correlation showed a methylethylene group [δ_C 112.7, δ_H 4.92 and 4.87, br s (H-

Résultats

18a and H-18b, respectively) and δ_{H} 1.04, s, H-19] connected to H-11. This compound was characterized by the presence of ether bond between C-17 and C-13 [δ_{C} 86.8, δ_{H} 4.20 and 3.48, d, $J = 12.0$ Hz (H-17a and H-17b, respectively)] as previously named 6 α ,17-epoxymyrsinol [40,41]. As see in **Fig. 4**, the HMBC spectrum allowed the observation of cross-peaks between oxymethines and ester carbonyl carbons, permitted the attachment of two acetate groups at C-3 and C-15, and two benzoate group at C-7 and C-14. The ROESY correlation, see in **Fig. 4**, allowed to attribute the α -orientation at H-2, H-3, H-4, H-7, H-14, H₂-17, and H₃-20 and the β -orientation at H-5 and H-12. Therefore, compound **11a** was identified as 3 β ,15 β -*O*-diacetyl-7 β -14 β -*O*-dibenzoyl-5 α -hydroxymyrsinol.

Figure 4. Key COSY (bold, left), HMBC (blue arrows, left) and ROESY (red arrows, right) correlations of compound **11a**.



The comparison of NMR and ESIHRMS data of new compounds **11b**, **11c**, and **11h**, isolated from *Euphorbia pithyusa* ssp. *cupanii*, with the myrsinol ester **11a** and the previously isolated compounds **11d–g** [42,43], assumed that these molecules had also a 13,17-oxymyrsinane skeleton. The structural elucidation, using the same approach that performed for compound **11a**, allowed to confirm that compounds **11b**, **11c**, and **11h** were myrsinol esters differing by their acylation pattern (**Fig. 3**). The HMBC and ROESY experiments were examined to elucidate the acylation pattern. Compound **11d**, **11f**, and **11h** were obtained in crystalline form and their crystal X-ray diffraction analysis allowing to confirm their absolute

Résultats

configuration (**Fig. S4**). These three compounds exhibited the same relative configuration, and regarding to ROE correlation of compounds **11a–c**, **11e**, and **11g**, the myrsinane series (**11a–h**) seems to adopt the same absolute configuration.

The structural elucidation of new compounds **12** and **13** was determined using the same approach as for myrsinol esters **11a–c**. Compound **12** possessed a molecular formula of $C_{37}H_{45}O_{13}$ deduced by HRESIMS analysis ($[M + Na]^+$ at m/z 721.2843). The 1D- and 2D-NMR spectroscopic data interpretation confirmed that **12** was also an 13,17-oxomyrsinol ester as comparable to those of myrsinol esters **11a–c**. Moreover, for compound **12**, an additional acetate group at C-10 was observed by HMBC correlations. The X-ray diffraction analysis permitted to confirm the absolute configuration (**Fig. S4**), so, the structure of the compound **12** to be assigned as $3\beta,5\alpha,7\beta,10,15\beta$ -*O*-pentacetyl- 14β -*O*-benzoyl-10,18-dehydromyrsinol. The HRESIMS of compound **13** showed a protonated molecular ion at m/z 735.2649 $[M + H]^+$, corresponding to the molecular formula, $C_{39}H_{43}O_{14}$. Its NMR data were closely comparable to those of compound **12** with also an additional acetate group at C-10, but a ketone at C-14 was assumed. Moreover, an additional benzoate group at C-2 was assigned. The compound **13** correspond to a rare hexaesterified 14-oxomyrsinol analogue.

Compounds **14a–c** and **15a–c**, isolated from *E. piithyusa* ssp. *cupanii*, showed a closely myrsinane skeleton as depicted for compound **11a**. The structural elucidation was solved by the interpretation of 1D- and 2D- NMR spectroscopy for these six new compounds (**Tables S6** and **S7**). The difference with the previously myrsinane skeleton was characterized by the presence of gendimethyl-substituted cyclopropane ring. As biosynthesis consideration, myrsinane carbon framework was considered as 5/7/6-tricyclic ring system, while a 5/7/6/3-tetracyclic framework was attributed to premyrsinane esters. According to the presence of the gendimethyl-substituted cyclopropane ring, compounds **14a–c** and **15a–c** were considered as premyrsinane skeletons. From NMR spectroscopic data interpretations, these compounds

Résultats

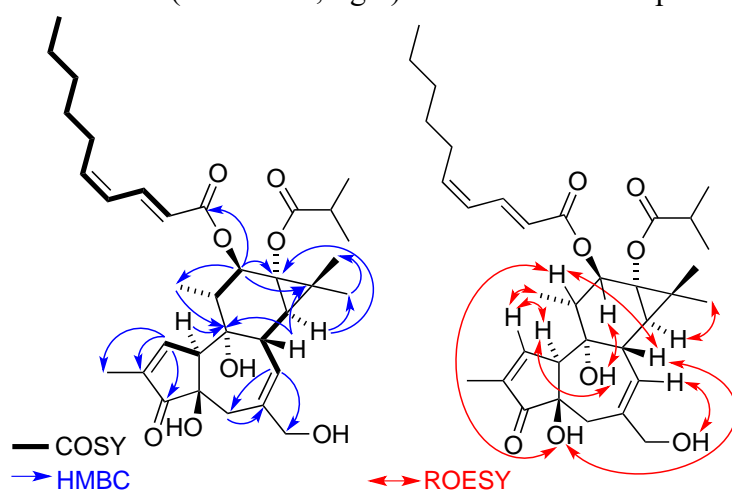
displayed an ether bond between C-13 and C-17 (13,17-oxy moiety) as previously shown for the isolated myrsinol esters **11a–h**, **12** and **13**. In the HMBC spectra of the compounds **14a–c**, the observation of cross-peaks between H-1 and H-12 to carbonyl group indicate that these compounds were elucidated as 14-oxopremyrsinols, while the presence of methine at C-14 suggested that compounds **15a–c** were 14-deoxopremyrsinol esters. Then, HMBC and ROESY experiments were recorded to define the acyloxy group's location and the molecular configuration. From the crystal of compound **15b** (**Fig. S4**), the X-ray diffraction analysis was recorded, allowing to confirm the absolute configuration for this compound **15b**, and it can be proposed that premyrsinol esters **14a–c**, **15a** and **15c** have the same absolute configuration.

Very low quantity of phorbol esters (**16a–c**, and **17**) was obtained (< 2 mg). Their structural elucidation on a 600 MHz NMR instrument was used to identify this four compounds (**Table S8**). Compound **16a** showed by HRESIMS, a molecular ion at m/z 607.3246 $[M + Na]^+$, corresponding to the molecular formula, $C_{34}H_{48}O_8$. Examination of HSQC, 1H and ^{13}C NMR spectra ($CDCl_3$, **Table S8**) allowed determination of one ketone carbonyl (δ_C 209.1), two ester carbonyls (δ_C 167.0 and 179.7) and two olefinic signals attributable to two vicinal-monosubstituted double bond, [δ_C 161.0 (C-1), 133.0 (C-2), and δ_H 7.59 (br d, $J = 10.4$ Hz, H-1)], and [δ_C 140.5 (C-6), 129.4 (C-7), and δ_H 5.68 (d, $J = 4.9$ Hz, H-7)]. The COSY and HMBC experiments permitted to deduce the ester's nature, which were assigned to a deca-2*E*,4*Z*-dienoyl group (δ_C 121.2, 140.1, 126.7, 121.2, 28.5, 29.2, 31.6, 22.9, and 11.8; δ_H 5.84, 7.58, 6.11, 5.86, 2.26, 1.39, 1.27, 1.26, and 0.86), and an isobutyrate group (δ_C 34.4, 18.8, and 18.7; δ_H 2.57, 1.18, and 1.15). Examination of the COSY spectrum of compound **16a** revealed three spin systems, H-1 with H-10, from H-7 to H-9, and H-11 with H-12 and H-18, as depicted in **Fig. 5**. The first one is represented by: =CH–CH [δ_H 7.59 (H-1) and 3.24 (d, $J = 7.4$ Hz, H-10)]; the Second is characterized by: =CH–CH–CH [δ_H 5.68 (m, H-7), 3.23 (m, H-8), and 1.04 (br s, H-14)]; and the third spin-system can be built by: –CH(CH₃)–CH [δ_H 2.15

Résultats

(m, H-11), 0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, H₃-18), and 5.44 (d, $J = 9.8$ Hz, H-12)]. The first spin-systems can be interconnected to a α,β -unsaturated carbonyl by correlations from H-1 to C-2, C-3, and C-19 [δ_C 133.0, 209.1, and 10.2 (δ_H 1.76, d, $J = 8.2$ Hz, H₃-19)], and from a methylene group [δ_H 2.47 and 2.51 (t, $J = 19.0$ Hz, H-5 α and H-5 β , respectively) to C-3 and C-4, observed in the HMBC spectrum (**Fig. 5**). Two spin-systems can be interconnected, deduced by HMBC correlations from H-5 and H-7 to C-6 and C-20 [δ_C 140.5 and 68.2, respectively (δ_H 4.03 and 3.98, d, $J = 12.9$ Hz, H₂-20)], and from H-10 and H-8 to C-9 (δ_C 78.4). Thus, the correlation between H-8, H-14, H-12, H₃-16, and H₃-18 to C-15, C-13, C-16, C-18, C-17, and C-9 correspond to the part of the molecule. All these observations were used to determinate a phorbol skeleton. The attachment of a deca-2*E*,4*Z*-dienoyl group at C-12 can be established thanks to HMBC correlations between the oxymethine protons and ester carbonyl carbons, and an isobutyrate group at C-13 (**Fig. 5**). Based on previous data and by the ROESY correlations observations as see in **Fig. 5**, the relative configuration of compound **16a** was established as 12 β -*O*-[deca-2*E*,4*Z*-dienoyl]-13 α -isobutyl-4 β -phorbol.

Figure 5. Key COSY (bold, left), HMBC (blue arrows, left) and ROESY (red arrows, right) correlations of compound **16a**.



Résultats

The same general approach was used to elucidate the structures of phorbol esters **16b**, **16c**, and **17** (Table S8). Compounds **16b** and **16c** possess the same 4 β -phorbol skeletons as compound **16a**. The phorbol ester **16b** differ to the compound **1a** by the acylation pattern at position C-13 with a 2-methylbutyl group instead an isobutyl group found in compound **16a**, solved thanks to COSY and HMBC experiments. The molecular ion at m/z at 607.3040 showed the same molecular formula than compound **16a**, allowing to confirm that the 4 β -phorbol ester **16c** was a stereoisomer. Indeed, the compound **16c** possess an deca-2Z,4E-dienoyl group at C-13. The molecular formula C₃₄H₄₆O₉ of compound **17** differ to compound **16c** while these two compound display the same acyl pattern. This compound **17**, identified as 12 β -O-[deca-2Z,4E-dienoyl]-13 α -isobutyl-5-ene-7-oxo-4 β -phorbol, is an example of a phorbol derivative as depicted by Hohmann *et al.* [44]. Indeed, the 5-ene-7-oxo functionality could be an autoxidation produced during the isolation step, as previously describe for some phorbol esters [45].

3.3. Fragmentation pathway of diterpene esters and molecular networks annotation

The MS/MS spectra of the isolated compounds (**11a–h**, **12**, **13**, **14a–c**, **15a–c**, **16a–c**, and **17**) from *E. pithyusa* ssp. *cupanii* were deposited to GNPS spectral libraries and molecular networks annotate was updated (Fig. 1A and 1D). Examination of the MS/MS spectra of the premyrsinol ester analogues in cluster II and IV, allowed to establish a characteristic diterpene backbone fragment ions. The premyrsinol esters **14a–c**, present in cluster IV, showed consistent fragment ions at m/z 295, 267, 265, and 137 (Fig. 6), while the premyrsinane esters **15a–c** showed fragment ions at m/z 297, 279, 267, and 149 (Fig. 7). The difference of 27.99 Da between fragment ions at m/z 295.1703 ([C₂₀H₂₃O₂]⁺, $\Delta_{m/z}$ = 1.67 ppm) and m/z 267.1743 ([C₁₉H₂₃O]⁺, $\Delta_{m/z}$ = 2.21 ppm) observed in the MS/MS spectra of compound **14c** (Fig. 6), corresponding to the neutral loss of CO as described for reference compounds (**1–7**). It should

Résultats

be noted that this fragmentation was not reported for the premyrsinol esters **15a–c**. As shown in **Fig. 6** and **7**, the MS/MS spectra of premyrsinol esters (**14a–c** and **15a–c**) exhibited a characteristic neutral loss of CH₂O (30.01 Da, for m/z 267 → 237, and m/z 279 → 249), resulting from the cleavage of the ether link between C-17 and C-13 of the 13,17-oxy derivatives. As depicted in **Fig. 1A** and **1D**, the 13,17-oxypremyrsinol esters (**15a–c**) and the 13,17-oxy-14-oxopremyrsinol esters (**14a–c**) were included in clusters III and IV, respectively.

Inspection of the MS/MS fragmentation pattern of the cluster V nodes showed also the characteristic diterpene backbone fragment ions of the myrsinane ester **8** (m/z at 295, 277, 265, and 247) [18]. The nodes of cluster V were annotated as tetraesterified myrsinol esters (**11a–c**) and the cluster VI nodes, bearing five acyl substitutions (**11d–h**), were annotated as pentaesterified myrsinol esters. While these two groups consisted of the same myrsinane skeleton, they were separated in different network based on their esterification degree.

Inversely, the cluster III (13,17-oxypremyrsinol esters) and V (tetraesterified myrsinol esters) were part of the same network, and both groups shared the same structural moieties including the C-13--C-17 ether link, the reduction of the ketone at C-14, and the four acyl substitutions.

The cluster VII consisted of four diterpene derivatives (including compound **13**) was annotated as hexaesterified 14-oxo-10,18-dehydromyrsinol ester. The examination of their MS/MS spectra showed the presence of ions at m/z 309, 291, 263, and 233, which differ from those previously described for the myrsinol esters. A neutral loss of CH₂O (30.01 Da, for m/z 291 → 263) and of C=O (27.99 Da, for m/z 263 → 233) was shown in the MS/MS spectrum of compound **13** (**Fig. 8**).

Finally, the phorbol esters isolated from *E. pithyusa* ssp. *cupanii* extract were not detected in the molecular networks. Inspection of LC-MS/MS data showed that those ions

Résultats

were not selected for MS/MS fragmentation in untargeted mode, due low intensity and co-elution with other ions [19].

Figure 6. Extracted ion chromatogram of the compound **14c** in LC-MS/MS with neutral loss and diterpene backbone fragment ions in zoom.

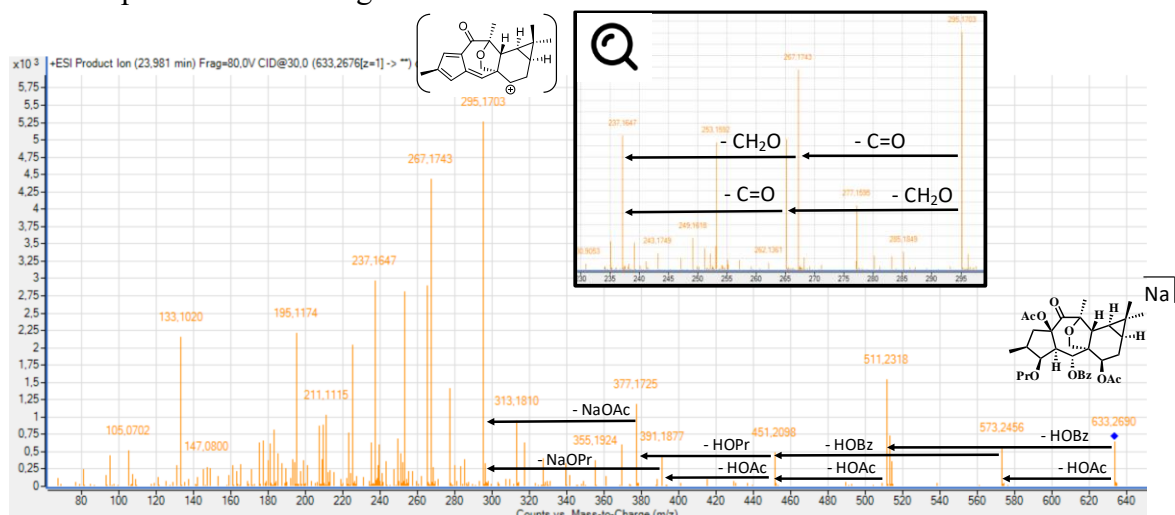


Figure 7. Extracted ion chromatogram of the compound **15b** in LC-MS/MS with neutral loss and diterpene backbone fragment ions in zoom.

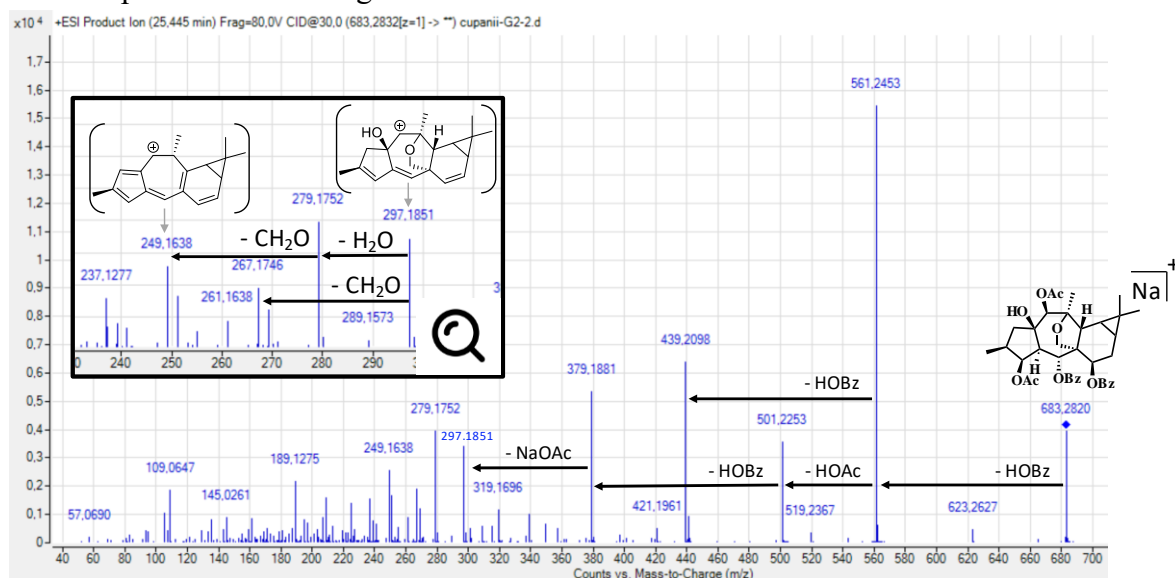
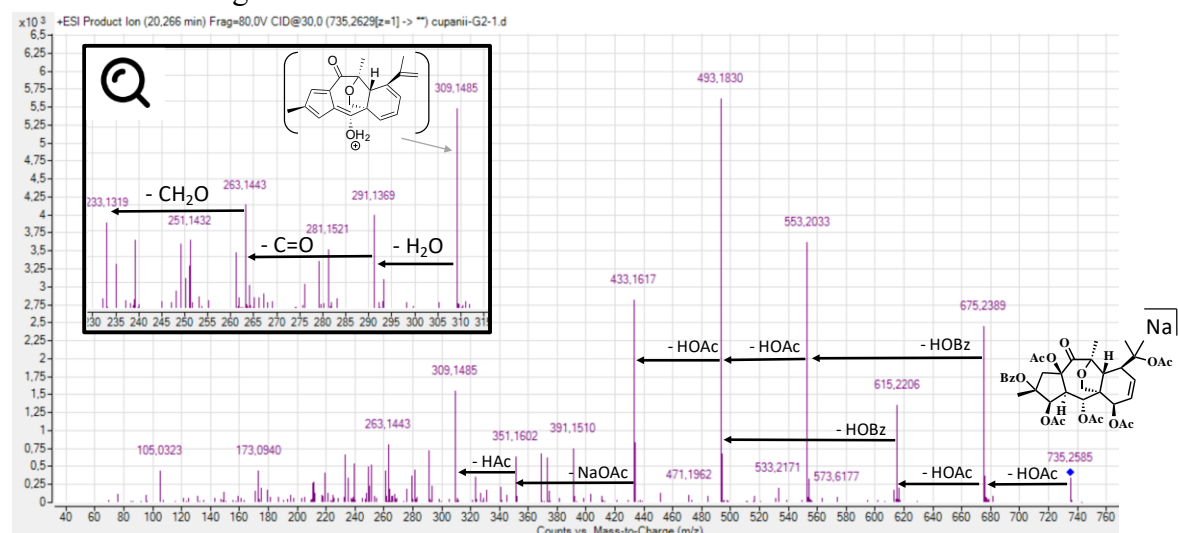


Figure 8. Extracted ion chromatogram of the compound **13** in LC-MS/MS with neutral loss and backbone fragment ions in zoom.



3.4. Chemotaxonomic comparison of two *E. pithyusa* and *E. pithyusa ssp cupanii* from Corsica

The molecular network-based comparison of *E. pithyusa* and *E. pithyusa ssp cupanii* from Corsica showed different diterpene profiles. The Venn's diagram of the MS/MS spectra that were annotated diterpenoids indicated that 37% were shared between the two species, while 28% were specific to *E. pithyusa* and 38% to *E. pithyusa ssp. cupanii*. Detailed molecular network annotation using reference MS/MS spectra and targeted isolation, indicated that the diterpenoid profile of *E. pithyusa* was characterized by a diversity of premyrsinol and dideoxyphorbol esters, while *E. pithyusa ssp. cupanii* profile was dominated by myrsinol, 13,17-oxy-premyrsinol derivatives, and phorbol esters.

In the regard to the *Ehlich* and *Raven's* seminal hypothesis, these results would indicate that the modulation of the diterpene ester content in *Euphorbia* species could be driven by environmental adaptation strategy against natural enemies. The fact that diterpene esters are key *Euphorbia* secondary metabolites, that are known to be endowed with various biological activities such as larviscidal, insecticides, antiviral, antimicrobial, and anti-

Résultats

herbivores activities, reinforce the pertinence of that hypothesis for those sister-species. Accounting that they grow in different ecosystems those natural enemies could be insects or microbes, or other wild animals. But their speciation or their distribution could also be related to livestock pressure in an island that has been shaped by agro-pastoral practices.

4. Conclusion

The study of two sister-species of *E. pithyusa* using an approach based on untargeted LC-MS/MS analysis and molecular networking allowed to show that their diterpene esters profiles differ significantly. In particular, it highlighted the presence of putative new compounds of premyrsinane- and myrsinane type, which prompted us to carry out a structure-guided isolation procedure on *E. pithyusa* ssp. *cupanii* extract, which led to the discovery of premyrsinol and myrsinol esters. In the MS/MS molecular networks, each group of analogues appeared as a cluster depending on structural features, in particular the oxidation level of diterpene backbone and its esterification degree (from 4 to 6).

Moreover, present results showed that the diterpene esters production in the sister species *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp *cupanii* differ significantly. To complete those results, it will be needed to study intra-specific variability, especially for *E. pithyusa*, which is present in numerous localities. Still, our data indicated that the speciation process of *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp *cupanii* was mediated via a change in their chemical arsenal. To better explore the validity of *Ehlich* and *Raven*'s seminal hypothesis, ecological studies on *E. pithyusa* and *E. pithyusa* ssp *cupanii* would have to be conducted to identify their natural enemies. Moreover, if the diterpene ester content is indeed driven by environmental adaptation strategy against natural enemies, we could expect an evolutionary convergence with a correlation between the *Euphorbia*'s diterpene esters profile and their typical ecosystem. Only a systematic study on

the genus level including species from each sub-genus clades would test properly the validity of *Ehlich* and *Raven*'s seminal hypothesis.

From a methodological stand-point, we showed that molecular networks is a valuable tool to characterized chemotaxonomical relationships in *Euphorbia* species. Nonetheless, one should expect that the development of next generation computational mass spectrometry tools will refine molecular annotation and streamlined statistical capabilities.

References

- [1] F. Halle, R.A.A. Oldeman, P.B. Tomlinson, *Tropical Trees and Forests: An Architectural Analysis*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [2] R. Govaerts, D.G. Frodin, A. Radcliffe-Smith, S. Carter, *World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)*, Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.
- [3] J.W. Horn, Z. Xi, R. Riina, J.A. Peirson, Y. Yang, B.L. Dorsey, P.E. Berry, C.C. Davis, K.J. Wurdack, *Evolution* 68 (2014) 3485–3504.
- [4] Y. Salmaki, S. Zarre, H.-J. Esser, G. Heubl, *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 206 (2011) 957–973.
- [5] P.V. Bruyns, R.J. Mapaya, T. Hedderson, *Taxon* 55 (2006) 397–420.
- [6] K.-R. Park, R.K. Jansen, *J. Plant Biol.* 50 (2007) 644–649.
- [7] N.F.A. Zimmermann, C.M. Ritz, F.H. Hellwig, *Plant Syst. Evol.* 286 (2010) 39–58.
- [8] V.W. Steinmann, J.M. Porter, *Ann. Mo. Bot. Gard.* (2002) 453–490.
- [9] V.W. Steinmann, *Acta Bot. Mex.* (2003) 45–50.
- [10] V.W. Steinmann, B. Van Ee, P.E. Berry, J. Gutiérrez, in: *An. Jardín Botánico Madr.*, Real Jardín Botánico, 2007, pp. 123–133.
- [11] J.W. Horn, B.W. van Ee, J.J. Morawetz, R. Riina, V.W. Steinmann, P.E. Berry, K.J. Wurdack, *Mol. Phylogenet. Evol.* 63 (2012) 305–326.
- [12] L. López-Maury, S. Marguerat, J. Bähler, *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 583–593.
- [13] B.E. Sedio, *New Phytol.* 214 (2017) 952–958.
- [14] D. Jeanmonod, J. Gamisans, *Flora Corsica*, Edisud 921, Aix-En-Provence, 2007.
- [15] I. Camarda, F. Valsecchi, *Alberi e Arbusti Spontanei Della Sardegna*, Università di Sassari. Istituto di Botanica, 1983.
- [16] F. Valsecchi, *Boll. Della Soc. Sarda Sci. Nat.* 19 (1980) 323–342.
- [17] G. Appendino, E. Belloro, G.C. Tron, J. Jakupovic, M. Ballero, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 1399–1404.
- [18] M. Esposito, L.-F. Nothias, P. Retailleau, J. Costa, F. Roussi, J. Neyts, P. Leyssen, D. Touboul, M. Litaudon, J. Paolini, *J. Nat. Prod.* 80 (2017) 2051–2059.
- [19] R.A. Quinn, L.-F. Nothias, O. Vining, M. Meehan, E. Esquenazi, P.C. Dorrestein, *Trends Pharmacol. Sci.* 38 (2017) 143–154.
- [20] A.A. Agrawal, K. Konno, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40 (2009) 311–331.
- [21] F. Pintus, R. Medda, A.C. Rinaldi, D. Spanò, G. Floris, *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* 144 (2010) 381–391.
- [22] K. Konno, *Phytochemistry* 72 (2011) 1510–1530.

- [23] M. Wang, J.J. Carver, V.V. Phelan, L.M. Sanchez, N. Garg, Y. Peng, D.D. Nguyen, J. Watrous, C.A. Kapon, T. Luzzatto-Knaan, C. Porto, A. Bouslimani, A.V. Melnik, M.J. Meehan, W.-T. Liu, M. Crüsemann, P.D. Boudreau, E. Esquenazi, M. Sandoval-Calderón, R.D. Kersten, L.A. Pace, R.A. Quinn, K.R. Duncan, C.-C. Hsu, D.J. Floros, R.G. Gavilan, K. Kleigrew, T. Northen, R.J. Dutton, D. Parrot, E.E. Carlson, B. Aigle, C.F. Michelsen, L. Jelsbak, C. Sohlenkamp, P. Pevzner, A. Edlund, J. McLean, J. Piel, B.T. Murphy, L. Gerwick, C.-C. Liaw, Y.-L. Yang, H.-U. Humpf, M. Maansson, R.A. Keyzers, A.C. Sims, A.R. Johnson, A.M. Sidebottom, B.E. Sedio, A. Klitgaard, C.B. Larson, C.A.B. P, D. Torres-Mendoza, D.J. Gonzalez, D.B. Silva, L.M. Marques, D.P. Demarque, E. Pociute, E.C. O'Neill, E. Briand, E.J.N. Helfrich, E.A. Granatosky, E. Glukhov, F. Ryffel, H. Houson, H. Mohimani, J.J. Kharbush, Y. Zeng, J.A. Vorholt, K.L. Kurita, P. Charusanti, K.L. McPhail, K.F. Nielsen, L. Vuong, M. Elfeki, M.F. Traxler, N. Engene, N. Koyama, O.B. Vining, R. Baric, R.R. Silva, S.J. Mascuch, S. Tomasi, S. Jenkins, V. Macherla, T. Hoffman, V. Agarwal, P.G. Williams, J. Dai, R. Neupane, J. Gurr, A.M.C. Rodríguez, A. Lamsa, C. Zhang, K. Dorrestein, B.M. Duggan, J. Almaliti, P.-M. Allard, P. Phapale, L.-F. Nothias, T. Alexandrov, M. Litaudon, J.-L. Wolfender, J.E. Kyle, T.O. Metz, T. Peryea, D.-T. Nguyen, D. VanLeer, P. Shinn, A. Jadhav, R. Müller, K.M. Waters, W. Shi, X. Liu, L. Zhang, R. Knight, P.R. Jensen, B.O. Palsson, K. Pogliano, R.G. Lington, M. Gutiérrez, N.P. Lopes, W.H. Gerwick, B.S. Moore, P.C. Dorrestein, N. Bandeira, *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 828–837.
- [24] P.R. Ehrlich, P.H. Raven, *Evolution* 18 (1964) 586–608.
- [25] J.W. Pflugrath, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55 (1999) 1718–1725.
- [26] Rigaku, *CrystalClear-SM Expert 2.0 R4*, Rigaku Corporation, Tokyo, Japan, 2009.
- [27] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.* 71 (2015) 3–8.
- [28] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8.
- [29] R.W.W. Hoof, L.H. Straver, A.L. Spek, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 96–103.
- [30] A.L. Spek, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71 (2015) 9–18.
- [31] H.D. Flack, *Chim. Int. J. Chem.* 68 (2014) 26–30.
- [32] S. Parsons, H.D. Flack, T. Wagner, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* 69 (2013) 249–259.
- [33] J.Y. Yang, L.M. Sanchez, C.M. Rath, X. Liu, P.D. Boudreau, N. Bruns, E. Glukhov, A. Wodtke, R. de Felicio, A. Fenner, W.R. Wong, R.G. Lington, L. Zhang, H.M. Debonsi, W.H. Gerwick, P.C. Dorrestein, *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 1686–1699.
- [34] M. Wang, J.J. Carver, V.V. Phelan, L.M. Sanchez, N. Garg, Y. Peng, D.D. Nguyen, J. Watrous, C.A. Kapon, T. Luzzatto-Knaan, C. Porto, A. Bouslimani, A.V. Melnik, M.J. Meehan, W.-T. Liu, M. Crüsemann, P.D. Boudreau, E. Esquenazi, M. Sandoval-Calderón, R.D. Kersten, L.A. Pace, R.A. Quinn, K.R. Duncan, C.-C. Hsu, D.J. Floros, R.G. Gavilan, K. Kleigrew, T. Northen, R.J. Dutton, D. Parrot, E.E. Carlson, B. Aigle, C.F. Michelsen, L. Jelsbak, C. Sohlenkamp, P. Pevzner, A. Edlund, J. McLean, J. Piel, B.T. Murphy, L. Gerwick, C.-C. Liaw, Y.-L. Yang, H.-U. Humpf, M. Maansson, R.A. Keyzers, A.C. Sims, A.R. Johnson, A.M. Sidebottom, B.E. Sedio, A. Klitgaard, C.B. Larson, C.A. Boya P, D. Torres-Mendoza, D.J. Gonzalez, D.B. Silva, L.M. Marques, D.P. Demarque, E. Pociute, E.C. O'Neill, E. Briand, E.J.N. Helfrich, E.A. Granatosky, E. Glukhov, F. Ryffel, H. Houson, H. Mohimani, J.J. Kharbush, Y. Zeng, J.A. Vorholt, K.L. Kurita, P. Charusanti, K.L. McPhail, K.F. Nielsen, L. Vuong, M. Elfeki, M.F. Traxler, N. Engene, N. Koyama, O.B. Vining, R. Baric, R.R. Silva, S.J. Mascuch, S. Tomasi, S. Jenkins, V. Macherla, T. Hoffman, V. Agarwal, P.G. Williams, J. Dai, R. Neupane, J. Gurr, A.M.C. Rodríguez, A. Lamsa, C. Zhang, K. Dorrestein, B.M. Duggan, J. Almaliti, P.-M. Allard, P. Phapale, L.-F. Nothias, T. Alexandrov, M. Litaudon, J.-L. Wolfender, J.E. Kyle, T.O. Metz, T. Peryea, D.-T. Nguyen, D. VanLeer, P. Shinn, A.

- Jadhav, R. Müller, K.M. Waters, W. Shi, X. Liu, L. Zhang, R. Knight, P.R. Jensen, B.Ø. Palsson, K. Pogliano, R.G. Linington, M. Gutiérrez, N.P. Lopes, W.H. Gerwick, B.S. Moore, P.C. Dorrestein, N. Bandeira, *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 828–837.
- [35] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, *Genome Res.* 13 (2003) 2498–2504.
- [36] A. Vasas, J. Hohmann, *Chem. Rev.* 114 (2014) 8579–8612.
- [37] Q.-W. Shi, X.-H. Su, H. Kiyota, *Chem Rev* 108 (2008) 4295–4327.
- [38] S. Öksüz, F. Gürek, R.R. Gil, T. Pengsuparp, J.M. Pezzuto, G.A. Cordell, *Phytochemistry* 38 (1995) 1457–1462.
- [39] S. Öksüz, F. Gürek, S.-X. Qiu, G.A. Cordell, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 1198–1201.
- [40] J. Xu, Y. Guo, C. Xie, Y. Li, J. Gao, T. Zhang, W. Hou, L. Fang, L. Gui, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 2224–2230.
- [41] V. Uddin Ahmad, A. Reza Jassbi, M. Parvez, *Tetrahedron* 54 (1998) 1573–1584.
- [42] J. Xu, Y. Guo, C. Xie, Y. Li, J. Gao, T. Zhang, W. Hou, L. Fang, L. Gui, *J Nat Prod* 74 (2011) 2224–2230.
- [43] F. Jeske, J. Jakupovic, W. Berendsohn, *Phytochemistry* 40 (1995) 1743–1750.
- [44] P. Forgo, D. Rédei, Z. Hajdu, P. Szabó, L. Szabó, J. Hohmann, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 639–643.
- [45] R. Schmidt, E. Hecker, *Cancer Res.* 35 (1975) 1375–1377.

F. MODIFICATIONS CHIMIQUES D'ESTERS DE DITERPÈNE POUR CRÉER DE LA DIVERSITÉ STRUCTURALE

1. Contexte, objectifs et moyens mis en œuvre

Les espèces du genre *Euphorbia* constituent une abondante source en esters de diterpène, dont la diversité structurale (cf. partie I, p.18-28) et les activités biologiques liées, sont toutes deux aussi remarquables.^{68,69} Plus particulièrement, les esters de jatrophane et les phorboïdes présentent des activités notables en tant que modulateurs des P-gp (cf. partie I, p.30-35) et des PKC (cf. partie I, p.40-46), respectivement. De ce fait, cette classe de composés représente une ressource de choix pour la préparation d'analogues plus puissants et plus solubles. De nombreux travaux concernant la synthèse totale et/ou la pharmacomodulation de ces dérivés ont d'ores et déjà été publiés (cf. partie I, p.36-39 et p.47-54). Cependant, la complexité structurale des constituants et/ou la faible quantité extraite des végétaux ont limité les investigations chimiques.

Les esters de jatrophane présentent une très grande variabilité (cf. partie I, p.19-22), notamment au niveau du nombre, de la position et de la nature des fonctions de type hydroxyle, cétone, époxyde, éther et ester. Ce sont des composés polyacylés, avec de trois à huit groupements esters. Durant ces 20 dernières années, des modifications chimiques de ces composés tels que des estérifications, saponifications, hydrogénations et époxydations, ont été développées dans le but d'étudier les relations structure-activité, notamment en lien avec l'activité inhibitrice de la P-gp (cf. partie I, p.32-35).

Une étude originale, où une grande diversité structurale a été obtenue, a particulièrement retenu notre attention. En 2001, Appendino et son équipe⁷⁰ ont réalisé des cyclisations

⁶⁸ 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.

⁶⁹ Vasas, A.; Hohmann, J. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (17), 8579–8612.

⁷⁰ Appendino, G.; Tron, G. C.; Jarevång, T.; Sterner, O. Unnatural Natural Products from the Transannular Cyclization of Lathyrane Diterpenes. *Org Lett* **2001**, *3* (11), 1609–1612.

Résultats

transannulaires sur deux lathyrane (**1a** et **1b** ; **Figure 1**) isolés d'*Euphorbia lathyris*. Cette procédure a permis d'exploiter le potentiel chimique du squelette lathyrane pour créer une série de composés possédant de nouveaux squelettes terpéniques originaux. En présence d'acide formique (HCOOH), trois squelettes diterpéniques non naturels (**Figure 1A**) ont été obtenus par une cyclisation transannulaire du composé **1a**, tandis que le lathyrane **1b** a donné deux autres dérivés réarrangés dans les mêmes conditions (**Figure 1B**). Les composés **7a** et **7b**, obtenus par réduction de la cétone en présence de tétrahydroborate de sodium (NaBH₄), ont été engagés dans des réactions en présence d'un acide de Lewis. Le composé **7a**, en présence de trifluorométhanesulfonate d'ytterbium (Yb(OTf)₃) dans le méthanol (MeOH), a permis d'obtenir un mélange de trois *abeo*-myrsinanes (**Figure 2A**), tandis que le composé **7b** a subi à un réarrangement, conduisant alors à deux nouveaux squelettes diterpéniques (**Figure 2B**). Cet acide de Lewis (Yb(OTf)₃) a donné de meilleurs résultats par rapport à l'utilisation d'autres plus forts tels que le BF₃.OEt₂, le SnCl₄ et l'Et₂AlCl.

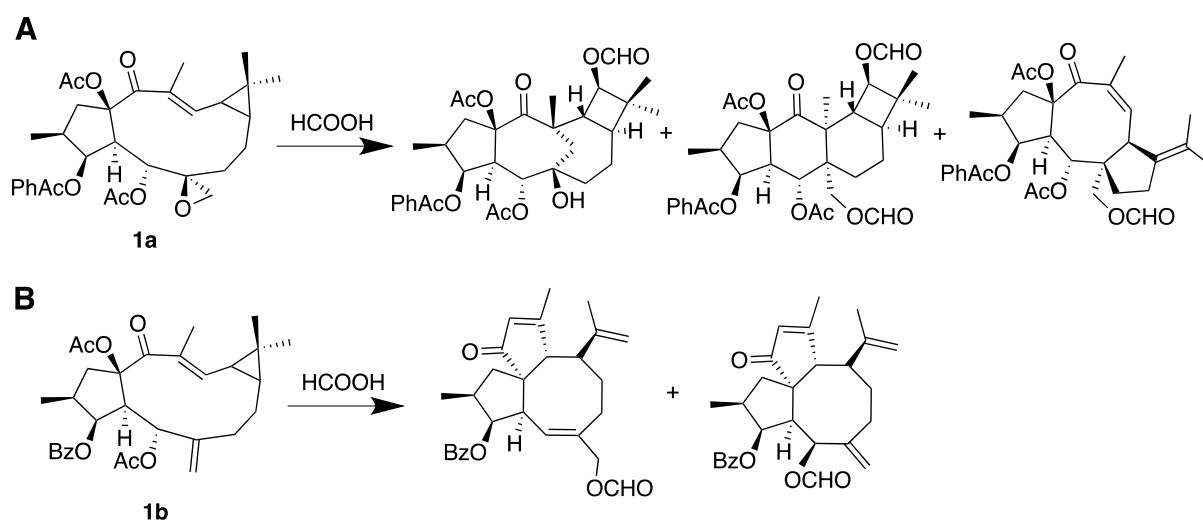


Figure 1. Cyclisations transannulaires des lathyrane **1a** et **1b** en présence d'acide formique (HCOOH).⁷⁰

Résultats

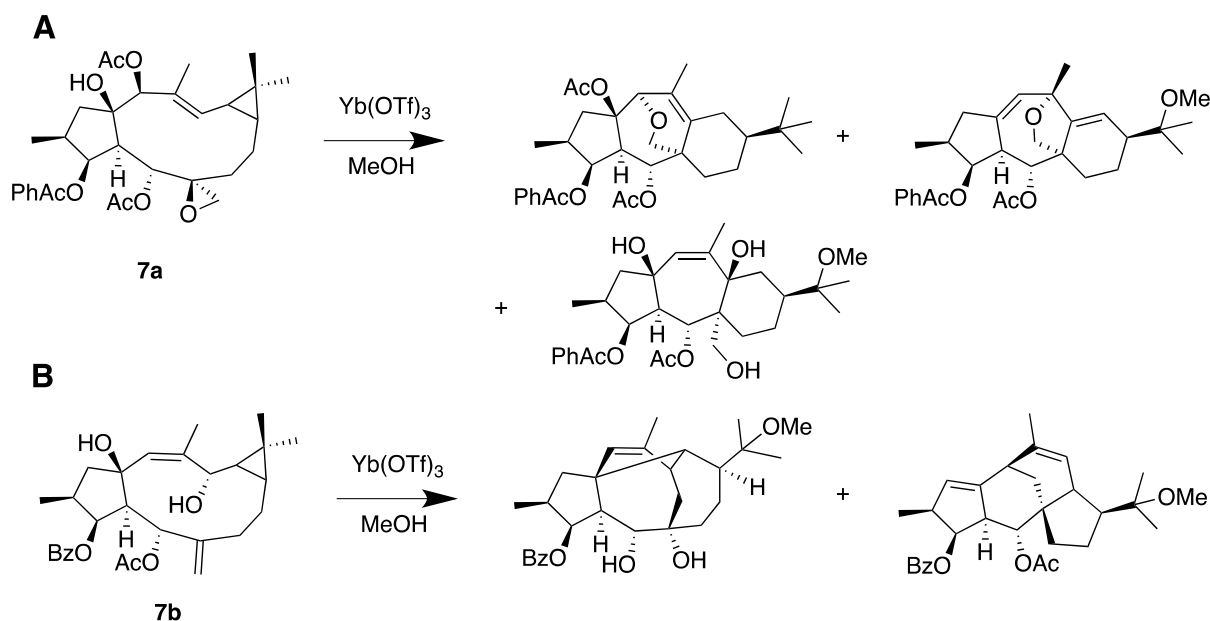


Figure 2. Cyclisations transanulaires des lathyrans **7a** et **7b** en présence de $\text{Yb}(\text{OTf})_3$.⁷⁰

Inspirés par ces travaux, nous envisageons de réaliser des modifications chimiques directement sur l'extrait de latex d'*E. dendroides* afin (i) d'évaluer la réactivité des squelettes jatrophane, 17-bishomojatrophane et tigliane identifiés chez cette plante en présence de certains réactifs chimiques, (ii) d'augmenter la diversité structurale connue des esters de diterpènes, afin de (iii) proposer de nouveaux dérivés plus actifs vis-à-vis de cibles biologiques. Par l'utilisation des réseaux moléculaires sur les extraits modifiés, nous cherchons à (i) mettre en avant une possible sélectivité d'un réactif vis-à-vis d'un squelette diterpénique déterminé, (ii) d'identifier les dérivés obtenus avec un rendement théorique et (iii) de proposer une structure pour chaque composé formé.

Au préalable à l'étude des extraits végétaux, nous avons dans un premier temps évalué la réactivité de deux esters de jatrophane (euphodendroidines E et F) – isolés en quantité suffisante – vis-à-vis de différents réactifs. Le but recherché est de fournir des molécules de référence afin d'interpréter les modifications réalisées sur les extraits, en fournissant des informations structurales et des données sur la réactivité des métabolites grâce aux réseaux moléculaires. Cette stratégie permettra un gain de temps et d'efficacité par rapport aux différentes étapes de réactions, d'analyses et de purifications des composés.

Dans cette partie consacrée aux résultats des modifications chimiques, nous présenterons exclusivement les réactions chimiques entreprises sur les deux esters de jatrophane, les euphodendroidines E et F (121 mg et 804 mg, respectivement), isolée de l'extrait de latex d'*E.*

dendroides. Dans un premier temps, nous avons envisagé des réactions d'époxydation pour ensuite obtenir des produits de réarrangement en présence de réactifs de différentes natures (base, acide de Lewis, etc.). En effet, ce type d'oxydations a déjà donné de bons résultats sur les lathyranes et les jatrophanes.^{71,72} Dans un second temps, nous avons envisagé des réactions s'adaptant plus spécifiquement au squelette jatrophane et jusqu'ici jamais réalisées sur ces types de composés, comme l'amination réductrice et la réaction de Tsuji-Trost. Enfin, nous avons utilisé des acides de Lewis en vue d'obtenir des cyclisations transanulaires ou des réarrangements tel que celle observées dans l'étude réalisée par Appendino.⁷⁰ Ces travaux ont été réalisés avec le Dr Sandy Desrat, sous la supervision du Dr Fanny Roussi.

2. Les modifications chimiques des euphodendroidines E et F

• Époxydation

L'époxydation de l'euphodendroidine F a été envisagée en vue de fonctionnaliser une ou les deux doubles liaisons pour conduire ensuite à des réarrangements par ouverture de l'époxyde. Deux essais d'époxydation ont été réalisés sur l'euphodendroidine F (**Figure 3**), un premier essai en présence de l'acide métachloroperbenzoïque (m-CPBA)⁷³ et un second avec le diméthylidioxirane⁷⁴ (DMDO)⁷⁵. Cependant, ces derniers n'ont pas permis d'isoler le dérivé époxydé recherché. Le spectre RMN du proton du mélange brut réactionnel a révélé la présence largement majoritaire de l'euphodendroidine F de départ. Aucune trace de produit d'époxydation n'a été détectée.

⁷¹ Appendino, G.; Cravotto, G.; Jarevång, T.; Sterner, O. Epoxidation Studies on Lathyrin-6(17),12-Dienes – Revised Structure of the Euphorbia Factor L1. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2000 (16), 2933–2938.

⁷² Zhu, J.; Wang, R.; Lou, L.; Li, W.; Tang, G.; Bu, X.; Yin, S. Jatropane Diterpenoids as Modulators of P-Glycoprotein-Dependent Multidrug Resistance (MDR): Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of Promising MDR Reversal Agents. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (13), 6353–6369.

⁷³ Shea, K. J.; Kim, J. S. Influence of Strain on Chemical Reactivity. Relative Reactivity of Torsionally Distorted Double Bonds in MCPBA Epoxidations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (8), 3044–3051.

⁷⁴ **Diméthylidioxirane** : non commercial, il est formé par oxydation de l'acétone, en présence de bicarbonate de sodium et d'hydrogènosulfate de potassium.

⁷⁵ Bach, R. D.; Glukhovtsev, M. N.; Gonzalez, C.; Marquez, M.; Estévez, C. M.; Baboul, A. G.; Schlegel, H. B. Nature of the Transition Structure for Alkene Epoxidation by Peroxyformic Acid, Dioxirane, and Dimethylidioxirane: A Comparison of B3LYP Density Functional Theory with Higher Computational Levels. *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101 (34), 6092–6100.

Résultats

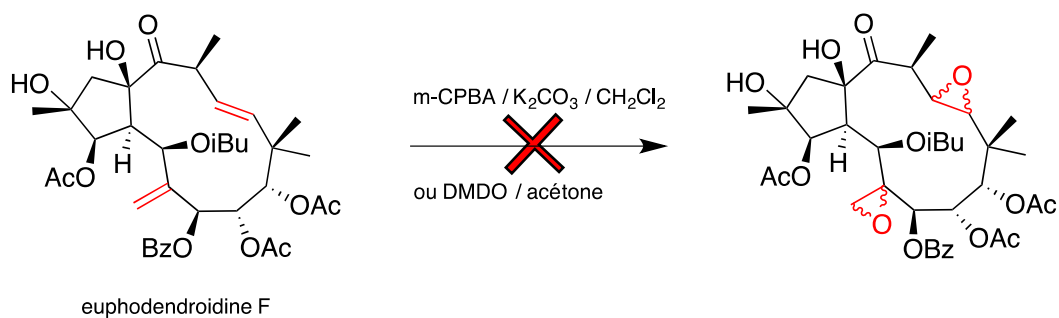


Figure 3. Essais d'époxydation de l'euphodendroidine F avec le m-CPBA ou le DMDO.

• Amination réductrice

Une amination réductrice permet de convertir un dérivé carbonylé de type cétone ou aldéhyde en amine par formation d'une imine intermédiaire.⁷⁶ Nous avons choisi d'introduire la benzylamine sur la cétone en C-14 de l'euphodendroidine F (Figure 4). Après formation de l'imine en présence de benzylamine et d'acide acétique, puis réduction par le NaHB(OAc)₃, l'analyse LC-MS n'a pas révélé la présence d'une masse paire caractéristique d'un dérivé aminé. D'autres essais réalisés en présence de différents réducteurs n'ont également pas donné le produit attendu.

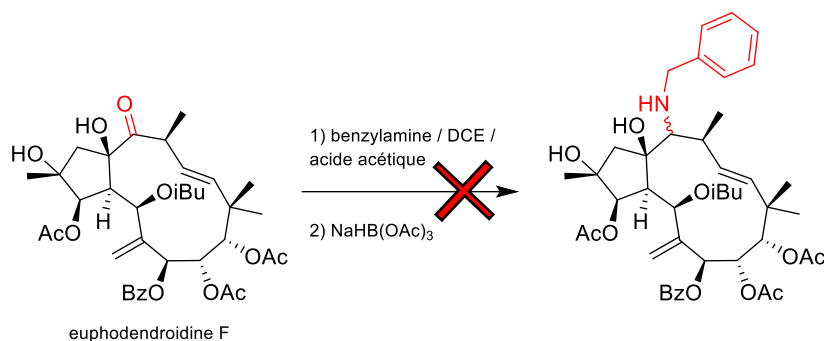


Figure 4. Essai d'amination réductrice sur l'euphodendroidine F avec la benzylamine.

⁷⁶ Consiglio, G.; Waymouth, R. M. Enantioselective Homogeneous Catalysis Involving Transition-Metal-Allyl Intermediates. *Chem. Rev.* **1989**, 89 (1), 257–276.

• La réaction de Tsuji-Trost

Généralités

La réaction de Tsuji-Trost permet d'introduire différents nucléophiles sur des substrats allyliques présentant un groupement partant (GP) en β , comme des acétates par exemple. Les euphodendroidines E et F présentent un système allylique (C-6–C-17) avec deux GPs de type ester de part et d'autre de cet exométhylène, ce qui en fait de bons candidats pour ce type de réaction.

Le mécanisme de la réaction de Tsuji-Trost est bien connu (Figure 5). Cette réaction est catalysée par des complexes de palladium(0).^{77,78} Le catalyseur au palladium(0) va se coordonner avec la double liaison qui possède un groupement partant (1). Il forme alors un complexe intermédiaire π -allylique suite au départ du GP par addition oxydante (2). Ensuite, selon la nature du nucléophile, il réagit sur ce complexe au palladium par deux mécanismes distincts (3), amenant à l'obtention du produit allylique désiré après une élimination réductrice (4).

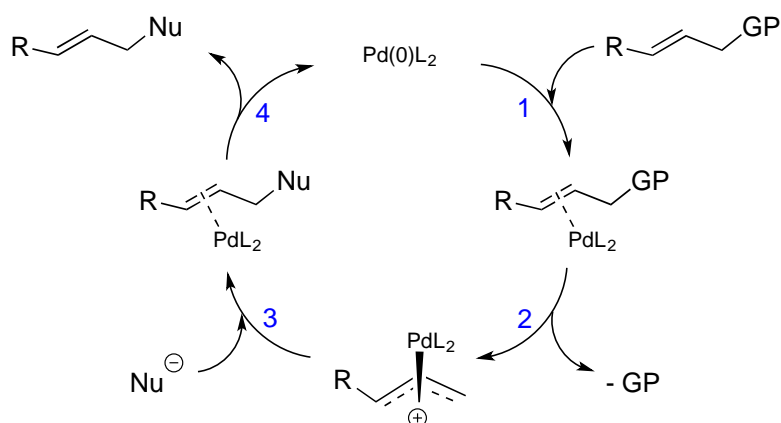


Figure 5. Mécanisme général de la réaction de Tsuji-Trost.

Dans le cadre de l'application de cette réaction sur les esters de jatrophone, nous avons envisagé l'utilisation de différents nucléophiles comme un hydrure avec le triéthylsilane

⁷⁷ Frost, C. G.; Howarth, J.; Williams, J. M. Selectivity in Palladium Catalysed Allylic Substitution. *Tetrahedron Asymmetry* **1992**, 3 (9), 1089–1122.

⁷⁸ Trost, B. M.; Van Vranken, D. L. Asymmetric Transition Metal-Catalyzed Allylic Alkylations. *Chem. Rev.* **1996**, 96 (1), 395–422.

Résultats

(Et_3SiH), ou encore des nucléophiles aminés. La présence de deux GPs en β du système allylique sur cette classe de composés laisse envisager la formation possible de deux composés distincts (Figure 6).

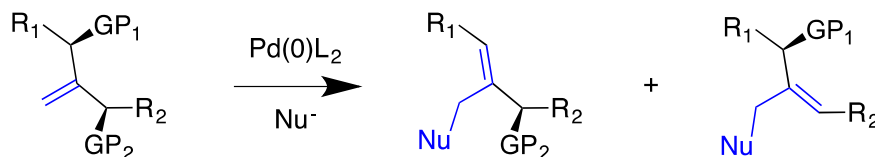


Figure 6. Formation de deux composés possibles via la réaction de Tsuji-Trost sur les euphodendroidines E et F.

Utilisation du triéthylsilane (Et_3SiH)

Les euphodendroidines E et F (10 mg) ont été mises en présence de bis(tri-*tert*-butylphosphine) de palladium [$\text{Pd}(\text{P}(t\text{-Bu})_3)_2$], de N-oxide 4-méthylmorpholine (NMO) et de triéthylsilane (Et_3SiH) dans le tétrahydrofurane anhydre (THF) à 70 °C pendant 20 h. L'interprétation conjointe de la RMN du proton et de la LC-MS du mélange réactionnel ont permis de mettre en évidence la formation d'un composé majoritaire à partir de l'euphodendroidine E, et d'un mélange de deux nouveaux dérivés à partir de l'euphodendroidine F (Figure 7).

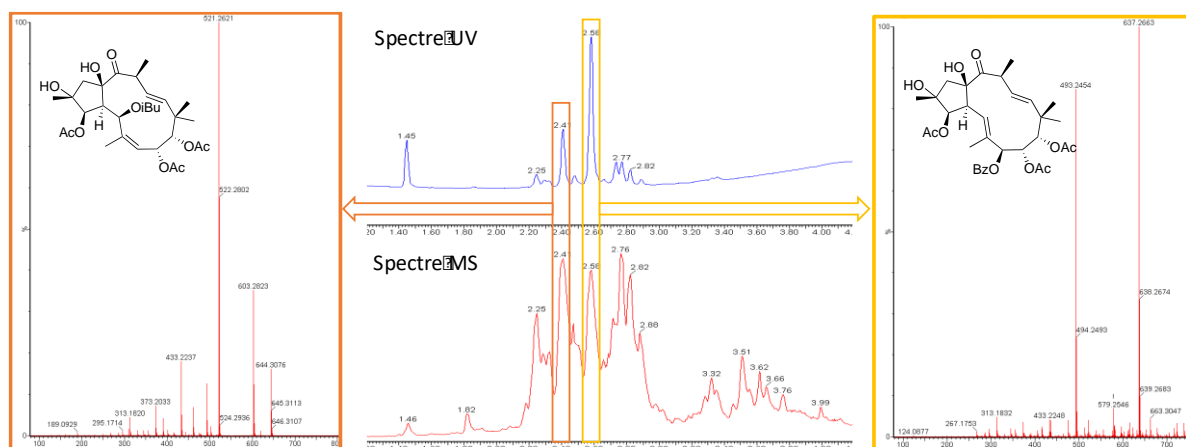


Figure 7. Spectre LC-MS du mélange réactionnel de la réaction de Tsuji-Trost sur l'euphodendroidine F avec Et_3SiH .

Résultats

Après purification sur une colonne de silice, un nouveau dérivé issu de la réaction à partir de l'euphodendroïdine E, nommé euphodendroïdine U (**1**), a pu être isolé (Figure 8). La réaction à partir de l'euphodendroïdine F (30 mg), après purification sur CLHP semi-préparative, a permis d'obtenir en proportion quasi équimolaire deux nouveaux dérivés, les euphodendroïdines V (**2**) et W (**3**) (Figure 8). L'interprétation de la RMN 1D et 2D a servi à l'élucidation complète de ces nouveaux dérivés **1** à **3** (Tableau 1 ; partie expérimentale). Les analyses RMN du composé **2** ont été réalisées à 227 K en raison de l'absence d'observation de certains déplacements chimiques et corrélations sur les spectres obtenus à 300 K.

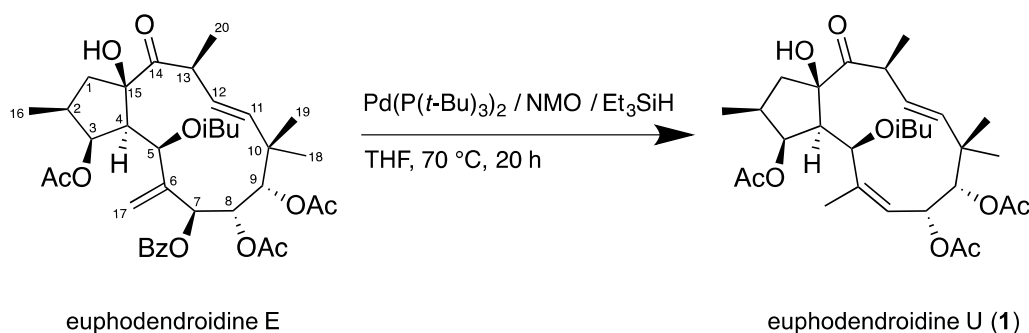


Figure 8. Réaction de Tsuji-Trost avec du Et_3SiH sur l'euphodendroïdine E.

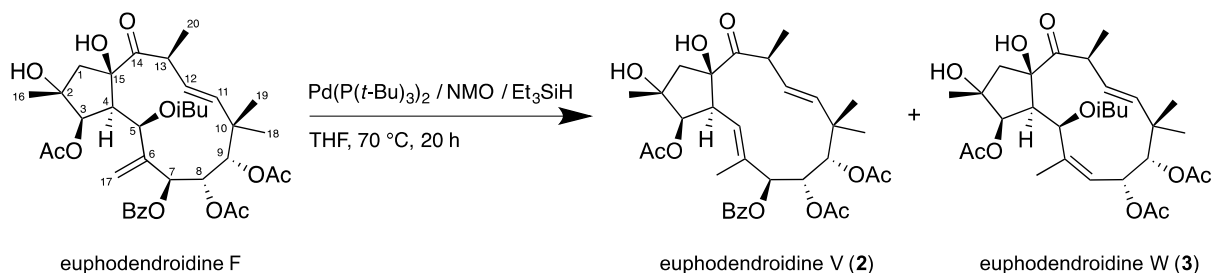


Figure 9. Réaction de Tsuji-Trost avec du Et_3SiH sur l'euphodendroïdine F.

La présence de deux GPs de part et d'autre de l'exométhylène de l'euphodendroïdine F a permis d'obtenir deux dérivés selon le mécanisme détaillé dans la Figure 10. Dans le cas **a**, un départ du benzoate est observé, tandis que dans le cas **b**, il s'agit d'une perte d'un isobutyrate. Lors de la réaction avec l'euphodendroïdine E, le départ du benzoate est largement favorisé par rapport à celui de l'isobutyrate.

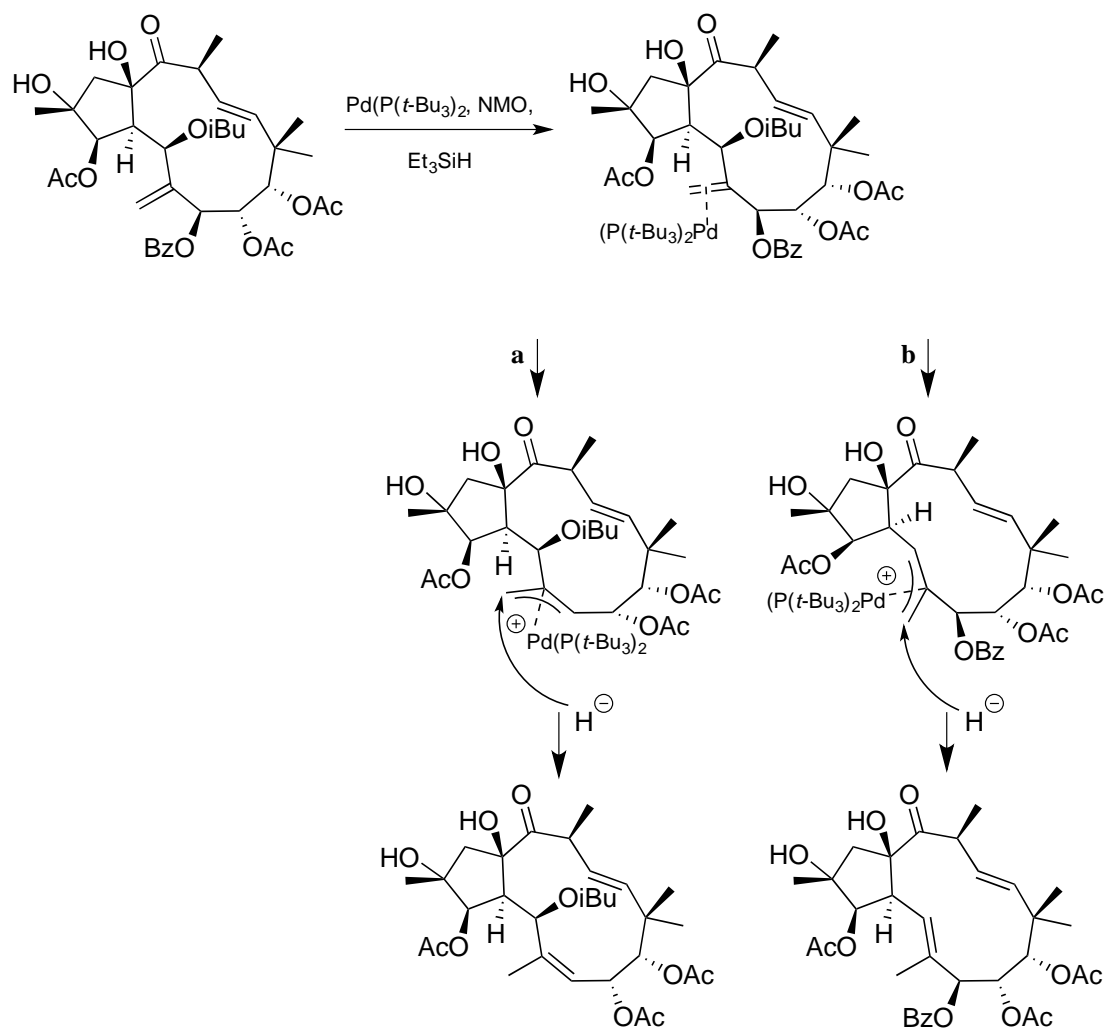


Figure 10. Mécanisme de la réaction de Tsuji-Trost sur l'euphodendroidine F avec Et_3SiH .

Utilisation d'amines

Des nucléophiles aminés comme la benzylamine, l'homovératrylamine ou la diéthylamine ont été utilisés dans cette réaction de Tsuji-Trost sur l'euphodendroidine F en modifiant les conditions par rapport à la réaction avec le triéthylsilane (Figure 11). Après 20 h de réaction en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, l'interprétation de l'analyse LC-MS pour ces trois réactions (exemple avec la benzylamine : Figure 12), a révélé la présence d'un pic correspondant à la masse du produit souhaité tandis que le spectre de RMN ^1H indique la présence majoritaire du produit de départ. Ces faibles taux de conversions n'ont pas permis d'isoler des produits d'amination par purification sur gel de silice.

Résultats

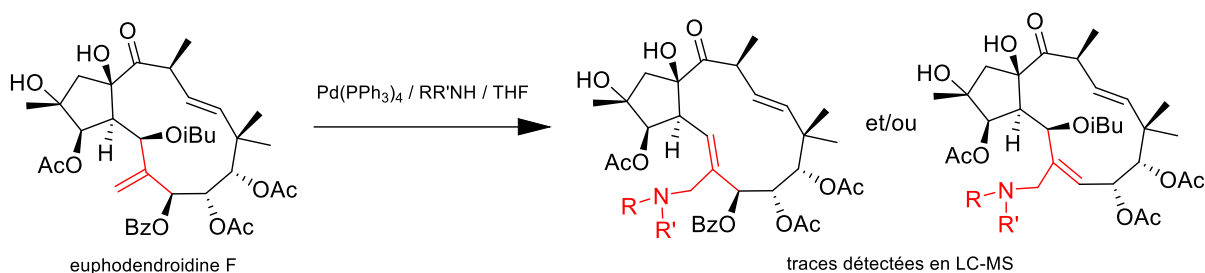


Figure 11. Réaction de Tsuji-Trost avec des nucléophiles aminés.

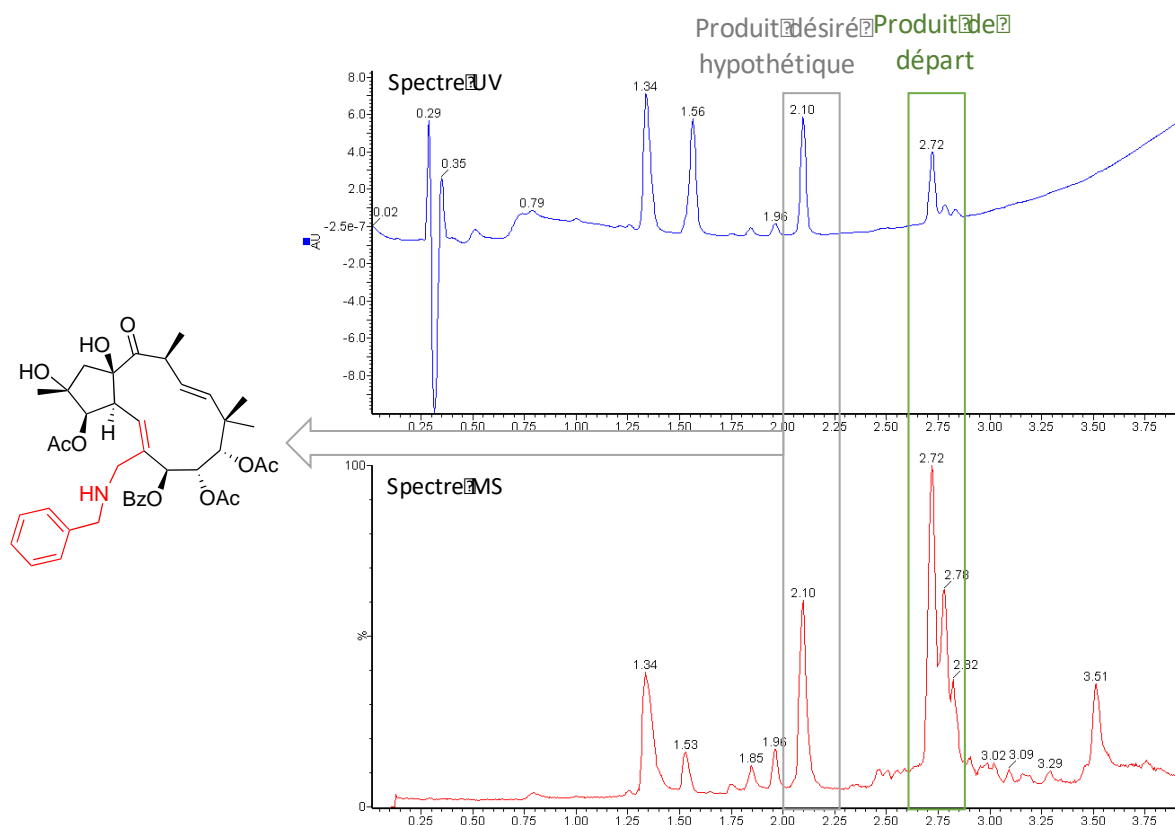


Figure 12. Analyse LC-MS du mélange réactionnel de la réaction de Tsuji-Trost avec la benzylamine sur l'euphodendroidine F.

Bien que nous ayons constaté une meilleure conversion de l'euphodendroidine F par l'amination en présence de diéthylamine, aucun produit n'a pu être isolé. Par la suite, nous nous sommes focalisés sur l'étude des modifications en présence d'acides de Lewis.

• Réaction en présence d'acides de Lewis

Utilisation du trifluorométhanesulfonate d'ytterbium [Yb(OSO₂CF₃)₃.H₂O]

Les acides de Lewis ont été utilisés par Appendino pour former des nouveaux dérivés à partir de lathyranes.⁷⁰ Il a notamment observé des réarrangements intéressants (cyclisations transanulaires) amenant à la formation de nouveaux squelettes diterpéniques, notamment en présence de trifluorométhanesulfonate d'ytterbium (Yb(OTf)₃) dans le méthanol. Ainsi, cette méthodologie a été appliquée aux euphodendroidines E et F. Contrairement aux lathyranes, l'utilisation de cet acide de Lewis sur nos deux esters de jatrophane n'a pas permis de mettre en évidence par LC-MS et par RMN ¹H la présence de nouveaux produits puisque seuls les produits de départ ont pu être observés. Suite à cela, nous avons envisagé l'utilisation d'un acide de Lewis plus fort comme le trifluoroéthérate de bore (BF₃.OEt₂).

Utilisation du trifluorure de bore (BF₃.OEt₂)

Après une heure, l'euphodendroidine F en présence d'un excès de BF₃.OEt₂ (5 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (CH₂Cl₂) a donné un mélange de composés dont trois sont majoritaires (**Figure 13**), d'après les analyses de RMN ¹H et de LC-MS. Cette dernière (**Figure 14**) a révélé la présence d'un produit de déshydratation (- H₂O), d'un dérivé déshydraté ayant également subi la perte d'un acétate (- H₂O et - OAc) et d'un composé possédant la même masse moléculaire que le produit de départ.

Après purification par CLHP semi-préparative, les différents composés ont pu être isolés et identifiés par analyses RMN 1D et 2D (**Tableau 2** ; partie expérimentale). Il s'agit d'un composé ayant été précédemment isolés d'un extrait de *E. dendroides*, l'épiabéodendroidine F (**4**) ayant le même *m/z* et la même formule brute que l'euphodendroidine F, et de deux nouveaux dérivés originaux, l'oxétanabéodendroidine X (**5**) et l'oxétanabéodendroidine F (**6**) (**Figure 13**).

Résultats

L'épiabédendroidine F a été isolée par Corea *et al.* en 2003 au cours de l'étude phytochimique d'*E. dendroides*.⁷⁹ D'après ce travail, la présence de ce constituant est due à la présence d'albumine neutre lors de la purification, ce qui entraîne un réarrangement de l'euphodendroidine F selon le mécanisme présenté en **Figure 15**. Toutefois, le recours à des procédures sans albumine ont permis d'isoler l'abédendroidine F (OH-15 en α) et l'épiabédendroidine F (OH-15 en β) de l'extrait de latex d'*E. dendroides* récoltée en Sardaigne. Ces résultats ont conduit ces auteurs à admettre la présence naturelle de ces dérivés au sein de la plante.

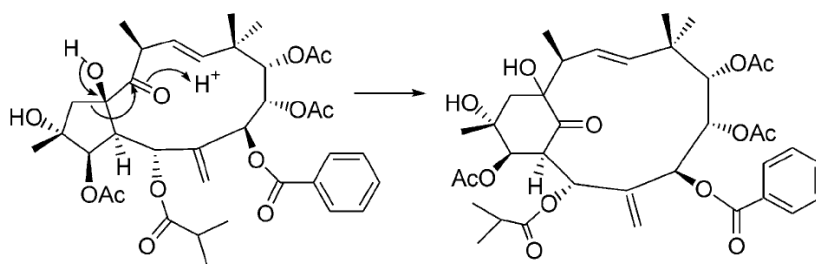


Figure 15. Mécanisme du réarrangement de l'euphodendroidine F en abédendroidine F et/ou en épiabédendroidine F d'après Corea.⁷⁹

Contrairement à l'euphodendroidine F, l'euphodendroidine E n'a pas réagi en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ puisque seul le produit de départ a été récupéré. Cette observation laisse envisager l'influence de l'alcool en position C-2 sur l'euphodendroidine F dans le mécanisme réactionnel proposé dans la **Figure 16**. De plus, nous pouvons supposer que la formation de l'oxétane entre C-2 et C-14 ainsi que la perte d'un acétate en C-8 retrouvées chez les composés **4** et **5** seraient induites par l'acidité du mélange réactionnel impliquant une déshydratation et une hydrolyse.

⁷⁹ Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatela-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Modified Jatropane Diterpenes as Modulators of Multidrug Resistance from *Euphorbia Dendroides* L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (23), 5221–5227.

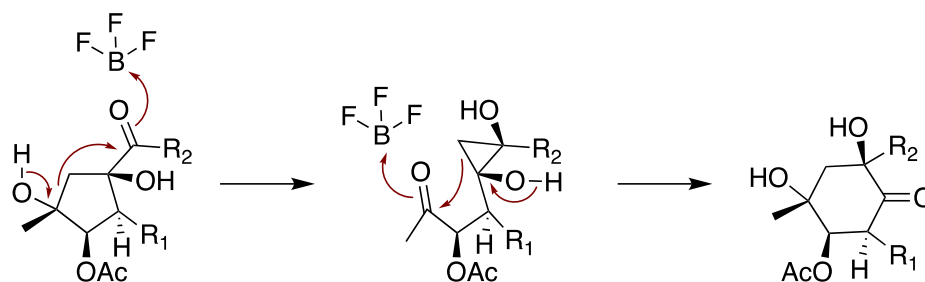


Figure 16. Mécanisme réactionnel proposé pour la réaction du $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ sur l'euphodendroidine F.

• Conclusion et perspectives

Ces essais préliminaires de modifications chimiques des euphodendroidines E et F nous ont permis d'explorer la réactivité de deux jatrophanes vis-à-vis de divers réactifs. Parmi les essais réalisés, la réaction de Tsuji-Tost en présence de triéthylsilane et l'utilisation de trifluoroéthérate de bore nous ont permis d'isoler six dérivés, dont certains possèdent des structures originales. Un seul de ces composés avait été décrit précédemment dans la littérature. Ces molécules vont permettre l'annotation des réseaux moléculaires générés à partir des analyses LC/MS/MS des extraits de latex modifiés chimiquement. Sur ces derniers, la poursuite du travail s'articulera essentiellement autour de la détection de nouveaux dérivés au sein des réseaux moléculaires ; si de nouveaux dérivés sont formés et si des références s'avèrent nécessaires pour annoter les réseaux moléculaires, des traitements chimiques seront entrepris une nouvelle fois sur les euphodendroidines E et F.

3. Partie expérimentale

General Experimental Procedures.

Optical rotations $[\alpha]_D$ were measured on a polarimeter MCP 300 Anton Paar polarimeter at 24 °C. Monochromatic light source is the sodium D-lines. MeOH was used as solvent. UV spectra were recorded on a Varian Cary 100 scan spectrophotometer and they were measured in a 1 cm quartz cell. The 1D- (^1H and ^{13}C) and 2D- (COSY, HSQC, HMBC and ROESY) NMR analysis were recorded in CDCl_3 at 300 K on a Bruker Avance 600 MHz instrument using

Résultats

a 1.7 mm microprobe for compound **5**, on a Bruker Avance 500 MHz instrument for compounds **1** and **3**, on a Bruker Avance 300 MHz instrument for compounds **4** and **6**, and in pyridine-*d*₅ at 340 K on a Bruker Avance 500 MHz instrument for compound **2**. The data processing software was NMRnotebook[®] (<http://www.nmrtec.com/>). Analytical C₁₈ columns (Kromasil, 250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, Thermo Scientific) was used for HPLC separation on 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. This unit was controlled with Masslynx software. Semi-preparative C₁₈ column (Kromasil, 250 × 10 mm; i.d. 5 μm) was used for semi-preparative HPLC separation using a Dionex autopurification system equipped with a binary pump (P580), an UV–vis array detector (200–600 nm, Dionex UVD340U), and a PL-ELS 1000 ELSD detector Polymer Laboratory. This unit was controlled with Chromeleon software. The staining reagent used for analytical TLC plates (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) was the sulfuric molybdate, which was prepared by dissolving ammonium dimolybdate (50 g) in water (450 mL) and slowly adding concentrated sulfuric acid (50 mL) in cold conditions. The plates were observed at 254 nm and 366 nm UV-wavelength. All other chemicals and solvents were purchased from SDS (Peypin, France).

Starting Materials.

Euphodendroidins E and F were isolated from *Euphorbia dendroides* latex extract.⁸⁰

Tsuji Trost reaction.

To a suspension of euphodendroidin E (10 mg, 0.015 mmol) in anhydrous THF (0.5 ml), NMO (19.8 mg, 0.146 mmol, 10 mol. Equiv.), Pd(P(*t*-Bu)₃)₂ (2.24 mg, 0.0044 mmol, 0.3 mol. Equiv.), and Et₃SiH (0.09 mL, 0.5845 mmol, 40 mol. Equiv.) were added at 70 °C, under argon atmosphere. After 20 h, the reaction was worked up by dilution with saturated NH₄Cl and extraction with MTBE (3 x). After drying (MgSO₄), filtration and evaporation under reduced pressure on a rotary evaporator, the residue was subjected to silica gel CC (heptane/EtOAc, 50:50) to give the compound **1** (2.5 mg).

⁸⁰ Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Nedev, H.; Gallard, J.-F.; Leyssen, P.; Retailleau, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; et al. *Euphorbia Dendroides* Latex as a Source of Jatrophone Esters: Isolation, Structural Analysis, Conformational Study, and Anti-CHIKV Activity. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79 (11), 2873–2882.

The same approach was used for euphodendroidin F (30 mg). the residue was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 35:65 in 40 min), allowing the isolation of compounds **2** (2.8 mg) and **3** (3.2 mg).

Reaction with Boron trifluoride diethyl etherate.

To a suspension of euphodendroidin F (50 mg, 0.075 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (1 ml), BF₃.OEt₂ (51.66 mg, 0.36 mmol, 5 mol. Equiv.) was added at room temperature, under argon atmosphere. After 1 h, the reaction was worked up by dilution with ultrapure water and extraction with MTBE (3 x). After drying (MgSO₄), filtration and evaporation under reduced pressure on a rotary evaporator, the residue was purified by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 25:75 in 40 min), affording three compounds, the epiabeodendroidin F (3.1 mg) and two new compounds **5** (1.8 mg) and **6** (7.9 mg).

Euphodendroidine U (**1**): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D +103$ (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 226 (3.88) 202 (4.08) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 587.2781 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₀H₄₄O₁₀Na, 587.2786).

Euphodendroidine V (**2**): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D +32.0$ (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 230 (3.88) 201 (4.07) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 637.2616 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₃H₄₂O₁₁Na, 637.2625).

Euphodendroidine W (**3**): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D +134$ (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 202 (3.88) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 603.2781 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₀H₄₄O₁₁Na, 603.2781).

Oxétanabéodendroidine X (**5**): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D +8$ (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 231 (3.67) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 2; HRESIMS *m/z* 663.2769 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₄₄O₁₁Na, 663.2781).

Oxétanabéodendroidine F (**6**): amorphous powder; $[\alpha]^{25}_D -8$ (*c* 1, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 231 (4.06) nm; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table 2; HRESIMS *m/z* 705.2892 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₇H₄₆O₁₂Na, 705.2887).

Résultats

Tableau 1. Données spectroscopiques de RMN ^1H et ^{13}C des euphodendroidines U (**1**) et W (**3**) à 300 K et de V (**2**) à 227 K, dans le CDCl_3 .

position	1			2			3		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	
1 α	47.4	1.73, d (9.3)	50.9	2.44, d (15.2)	53.8	2.28, d (15.3)			
1 β		2.33, d (9.3)		2.04, d (15.2)		2.04, d (15.3)			
2	38.3	2.30, m	80.4	-	79.9	-			
3	78.2	5.71, t (3.7)	85.1	5.29, d (4.1)	82.2	5.44, t (4.5)			
4	56.9	2.78, dd (10.3, 4.2)	45.5	4.19, dd (10.8, 4.1)	54.0	3.36, dd (10.7, 4.5)			
5	71.8	5.17, d (10.3)	123.3	5.31, d (10.8)	71.8	5.16, d (10.7)			
6	143.7	-	146.3	-	143.3	-			
7	122.0	5.65, br d (10.0)	67.3	6.19, br s	122.4	5.69, d (10.1)			
8	68.3	5.50, dd (10.0, 1.3)	71.2	4.78, br s	68.4	5.50, d (10.1)			
9	80.1	5.00, d (1.3)	82.2	4.80, br s	80.3	5.00, br s			
10	39.2	-	40.0	-	39.2	-			
11	136.8	5.52, d (15.7)	135.4	5.92, d (15.7)	136.9	5.56, d (15.9)			
12	127.7	5.28, dd (15.8, 9.5)	129.8	5.35, dd (15.7, 10.1)	128.1	5.28, dd (15.9, 10.1)			
13	43.9	3.39, dq (9.5, 6.5)	43.0	4.24, m	43.1	3.90, dq (10.1, 6.2)			
14	214.0	-	213.4	-	214.7	-			
15	85.3	-	86.9	-	85.2	-			
16	14.4	1.02, d (6.0)	23.6	1.35, s	23.9	1.35, s			
17	16.9	1.51, d (1.1)	20.8	1.50, s	16.9	1.50, s			
18	26.8	0.90, s	25.9	0.84, s	26.8	0.90, s			
19	23.4	1.17, s	23.3	1.77, s	23.4	1.17, s			
20	21.1	1.27, d (6.5)	19.9	1.2, d (6.3)	20.9	1.24, d (6.2)			
2-OH	-	-	-	n.d.	-	1.69, br s			
3-OAc	170.9		170.9		170.7				
	21.1	2.05, s	21.7	2.04, s	21.0	2.06, s			
5-OiBu	175.5		-	-	175.5	-			
	34.0	2.45, m			34.1	2.44, m			
	19.0	1.07, d (7.0)			19.0	1.07, d (8.8)			
	18.4	1.05, d (7.0)			18.5	1.05, d (8.8)			
7-OBz	-	-	165.2		-	-			
			129.5	7.98, d (7.5)					
			128.8	7.40, br t (7.5)					
			133.6	7.53, br t (7.5)					
8-OAc	170.1		170.1		170.1				
	21.0	2.13, s	21.6	2.16, s	21.0	2.13, s			
9-OAc	170.4		170.5		170.4				
	21.1	1.84, s	19.8	1.50, s	21.1	1.84, s			
15-OH	-	4.34, br s		n.d.		4.37, br s			

n.d. : non déterminé

Résultats

Tableau 2. Données spectroscopiques de RMN ^1H et ^{13}C de l'oxétanabédendroidine F (**5**) et de l'oxétanabédendroidine X (**6**) à 300 K dans le CDCl_3 .

position	5		6	
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1 α	46.1	2.83, d (17.3)	46.2	2.83, d (17.6)
1 β		2.17, d (17.3)		2.18, d (17.6)
2	81.7	-	81.6	
3	75.4	5.51, br d (10.3)	75.3	5.52, br d (10.6)
4	46.8	3.21, d (10.3)	46.8	3.14, d (10.6)
5	67.7	5.50, br s	67.8	5.50, br s
6	146.7	-	146.8	-
7	68.3	5.68, br s	70.1	5.33, br s
8	71.6	5.47, br s	70.3	4.38, br d (5.7)
9	81.1	5.03, br s	87.6	4.69, br s
10	40.5	-	40.5	-
11	130.2	5.85, br d (7.4)	136.4	5.83, br d (2.0)
12	136.7	5.86, m	130.2	5.83, m
13	43.2	2.80, m	43.2	2.78, m
14	90.9	-	90.8	-
15	209.3	-	209.4	-
16	20.1	1.45, br s	20.1	1.45, br s
17a	107.4	4.91, br s	107.4	4.74, br s
17b		4.68, br s		4.95, br s
18	23.05	1.46, s	23.2	1.37, s
19	26.9	0.93, s	27.4	1.03, s
20	15.8	1.10, d (6.6)	15.9	1.10, d (6.6)
3-OAc	169.5		169.4	
	21.3	2.01, s	21.4	2.02, s
5-OiBu	174.7		175.4	
	34.2	2.52, m	34.2	2.52, m
	19.3	1.21, d (7.2)	19.3	1.22, d (6.6)
	18.6	1.18, d (7.2)	18.5	1.19, d (6.6)
7-OBz				
1'	165,0		164.6	
2', 6'	129.8	8.07, d (7.5)	129.9	8.03, d (7.4)
3', 5'	128.8	7.45, br t (7.5)	128.9	7.44, br t (7.4)
4'	133.6	7.58, br t (7.5)	133.8	7.57, br t (7.4)
8-OAc/-OH	170.2		-	3.58, br d (9.3)
	20.9	2.10, s		
9-OAc	170,0		173.2	
	20.5	1.56, s	20.6	1.61, s

III. ANALYSE TRANSVERSALE

Les présents travaux de recherche s’inscrivent dans la continuité des travaux menés sur les esters de diterpène d’*Euphorbia* de Corse entre 2011 et 2015. Le choix des plantes à investiguer s’est notamment appuyé sur les résultats de cette thèse, qui a révélé le potentiel inhibiteur d’extraits d’*Euphorbia* de Corse sur la réplication du virus du chikungunya (CHIKV).⁸¹ Dans ce chapitre, nous présenterons une analyse transversale des articles et des résultats présentés précédemment, tout en précisant le cheminement scientifique ayant guidé ces différentes études. La première partie (A) fait référence à l’étude du latex d’*Euphorbia dendroides*, décrite dans les trois **articles** précités (1, 2 et 3) et la **partie F** des « résultats », tandis que la partie (B) présente les résultats de l’**article 4** et du **manuscrit 5** (en préparation) obtenus lors de l’investigation des extraits issus des parties aériennes de deux espèces sœurs, *Euphorbia pithyusa* et la sous-espèce *E. pithyusa* subsp. *cupanii*.

⁸¹ 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.

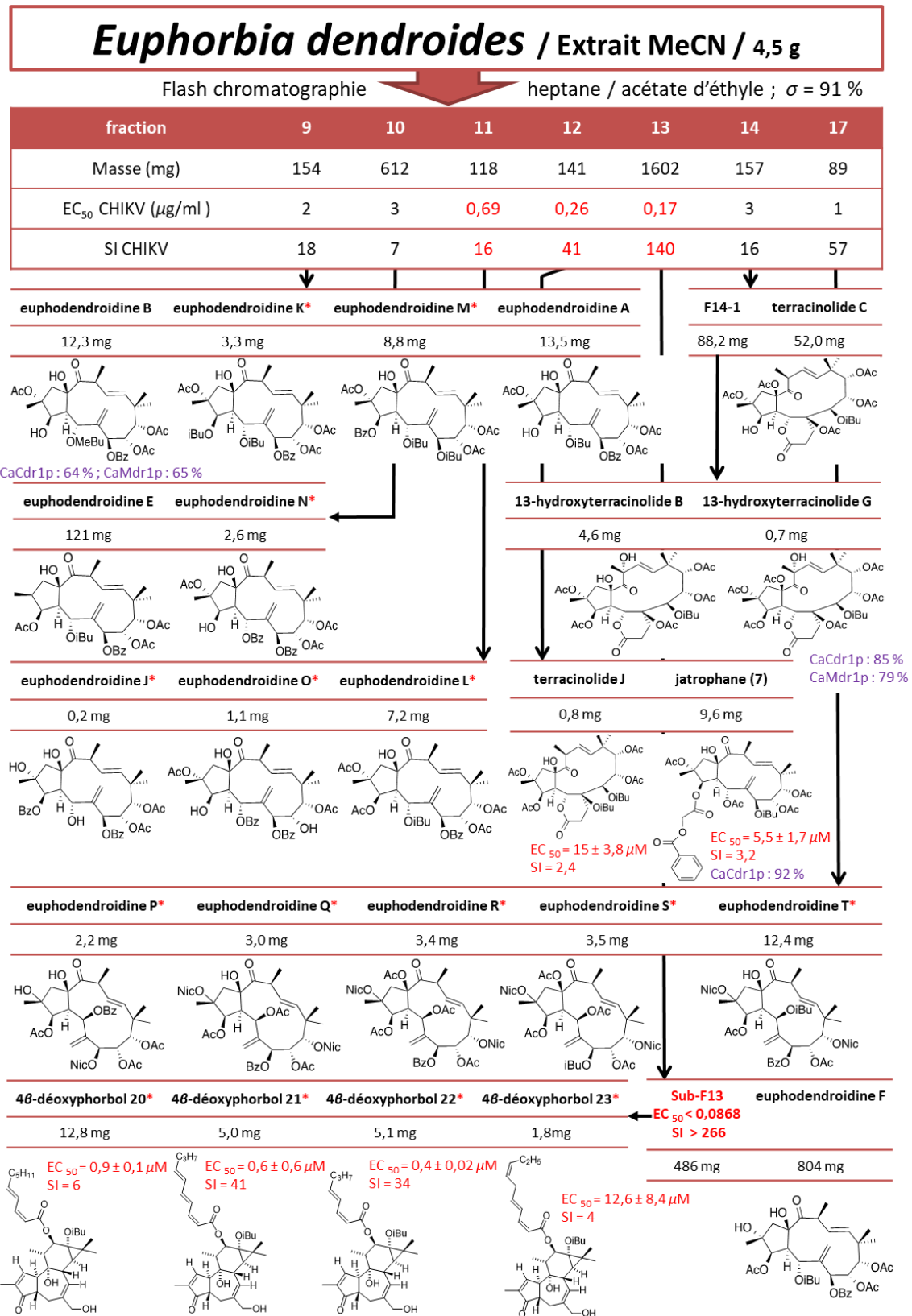
A. ÉTUDE DU LATEX D'*EUPHORBIA DENDROIDES*

L'objectif de notre étude visait à isoler et identifier de nouveaux esters de diterpène dans le latex d'*Euphorbia dendroides* ; il s'agissait notamment de découvrir des constituants dotés d'activité antivirale sur le CHIKV, mais aussi d'évaluer leur capacité à inhiber les pompes d'efflux impliqués dans la résistance acquise de *Candida albicans* au fluconazole. L'espèce *E. dendroides* a été sélectionnée car elle présente l'avantage d'être la seule espèce arborescente en Corse, produisant des quantités relativement importantes de latex à partir de ses parties ligneuses ou de ses feuilles, facilitant ainsi la récolte de ce dernier. Par ailleurs, lors des travaux précédents réalisés en vue de découvrir de nouveaux métabolites secondaires potentiellement antiviraux à partir d'extraits d'Euphorbes de Corse,⁸¹ il avait été montré que le latex d'*E. dendroides* possédait une forte activité inhibitrice de la réplication du CHIKV [EC₅₀ CHIKV = 0,11 µg/ml (SI = 68)]. De plus, les études antérieures entreprises par des équipes sarde et serbe, visant à caractériser la composition chimique de cette espèce, ont permis de mettre en évidence la présence d'esters de jatrophane dans les parties aériennes et le latex (cf. partie I, p.10-12). Ces composés sont notamment connus pour leur potentiel inhibiteur de la réplication virale (CHIKV et VIH)^{82,83}, mais aussi pour leur activité modulatrice de la glycoprotéine-P humaine (P-gp) (cf. partie I, p.32-35).

⁸² 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 Jatrophane Diterpene Activates Classical PKCs and Displays Strong Activity against HIV in Vitro. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77* (6), 965–978.

⁸³ Nothias-Scaglia, L.-F.; Retailleau, 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.

1. Schéma récapitulatif



* : Nouveaux composés / EC₅₀ et SI : activité anti-CHIKV / CaCdr1p et CaMdr1p : pourcentage d'inhibition des récepteurs de *C. albicans*

2. Identification d'esters de jatrophane

Le latex d'*Euphorbia dendroides* L. a été récolté à partir d'une vingtaine de spécimens poussant sur les falaises de la baie de Ficaghjola (Piana) à l'aide de coton préalablement décontaminé par plusieurs lavages à l'heptane, l'acétate d'éthyle (AcOEt) et au méthanol (MeOH). Les extractions solide-liquide à l'AcOEt (ESL n°1) et au méthanol (ESL n°2) du coton imbibé de latex (Figure 44) a permis l'obtention des extraits correspondants (AcOEt et MeOH). Ensuite, une partition liquide-liquide (PLL n°1) de l'extrait AcOEt au pentane et à l'acétonitrile (MeCN) a donné les extraits respectifs.⁸⁴

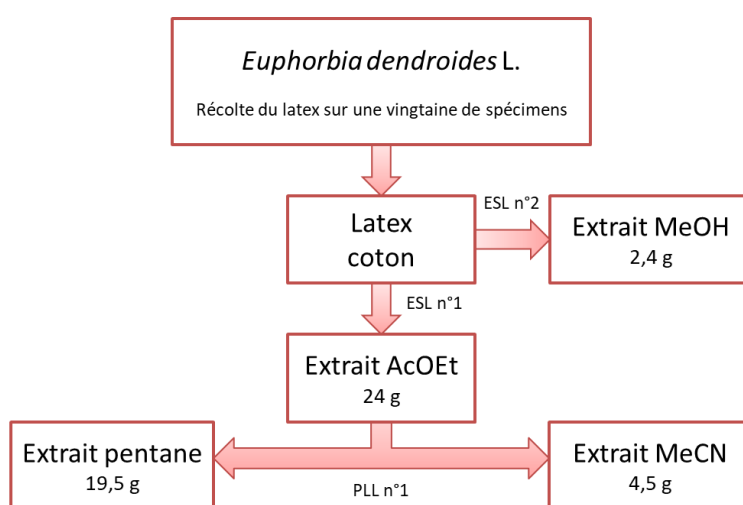


Figure 44. Schéma d'extraction du latex d'*E. dendroides*.

L'extrait MeCN (4,5 g) a été sélectionné pour être investigué sur la base de sa forte activité anti-CHIKV [EC_{50} CHIKV = 0,11 μ g/ml (SI = 68)].⁸¹ Ce dernier a été séparé en dix-huit fractions par chromatographie flash en phase normale suivant un gradient heptane/AcOEt. Sur la base d'analyses RMN et par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en haute résolution multi-niveaux (LC-MSⁿ) et de la RMN du ¹H, six fractions (F9–F14) ont été choisies en raison de la présence significative d'esters de jatrophane. L'analyse des données a notamment permis de mettre en évidence la présence d'un composé majoritaire dans la fraction

⁸⁴ 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.

F13, l'euphodendroidine F (Figure 45).⁸⁵ Une deuxième chromatographie flash réalisée sur cette dernière a conduit à l'isolement de 804 mg de ce composé. Cette molécule est donc présente à une teneur d'environ 18% dans l'extrait MeCN, ce qui est assez inhabituel puisque seules deux études ont été rapportées sur l'isolement d'esters de diterpène en grande quantité : l'euphorbia factor L1 et le jolkinol D à partir d'extraits d'*E. lathyris*⁸⁴ et d'*E. piscatirial*⁸⁶, respectivement.

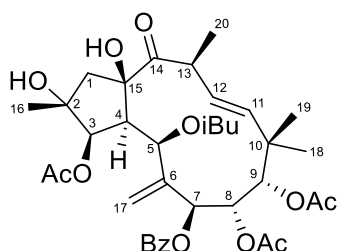


Figure 45. Euphodendroidine F

La séparation des fractions F9–F14 par CLHP préparative ou semi-préparative a permis l'isolement de 14 autres esters de jatrophane (schéma récapitulatif). L'élucidation structurale de ces constituants a été réalisée grâce à l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse haute résolution (ESI-HRMS), de la RMN 1D et 2D (COSY, HSQC, HMBC et ROESY) et par comparaison des données à celles de la littérature. Il s'agit de onze molécules de type 6,11-diène-16-oxojatrophane nommées euphodendroidines, dont six sont nouvelles, et de quatre composés de type 17-bishomojatrophane nommés terracinolides (Figure 46 et schéma récapitulatif). L'analyse par diffraction des rayons X des cristaux, obtenus pour trois de ces composés, a permis de déterminer par extrapolation la configuration absolue de la série. Par ailleurs, une étude conformationnelle (détaillée dans la partie suivante), conduisant à des expériences RMN à basse température dans le chloroforme deutéré (CDCl₃), a été réalisée pour deux euphodendroidines (K et L) en raison de leur comportement coalescent à température

⁸⁵ Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Jatrophane Diterpenes as P-Glycoprotein Inhibitors. First Insights of Structure–Activity Relationships and Discovery of a New, Powerful Lead. *J Med Chem* **2003**, *46* (15), 3395–3402.

⁸⁶ Reis, M.; Ferreira, R. J.; Santos, M. M. M.; dos Santos, D. J. V. A.; Molnár, J.; Ferreira, M.-J. U. Enhancing Macrocyclic Diterpenes as Multidrug-Resistance Reversers: Structure–Activity Studies on Jolkinol D Derivatives. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (3), 748–760.

ambiante. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article publié en 2016 dans *Journal of Natural Product* (**article 1**).⁸⁷

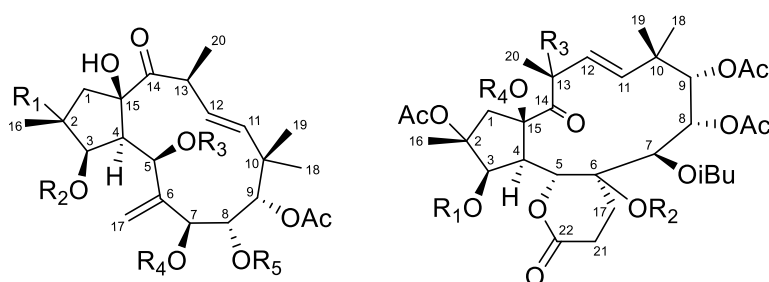


Figure 46. Structures des euphodendroidines (à gauche) et des terracinolides (à droite).

Enfin, l'analyse par RMN ¹H de la fraction F17, notamment l'observation de signaux caractéristiques au-dessus de 7 ppm, suggérait la présence de diterpènes substitués par des groupements esters de type nicotinoate. L'investigation de cette fraction a conduit à la purification de cinq nouvelles euphodendroidines P–T ([schéma récapitulatif](#)). L'élucidation structurale de ces dernières a été rendue possible par l'interprétation des données ESI-HRMS et RMN 1D et 2D. Cependant, l'observation d'un comportement atypique à température ambiante (semblable à celui décrit dans l'**article 1** pour les euphodendroidines K et L), a nécessité des analyses RMN dans la pyridine-*d*₅ à haute température ainsi que des comparaisons deux à deux ou avec les déplacements chimiques de molécules décrites dans la littérature. Ces résultats ont été publiés dans *Journal of Natural Product* en février 2017 (**article 2**).⁸⁸

⁸⁷ Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Nedev, H.; Gallard, J.-F.; Leyssen, P.; Retailleau, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; et al. Euphorbia Dendroides Latex as a Source of Jatrophone Esters: Isolation, Structural Analysis, Conformational Study, and Anti-CHIKV Activity. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (11), 2873–2882.

⁸⁸ Esposito, M.; Nim, S.; Nothias, L.-F.; Gallard, J.-F.; Rawal, M. K.; Costa, J.; Roussi, F.; Prasad, R.; Di Pietro, A.; Paolini, J.; et al. Evaluation of Jatrophone Esters from Euphorbia Spp. as Modulators of Candida Albicans Multidrug Transporters. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (2), 479–487

3. Étude conformationnelle des esters de jatrophane

L'élucidation structurale complète de deux esters de jatrophane, les euphodendroidines K et L ([schéma récapitulatif](#)), n'a pas été possible sur la seule base des analyses RMN 1D et 2D réalisées à température ambiante dans le CDCl₃. En effet, l'absence de signaux (signaux larges situés dans le bruit de fond) autour de l'exométhylène (C-5 à C-7) en RMN ¹H ([Figure 47](#)) et ¹³C, ne nous permettait pas de conclure avec certitude quant à la structure exacte du squelette jatrophane. Nous avons alors envisagé la présence d'un échange intra-, intermoléculaire ou interconformationnel pour chacun de ces deux composés.

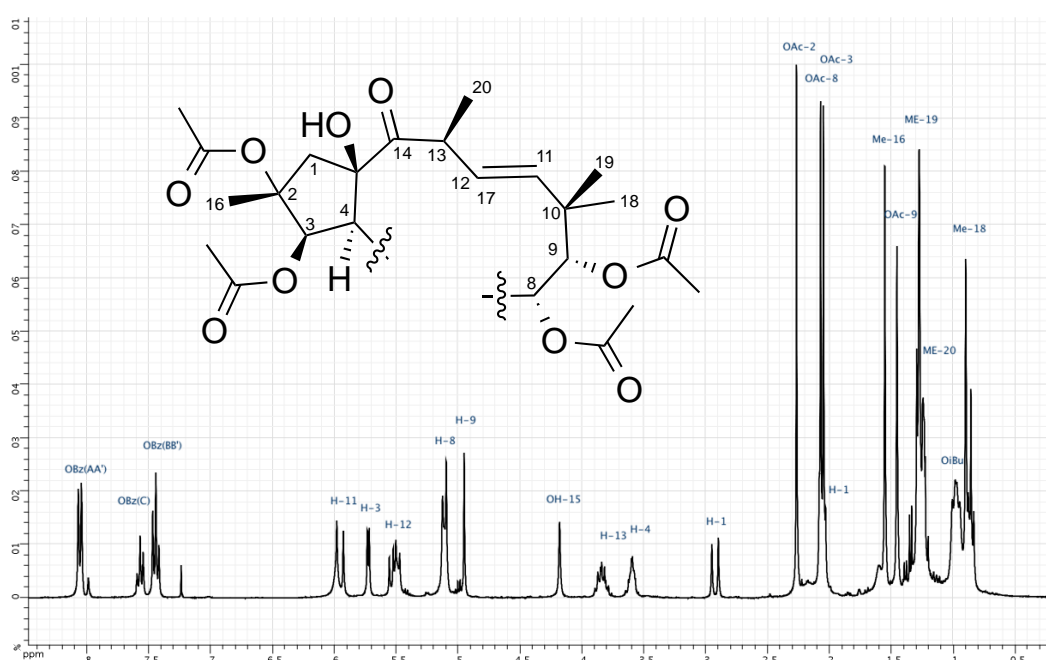


Figure 47. Spectre RMN ¹H de l'euphodendroidine K à température ambiante dans le CDCl₃.

Une étude menée par Günther et ses collaborateurs sur l'ésulatine F – un ester de jatrophane isolé d'*E. esula* – décrit la présence de signaux très larges, mais encore visibles, lorsque la température d'acquisition est proche de la température de coalescence (TC), mais également le dédoublement des signaux lorsque les expériences de RMN sont réalisées à basse température.⁸⁹ Ce phénomène est dû au fait que les esters de jatrophane peuvent adopter deux conformations différentes (cf. partie I, p.20), le type *endo* et le type *exo* ([Figure 48](#)). Lorsque la

⁸⁹ 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.

Analyse transversale

température est assez basse pour figer la molécule, les deux conformères sont alors observables par RMN (dédoublément), tandis qu'une valeur moyenne est observée lorsque l'échange interconformationnel est rapide.

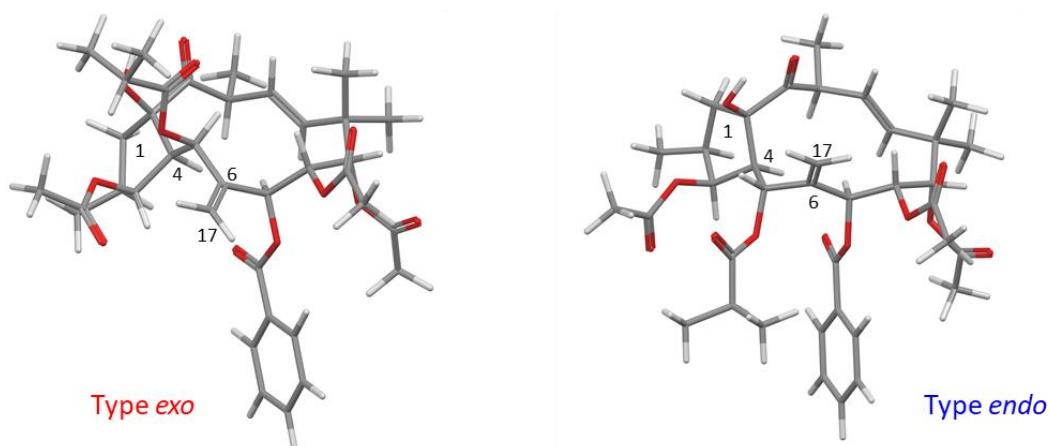


Figure 48. Modèles moléculaires des conformères de *type exo* (gauche) et de *type endo* (droite) d'un ester de jatrophone.

Des expériences de RMN à basse température, réalisées sur les deux molécules au comportement coalescent à température ambiante, ont permis d'obtenir des spectres proton et carbone dédoublés (Figure 49). Les déplacements chimiques des deux conformères des euphodendroidines K et L ont été observés, permettant ainsi une élucidation structurale certaine. Il nous a ainsi été permis de conclure que la TC de ces deux composés est proche de la température ambiante et que ces derniers présentent un échange interconformationnel ralenti par rapport aux autres esters de jatrophone isolés.

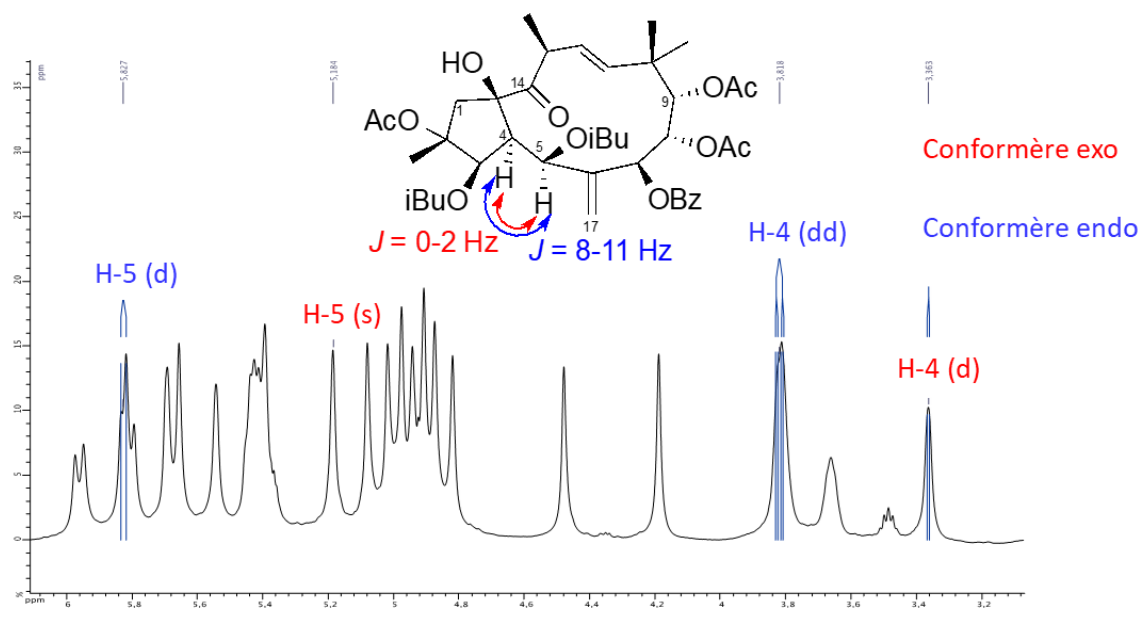


Figure 49. Zoom du spectre RMN ^1H (6,5 à 3,2 ppm) de l'euphodendroïdine K à basse température.

Afin d'expliquer cet échange interconformationnel ralenti, une modélisation moléculaire a été entreprise en comparant les résultats obtenus pour les deux composés au comportement coalescent avec ceux d'une molécule ne présentant pas de coalescence dans les mêmes conditions analytiques, l'euphodendroïdine E ([schéma récapitulatif](#)). Pour ces trois composés, le calcul de l'énergie relative interne et du taux d'interconversion montre que les conformères de type *exo* sont favorisés par rapport à ceux du type *endo* ([Figure 50](#)). De plus, la valeur de la barrière d'activation à TC de l'euphodendroïdine E est moins élevée que celle des euphodendroïdines K et L, ce qui confirme un échange ralenti entre les conformères de ces derniers. Pour les trois constituants (euphodendroïdines K, L et E), les modèles moléculaires de chaque conformère ont été calculés par modélisation moléculaire dérivé de la mécanique quantique (théorie de la fonctionnelle de densité, DFT) et comparés aux valeurs expérimentales obtenues pour chacun d'entre eux (déplacements chimiques du proton, du carbone et constantes de couplage).

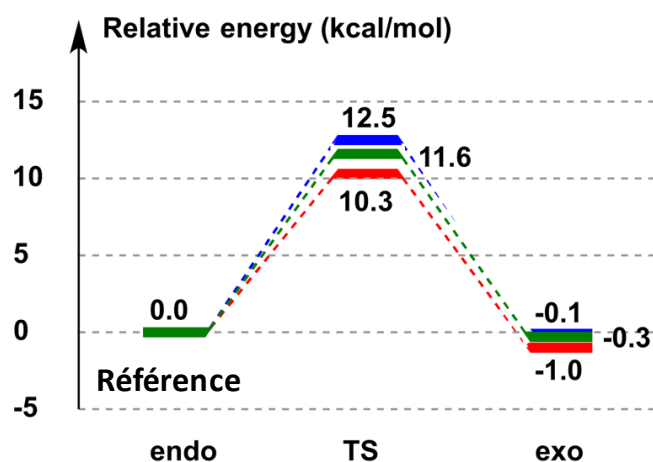


Figure 50. Energie relative des taux de transitions d'interconversion des euphodendroidines E (rouge), K (vert) et L (bleu).

Dans la littérature, la conformation des esters de jatrophane n'est pas systématiquement étudiée, cependant, Jeske et Appendino déduisent des signaux RMN rapportées que ces derniers adoptent préférentiellement une conformation de type *exo*.^{90,91} Toutefois, les amygdaloidines (isolées d'*E. amygdaloides*) sont l'un des rares exemples d'esters de jatrophane ayant une conformation de type *endo*.⁹² Les euphodendroidines K et L sont les premiers exemples de composés présentant un comportement coalescent à température ambiante, lié à un échange interconformationnel ralenti. La présence d'acylation sur les carbones 2 et 3 ainsi que des groupements esters volumineux autour de l'exométhylène (C-5–C-7) ou encore les conditions analytiques en RMN, tels que la température d'acquisition et le solvant utilisé, sont autant de paramètres interférant sur la conformation et l'échange interconformationnel des esters de jatrophane (**articles 1**).⁸⁷

⁹⁰ Jeske, F.; Jakupovic, J.; Berendsohn, W. Diterpenes from *Euphorbia Seguieriana*. *Phytochemistry* **1995**, *40* (6), 1743–1750.

⁹¹ 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.

⁹² Corea, G.; Fattorusso, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. Amygdaloidins A–L, Twelve New 13 α -OH Jatrophane Diterpenes from *Euphorbia Amygdaloides* L. *Tetrahedron* **2005**, *61* (18), 4485–4494.

4. Evaluation des esters de jatrophane sur la chimiorésistance

Depuis plusieurs années, l'émergence des infections bactériennes ou fongiques liées au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a conduit à l'adaptation de ces microorganismes face aux médicaments, appelée résistance médicamenteuse ou chimiorésistance (cf. partie I, p.30-31).⁹³ Les candidoses, causées pour 50–60% par *Candida albicans*, conduisent souvent à l'émergence de chimiorésistance à la faveur de traitements médicamenteux prolongés.⁹⁴ Des études, menées dans les années 1990 à 2000, ont identifié les transporteurs CaCdr1p et CaMdr1p comme étant les protéines les plus impliquées dans l'efflux d'antifongique chez *Candida albicans*.^{95,96,97,98} En outre, des travaux ont permis de mettre en évidence l'inhibition de ces transporteurs par certains esters de jatrophane, ces molécules constituent ainsi une nouvelle classe prometteuse pour le blocage de l'efflux d'antifongiques.⁹⁹ Une collaboration avec l'équipe du Pr. Rajendra Prasad à l'Université de Jawaharlal Nehru en Inde, à travers un partenariat avec le Pr. Attilio Di Pietro de l'Institut de protéines biologiques et chimiques de l'Université de Lyon, a permis l'évaluation de 29 esters de jatrophane (et un lathyrane) sur leur capacité à bloquer les transporteurs CaCdr1p et CaMdr1p de *Candida albicans* (**article 2**).⁸⁸ Ces molécules sont classées selon leur structure en quatre classes : les 9-14-dioxojatrophanes (**A**), les 9-oxojatrophanes (**B**), les 14-oxojatrophanes (**C**) et les terracinolides (**D**) (**Figure 51**). Parmi eux, 19 composés – les euphodendroidines du groupe **C** et les terracinolides du groupe **D** – ont été isolés à partir de l'extrait MeCN du latex d'*Euphorbia dendroides* (**schéma**

⁹³ White, T. C.; Marr, K. A.; Bowden, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11* (2), 382–402.

⁹⁴ 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.

⁹⁵ Prasad, R.; Wergifosse, P. D.; Goffeau, A.; Balzi, E. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Gene of *Candida Albicans*, CDR1, Conferring Multiple Resistance to Drugs and Antifungals. *Curr. Genet.* **1995**, *27* (4), 320–329.

⁹⁶ Sanglard, D.; Ischer, F.; Monod, M.; Bille, J. Cloning of *Candida Albicans* Genes Conferring Resistance to Azole Antifungal Agents: Characterization of CDR2, a New Multidrug ABC Transporter Gene. *Microbiology* **1997**, *143* (2), 405–416.

⁹⁷ Pasrija, R.; Banerjee, D.; Prasad, R. Structure and Function Analysis of CaMdr1p, a Major Facilitator Superfamily Antifungal Efflux Transporter Protein of *Candida Albicans*: Identification of Amino Acid Residues Critical for Drug/H⁺ Transport. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6* (3), 443–453.

⁹⁸ Prasad, R.; Lata Panwar, S.; Smriti. Drug Resistance in Yeasts - an Emerging Scenario; Physiology, B.-A. in M., Ed.; Academic Press, 2002; Vol. 46, pp 155–201.

⁹⁹ Rawal, M. K.; Shokoohinia, Y.; Chianese, G.; Zolfaghari, B.; Appendino, G.; Tagliatela-Scafati, O.; Prasad, R.; Di Pietro, A. Jatrophanes from *Euphorbia Squamosa* as Potent Inhibitors of *Candida Albicans* Multidrug Transporters. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (12), 2700–2706.

[récapitulatif](#)), tandis que les dix autres sont issus d'une étude antérieure sur les parties aériennes d'*E. semiperfoliata*⁸³ (groupes **A** et **B**).

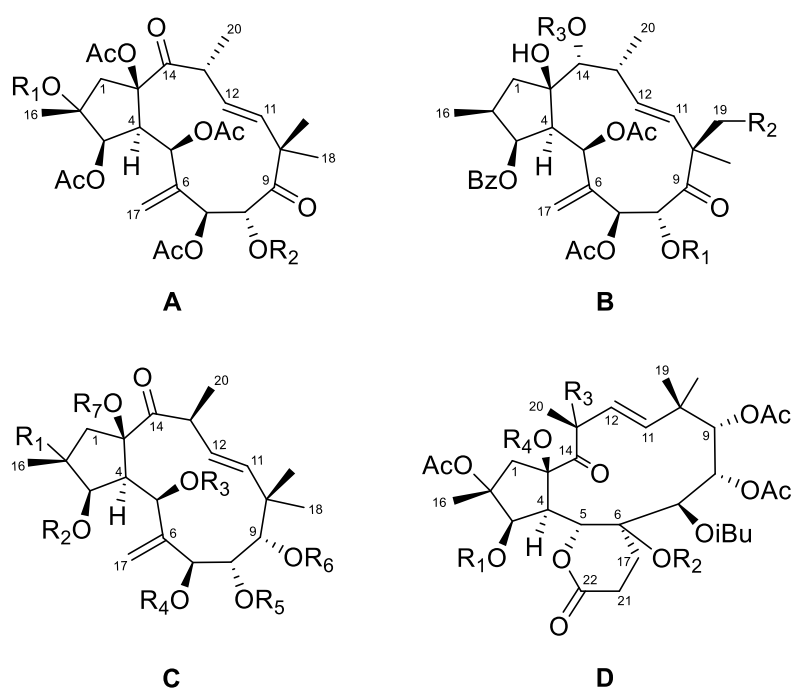


Figure 51. Les quatre types de dérivés d'esters de jatrophane : les 9-14-dioxojatrophanes (**A**), les 9-oxojatrophanes (**B**), les 14-oxojatrophanes (**C**) et les terracinolides (**D**).

Dans un premier temps, la stratégie utilisée pour mesurer l'activité s'est appuyée sur une évaluation de l'efflux du rouge Nil (NR) via les transporteurs de *Candida albicans*, Cdr1p et Mdr1p, surexprimés chez une souche de *Saccharomyces cerevisiae* dépourvue de ses propres transporteurs. Quatre esters de jatrophane ont induit un faible pourcentage d'efflux du NR ; le composé **21** (groupe **C**) a inhibé le transporteur CaCdr1p, le composé **8** (groupe **B**) a bloqué la pompe à efflux CaMdr1p tandis que les deux autres inhibiteurs **12** et **23** (groupes **D** et **C**, respectivement) ont montré une inhibition des deux transporteurs ([schéma récapitulatif](#)). Dans le but de corréler l'activité biologique à certains paramètres structuraux des composés testés, une analyse en composante principale a été effectuée par l'emploi de l'outil informatique ChemGPS-NP. Cet outil chimiométrique permet de définir des espaces chimiques biologiquement pertinents et de prédire les propriétés physico-chimiques intrinsèques

utiles.^{100,101,102} Nous obtenons ainsi une représentation 3D de la répartition des esters de jatrophane en fonction de trois axes : (i) la composante principale liant la taille et la forme, (ii) la conjugaison et l'aromaticité et (iii) l'hydrophobicité, la polarité et la capacité à former des liaisons hydrogènes. L'analyse des relations structure-activité via cette représentation a révélé que l'activité inhibitrice de ces quatre composés ne pouvait être expliquée par les caractéristiques chimiques utilisées dans le modèle. Il semble que seule la nature et/ou la position spatiale des groupements esters soient à l'origine de la modulation de l'inhibition des pompes à efflux. En effet, comme indiqué dans la partie précédente, ces facteurs influencent fortement la conformation des esters de jatrophane, jouant un rôle important dans l'interaction avec la cible.

Dans un second temps, l'évaluation des propriétés inhibitrices des récepteurs impliqués dans la résistance médicamenteuse a consisté en la mesure de la cytotoxicité des quatre composés actifs (**8**, **12**, **21** et **23**) ainsi que leur potentiel effet synergique avec l'antifongique de référence, le fluconazole, sur une souche résistante de *C. albicans*. Aucun de ces constituants n'a présenté de cytotoxicité ou de capacité à sensibiliser la souche résistante. Nous pouvons en conclure qu'ils n'exercent pas d'effet synergique avec l'antifongique et qu'ils ne sont pas transportés par CaCdr1p et CaMdr1p (**article 2**).⁸⁸

5. Evaluation anti-CHIKV des esters de jatrophane

Dans la présente étude, l'évaluation sur la réplication du CHIKV des extraits, obtenus à partir du latex d'*E. dendroides*, des fractions correspondantes et des molécules pures, a été réalisée dans l'équipe du Dr. Pieter Leyssen, responsable du laboratoire de virologie de l'Université de Leuven en Belgique (**Figure 52**). L'extrait MeCN est celui qui a montré la plus forte activité antivirale [EC_{50} CHIKV = 0,11 μ g/ml (SI = 68)]. Le pouvoir inhibiteur de la réplication du CHIKV des dix-huit fractions (F1–F18), issues de cet extrait actif, a également

¹⁰⁰ Larsson, J.; Gottfries, J.; Muresan, S.; Backlund, A. ChemGPS-NP: Tuned for Navigation in Biologically Relevant Chemical Space. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (5), 789–794.

¹⁰¹ Rosén, J.; Lövgren, A.; Kogej, T.; Muresan, S.; Gottfries, J.; Backlund, A. ChemGPS-NPWeb: Chemical Space Navigation Online. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2008**, *23* (4), 253–259.

¹⁰² Rosen, J.; Gottfries, J.; Muresan, S.; Backlund, A.; Oprea, T. I. Novel Chemical Space Exploration via Natural Products. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (7), 1953–1962.

été évalué. Trois fractions (F11–F13) ont exhibé des propriétés antivirales particulièrement intéressantes ($EC_{50} < 0,7 \mu\text{g/ml}$ et SI entre 16–140).

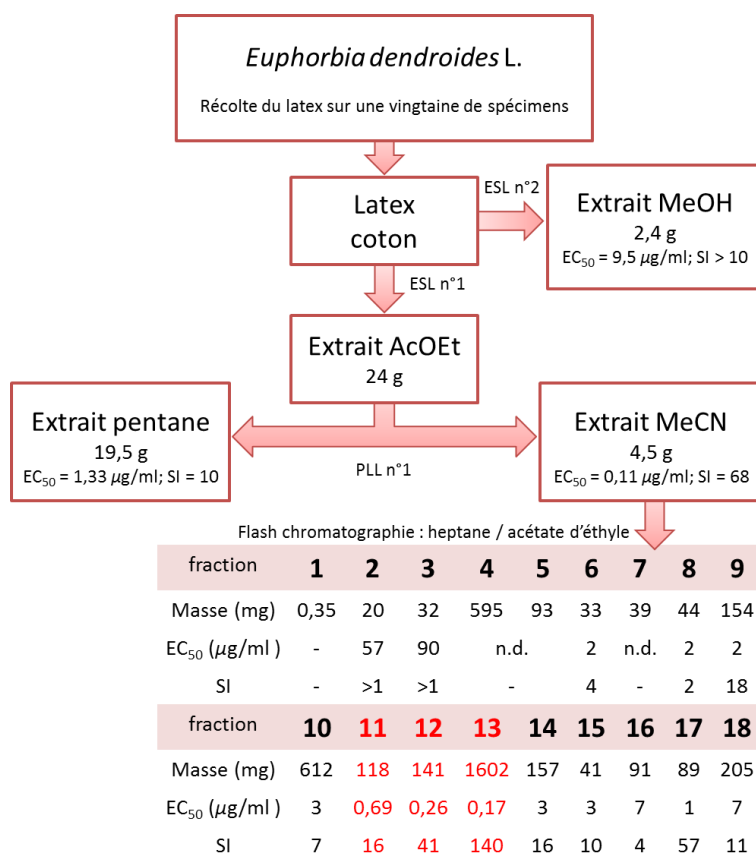


Figure 52. Schéma de fractionnement du latex d'*E. dendroides* et activités anti-CHIKV des extraits et des fractions correspondantes.

L'évaluation des propriétés antivirales des quinze esters de jatrophone, isolés des fractions F9–F14, a permis de mettre en évidence une activité antivirale pour l'ester de jatrophone (7) et le terracinolide J, liée toutefois à un effet anti-métabolique du fait d'un SI inférieur à 5 (schéma récapitulatif). Les autres esters de jatrophone n'ont pas montré d'activité significative avec des EC_{50} supérieur à 25. Suite à ces observations, aucune relation structure-activité n'a pu être précisée.

L'ensemble de ces résultats, décrits dans l'article 1,⁸⁷ suppose que la forte activité anti-CHIKV mise en évidence pour le latex d'*E. dendroides* n'est pas due à la présence des esters de jatrophone – métabolites majoritaires de l'extrait – mais probablement à des constituants minoritaires possédant une puissante activité inhibitrice de la réplication virale du CHIKV. Il

nous est donc apparu nécessaire de procéder à la purification et à l'élucidation structurale de ces principes actifs.

6. Prédiction de bioactivité : identification des esters de déoxyphorbol

Le fractionnement bio-guidé de l'extrait MeCN du latex d'*E. dendroides* n'a pas permis d'isoler les composés les plus actifs sur la réplication du CHIKV. En effet, tel que décrit précédemment, aucun des esters de jatrothane évalués n'a montré d'activité significative à la hauteur de celle des fractions dans lesquels ils ont été isolés. Ainsi, l'hypothèse de la présence de diterpènes doués d'une forte activité anti-CHIKV et structuralement différents des composés préalablement isolés a été proposée. Afin de cibler plus efficacement ces métabolites, nous avons fait appel à l'utilisation de nouveaux outils et plus particulièrement aux réseaux moléculaires (cf. partie I, p.55-66). Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Louis-Félix Nothias, chercheur post-doctoral dans l'équipe du Pr. Pieter Dorrestein à l'Université de San Diego en Californie (USA). L'intégration des résultats biologiques (activité anti-CHIKV) des fractions dans les réseaux moléculaires a été réalisée par une approche novatrice permettant de détecter et d'annoter les groupes d'ions probablement associés à l'activité biologique dans le cadre d'un fractionnement bioguidé. Un score d'activité biologique est établi en corrélant l'intensité de chaque ion et l'index de sélectivité de chaque fraction. Les ions ayant une corrélation positive significative ($r^2 > 0,85$ et $p\text{-value} < 0,03$) sont représentés par un nœud de grande taille dans le réseau. Cette approche a requis le développement de plusieurs scripts bioinformatiques librement accessibles. Cette approche, décrite dans l'**article 3** (soumis dans *Journal of Natural Products*), a permis de mettre en évidence les composés responsables de l'activité anti-CHIKV par la taille et l'intensité de la couleur rouge de la perle.

La vingtaine d'esters de jatrothane isolée précédemment a permis d'annoter le réseau moléculaire généré à partir des analyses LC-MSⁿ des 18 fractions (**Figure 53**). Dans le premier réseau, quatre groupes de composés ont pu être annotés : les jatrophanes tétra- et pentaestérifiés, les jatrophanes hexaestérifiés, les terracinolides et enfin les jatrophanes dinicotinoylés. Sachant que ces composés n'ont pas montré d'activité anti-CHIKV significative, nous nous sommes intéressés à un second réseau ayant une forte proportion de candidats bioactifs. L'étude détaillée de ce réseau a permis de détecter trois ions ayant un bon score de bioactivité et dont les spectres MS/MS pourraient correspondre à des esters de déoxyphorbol, présents majoritairement dans

la sous-fraction 13 (sub-F13, 486 mg). L'investigation ciblée de cette fraction a conduit à l'isolement et l'élucidation structurale de quatre nouveaux constituants de type 4 β -déoxyphorbol (4-dPE) (Figure 53). Par ailleurs, ces quatre 4-dPE (**20–23**) présentent de fortes propriétés inhibitrices de la réplication du CHIKV, notamment deux molécules (**21** et **22**) montrent une activité de l'ordre du sub-micromolaire ($0,4 \pm 0.02 \mu\text{M}$ et $0,6 \pm 0.6 \mu\text{M}$, respectivement) avec un fort indice de sélectivité (SI = 34 et 41, respectivement), alors que les deux autres (**20** et **23**) ont un effet cytotoxique marqué (SI = 6 et 4, respectivement) (Figure 53). Cette différence d'activité entre ces esters de déoxyphorbol peut être attribuée au nombre et la nature des doubles liaisons ainsi qu'à la longueur de la chaîne carbonée du groupement ester en position C-12. Ces résultats nous permettent de conclure que l'activité antivirale de l'extrait de latex d'*E. dendroides* est liée à la présence des esters de 4 β -déoxyphorbol, mais aussi d'introduire un nouveau concept basé sur les réseaux moléculaires pour la réalisation de fractionnement bioguidé.

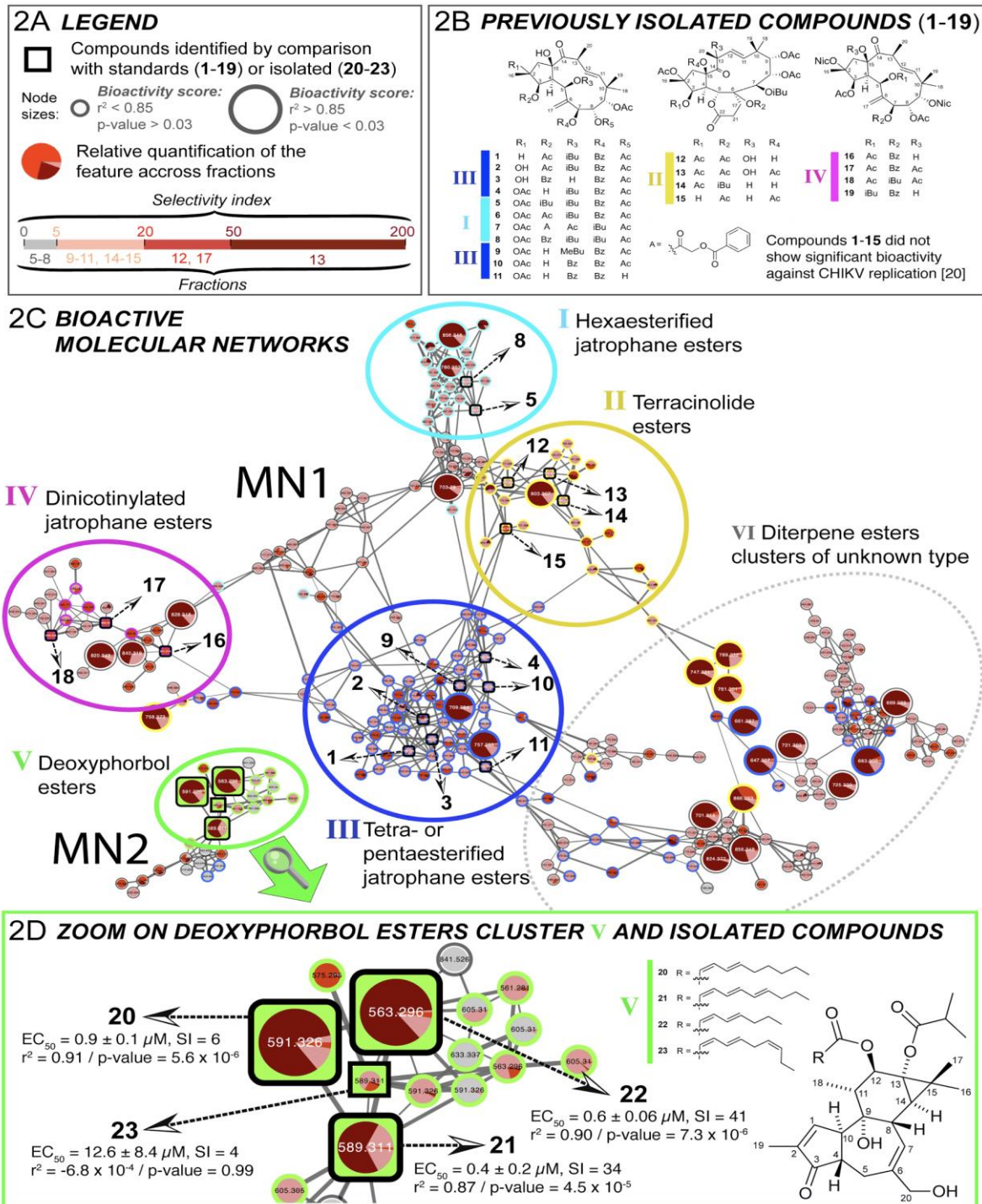


Figure 53. Figure du réseau moléculaire du latex d'*Euphorbia dendroides* présenté dans l'article 3.

7. Modifications chimiques des esters de diterpène

L'isolement de 804 mg d'euphodendroïdine F et de 121 mg d'euphodendroïdine E, à partir de l'extrait MeCN du latex d'*E. dendroides*, nous a permis d'envisager des modifications chimiques sur ces deux esters diterpéniques. L'objectif principal était de créer des dérivés originaux, susceptibles d'activer plus efficacement la modulation de la P-gp. Dans la grande majorité des études scientifiques qui traitent de l'hémisynthèse d'esters de jatrophone, les modifications de la configuration des carbones asymétriques, de la nature et/ou la position des esters sont régulièrement envisagées. Elles ont pour but d'étudier les relations structure-activité en lien à leur interaction avec la P-gp (cf. partie I, p.32-35). Afin d'induire des réarrangements intéressants et d'explorer la réactivité de ces euphodendroïdines, nous nous sommes attardés sur quelques réactions de type époxydation, amination réductrice, la réaction de Tsuji-Trost ainsi que des réactions impliquant des acides de Lewis.

Les résultats, présentés dans la **partie F** des résultats (cf. partie II, p.143-155), nous permettent de déduire que la réactivité des esters de jatrophone semble différer selon l'acide de Lewis utilisé. Les réactions (i) de Tsuji-Trost avec Et_3SiH et (ii) avec l'acide de Lewis BF_3 , ont permis d'obtenir six dérivés originaux (**1–6**, [Figure 54](#)), dont le composé **4** avait déjà été isolé à partir de cette plante.¹⁰³ Les euphodendroïdines E et F ainsi que leurs dérivés synthétiques n'ont pas montré d'activité inhibitrice de la P-gp ($\text{EC}_{50} > 100$).

¹⁰³ Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatela-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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11* (23), 5221–5227.

Analyse transversale

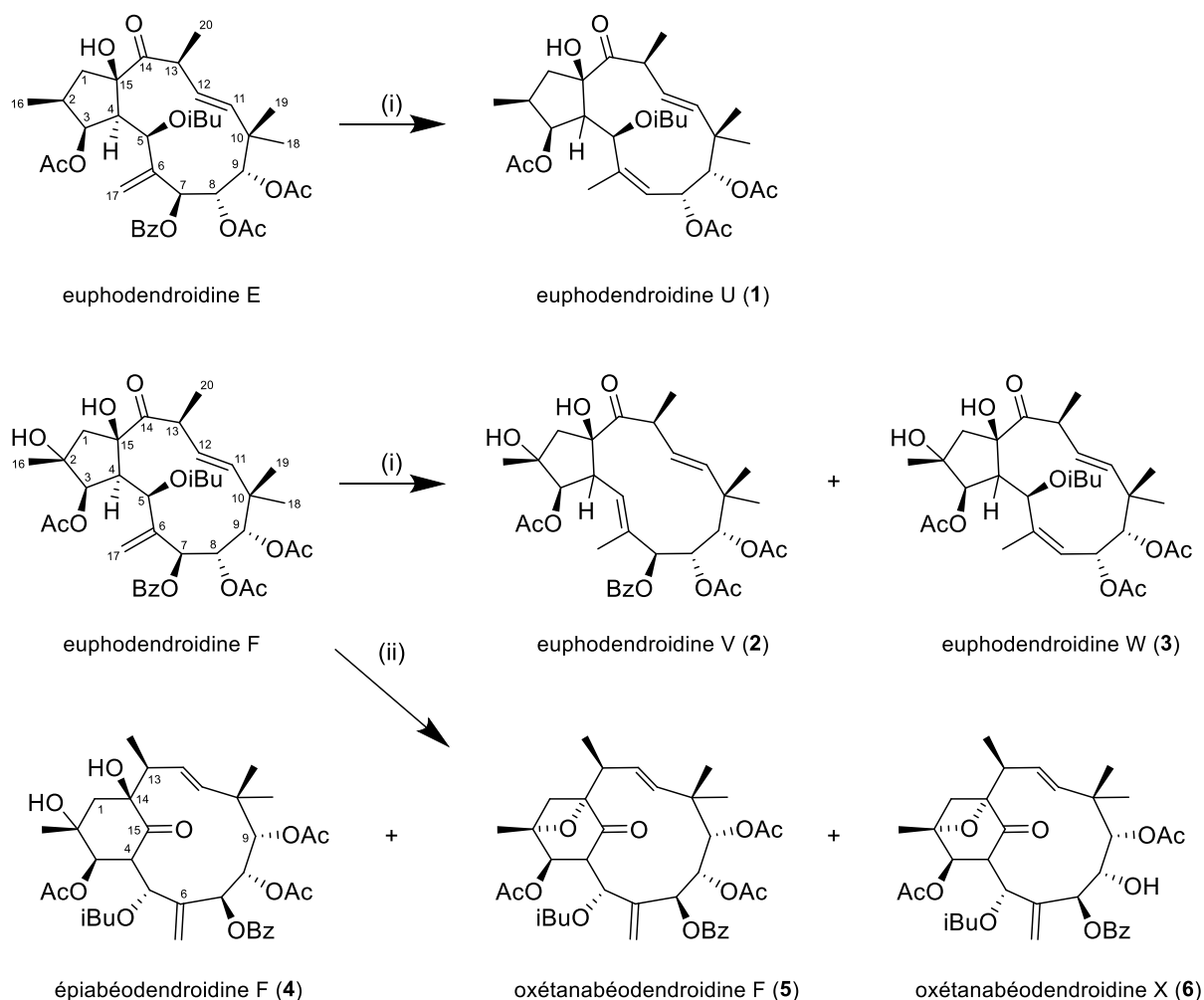


Figure 54. Réactifs, produits et conditions de la réaction : (i) $\text{Pd}(\text{P}(t\text{-Bu})_3)_2$, NMO, Et_3SiH , THF, 70 °C, 20 h ; (ii) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , température ambiante, 1 h.

En perspective à ce travail, un projet consistant à modifier les structures des constituants présents dans l'extrait du latex d'*E. dendroides* a été entrepris. Il vise à explorer la réactivité des squelettes jatropane, 17-bishomojatropane (terracinolide) et tigliane (4-dPE) préalablement identifiés chez cette plante. Cette étude vise à créer de la diversité structurale au sein de la famille des esters de diterpène afin d'enrichir les chimiothèques et ainsi de proposer de nouveaux dérivés plus actifs vis-à-vis de cibles biologiques. Cette étude a été menée en effectuant des transformations de l'extrait de latex d'*E. dendroides* avec une douzaine d'acide de Lewis (AlMe_3 ; Et_2ClAl ; $\text{Al}(\text{OiPr})_3$; $\text{Yb}(\text{OTf})_3$; LiBF_4 ; ZnCl_2 ; Montmorillonite K 10 ; TiCl_4 ; SnCl_4 ; $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$; FeCl_3 ; AlCl_3), cinq acides (HCl 37% ; HCOOH 98% ; AcOH 99% ; TFA 99% ; H_2SO_4 96%), trois bases (K_2CO_3 ; *t*-BuOK ; KOH) et la réaction de Tsuji-Trost avec le triéthylsilane. La caractérisation de la composition chimique des extraits modifiés se

fera par le recours aux réseaux moléculaires en vue d'identifier les dérivés formés et de mettre en évidence une sélectivité préférentielle des réactifs sur un type de squelette diterpénique. De plus, les dérivés synthétisés dans la présente étude (1–6, Figure 54) seront utilisés pour annoter les réseaux moléculaires issus des extraits obtenus après réaction de Tsuji-Trost et avec l'acide de Lewis BF_3 . Ainsi, nous pourrions valider notre approche analytique par LC-MS/MS associée aux MN pour l'interprétation des résultats relatifs aux modifications chimiques de l'extrait (travaux en cours au moment où nous terminons la rédaction du manuscrit de thèse).

Pour illustrer cette piste de recherche, des réseaux moléculaires sont présentés à la figure 55 ; ils ont été générés à partir de l'extrait brut du latex d'*E. dendroides* et de trois extraits modifiés (un en milieu basique, un en milieu acide et un avec un acide de Lewis). L'extrait modifié avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) a montré une diminution par un facteur 10 de la diversité chimique par rapport à l'extrait brut (10 et 111 nœuds, respectivement). Cette observation suppose la présence d'une dizaine de squelettes diterpéniques différents. L'acide formique (HCOOH) n'a pas permis d'obtenir de nouveaux dérivés par rapport à l'extrait de départ. En revanche, la réaction de l'extrait avec l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ a permis l'observation de 45 nouveaux nœuds sur le réseau, soit la formation de constituants potentiellement originaux.

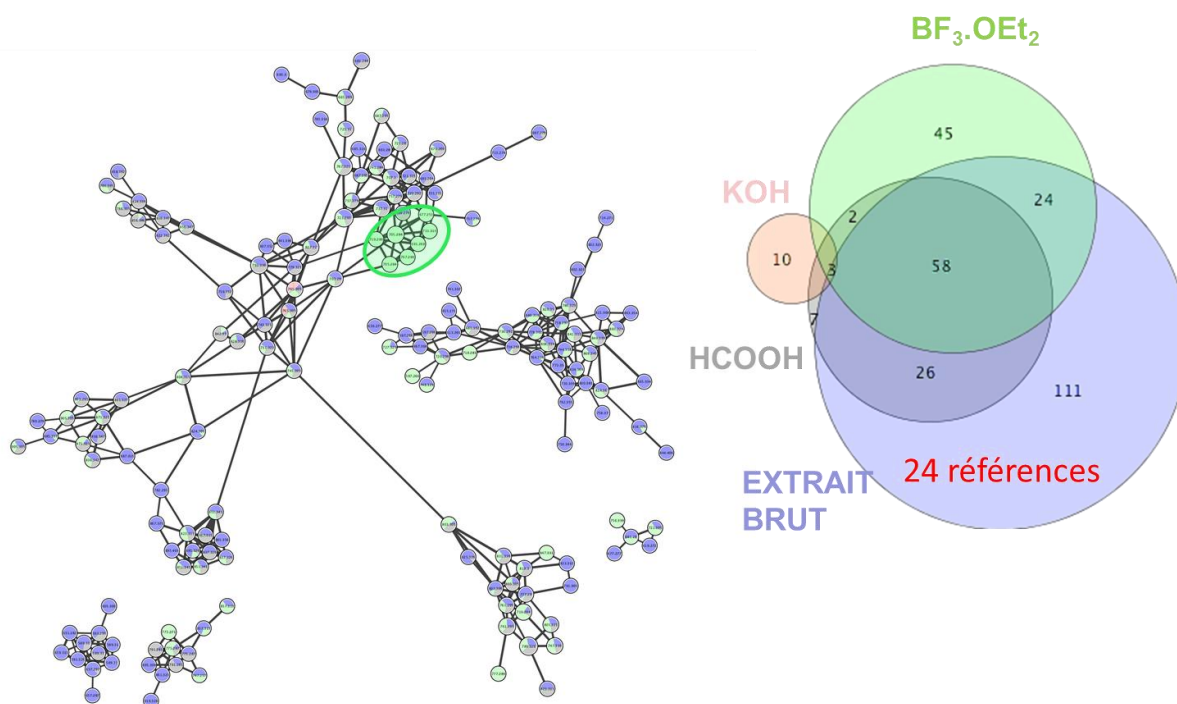


Figure 55. Réseaux moléculaires permettant de visualiser la réactivité des composés diterpénique en mélange d'*E. dendroides* (à gauche) et son diagramme de Venn (à droite).

Analyse transversale

Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'interprétation des réseaux moléculaires obtenus à partir des analyses de l'extrait modifié par l'acide de Lewis BF_3 (Figure 56). Dans un premier temps, les composés préalablement isolés (jatrophanes, terracinolides et déoxyphorbols) de la plante ont été utilisés comme références pour annoter les différents réseaux. Dans un second temps, l'interprétation des spectres MS/MS correspondants aux nœuds observés spécifiquement pour l'extrait modifié a permis d'observer la déshydratation de l'euphodendroïdine F (ion à m/z 723,295) amenant à la formation de l'ion à m/z 705,284 (zoom rouge, Figure 56). Ce dernier correspond à l'oxétanabéodendroïdine F (5), obtenue à partir de la réaction de cet acide de Lewis sur l'euphodendroïdine F. Ce nouveau composé correspond bien à un dérivé réarrangé et déshydraté de l'euphodendroïdine F.

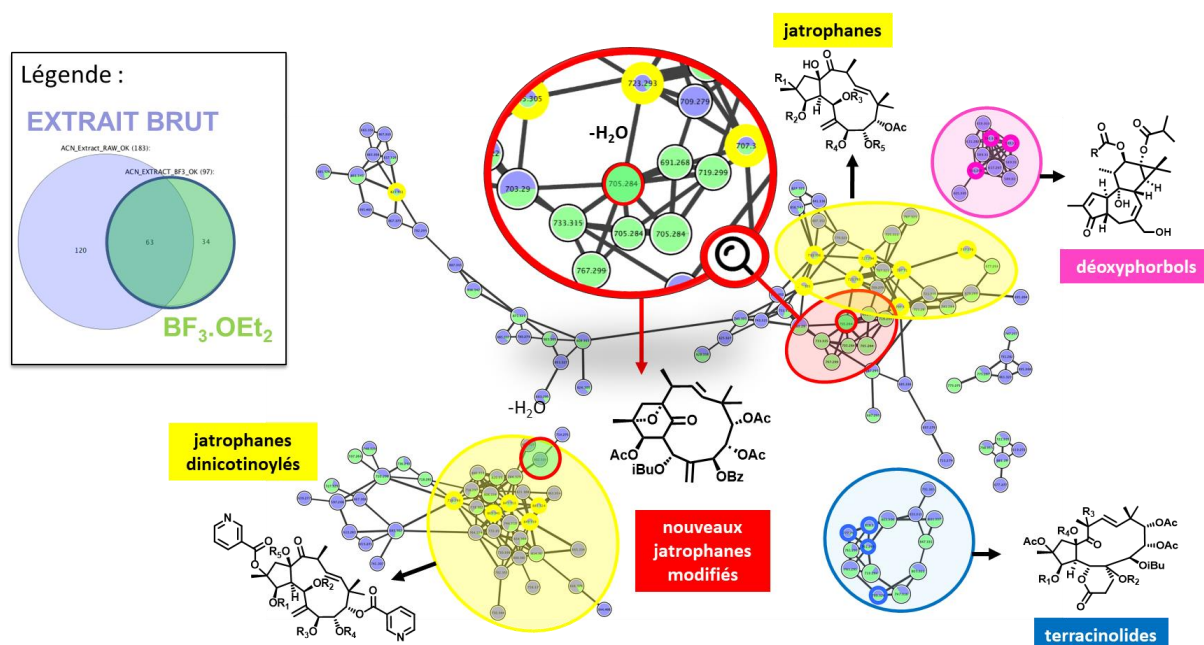


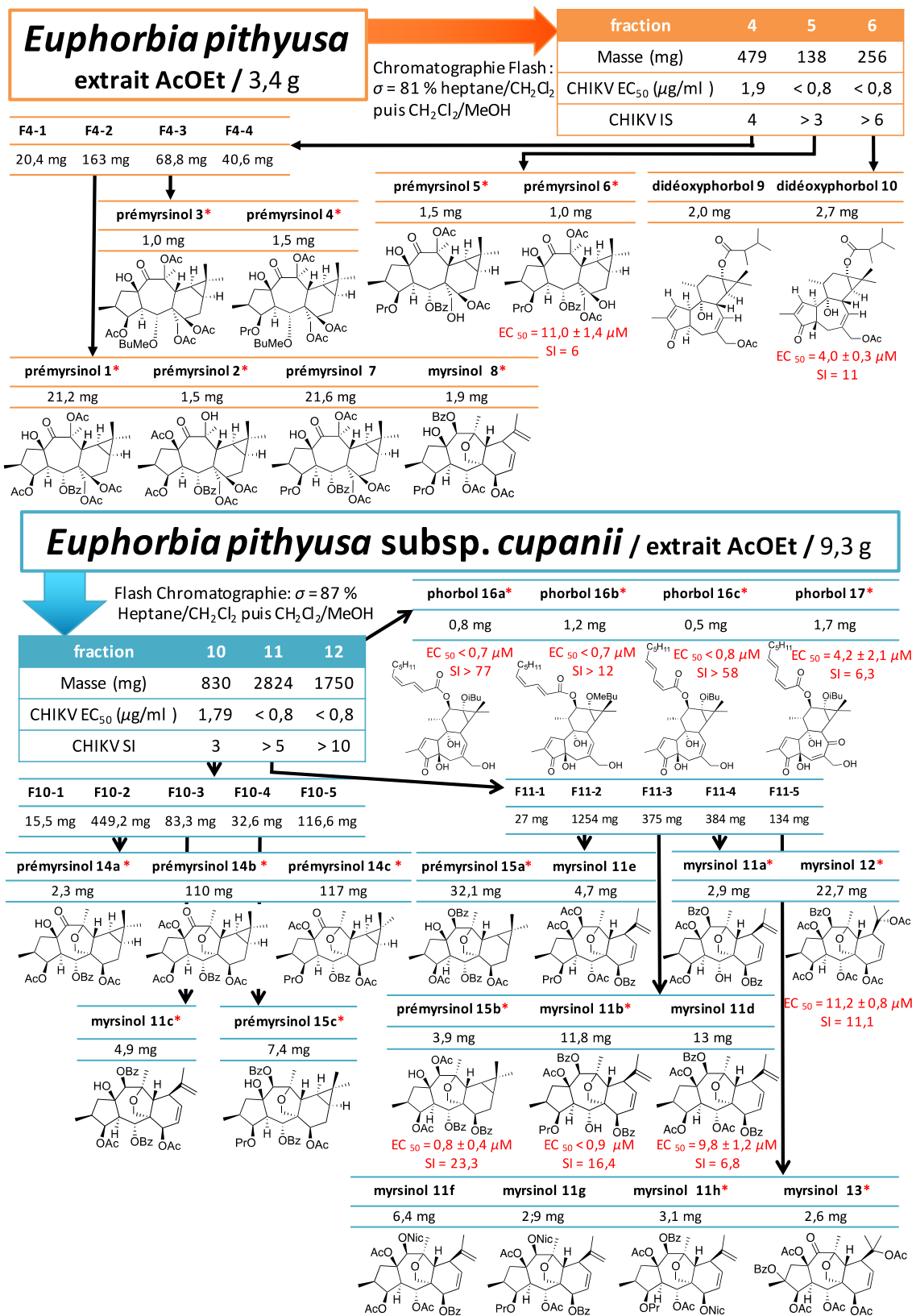
Figure 56. Réseaux moléculaires obtenus à partir de l'extrait brut d'*E. dendroides* (en violet) et de l'extrait modifié par l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, (en vert) ; observation des différents types de squelettes diterpéniques : références de type jatrophane (en jaune), terracinolide (en bleu), déoxyphorbol (en rose) et des nouveaux jatrophane modifiés (en rouge).

B. ÉTUDE DE DEUX SOUS-ESPÈCES : *EUPHORBIA PITHYUSA* ET *EUPHORBIA PITHYUSA* SUBSP. *CUPANII*

Lors d'une précédente étude dédiée à l'évaluation d'*Euphorbia* de Corse sur l'inhibition du virus du chikungunya, *Euphorbia pithyusa*, une plante endémique sténo-méditerranéenne (cf. partie I, p.13-14), a montré une forte activité antivirale avec une EC₅₀ CHIKV < 0,8 µg/ml et un SI > 15.⁸¹ Cette espèce n'avait jamais été investiguée chimiquement auparavant, tandis que celle de la sous-espèce *E. pithyusa* subsp. *cupanii* a fait l'objet d'investigation phytochimique à partir d'échantillons récoltés en Sardaigne (cf. partie I, p.15-17). Des chercheurs italiens ont isolé des composés diterpéniques à squelette lathyrane, prémyrsinane et tigliane.¹⁰⁴ Au cours de nos travaux, nous nous sommes donc intéressés à la présence potentielle de ces diterpènes chez *E. pithyusa* de Corse, afin d'évaluer leur capacité d'inhibition de la réplication virale du CHIKV. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'avait été entreprise sur l'activité anti-CHIKV des diterpènes de type lathyrane et prémyrsinane, tandis qu'elle était, *a priori*, avérée chez les tiglianes (cf. partie I, p.44-46). Par ailleurs, une approche chimiotaxonomique basée sur l'utilisation des réseaux moléculaires (cf. partie I, p.55-66) a été développée en vue de comparer la composition en esters de diterpène des deux taxa présents en Corse, à savoir *E. pithyusa* et *E. pithyusa* subsp. *cupanii*. L'étude des voies de fragmentation des esters de prémyrsinol et de myrsinol isolés a permis l'annotation des constellations du réseau moléculaire et la recherche d'analogues originaux chez *E. pithyusa* subsp. *cupanii*.

¹⁰⁴ Appendino, G.; Belloro, E.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Ballero, M. Diterpenoids from *Euphorbia Pithyusa* Subsp. *Cupanii*. *Journal of Natural Products* **1999**, 62 (10), 1399–1404.

1. Schéma récapitulatif



2. Identification des diterpènes de type prémyrsinane, myrsinane et tigliane.

Les parties aériennes d'*E. pithyusa* et d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* ont été récoltées en Corse à Macinaggio (commune de Rogliano) et à Morosaglia, respectivement. Après séchage et broyage des échantillons, une extraction solide-liquide AcOEt/MeOH (80/20) (ESL n°1) a été réalisée par macération pour *E. pithyusa* (Figure 57) et au Zippertex¹⁰⁵ pour *E. pithyusa* subsp. *cupanii* (Figure 58).



Figure 57. Extraction Solide-Liquide par macération.



Figure 58. Extraction Solide-Liquide au Zippertex.

Les extraits de chacun des taxa ont été fractionnés par des partitions liquide-liquide successives (PLL n°1 et n°2, Figure 59), conduisant à l'obtention d'extraits aqueux, acétate d'éthyle, heptane et acétonitrile. Les extraits MeCN de chacune des espèces ont été traités avec du diacétate de plomb, afin d'entraîner la précipitation des chlorophylles (Figure 60) et ainsi obtenir des extraits AcOEt enrichis en esters diterpéniques. Le fractionnement de ces derniers par chromatographie flash a permis d'obtenir onze et quatorze fractions à partir de l'extrait d'*E. pithyusa* et de celui d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii*, respectivement. Les étapes suivantes par chromatographie flash, chromatographie liquide semi-préparative ou préparative des fractions obtenues à partir des extraits de ces deux plantes ont amené à l'isolement de trente diterpènes : dix composés chez *E. pithyusa* et vingt constituants chez *E. pithyusa* subsp. *cupanii*.

¹⁰⁵ Technologie Dionex utilisant l'extraction au solvant accéléré (www.zippertex.com).

Analyse transversale

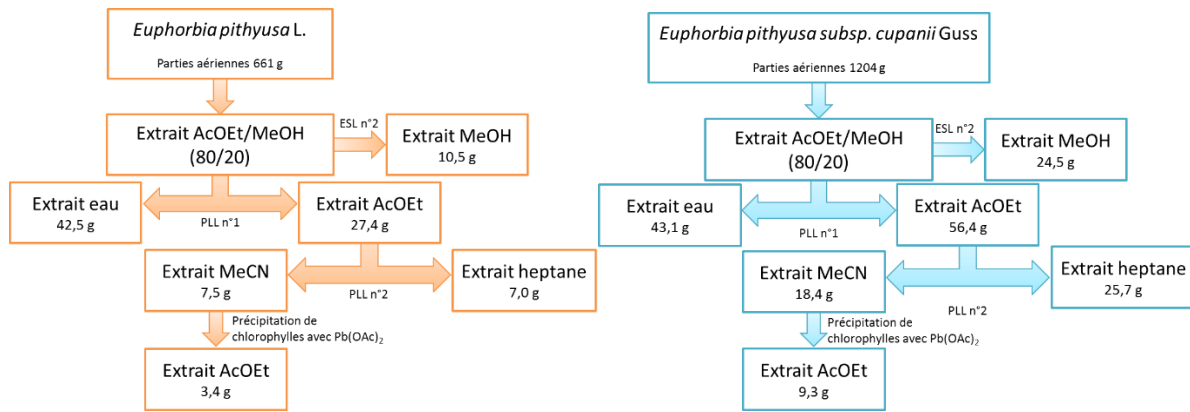


Figure 59. Schémas de fractionnement d'*E. pithyusa* (à gauche) et d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* (à droite).

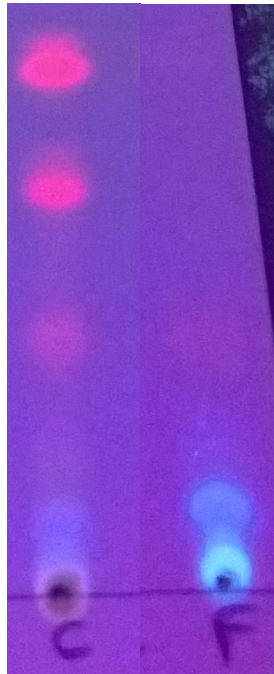


Figure 60. CCM sous UV : C = extrait MeCN avec chlorophylles (tâches rouges) ; F = extrait AcOEt après étapes de précipitation des chlorophylles.

Les élucidations structurales de ces 30 esters de diterpène ont été détaillées dans l'**article 4¹⁰⁶** et le **manuscrit 5**. A partir des résultats des analyses par RMN du proton et MS, quatre myrsinols (**11d–g**), un prémyrsinol (**7**) et deux didéoxyphorbols (**9** et **10**) ont été identifiés par comparaison avec les données de la littérature (**schéma récapitulatif**). Les 23 autres molécules sont des nouveaux composés ; ainsi, la détermination de leur structure a nécessité l'utilisation conjointe de la RMN 1D et 2D, de la HRMS et de la diffraction des rayons-X réalisée sur six constituants obtenus sous forme cristalline (**1**, **11d**, **11f**, **11h**, **12** et **15b** ; **schéma récapitulatif**). Douze d'entre elles ont été caractérisées comme étant des esters de prémyrsinol, appartenant plus particulièrement à trois classes de dérivés (**Figure 61**) : les 14-oxoprémyrsinols (**A** ; **1–7**), les 13,17-oxy-14-oxoprémyrsinols (**B** ; **14a–c**) et les 13,17-oxyprémyrsinols (**C** ; **15a–c**).

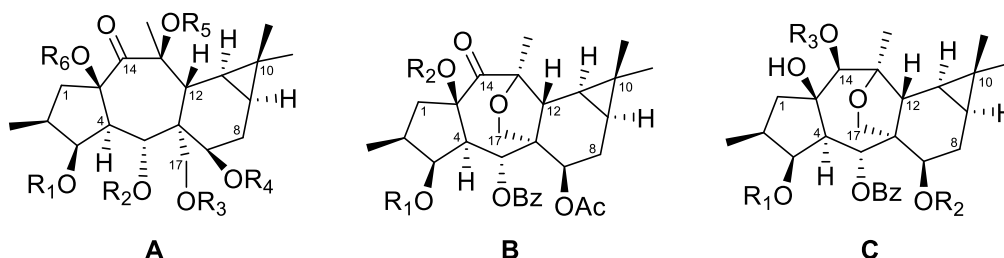


Figure 61. Trois classes (**A**, **B** et **C**) de dérivés de diterpènes à squelette prémyrsinane.

Six esters de myrsinol de type 13,17-oxymyrsinol (**D** ; **8**, **11a–c**, **11h** et **12**) et un de type 13,17-oxy-14-oxomyrsinol (**E** ; **13**) ont également été identifiés (**Figure 62**) ; dont deux d'entre eux (**12** et **13**) présentent la particularité d'avoir un groupement acétyle en C-10 (**schéma récapitulatif**). Les groupes esters rencontrés chez ces diterpènes sont des acétate, propionate, benzoate et nicotinate. Ces substituants – compris entre quatre et six selon les composés – sont préférentiellement positionnés en C-3, C-5, C-7 et C-15, mais aussi en C-14 et C-17, et plus rarement en C-2 et C-10.

¹⁰⁶ Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Retailleau, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Touboul, D.; Litaudon, M.; Paolini, J. Isolation of Premyrsinane, Myrsinane, and Tigliane Diterpenoids from *Euphorbia Pithyusa* Using a Chikungunya Virus Cell-Based Assay and Analogue Annotation by Molecular Networking. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (7), 2051–2059.

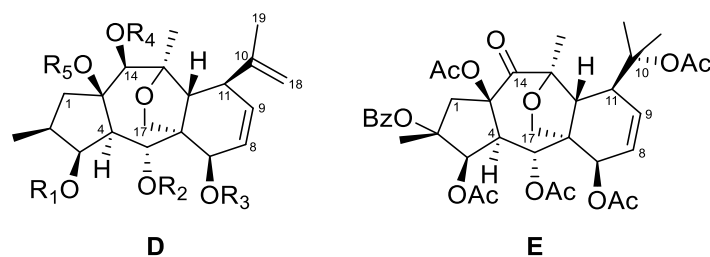


Figure 62. Deux classes (**D** et **E**) de dérivés de diterpènes à squelette myrsinane.

Enfin, quatre esters de 4 β -phorbol (**F** ; **16a–c** et **17**) ont été identifiés comme étant de nouvelles molécules (**Figure 63**). Ces constituants ont la particularité de posséder en C-12 une longue chaîne d'acide gras 2,4-diinsaturée, tandis qu'un groupement isobutyrate ou 2-méthylbutyrate peut être trouvé en C-13. L'un d'entre eux, le composé **17** (**G**) se singularise par la présence d'une fonction cétone α,β -insaturée en C-7 (**Figure 63**). Des dérivés oxydés de ce type ont déjà été décrits dans les extraits végétaux ; toutefois, ils ne semblent pas présents à l'état naturel chez les plantes mais ils seraient plutôt induits par une auto-oxydation liée aux conditions d'extraction.^{107,108}

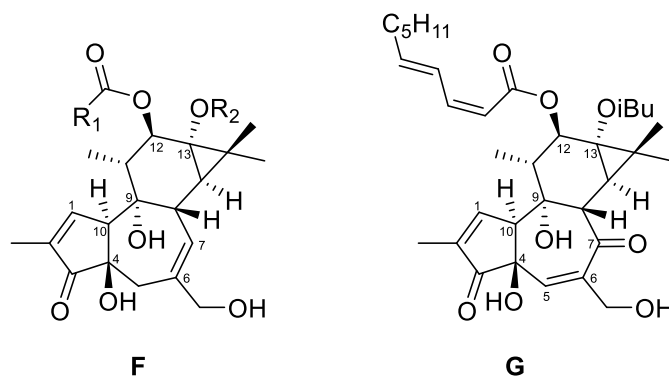


Figure 63. Les esters de phorbol (**F**) et le dérivé auto-oxydé (**G**).

Avec l'objectif de cristalliser ces composés, chaque produit purifié a été solubilisé dans un volume minimum d'éther diéthylique et placé à l'abri de la lumière dans une cuve saturée en hexane. Les cristaux de six composés (**1**, **11d**, **11f**, **11h**, **12** et **15b** ; [schéma récapitulatif](#)) ont ainsi été obtenus et analysés par diffraction des rayons X, ceci pour confirmer les élucidations

¹⁰⁷ Schmidt, R.; Hecker, E. Autoxidation of Phorbol Esters under Normal Storage Conditions. *Cancer research* **1975**, *35* (5), 1375–1377.

¹⁰⁸ 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.

structurales précédentes et déterminer les configurations absolues. Par extrapolation des données cristallographiques obtenues et grâce à l'étude des corrélations ROE, les configurations absolues de l'ensemble des esters de prémyrsinol et myrsinol isolés ont pu être proposées (**article 4**¹⁰⁶ et **manuscrit 5**).

3. Évaluation anti-CHIKV des prémyrsinanes, myrsinanes et tiglianes

Les extraits obtenus à partir d'*E. pithyusa* et d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii*, les fractions correspondantes et les composés purifiés, ont été évalués sur la réplication du CHIKV par l'équipe du Dr. Pieter Leyssen. Pour chaque plante, les extraits AcOEt enrichis en esters diterpéniques sont ceux qui exhibent la plus forte activité antivirale [EC_{50} CHIKV < 0,6 μ g/ml (SI > 12)]. Le pouvoir anti-CHIKV des fractions issues de ces extraits actifs a également été évalué (**Figure 64** et **65**). Deux fractions issues d'*E. pithyusa* (F5 et F6) et deux autres d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* (F11 et F12) ont montré de puissantes propriétés antivirales avec des EC_{50} < 0,6 μ g/ml et des SI compris entre 6 et 129. Les purifications bio-guidées et structure-guidées ont permis d'isoler 10 composés chez *E. pithyusa* (**article 4**¹⁰⁶) et 20 chez *E. pithyusa* subsp. *cupanii* (**manuscrit 5**), respectivement.

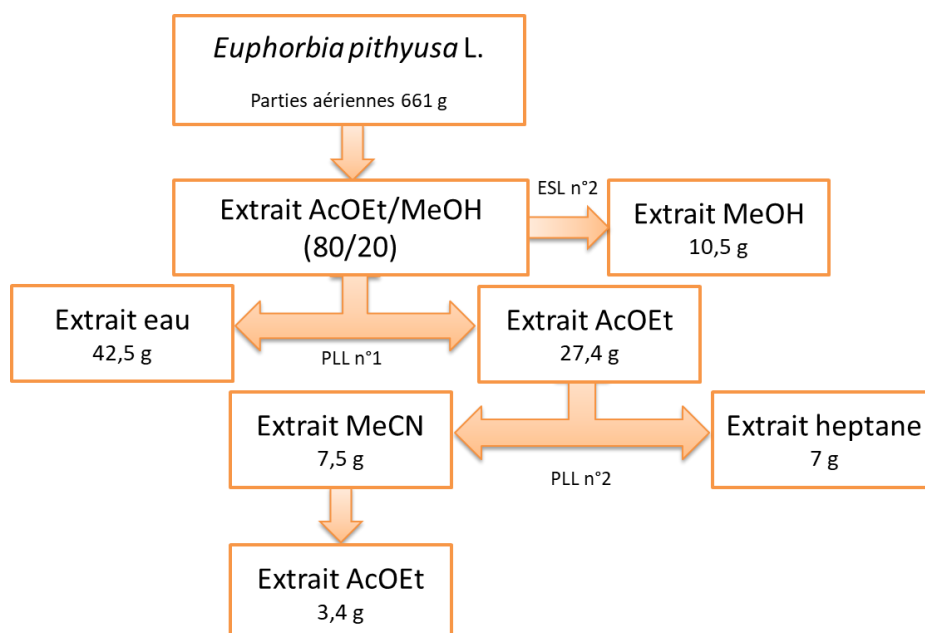


Figure 64. Schéma de fractionnement d'*E. pithyusa* et activité anti-CHIKV.

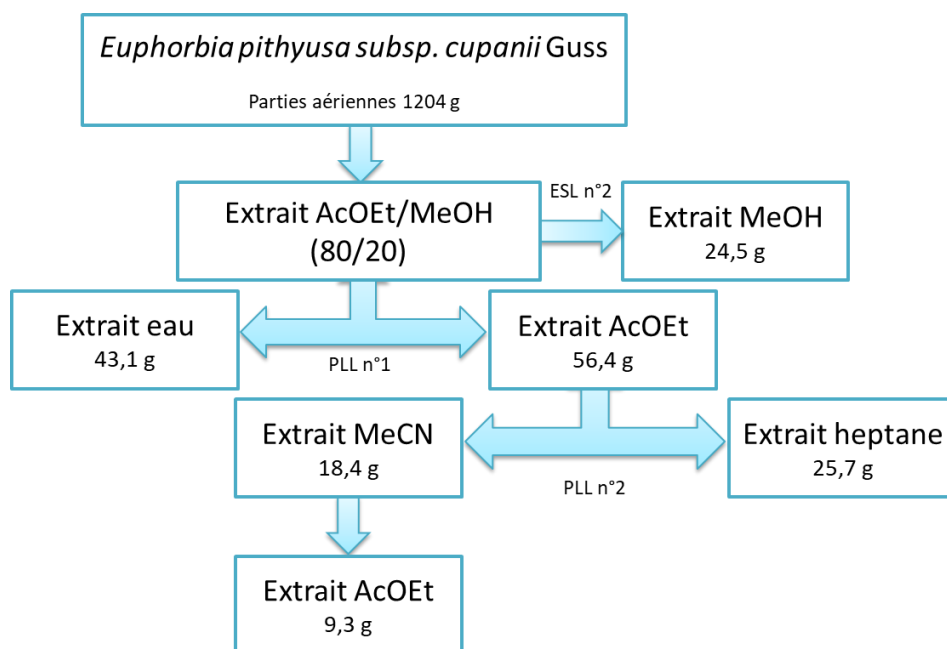


Figure 65. Schéma de fractionnement d'*E. pithyusa subsp. cupanii* et activité anti-CHIKV.

Aucune étude de la bibliographie ne permettait de présager de l'activité antivirale des esters de prémyrsinol et de myrsinol, tandis que le pouvoir anti-CHIKV de nombreux tiglianes a déjà été rapporté. Les relations structure-activité anti-CHIKV de l'ensemble des diterpénoïdes isolés sont détaillées ci-dessous en fonction du type de dérivés identifiés et les valeurs sont présentées dans le [schéma récapitulatif](#) pour les esters de diterpène les plus actifs.

Pour les esters de prémyrsinol de type 14-oxoprémyrsinol (**A** ; **1–7** ; [Figure 61](#)) six molécules n'ont pas montré d'activité anti-CHIKV avec des EC_{50} élevées (> 15), tandis qu'un composé (**6**) se démarque par une activité modérée. Nous pouvons noter que les six constituants inactifs présentent cinq groupements esters alors que le seul composé actif n'en possède que quatre, ce qui pourrait être un facteur influençant l'inhibition de la réplication virale. Les trois composés de type 13,17-oxy-14-oxoprémyrsinol (**B** ; **14a–c** ; [Figure 61](#)) n'exhibent pas de propriétés anti-CHIKV avec des $EC_{50} > 100$. Concernant les trois dérivés de type 13,17-oxyprémyrsinol (**C** ; **15a–c** ; [Figure 61](#)), un seul composé (**15b**) est fortement inhibiteur du CHIKV avec une $EC_{50} = 0,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ et un $SI = 23,3$. D'un point de vue structural, ce dernier se différencie des deux autres constituants par la présence en C-14 d'un groupement ester volumineux, soit un benzoate à la place d'un acétate.

Chez les esters de myrsinol de type 13,17-oxymyrsinol (**D** ; **8, 11a–h** et **12** ; [Figure 62](#)) sept des dix dérivés ont induit un effet anti-métabolique avec des $SI < 5$ provoquant la mort

cellulaire, tandis que trois autres (**11b**, **11d** et **12**) ont présenté une activité anti-CHIKV. Parmi ces trois diterpènes, deux constituants possèdent une activité modérée alors qu'un composé (**11b**) présente un fort pouvoir inhibiteur avec une $EC_{50} < 0,9 \mu\text{M}$ et un $SI = 16,4$. Toutefois, la structure de ce dernier ne se distingue pas de manière suffisamment significative de celles des autres dérivés pour expliquer les écarts observés entre leur activité respective. Par ailleurs, le composé de type 13,17-oxy-14-oxomyrsinol (**E** ; **13** ; [Figure 62](#)) s'est révélé non actif.

Pour l'ensemble des diterpènes de type prémyrsinane et myrsinane, il apparaît que la présence d'une cétone en C-14 est délétère pour l'inhibition de la réplication virale, alors que la présence de la liaison éther C-13–C-17 des prémyrsinols semble améliorer l'activité anti-CHIKV. Environ vingt dérivés sont fortement cytotoxiques ou dénués de propriétés inhibitrices, trois constituants ont une activité modérée et seulement deux molécules (**11b** et **15b**) présentent un important pouvoir antiviral. D'après ces résultats, même si quelques rares dérivés exhibent une activité anti-CHIKV modérée voire forte, il apparaît que les esters de prémyrsinol et de myrsinol ne sont pas une classe prometteuse de métabolites pour la lutte contre le virus du chikungunya.

En revanche, les trois diterpènes de type phorbol (**F** ; **16a–c** ; [Figure 63](#)) présentent un fort pouvoir inhibiteur de la réplication du CHIKV ($EC_{50} \text{ CHIKV} < 0,8 \mu\text{M}$), avec de bon indice de sélectivité ($SI > 12$), tandis que le phorbol oxydé (**G** ; **17** ; [Figure 63](#)) présente une activité modérée. Enfin, les données obtenues pour les deux composés de type didéoxyphorbol (4 β - et 4 α -) ont permis de démontrer que le pouvoir inhibiteur de l'épimère 4 β - [$EC_{50} \text{ CHIKV} = 4,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ($SI = 10,6$)] est nettement supérieur à celui du 4 α - ($EC_{50} \text{ CHIKV} > 11 \mu\text{M}$). Ces observations sont en accord avec celles de la littérature qui soulignent l'importance de la stéréochimie du C-4 des phorbols et déoxyphorbols pour les propriétés antivirales,^{108,109} ainsi, les didéoxyphorbols ne font pas exception à cette règle.

¹⁰⁹ Nothias-Scaglia, L.-F.; Pannecouque, C.; Renucci, F.; Delang, L.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leysen, 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. Comparaison chimiotaxonomique de la composition en esters diterpéniques d'*Euphorbia pithyusa* et d'*Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*

D'un point de vue taxonomique, *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* est considérée comme une sous-espèce d'*Euphorbia pithyusa* (subsp. *pithyusa*). Dans le travail détaillé dans le **manuscrit 5** (article en préparation), nous avons cherché à caractériser les deux taxa sur la base de leur composition chimique en esters de diterpène. A cette fin chimiotaxonomique, les fractions issues des extraits AcOEt – enrichis en esters de diterpène – ont été analysées par LC-MS/MS afin de générer un réseau moléculaire incluant les deux plantes. Tout d'abord, nous constatons que les compositions diterpéniques sont caractérisées par la présence de prémyrsinols, de myrsinols et de phorboïdes chez ces deux espèces. Néanmoins, chaque espèce se distingue par l'observation de constellations d'esters de diterpène spécifiques à chacune des sous-espèces (**Figure 66**). L'annotation détaillée du réseau moléculaire (**Figure 66**), réalisée grâce aux molécules précédemment isolées d'*E. pithyusa* (subsp. *pithyusa*) et à l'étude des voies de fragmentation, a permis de repérer des ions d'intérêt dans les fractions d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii*. La réalisation d'une procédure d'isolement cible a conduit à l'obtention et l'identification de nouveaux prémyrsinanes, myrsinanes, et phorboïdes.

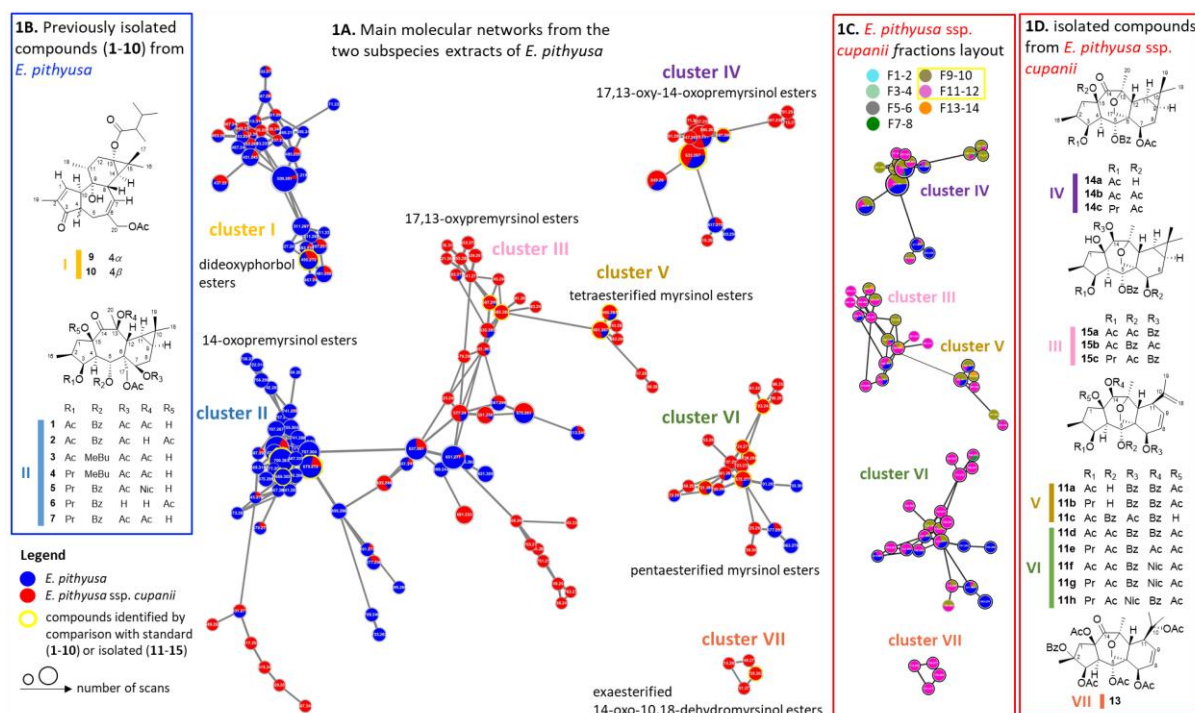


Figure 66. Figure des réseaux moléculaires d'*E. pithyusa* et d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* du **manuscrit 5**.

L'étude des voies de fragmentations des diterpènes isolés d'*E. pithyusa*, dits de références – décrite dans l'**article 4**¹⁰⁶ – a permis de mettre en évidence la présence d'ions spécifiques au squelette prémyrsinane (de type **A**) à m/z 295, 277, 267 et 149, ainsi qu'au squelette myrsinane (de type **D**) à m/z 295, 277, 265 et 247 (**Figure 67**). Les spectres MS² des prémyrsinanes se caractérisent par l'observation d'une perte neutre C=O (- 27,99 Da) tandis que les myrsinanes présentent une perte neutre CH₂O (- 30,01 Da) liée au pont éther entre C-13 et C-17. L'interprétation des spectres MS² des ions présents dans les fractions d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* a montré qu'ils pourraient correspondre à des dérivés originaux de prémyrsinols et de myrsinols. En effet, la grande majorité de ces composés présentent des spectres avec à la fois des ions correspondants à une perte neutre CH₂O et des ions issus de la perte d'un C=O. Afin de valider la présence de ces nouveaux analogues, une purification a été entreprise à partir des fractions les plus riches en ces ions, amenant à l'identification de 6 nouveaux dérivés de prémyrsinols (de type **B** et **C**) et de 10 de type myrsinane (de type **D**) dont un nouveau dérivé original (de type **E**) (**Figure 67**). L'analyse des voies de fragmentation de ces nouveaux dérivés a été décrite dans le **manuscrit 5**. Concernant les dérivés de phorboïdes (type **F** and **G**), aucun de ces composés n'a pu être visualisé dans le réseau moléculaire; due à la coélution entre ces phorbols – ayant un caractère apolaire dû à la présence de longue chaîne alkyle – et d'autres composés lipophiles susceptibles d'être présents dans les mélanges.

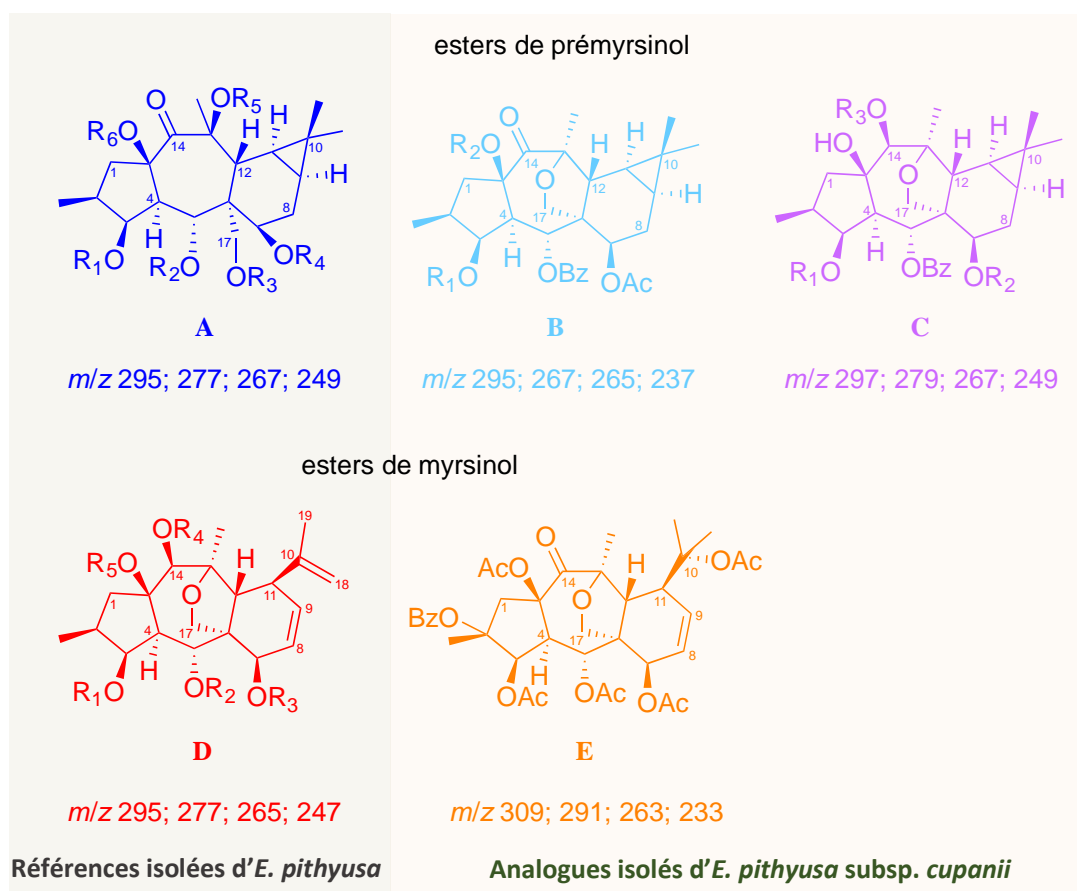


Figure 67. Esters de prémyrsinol (A, B et C) et myrsinol (D et E) (références et analogues) et leurs ions caractéristiques de la fragmentation de leur squelette.

La comparaison des compositions diterpéniques des deux taxa indique qu'*E. pithyusa* contient principalement des esters de prémyrsinol estérifiés en C-17 et des didéoxyphorbols, alors qu'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* présente des dérivés de prémyrsinols et myrsinols avec un pont éther entre C-13–C-17 et des phorbols. Par ailleurs, les diterpènes de type myrsinane semblent être en nombre plus important chez *E. pithyusa* subsp. *cupanii* que chez l'espèce sœur. Nous pouvons également constater que la présence de phorbols *sensu stricto* est remarquable, puisque seulement 13 constituants de ce type ont été rapportés à ce jour dans le genre *Euphorbia*.

Ainsi, l'approche combinée de la LC/MS-MS et des réseaux moléculaires nous a permis de différencier la composition en ester de diterpène des deux sous-espèces d'*E. pithyusa* de Corse. Grâce aux molécules isolées et à l'interprétation de leurs voies de fragmentation, nous avons pu annoter les constellations correspondantes aux principales familles chimiques présentes dans les fractions. Ces différences de composition en esters de diterpène indiquent

que le processus de spéciation, qui est survenu entre ces deux taxa, a été associé à une modulation de la production de métabolites secondaires. Selon l'hypothèse séminale d'Ehrlich et Raven,¹¹⁰ cette modulation indiquerait une réponse adaptative aux différents ennemis naturels. L'utilisation de la LC-MS/MS et des réseaux moléculaires devrait accélérer la caractérisation du rôle écologique des métabolites secondaires au regard du processus de spéciation d'un des plus grands genres de plante à fleurs.

¹¹⁰ Ehrlich, P. R.; Raven, P. H. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* **1964**, *18* (4), 586–608.

IV. CONCLUSION

Les études antérieures menées sur les esters diterpéniques présents les extraits d'*Euphorbia* de Corse et leurs potentialités antivirales dans l'inhibition de la réplication du chikungunya (CHIKV) ont été déterminants dans le choix des plantes à travailler dans le cadre de cette thèse. L'un des objectifs étant de découvrir des nouvelles molécules antivirales ; nous avons focalisé notre étude phytochimique sur la caractérisation du latex d'*E. dendroides* et des parties aériennes d'*E. pithyusa* ; comme en témoigne les trois articles publiés en 2016 et 2017 dans *Journal of Natural Products*. Par ailleurs, la présence d'esters de jatrophane - doués de propriétés inhibitrices de la P-gp - chez *E. dendroides* nous a conduit à isoler les métabolites de cette plante et à évaluer leur activité sur l'inhibition des transporteurs CaCdr1p et CaMdr1p de *Candida albicans* impliqués dans la chimiorésistance ; ces travaux ont fait l'objet d'un quatrième article paru dans *Journal of Natural Products* en 2017. Enfin, un dernier manuscrit consacré à la différenciation chimiotaxonomique de deux taxons apparentés, *E. pithyusa* et *E. pithyusa* subsp. *cupanii*, est proposé en vue d'une publication prochaine dans *Phytochemistry*.

Les travaux phytochimiques menés sur le latex d'*E. dendroides* ont permis l'isolement et l'identification de vingt-quatre esters de diterpène dont quinze nouveaux composés. Il s'agit de seize constituants de type 6,11-diène-16-oxojatrophane nommés euphodendroidines (A, B, E, F, J–T, 7), de quatre dérivés de type 17-bishomojatrophane nommés terracinolides (B, C, G, J) et de quatre esters de 4 β -déoxyphorbols (20–23). Trois composés ont été obtenus sous forme cristalline, permettant ainsi une analyse par diffraction des rayons X et l'obtention de la configuration absolue pour la totalité de la série chimique. Au cours des travaux réalisés sur cette espèce, l'isolement de sept esters de jatrophane ayant un comportement atypique en solution – équilibre conformationnelle ralenti à température ambiante par rapport à l'analyse RMN – nous a amené à étudier l'équilibre conformationnelle par RMN et calcul DFT de deux d'entre eux, l'euphodendroidine K et L. De plus, l'isolement de deux esters de jatrophane en quantité importante, l'euphodendroidine E et F, nous a incités à approfondir nos investigations en réalisant des modifications structurales sur ces composés au moyen de réactions chimiques simples. Six dérivés originaux d'esters de jatrophane (1–6) ont ainsi été créés en utilisant la réaction de Tsuji-Trost et un acide de Lewis, le BF₃. Ces dérivés n'ont pas montré d'activité inhibitrice de la P-gp humaine.

Conclusion

Une trentaine d'esters de jatrophane, dont 19 isolés du latex d'*E. dendroides* et 10 autres issus d'*E. semiperfoliata*, ont été évalués pour leur capacité à bloquer les transporteurs CaCdr1p et CaMdr1p de *Candida albicans*. Les résultats ont montré que quatre d'entre eux induisaient, à des degrés divers, l'inhibition du transport du rouge Nil, mais aucun n'a présenté la capacité à sensibiliser la souche résistante au fluconazole. L'évaluation des propriétés anti-CHIKV des esters de jatrophane a permis de mettre en évidence une activité antivirale pour deux d'entre eux liée à un effet anti-métabolique. Les autres composés de la série n'ont pas montré d'activité anti-CHIKV significative. La forte activité anti-CHIKV de l'extrait de latex d'*E. dendroides* n'étant pas due à la présence d'esters de jatrophane, il s'est avéré nécessaire de rechercher les métabolites minoritaires pouvant être responsables de celle-ci. Ce questionnement nous a incités à intégrer l'activité anti-CHIKV des fractions dans les réseaux moléculaires afin de cibler les molécules actives. Ce travail s'est appuyé sur l'emploi d'un outil de prédiction d'activité biologique mis au point par l'équipe de P. Dorrestein, permettant de mieux visualiser les ions candidats pour l'activité biologique. Quatre nouveaux esters de 4 β -déoxyphorbol, dont deux (**21**, **22**) présentant une très forte activité anti-CHIKV et 2 autres (**20**, **23**) un effet cytotoxique marqué, ont ainsi été isolés.

L'étude des parties aériennes d'*E. pithyusa* et d'*E. pithyusa* subsp. *cupanii* a conduit à l'isolement et l'identification de 30 esters de diterpène dont 23 sont nouveaux : 11 esters de prémyrsinol de type 14-oxoprémyrsinols (**1–7**), 13,17-oxy-14-oxoprémyrsinols (**14a–c**) et 13,17-oxyprémyrsinols (**15a–c**) ; 6 esters de myrsinol de type 13,17-oxymyrsinols (**8**, **11a–c**, **11h**, **12**) et 13,17-oxy-14-oxomyrsinol (**13**) ; 6 esters de phorbol de type 4 β -phorbol (**16a–c**, **17**) et 4,12-didéoxyphorbol (**9–10**). Six d'entre eux (**1**, **11d**, **11f**, **11h**, **12** et **15b**) ont été cristallisés et analysés par diffraction des rayons-X. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les esters de diterpène de type 14-oxoprémyrsinols, 13,17-oxymyrsinols et 4,12-didéoxyphorbol présents dans l'espèce *E. pithyusa*. L'étude des ions caractéristiques des squelettes prémyrsinane et myrsinane a ensuite permis de mettre en évidence la présence d'analogues originaux dans la sous-espèce *E. pithyusa* subsp. *cupanii*. L'investigation chimique de cette dernière a finalement conduit à l'isolement de dérivés nouveaux, soit des 13,17-oxy-14-oxoprémyrsinols, 13,17-oxyprémyrsinols et 13,17-oxy-14-oxomyrsinol. La présence d'une cétone en C-14, d'une liaison éther entre C-13 et C-17 et le nombre de groupements esters semblent être des éléments déterminants pour la discrimination de ces deux taxa. En effet, il apparaît que l'espèce *E. pithyusa* biosynthétise préférentiellement des composés de type 14-oxoprémyrsinols tandis que les myrsinols et les 4,12-didéoxyphorbols ne sont détectés qu'en

Conclusion

faible proportion. Chez *E. pithyusa* subsp. *cupanii*, les esters de prémyrsinol et myrsinol sont également présents mais préférentiellement sous la forme 13,17-oxy-14-oxoprémyrsinol, 13,17-oxyprémyrsinol et 13,17-oxymyrsinol. L'évaluation de ces 30 esters de diterpène sur la réplication virale du CHIKV a révélé une forte activité inhibitrice pour cinq d'entre eux (**15b**, **11b**, **16a–c**).

Au final, 54 esters de diterpène ont été isolés de ces trois espèces, dont plus des deux tiers sont nouveaux (38 composés), démontrant ainsi la forte diversité structurale de ces métabolites au sein du genre *Euphorbia*. Les résultats acquis au cours de ces travaux ont permis :

- (i) de confirmer l'intérêt de la classe des tiglianes dans la lutte antivirale, par l'identification de nouveaux esters de 4β -déoxyphorbol et 4β -phorbol particulièrement actifs ;
- (ii) de décrypter le comportement conformationnel atypique de certains jatrophanes en solution, notamment pour les euphodendroidines qui peuvent présenter un comportement coalescent à température ambiante, lié à un échange interconformationnel ralenti ;
- (iii) de discriminer sur le plan chimiotaxonomique deux sous-espèces, par la mise en œuvre d'une étude approfondie des voies de fragmentation des esters de prémyrsinol et myrsinol et d'une méthodologie innovante dite "des réseaux moléculaires".

Le recours aux nouveaux outils bio-informatique ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude phytochimique des plantes supérieures, et plus généralement pour la caractérisation du métabolome d'organismes vivants. Les futurs développements de ces approches permettent d'envisager une meilleure dérégulation par l'annotation des métabolites bioactifs et la détection de leurs analogues structuraux au sein de mélanges complexes.

ANNEXES

FIGURES 1–5, 51, 52, 66 ET 67
ISSUES DU SUPPORTING
INFORMATION DE L'ARTICLE 1

Figure 1. LC-HRESIMSⁿ analysis of *E. dendroides* MeCN extract in positive ion mode (A) LC-ESI-MS base peak chromatogram; (B) ESI-MS spectrum at 13.8 min

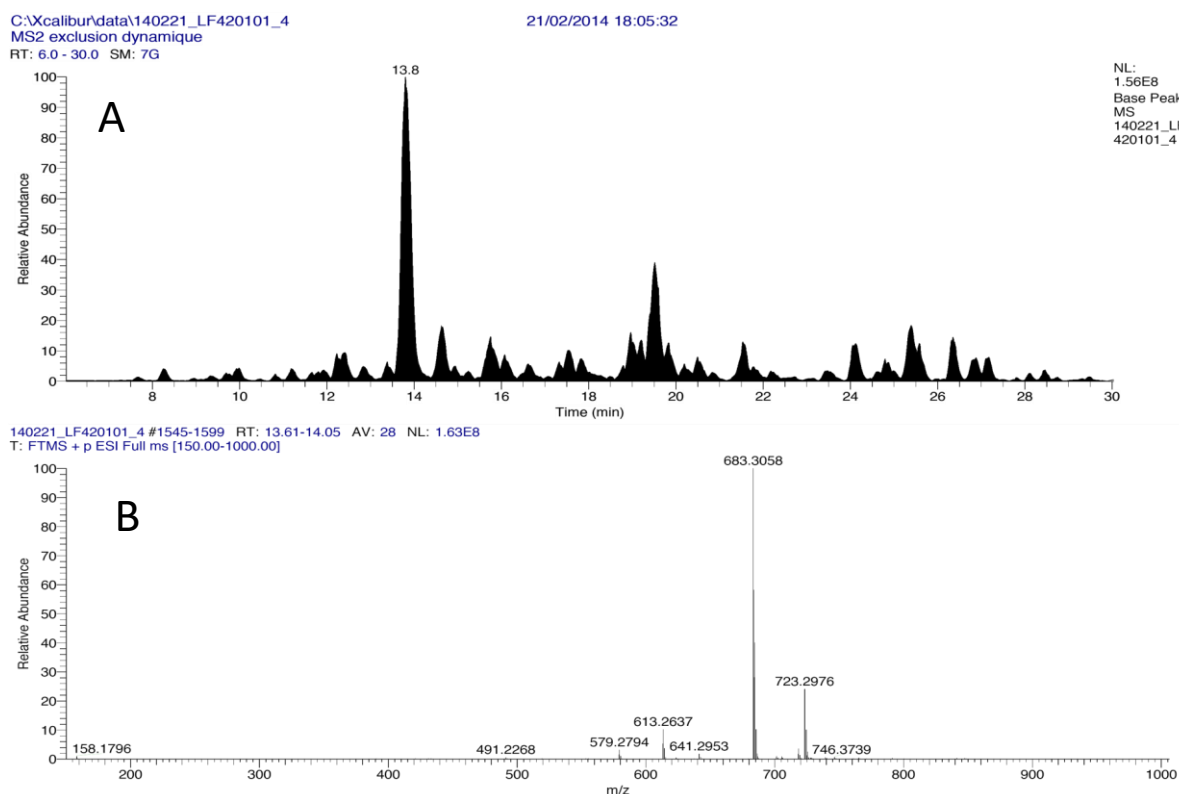
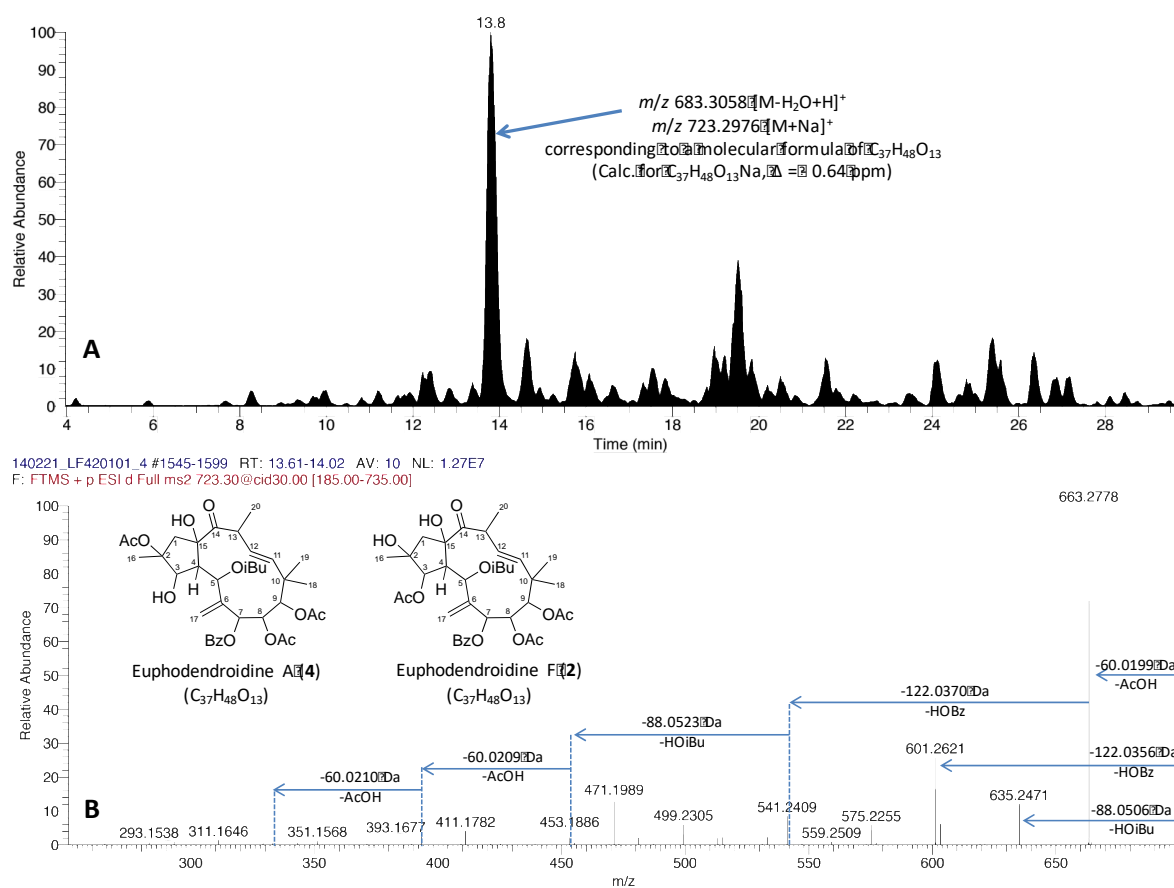


Figure 2. LC-HRESIMSⁿ analysis of *E. dendroides* MeCN extract in positive ion mode (A) Base peak chromatogram (zoom from 4 to 30 min) and molecular ions observed for peak at 13.8 min. (B) Calculated molecular formula deduced from the molecular ion [M + Na]⁺ at 13.8 min corresponding to euphodendroidins A (4) and/or F (2). The HRESIMSⁿ spectrum of the ion *m/z* 723.30 at 13.8 min is compatible with this structure. The molecular formula, C₃₇H₄₈O₁₃, which was deduced from the ion at *m/z* 723.2976 (calc. 723.2993), could correspond to euphodendroidins A and/or F (4 and/or 2), two compounds possessing the same elemental composition and previously isolated from *E. dendroides*¹. The HRESIMSⁿ spectrum of the ion at *m/z* 723.2976 revealed collision-induced fragment ions corresponding to the neutral loss of acyl groups as acid moieties, indicating the presence of three acetyloxy groups, one benzoyl group and one isobutyl group.



- (1) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatela-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.-N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3395–3402.

Figure 3. LC-HRESIMSⁿ analysis of *E. dendroides* MeCN extract in positive ion mode (A) LC-ESI-MS base peak chromatogram; (B) ESI-MS spectrum at 13.8 min; (C) Extract ion chromatogram of *m/z* 682.8 – 683.8 and (D) of *m/z* 722.8 – 723.8.

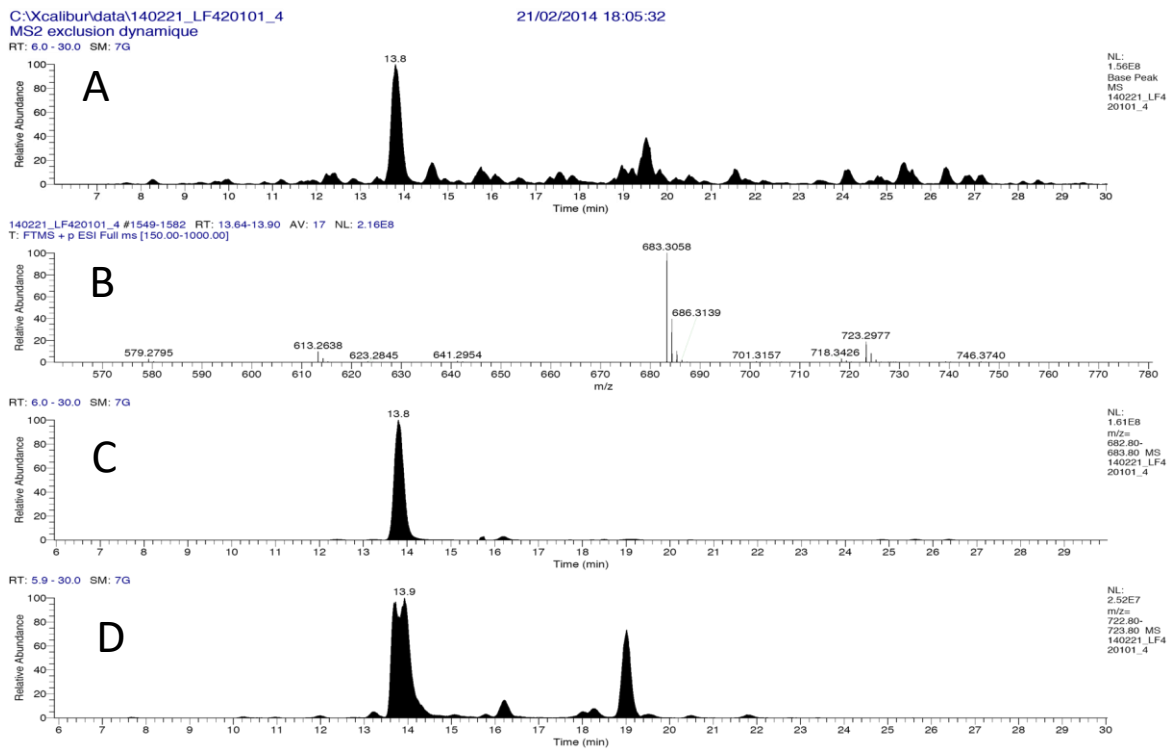


Figure 4. LC-HRESIMSⁿ analysis of *E. dendroides* MeCN extract in positive ion mode (A) ESI-MS spectrum at 13.8 min; (B) ESI-MS/MS spectrum of *m/z* 683.3 [M-H₂O+H]⁺ at 13.7 min; (C) ESI-MS/MS spectrum of *m/z* 723.3 [M+Na]⁺ at 13.8 min.

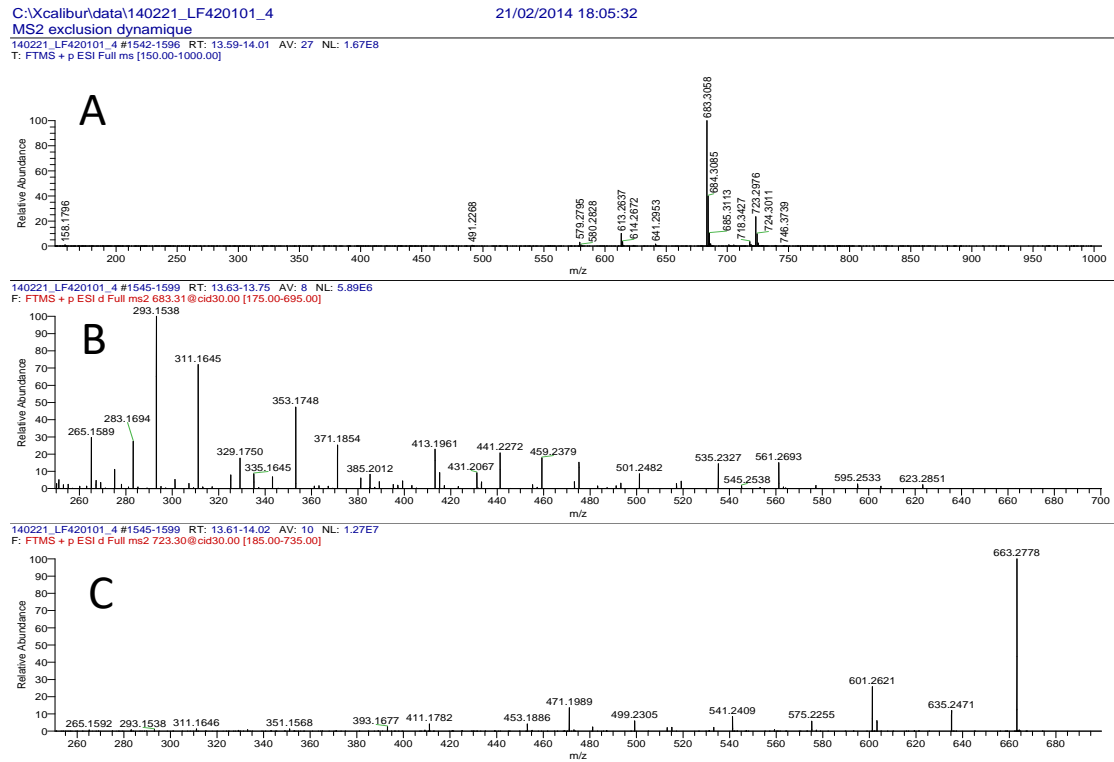


Figure 5. LC-HRESIMSⁿ analysis of *E. dendroides* MeCN extract in positive ion mode (A) ESI-MS/MS spectrum of m/z 683.3 [M-H₂O+H]⁺ at 13.7 min; (B) ESI-MS/MS spectrum of m/z 723.3 [M+Na]⁺ at 13.8 min with elemental formula.

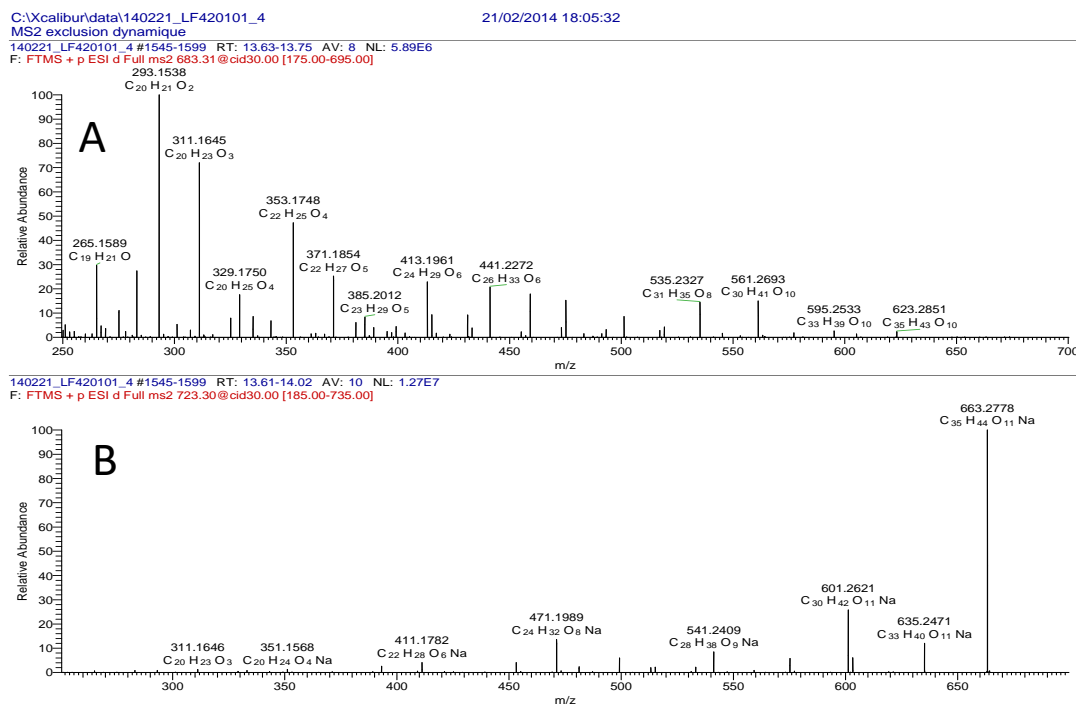


Figure 51. Calculated conformers for **5**

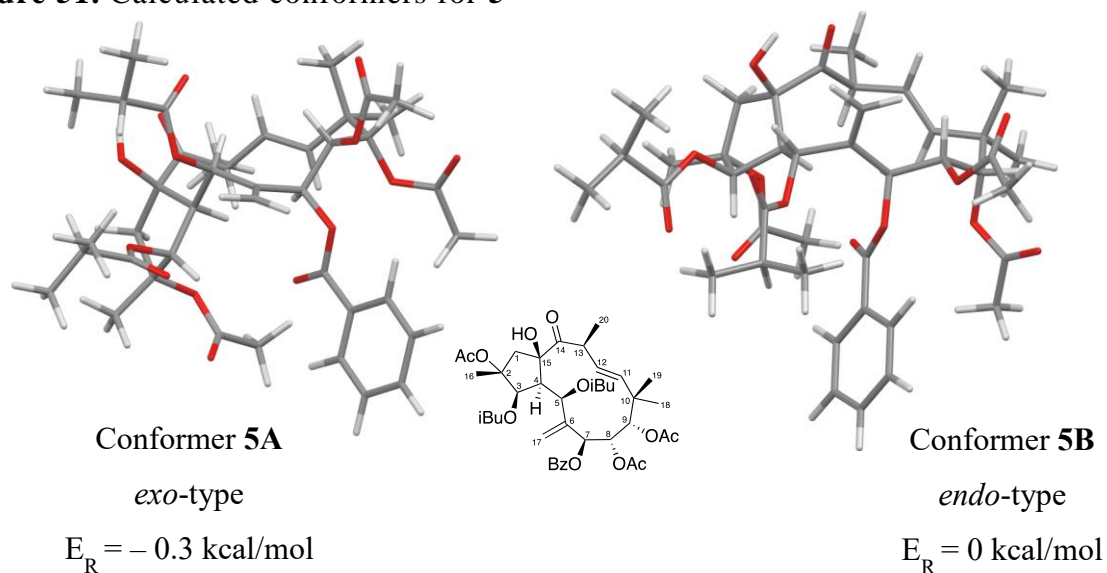


Figure 52. Relative energies of transition states for the interconversion between the *endo* and *exo* conformers of compounds **1**, **5** and **6**. The diagram for compound **1** is colored in red, for compound **5** in green and for compound **6** in blue.

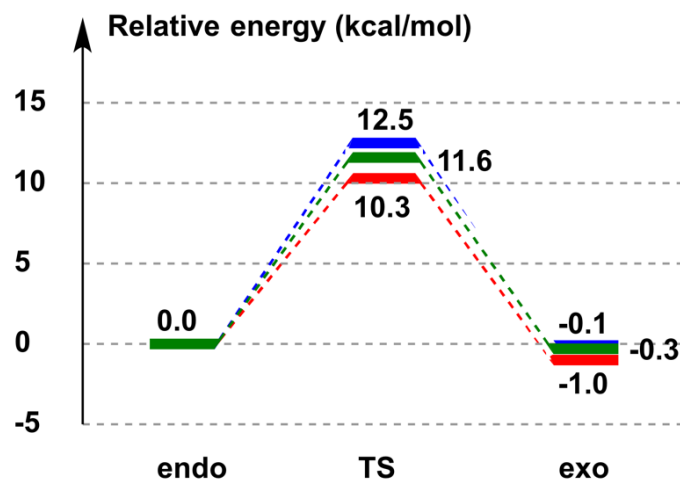


Figure 66. Antiviral Activities of Compounds **1–15** against CHIKV in Vero Cells ^a

compound	CC ₅₀	EC ₅₀	SI ^{bc}
1	n.d.	>	n.d.
2	107.8	57.3	1.9
3	n.d.	>	n.d.
4	n.d.	>	n.d.
5	129.8	>	1.0
6	n.d.	>	n.d.
7	17.7	5.5 ±	3.2
8	n.d.	>	n.d.
9	68.5	133.6	0.5
10	45.3	>	1.1
11	36.4	27.4	1.3
12	n.d.	>	n.d.
13	n.d.	>	n.d.
14	36.0	15.0	2.4
15	n.d.	>	n.d.
chloroquine	89 ±	11 ±	8.1

^a Data in μM . Values are the median \pm median absolute deviation calculated from at least three independent assays.

^b SI or window for antiviral selectivity calculated as $\text{CC}_{50} \text{ Vero} / \text{EC}_{50} \text{ CHIKV}$

^c n.d. not determined

Figure 67. Experimental Procedures and Complementary Information

General Experimental Procedures. Optical rotations $[\alpha]_D$ were measured on a polarimeter MCP 300 Anton Paar polarimeter at 24 °C. Monochromatic light source is the sodium D-lines. MeOH was used as solvent. Melting point was determined in open-end capillary tubes on a Büchi B-540 melting point apparatus and they are uncorrected. IR spectra were obtained on a Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR system. UV spectra were recorded on a Varian Cary 100 scan spectrophotometer and they were measured in a 1 cm quartz cell. The 1D- (^1H and ^{13}C) and 2D- (COSY, HSQC, HMBC and ROESY) NMR analysis were recorded in CDCl_3 at 300 K on a Bruker Avance 600 MHz instrument using a 1.7 mm microprobe for compounds **3**, **11**, **12**, **14**, on a Bruker Avance 500 MHz instrument for compounds **8**–**10** and **13**, and on a Bruker Avance 300 MHz instrument for compounds **2**, **4**, **7** and **15**. Analysis of compound **5** and **6** were performed at a temperature of 300 K on a Bruker Avance 500 MHz instrument then at 227 K on a Bruker Avance 600 MHz instrument. The data processing software was NMRnotebook[®] (<http://www.nmrtec.com/>). Analytical C_{18} columns (Kromasil, 250 × 4.6 mm i.d., 5 μm , Thermo Scientific) and PFP column (Nucleodur, 250 × 4.6 mm i.d., 5 μm , Macherey-Nagel) were used for HPLC separation on 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. This unit was controlled with Masslynx software. Semi-preparative C_{18} column (Kromasil, 250 × 10 mm; i.d. 5 μm) and PFP column (Nucleodur, 250 × 10 mm i.d. 5 μm , Macherey-Nagel) were used for semi-preparative HPLC separation using a Dionex autopurification system equipped with a binary pump (P580), an UV–vis array detector (200–600 nm, Dionex UVD340U), and a PL-ELS 1000 ELSD detector Polymer Laboratory. This unit was controlled with Chromeleon software. Pre-packed silica cartridges were used for flash chromatography using a Combiflash Companion apparatus (Serlabo). The staining reagent used for analytical TLC plates (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) was the sulfuric molybdate, which was prepared by dissolving ammonium dimolybdate (50 g) in water (450 mL) and slowly adding concentrated sulfuric acid (50 mL) in cold conditions. The plates were observed at 254 nm and 366 nm UV-wavelength. GraceResolv silica cartridges (80 g) and VersaFlash C_{18} spherical silica (23 x 110 mm, 30 g, 20–40 μm) were used for flash chromatography using a Combiflash Companion (RF-200, Teledyne Isco) and UV detector. Peak detection was performed at 260 nm for MECN extract and at 200 and 233 nm wavelength for fraction 13. An Acquity Waters UPLC Waters system coupled with a LCT Premier XE time-of-flight mass spectrometer were used for acquired LC-HRESIMS data. This

MS was fitted with an ESI source operating in positive ion mode in the range m/z 80-1500. UPLC system was composed of a Waters Acquity PDA detector, a BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) at a flow rate of 0.6 mL/min. Elution was conducted with a H₂O–acetonitrile (MeCN) + 0.1% formic acid gradient as follows: 95:5 to 0:100 in 5.5 min. The data were treated with Masslynx[®] software. All other chemicals and solvents were purchased from SDS (Peypin, France).

Isolation procedure. Compounds **1**–**15** were isolated as follow. The purification of fraction F9 (154 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 30:70 in 40 min) afforded two compounds isolated previously, euphodendroidin A (**4**) (13.5 mg), euphodendroidin B (**9**) (12.3 mg) and allowed isolation of two new jatrophane esters, compounds **5** (3.3 mg) and **8** (13.5 mg). The purification of fraction F10 (612 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 38:62 in 40 min) afforded two compounds isolated previously, euphodendroidin A (**4**) (13.6 mg), euphodendroidin E (**1**) (121 mg) and an impure mixture (10.4 mg). The latter was separated by semi-preparative HPLC (PFP C₁₈, isocratic H₂O–MeOH–MeCN + 0.1% formic acid, 28:36:36 in 20 min), leading to the purification of compound 10 (2.9 mg). Purification of fraction F11 (118 mg) with semi-preparative HPLC (PFP C₁₈, isocratic H₂O–MeOH–MeCN + 0.1% formic acid, 28:36:36 in 20 min) afforded compounds **3** (0.2 mg), **6** (7.2 mg) and **11** (1.1 mg). The purification of fraction F12 (141 mg) by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 40:60 in 40 min) afforded two compounds isolated previously, terracinolide J (**14**) (0.8 mg) and compound **7** (9.6 mg). The fraction F13 (1.6 g) was mixed with 2 g of Celite and subjected to flash chromatography on a VersaFlash C₁₈ column (Spherical, 23 x 110 mm, 30 g). The eluting system chosen was H₂O–MeCN + 0.1% formic acid (40:60 to 100:0 in 63 minutes), leading to isolation of euphodendroidin F (**2**) (804 mg). From F14 (470 mg), terracinolide C (**15**) (51.9 mg) was obtained by precipitation in diethyl ether. The filtrate was further separated by semi-preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–MeCN + 0.1% formic acid, 48:52 in 20 min) and provided two compounds, 13 α -OH terracinolide G (**12**) (0.7 mg) and 13 α -OH terracinolide B (**13**) (4.6 mg).

HPLC-HRMSⁿ analysis details. The main advantage of the ESI-LTQ-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 MS² spectra. Data-dependent MSⁿ mode was used to monitor 1 to 3 most intense ions with an exclusion duration of 40 sec after 8 repetitions. Instrumental parameters were set as follows: source voltage: 5 kV, lens 1 voltage: -15 V, capillary temperature: 275 °C, gate lens voltage: -35 V, capillary voltage: 25V, 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 x 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% formic acid (A) and MeCN + 0.1% formic acid (B), following the gradient 5 to 95% B in 40 min, then maintaining 100% B for 10 min at a flow rate of 250 μL/min. Injection volume was fixed at 10 μL.

Structural elucidation. Regarding compound **5**, the ¹H and ¹³C NMR (300 K, CDCl₃, Tables **3** and **4**) spectra showed signals that are reminiscent of euphodendroidin structures, a *trans*-disubstituted double bond [δ_C 137.3 (C-11), 129.7 (C-12) and δ_H 5.95 (d, J = 15.9 Hz, H-11), δ_H 5.53, (dd, J = 15.9 and 9.5 Hz, H-12)], a *gem*-dimethyl group [H₃-18 and H₃-19 (δ_H 1.28, s and 0.90, s)], along with one ketone carbonyl (δ_C 211.2) and six ester carbonyls (δ_C 165.0, 170.2, 170.2, 170.3, 175.5, and 175.7).

Conformational exchange of 5A/5B. Conformational exchange can thermodynamically be characterized by NMR spectroscopic analysis by using the Eyring equation³ if the coalescent temperature (CT) is known. CT is the temperature at which conformational equilibrium is at an intermediate exchange rate, called coalescent state, in relation to the NMR experiment time scale. The coalescent state is characterized by broadened and poorly visible signals. The determination of CT by NMR required recording ¹H NMR spectra at various temperature steps, reflecting the level of exchange rate from slow (signal duplication) to fast (average signals) by increasing the temperature.⁴ The fact that some signals were not observable at room temperature indicated that the CT for compound **5** is above room temperature. However, CT could not be determined since compound **5** underwent relatively rapid chemical degradation in CDCl₃ at room temperature.

(3) Bain, A. D. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *43*, 63–103.

(4) Günther, G.; Martinek, T.; Dombi, G.; Hohmann, J.; Vasas, A. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 365–370.

Discussion on the role of the acylation pattern on the conformational behavior of jatrophane esters. Firstly, by comparing compounds **5** and **6** with **4**, it can be inferred that the acyl residue at C-3 was required to induce a slow intermediate exchange interconversion rate in **5** and **6**, the effect being similar when the residue is an acetyloxy group (**6**) or an isobutyryloxy group (**5**). Secondly, taking into account that compounds **5** and **6** were acetylated at C-2 compared to compounds **1** and **2**, devoid of acetyl group at this position, it was established that a C-2 acyloxy group has a significant role in this equilibrium. Interestingly, it has been previously shown that jatrophane esters lacking a substituent at C-7 adopt preferentially an *endo*-type conformation.^{5,6}

(5) Jakupovic, J.; Jeske, F.; Morgenstern, T.; Tschritzis, F.; Marco, J. A.; Berendsohn, W. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1583–1600.

(6) Jadranin, M.; Pešić, M.; Aljančić, I. S.; Milosavljević, S. M.; Todorović, N. M.; Podolski-Renić, A.; Banković, J.; Tanić, N.; Marković, I.; Vajs, V. E.; Tešević, V. V. *Phytochemistry* **2013**, *86*, 208–217

Discussion on the influence of the solvent on the acylation pattern on the conformational behavior of jatrophane esters. The rate of conformational interconversion also depends on the temperature and solvent.³ To explore the solvent influence on the conformational exchange of jatrophane esters, compound **6** was analyzed in pyridine-*d*₅ at various temperatures. In the ¹H NMR spectrum of **6** at 303 K (Figure S51, Supporting Information) all protons were observable as sharp signals, indicating that **6** underwent a faster exchange rate in pyridine-*d*₅ than in CDCl₃. However, the decrease in temperature (263 to 243 K) induced a change in the conformational behavior of **6**, with some proton signals becoming very broad. A clear visualization of both conformers at the lowest temperature (243 K) was not possible. These results confirmed that the solvent greatly influence the conformational behavior of jatrophane esters, as reported previously.⁵ Other phenomena, such as intermolecular interaction with solvent,^{7,4} could also influence the molecular constraints of these diterpene conformers, and thus might also be involved.

(7) Corea, G.; Fattorusso, C.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4485–4494.

SUPPORTING INFORMATION DE **L'ARTICLE 3 (FIGURES S1–S26)**

STRUCTURAL ELUCIDATION

Compound **20** showed by HRESIMS, a molecular ion at m/z 591.3272 $[M + Na]^+$, corresponding to the molecular formula, $C_{34}H_{48}O_7$, indicating 11 degrees of unsaturation. Examination of HSQC, 1H and ^{13}C NMR spectra ($CDCl_3$, Figure S1, table 1H and ^{13}C) allowed determination of one ketone carbonyl (δ_C 210.1), two ester carbonyls (δ_C 166.1 and 179.7) and two olefinic signals attributable to two vicinal-monosubstituted double bond, [δ_C 160.1 (C-1), 136.5 (C-2) and δ_H 7.54 (br t, $J = 1.7$ Hz, H-1)] and [δ_C 142.1 (C-6), 126.7 (C-7) and δ_H 5.52 (d, $J = 5.4$ Hz, H-7)]. The COSY and HMBC experiment permit to deduced the ester's nature, which were assigned to one deca-2*Z*,4*E*-dienoyl groups (δ_C 115.0, 146.3, 127.0, 146.6, 33.2, 28.6, 31.6, 22.7, 14.2; δ_H 5.52, 6.56, 7.29, 6.07, 2.15, 1.41, 1.27, 1.28, 0.87), and one isobutyrate groups (δ_C 34.4, 18.8, 18.7; δ_H 2.57, 1.18, 1.15). From 11 degrees of unsaturation, 7 were attributed to two ester groups, one carbonyl and two double bonds, and thus four additional rings had to be assumed as tigliane skeleton. Examination of the COSY spectrum of compound **20** revealed three spin systems (H-1, H-10, H-4 and H-5; H-7, H-8 and H-14; and H-11, H-12 and H-18). The first one is represented by: =CH–CH–CH–CH₂ [H-1 and δ_H at 3.23 (m, H-10); 2.44 (td, $J = 9.5$ and 4.5 Hz, H-4)] connected through methylene group [δ_H 2.82 and 2.12 (dd, $J = 18.0$ and 10.0 Hz, H-5 α and H-5 β respectively)]. The Second is characterized by: =CH–CH–CH [H-7; δ_H 2.35 (t, $J = 5.4$ Hz, H-8) and 1.01 (d, $J = 5.4$ Hz, H-14)]. The third spin-system can be built by: –CH(CH₃)–CH [δ_H 1.56 (dd, $J = 6.4$ and 9.8 Hz, H-11); 0.91 (d, $J = 6.4$ Hz, H₃-18) and 5.43 (d, $J = 9.8$ Hz, H-12)].

The first spin-system can be interconnected to one α,β -unsaturated carbonyl by correlations from H-1 to C-2, C-3 and C-19 [(δ_C 136.5, 210.1 and 10.4 (δ_H 1.70, dd, $J = 2.4$ and 1.2 Hz, H₃-19)] and from H-4 to C-3, observed in the HMBC spectrum. Two spin-systems can be interconnected, deduced by HMBC correlations from H-5 and H-7 to C-6 and C-20 [(δ_C 142.1 and 67.7 (δ_H 4.01, br s, H₂-20)] and, from H-10 and H-8 to C-9 (δ_C 77.9). Thus, the correlation between H-8, H-14, H-12, H₃-16 and H₃-18 to C-15, C-13, C-16, C-18, C-17 and C-9 correspond to the part of the molecule. All these observations were used to determinate a 4 β -

deoxyphorbol skeleton. The attachment of an deca-2*Z*,4*E*-dienoyl group at C-12 and an isobutyryl group at C-13 can be established thanks to HMBC correlations between the oxymethine protons and ester carbonyl carbons (Figure S2). The ROESY spectrum, allowing the attachment of two hydroxyl groups at δ_{H} 5.81 and 5.27 at position C-9 and C-20 respectively. Based on previous data, and by observation of ROESY correlations, the relative configuration of compound **20** was established as depicted in Figure S2 and established as 12 β -*O*-[deca-2*Z*,4*E*-dienoyl]-13 α -isobutyryl-4 β -deoxyphorbol.

The same general approach was used to elucidate the structures of 4 β -deoxyphorbol esters **21**–**23**. These compounds possess the same 4 β -deoxyphorbol skeleton and the isobutyrate group at C-13 as depicted for compound **20**, but differ in C-12 ester pattern. Elucidation of the acylation pattern was solved thanks to COSY and HMBC experiments (Figures S12, S14; S17, S19; and S22, S24).

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations (α_{D}) were measured with the sodium's D line monochromatic light source in EtOH at 24°C. Instrument used was a polarimeter MCP 300 Anton Paar polarimeter. A Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR system was used to record IR spectra. UV spectra were measured in a 1 cm quartz tank from a Varian Cary 100 scan spectrophotometer. The 1D (^1H and ^{13}C) and 2D (COSY, HSQC, HMBC and ROESY) NMR analysis were obtained in CDCl_3 for compounds **20**, **21** and **22** on a Bruker Avance 300 MHz and for compound **23** on a 500 MHz instrument, using a 1.7 mm microprobe. HPLC separation was performed on analytical C_{18} columns (Kromasil, 250 \times 4.6 mm i.d., 5 μm , Thermo Scientific) and on semi-preparative C_{18} columns for fractionation. 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 was used. Preparative HPLC separation was performed on semi-preparative C_{18} column (Kromasil, 250 \times 10 mm; i.d. 5 μm). A Dionex autopurification system equipped with a binary pump (P580), an UV–vis array detector (200–600 nm, Dionex UVD340U), and a PL-ELS 1000 ELSD detector Polymer Laboratory was used. LC-HRESIMS data were recorded on an Acquity Waters UPLC Waters system coupled with a LCT Premier XE time-of-flight mass spectrometer. This instrument was composed by an ESI source operating in positive ion mode

in the range m/z 80-1500, an UPLC system composed by a Waters Acquity PDA detector and, a BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm,) at a flow rate of 0.6 mL/ min. Elution was conducted with a H₂O–CH₃CN + 0.1% formic acid gradient as follows: 95:5 to 0:100 in 5.5 min. All other chemicals and solvents were purchased from SDS (Peypin, France).

Plant Material. The harvest of *Euphorbia dendroides* L. latex and the extraction/fraction protocols were described in previous publication.

Extraction and Isolation. Virus-cell-based bioassay against CHIKV replication showed that sub-F13 (486.5 mg) was the most active fraction. The purification of this one by preparative HPLC (Kromasil C₁₈, isocratic H₂O–CH₃CN/MeOH (5/5) + 0.1% formic acid, 8:92 in 40 min) afforded four new compounds, compound **20** with 12.8 mg, **21** (5.0 mg), **22** (5,1 mg), and compound **23** (1,8 mg).

Spectral feature detection with Optimus workflow. Optimus is an open-source and open-format LC-MS processing workflow <http://github.com/MolecularCartography/Optimus> using OpenMS algorithms [<http://www.nature.com/nmeth/journal/v13/n9/full/nmeth.3959.html>], and available as Knime workflow and run on Knime v. 3.2.1 on MacOS 10.12. The parameters used were set as following for Detect LC-MS features: m/z tolerance (15 ppm), Noise threshold (1 000 000), Half of the MS/MS isolation window (0.075 Da), RT tolerance for MS/MS acquisition (10 s) ; for Detect LC-MS features/Set advanced FD settings: common_chrom_peak_snr (3.0), common_chrom_fwhm (25 s), mtd_reestimate_mt_sd (yes), mtd_trace_termination_criterion (outlier), mtd_trace_termination_outliers (3 spectra), mtd_min_sample_rate (0.5), mtd_max_sample_rate (100), epd_width_filtering (fixed), epd_min_fwhm (3), epd_max_fwhm (40), epd_masstrace_snr_filtering (no), ffm_local_rt_range (20 s), ffm_local_mz_range (5 s), ffm_charge_lower_bound (1), ffm_charge_upper_bound (3); for Detect LC-MS features/Detect LC-MS features/Decharger: Potential adducts: H+:0.1 / Na+:0.1 , Align and quantify features, RT tolerance (60 s), Enable re-integration of missing features (yes), Enable pose clustering alignment (no); for Filter features: Minimum intensity ratio as compared to blanks (3.0), Minimal occurrence number (2.0), High chromatographic peak quality (yes), Elution time to discard at start (300 s), Elution time to discard at end (600 s), Presence of MS/MS (yes); for Normalize features: Enable feature normalization (no); for Prepare results, Save as mgf (yes), MS1 noise threshold (5000), MS2 noise threshold (1000).

Figure S1. Table ^1H and ^{13}C NMR Data for Compound **20** (300 MHz) in CDCl_3 (δ_{H} and δ_{C} in ppm, J in Hz)

20					
position	δ_{C}	δ_{H}	position	δ_{C}	δ_{H}
1	160.1	7.54, br t (1.7)	19	10.4	1.70, dd (2.4, 1.2)
2	136.5	-	20	67.7	4.01, br s
3	210.1	-	9-OH		5.81, br s
4	44.4	2.44, td (9.5, 4.5)	20-OH		5.27, br s
5	29.8	2.82, dd (18.0, 10.0)	12-OR	166.1	-
		2.12, dd (18.0, 10.0)	1'	115.0	5.52, d (11.3)
6	142.1	-	2'	146.3	6.56, t (11.3)
7	126.7	5.52, d (5.4)	3'	127.0	7.29, dd (15.6, 11.5)
8	42.2	2.35, t (5.4)	4'	146.6	6.07, ddd (15.6, 7.1, 6.8)
9	77.9	-	5'	33.2	2.15, dd (13.6, 7.1)
10	54.4	3.23, m	6'	28.6	1.41, m
11	42.7	1.56, dd (6.4, 9.8)	7'	31.6	1.27, m
12	76.2	5.43, d (9.8)	8'	22.7	1.28, m
13	65.1	-	9'	14.2	0.87, t (6.9)
14	35.8	1.01, d (5.4)	13-OiBu	-	-
15	26.1	-	1''	179.7	-
16	23.9	1.18, s	2''	34.4	2.57, q (7.0)
17	16.9	1.18, s	3''-Me	18.8	1.18, d (7.0)
18	15.2	0.91, d (6.4)	4''-Me	18.7	1.15, d (7.0)

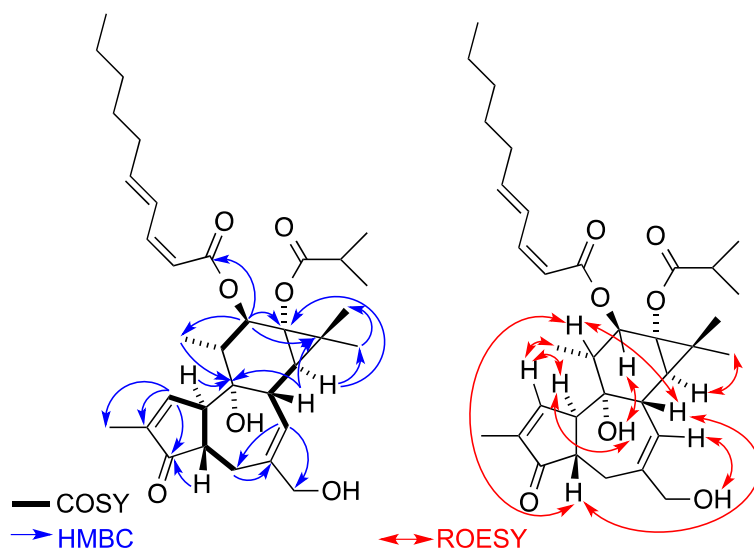
Figure S2. Key COSY (bold, left), HMBC (blue arrows, left) and ROESY (red arrows, right) correlations of compound **20**.

Figure S3. Extracted ion chromatogram of the compound **20** in LC-MS/MS with neutral loss and backbone fragment ions in zoom.

http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=548b824c6fab4ebe8b5447f5bf4b68bb&view=cluster_details&protein=118 and [CCMSLIB00000840550](http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=548b824c6fab4ebe8b5447f5bf4b68bb&view=cluster_details&protein=118)

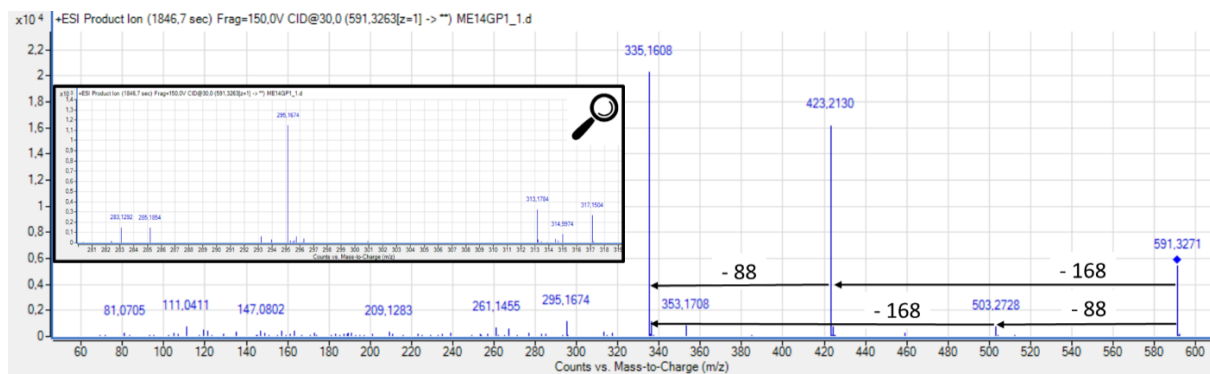


Figure S4. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **20**

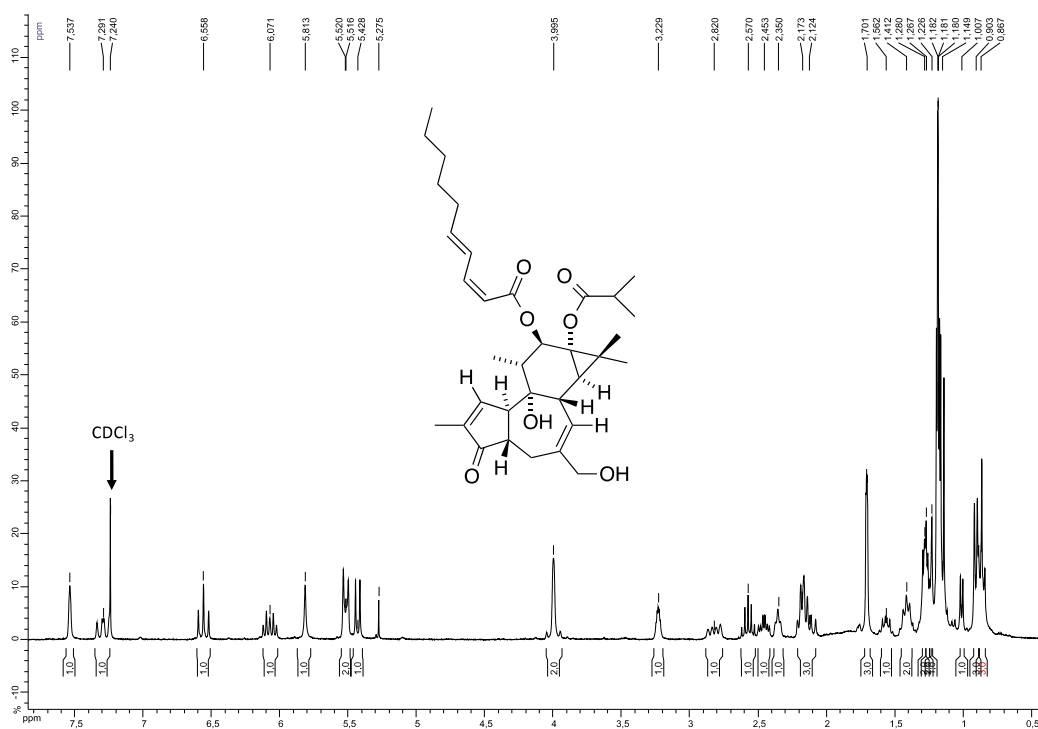


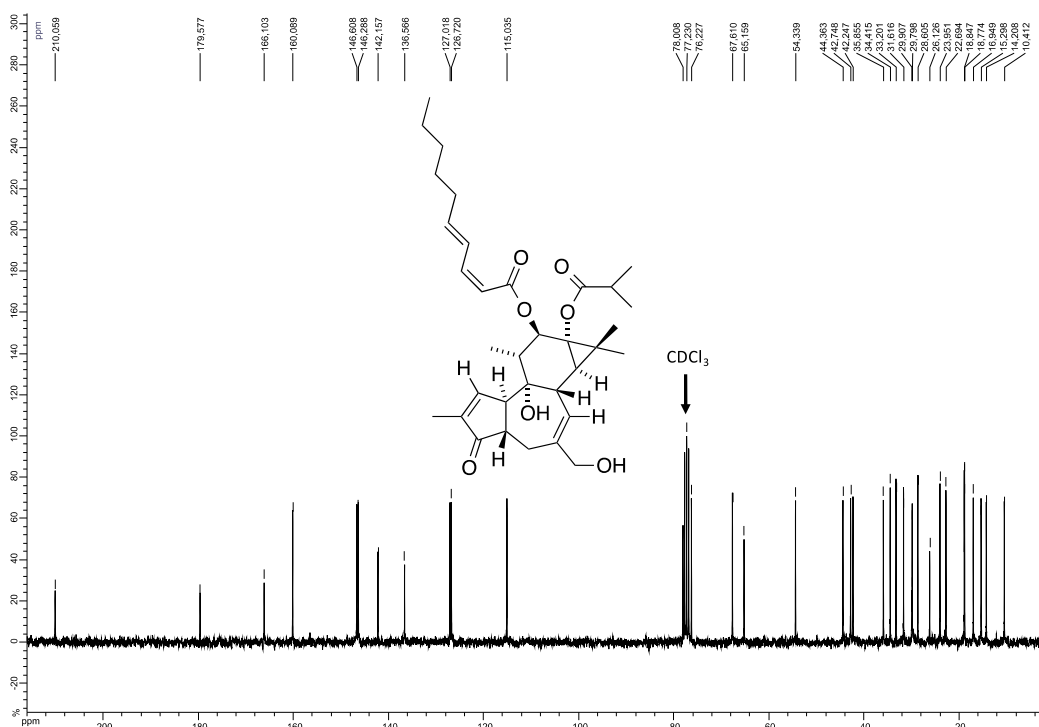
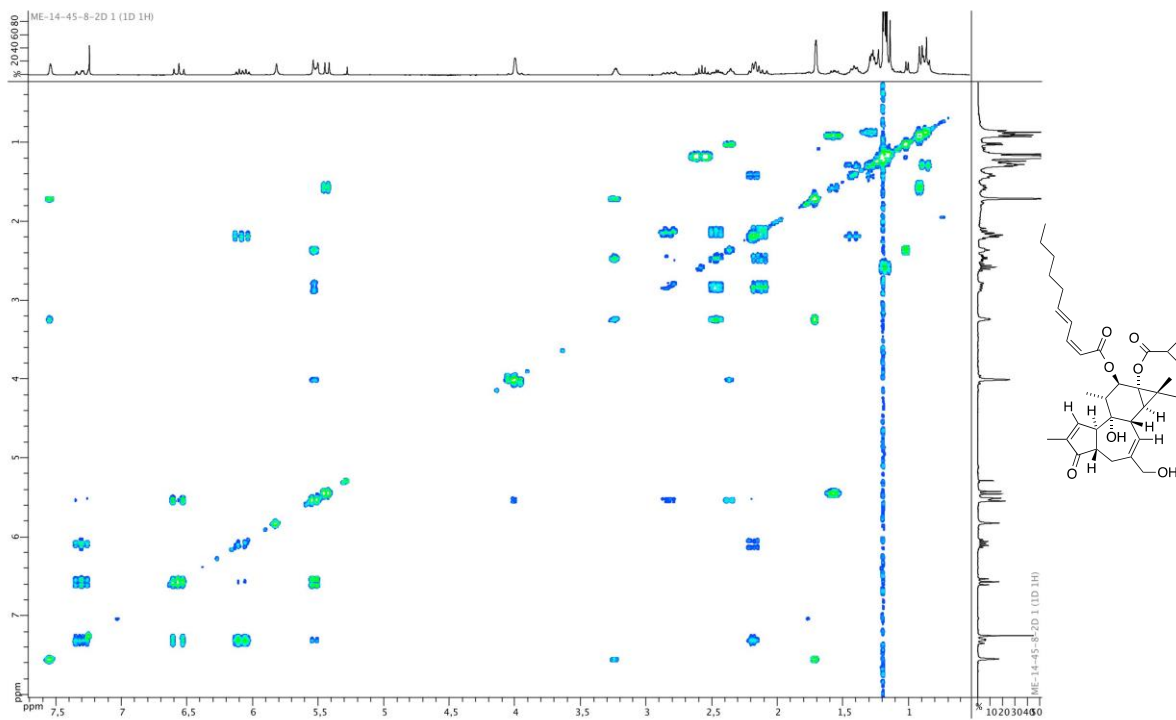
Figure S5. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **20****Figure S6.** COSY NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **20**

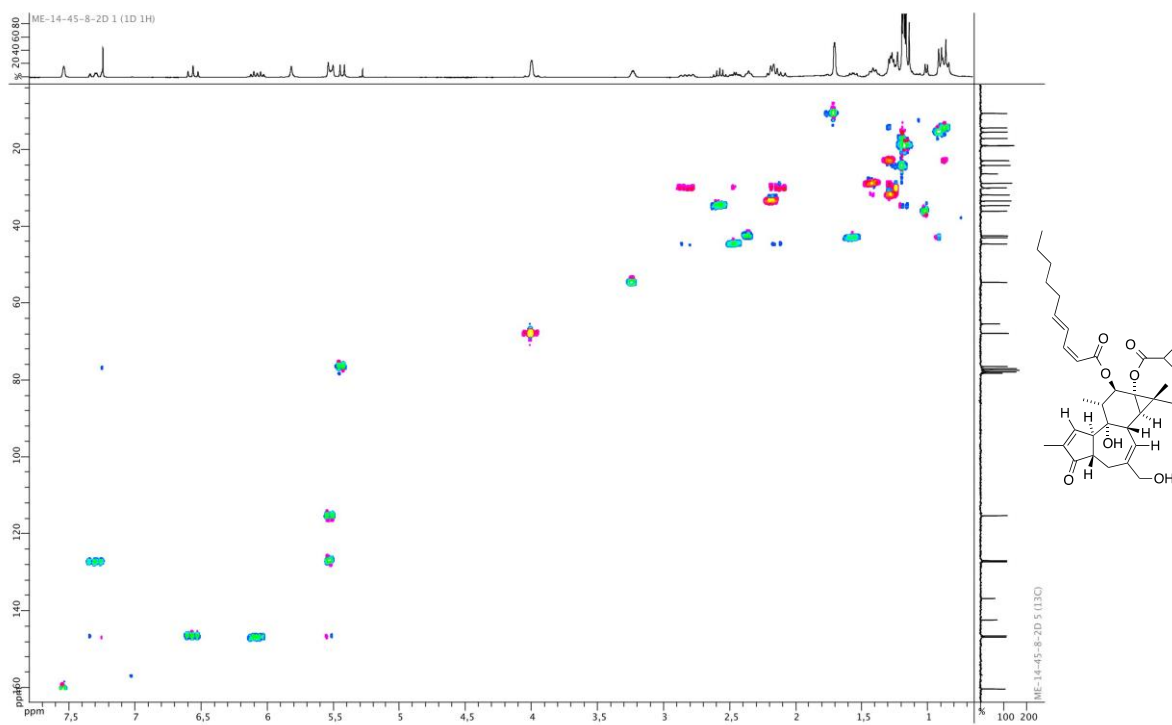
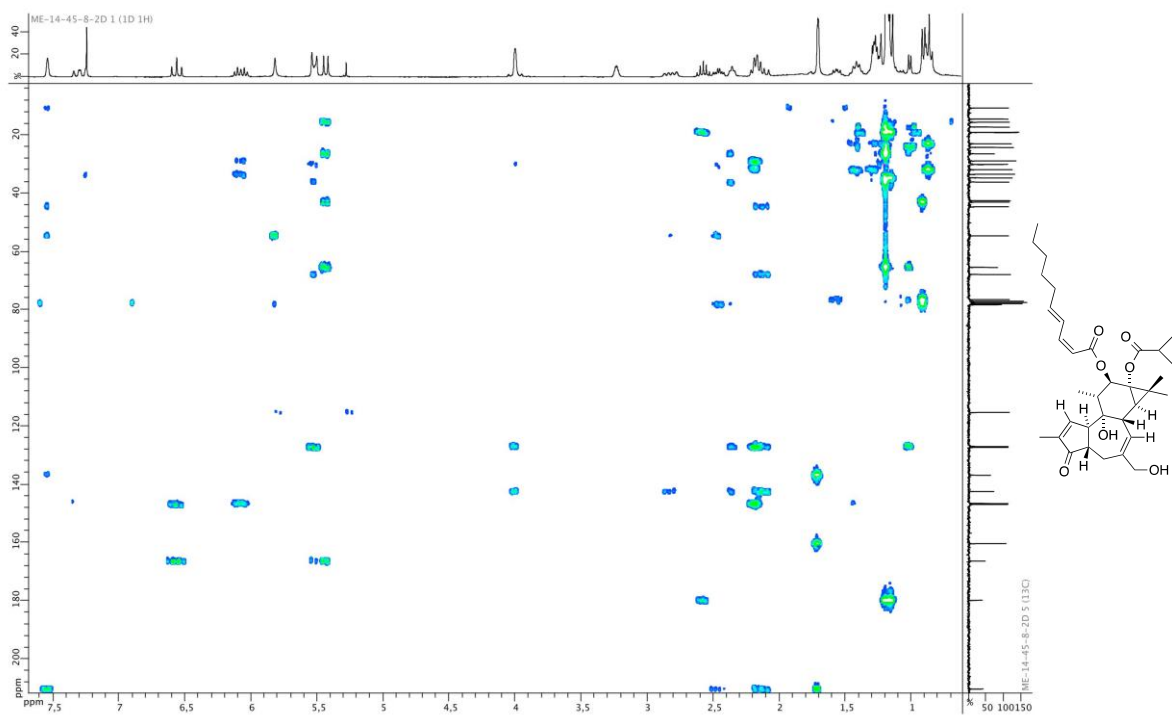
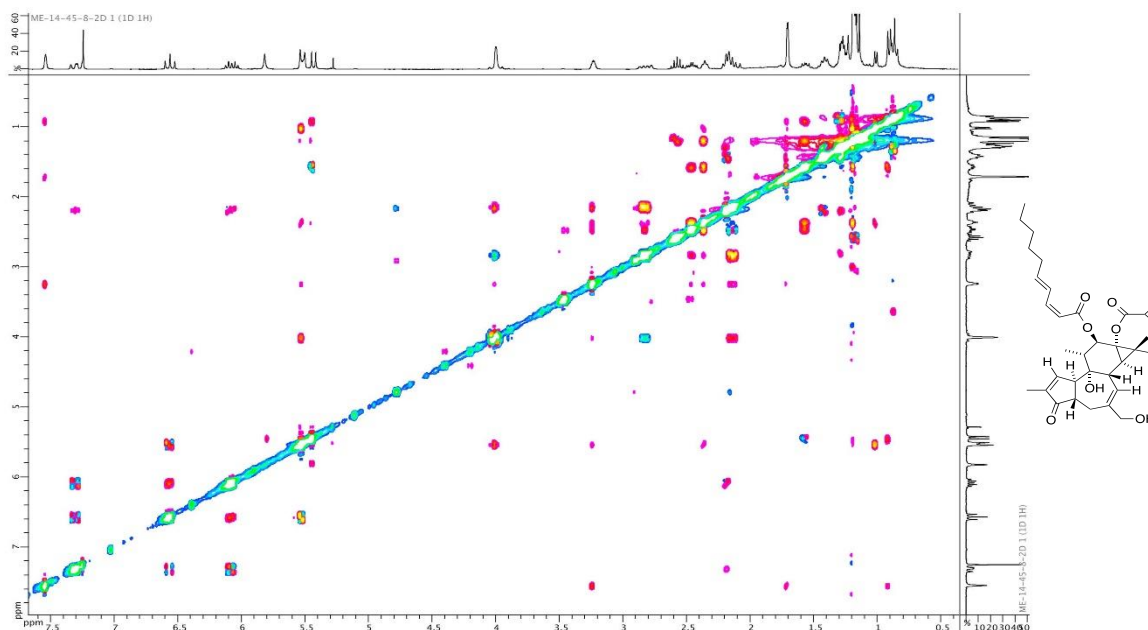
Figure S7. HSQC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **20****Figure S8.** HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **20**

Figure S9. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **20****Figure S10.** HRESIMS spectrum (TOF) of **20****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

644 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

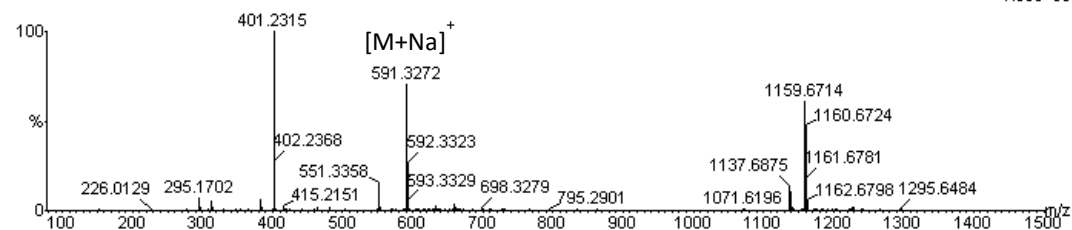
05-Feb-2016 10:55:22

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito28-4 746 (3.473)

1: TOF MS ES+

1.53e+004



Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5

Mass

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
591.3272	591.3263	0.9	1.5	22.5	285.1	7.9	C43 H43 O2
	591.3298	-2.6	-4.4	10.5	277.3	0.0	C34 H48 O7 Na [M+Na] ⁺

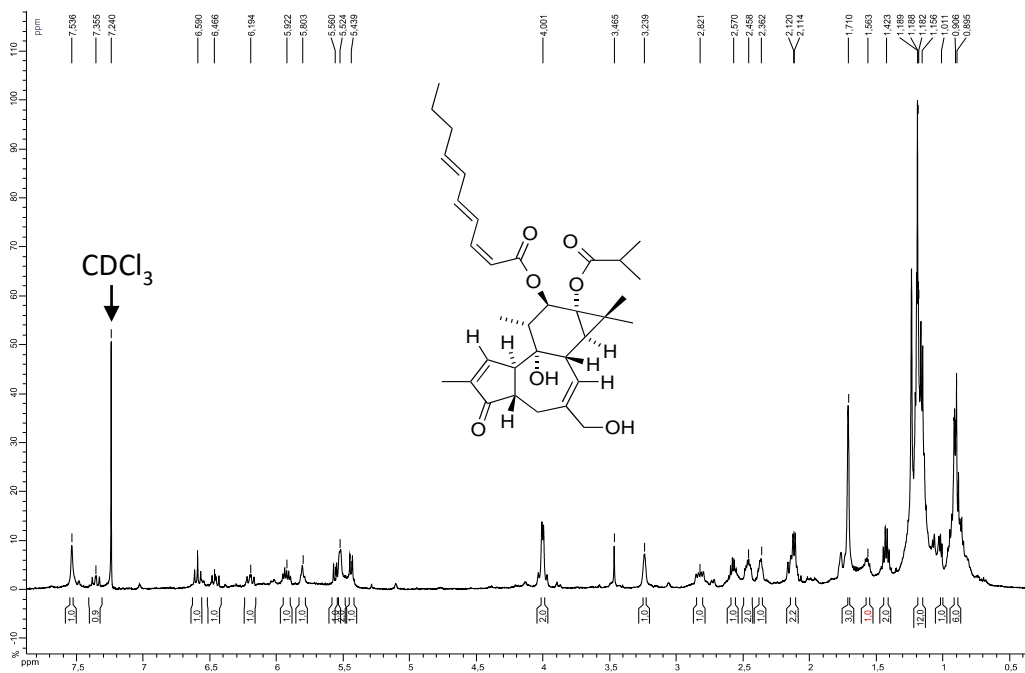
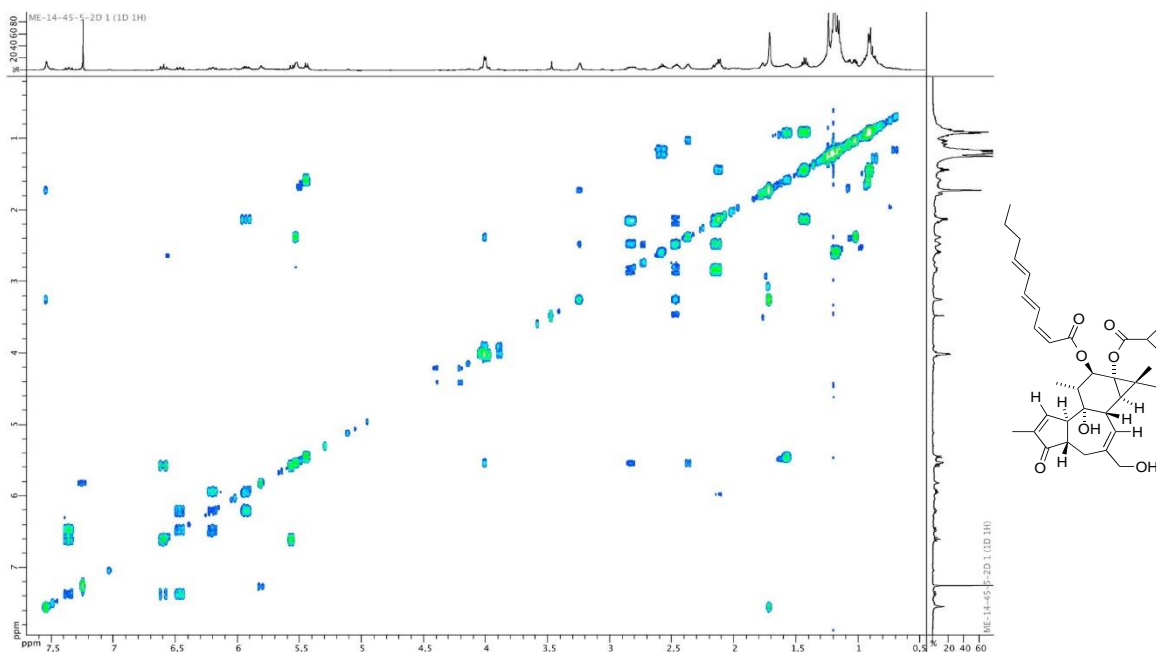
Figure S11. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **21****Figure S12.** COSY NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **21**

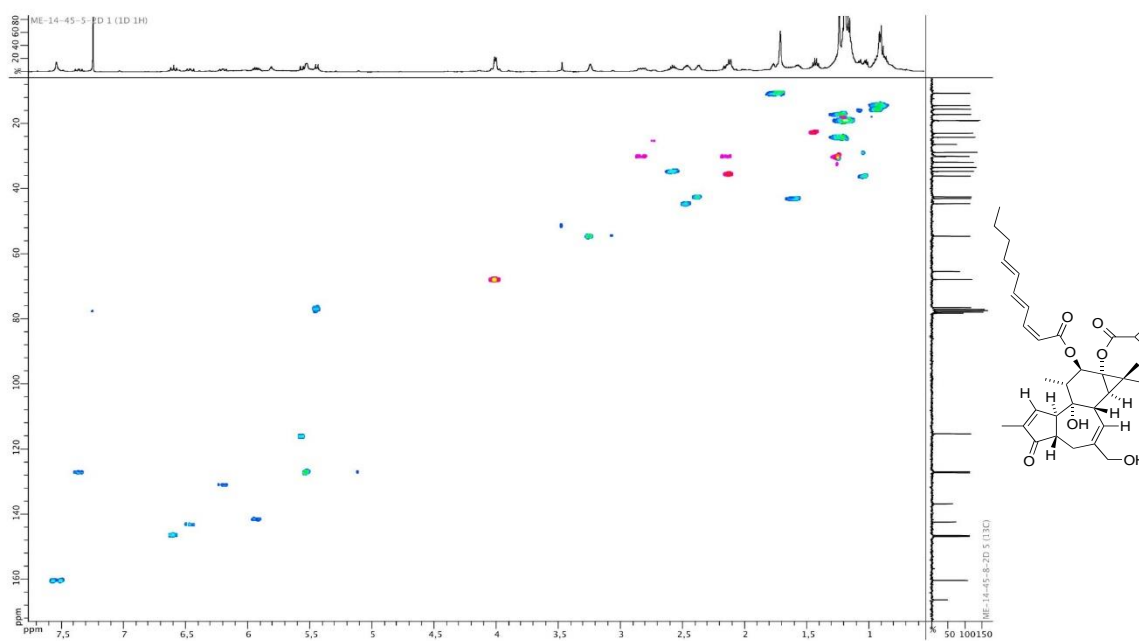
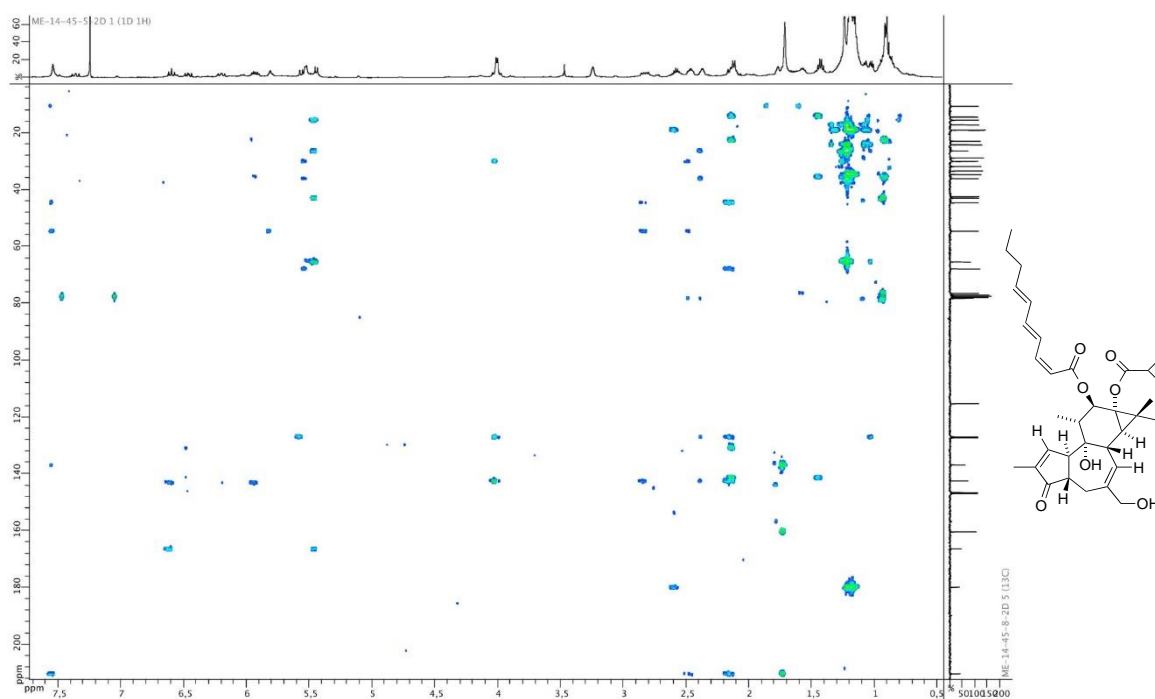
Figure S13. HSQC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **21****Figure S14.** HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **21**

Figure S15. HRESIMS spectrum (TOF) of 21

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

640 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

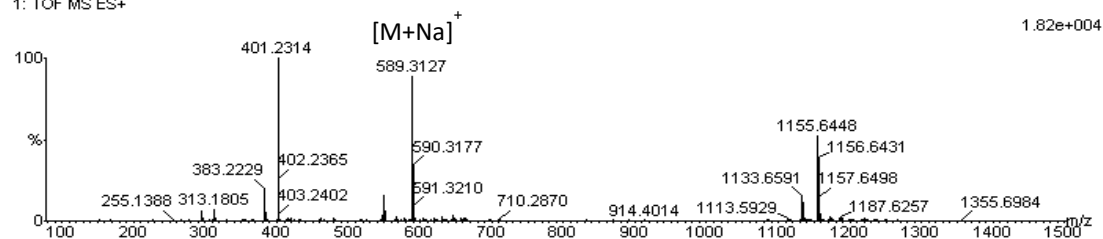
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

05-Feb-2016 10:43:44

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito28-3 732 (3.372)

1: TOF MS ES+



Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
589.3127	589.3141	-1.4	-2.4	11.5	333.4	0.0	C ₃₄ H ₄₆ O ₇ Na [M+Na] ⁺
	589.3107	2.0	3.4	23.5	339.3	5.9	C ₄₃ H ₄₁ O ₂

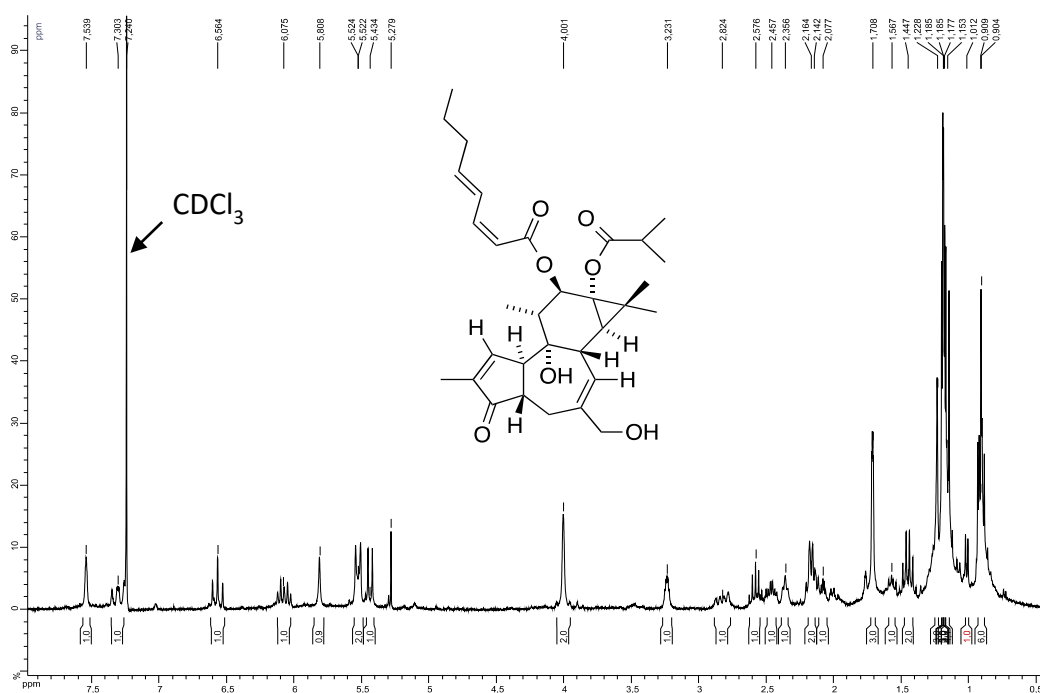
Figure S16. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of 22

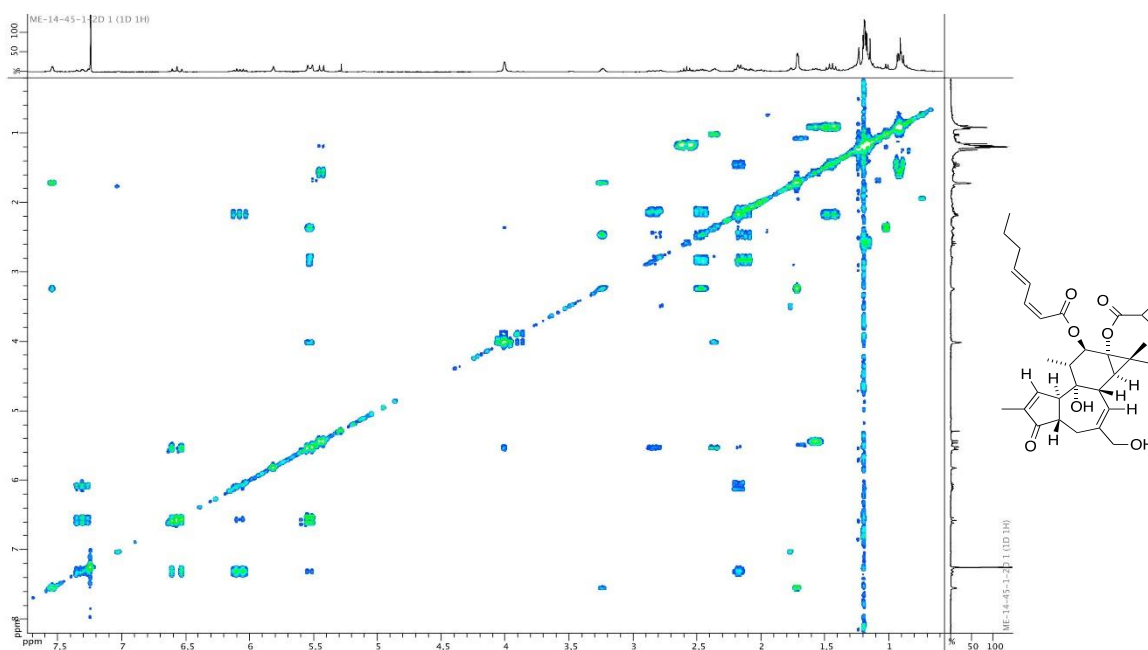
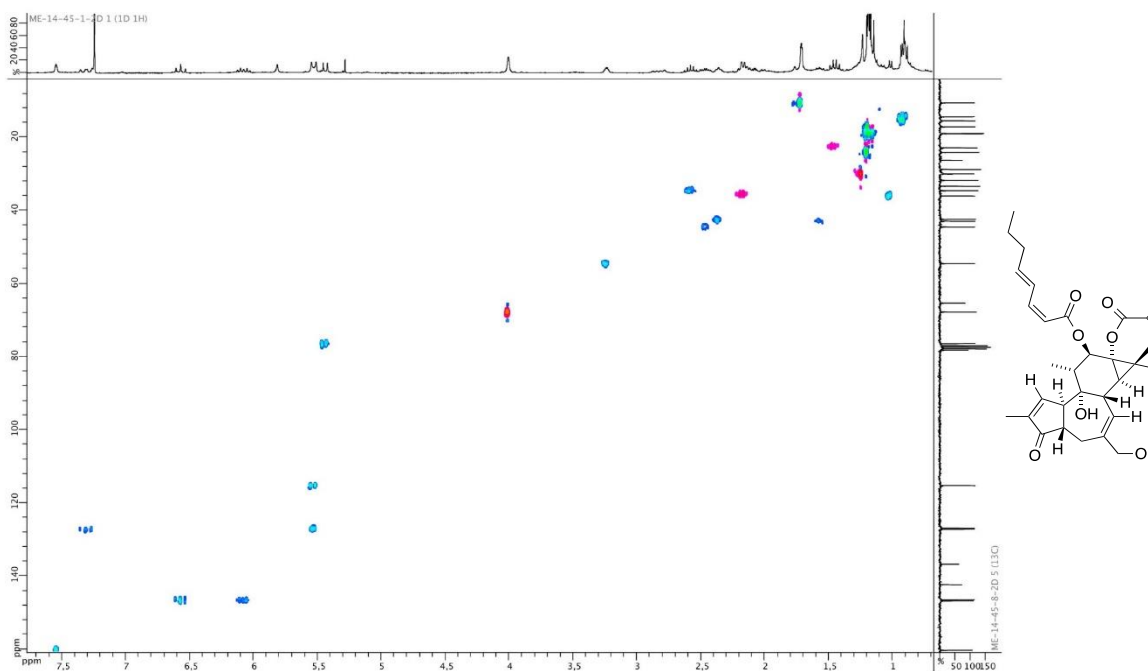
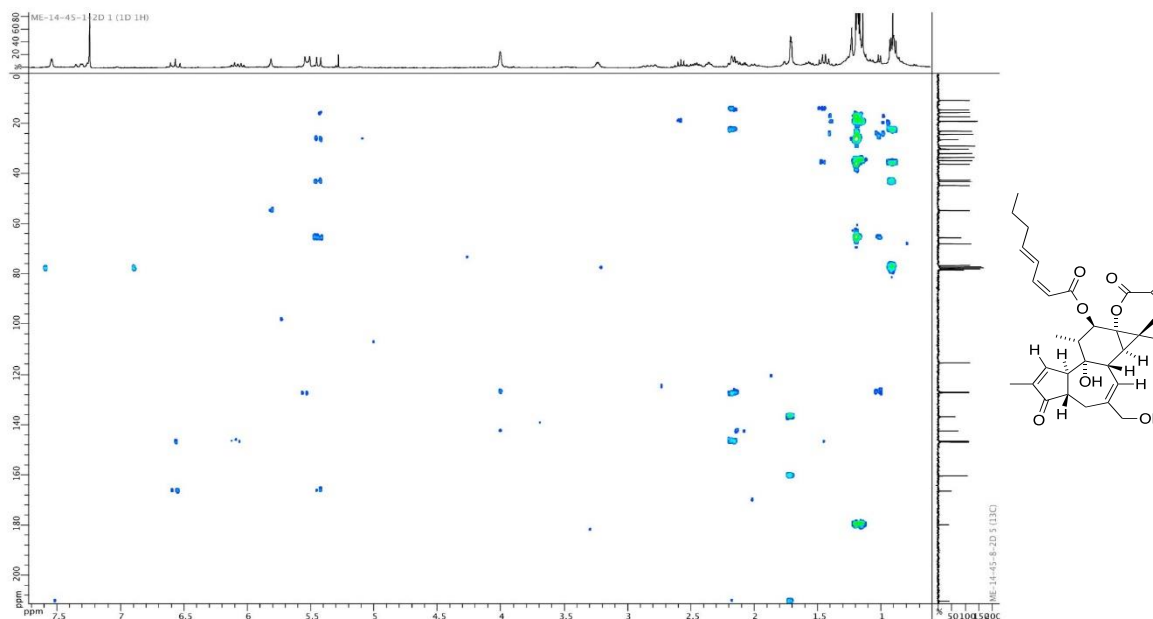
Figure S17. COSY NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **22****Figure S18.** HSQC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **22**

Figure S19. HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **22****Figure S20.** HRESIMS spectrum (TOF) of **22****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

589 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

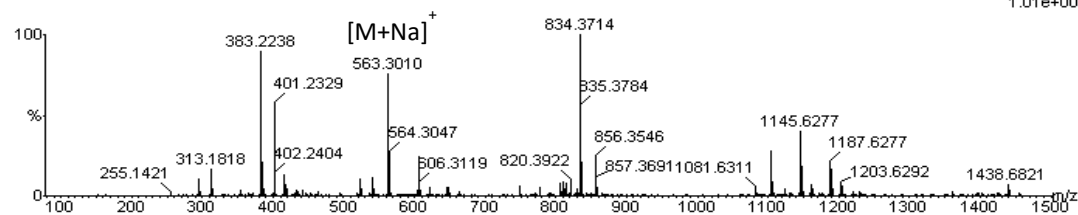
05-Feb-2016 10:20:45

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito28-1 698 (3.229)

1: TOF MS ES+

1.01e+004



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
563.3010	563.3009	0.1	0.2	13.5	271.8	0.3	C ₃₄ H ₄₃ O ₇
	563.2985	2.5	4.4	10.5	273.0	1.4	C ₃₂ H ₄₄ O ₇ Na [M+Na] ⁺

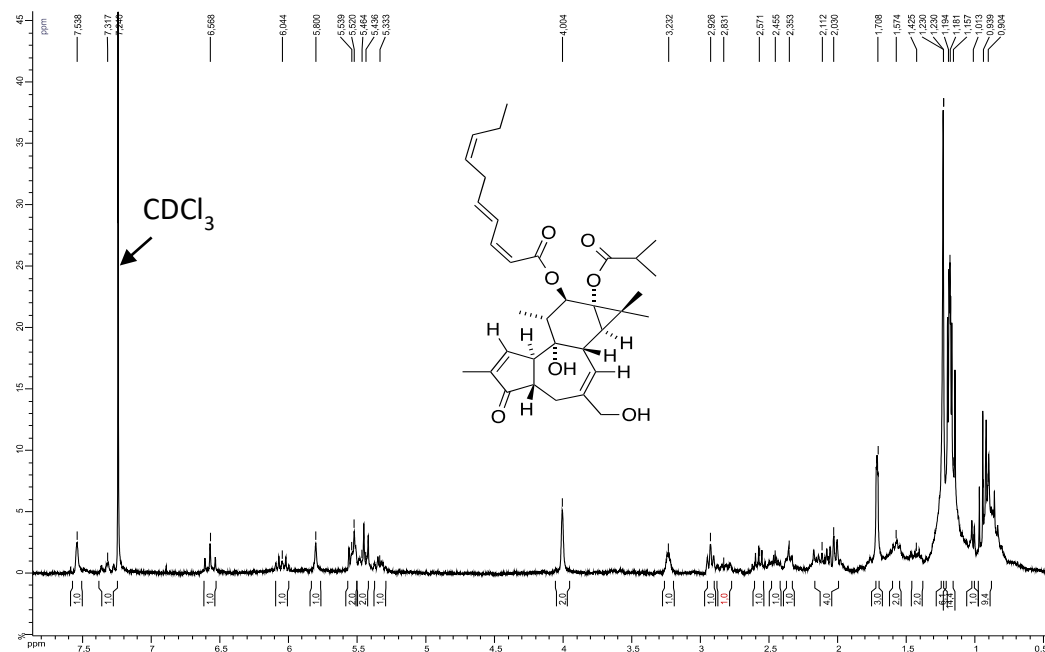
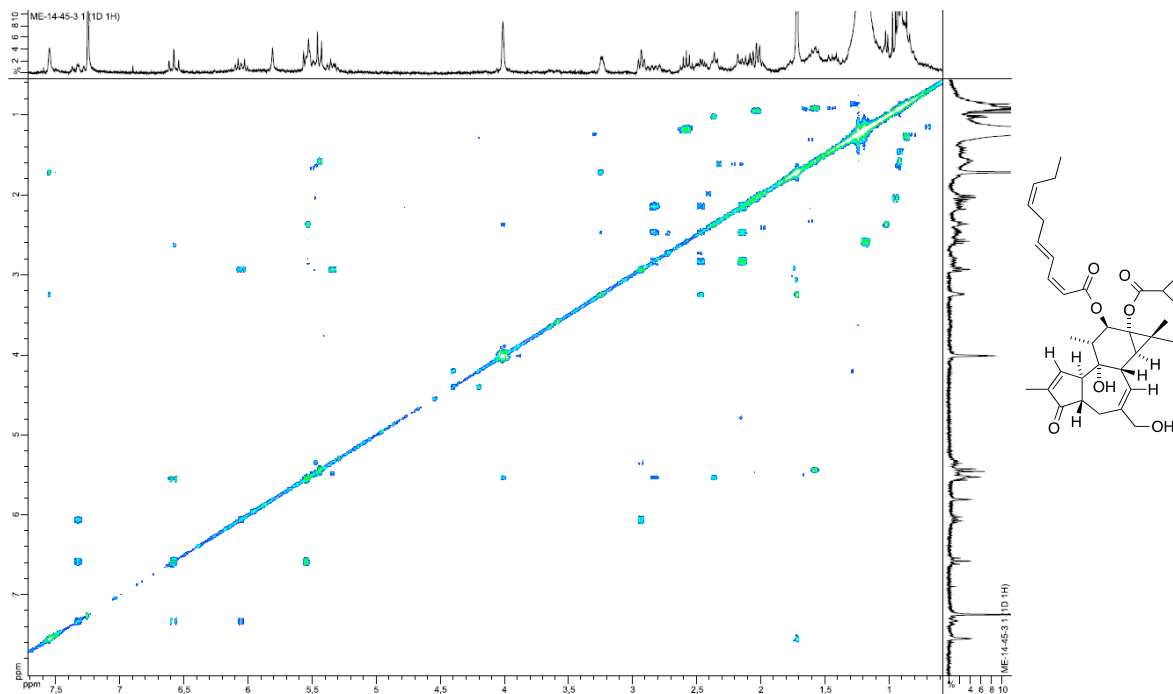
Figure S21. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **23****Figure S22.** COSY NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **23**

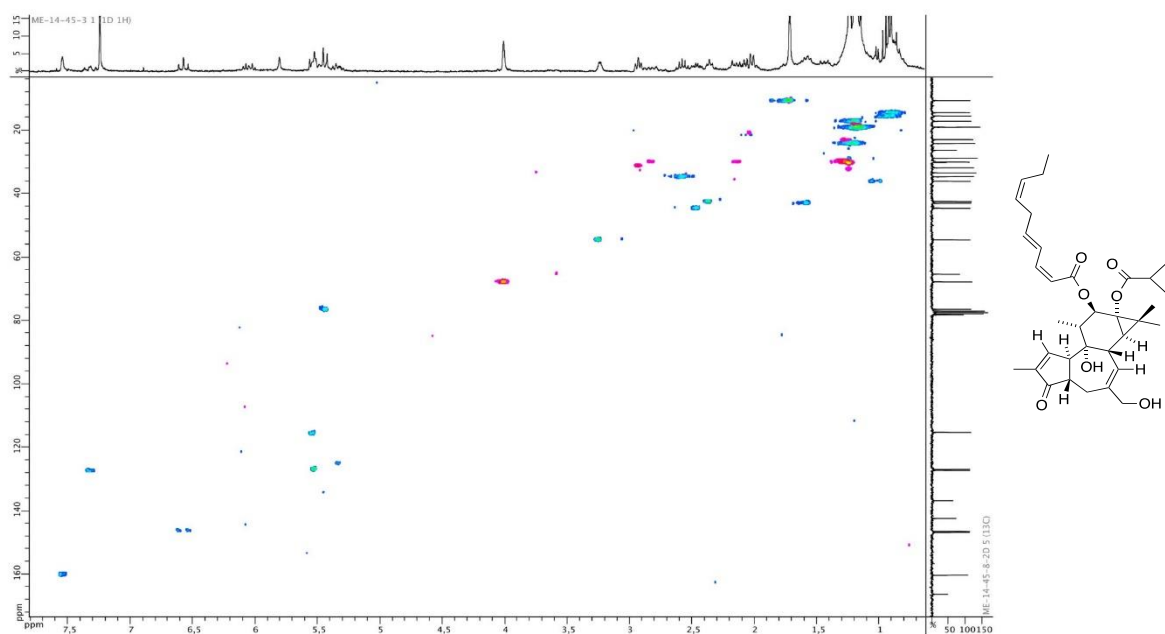
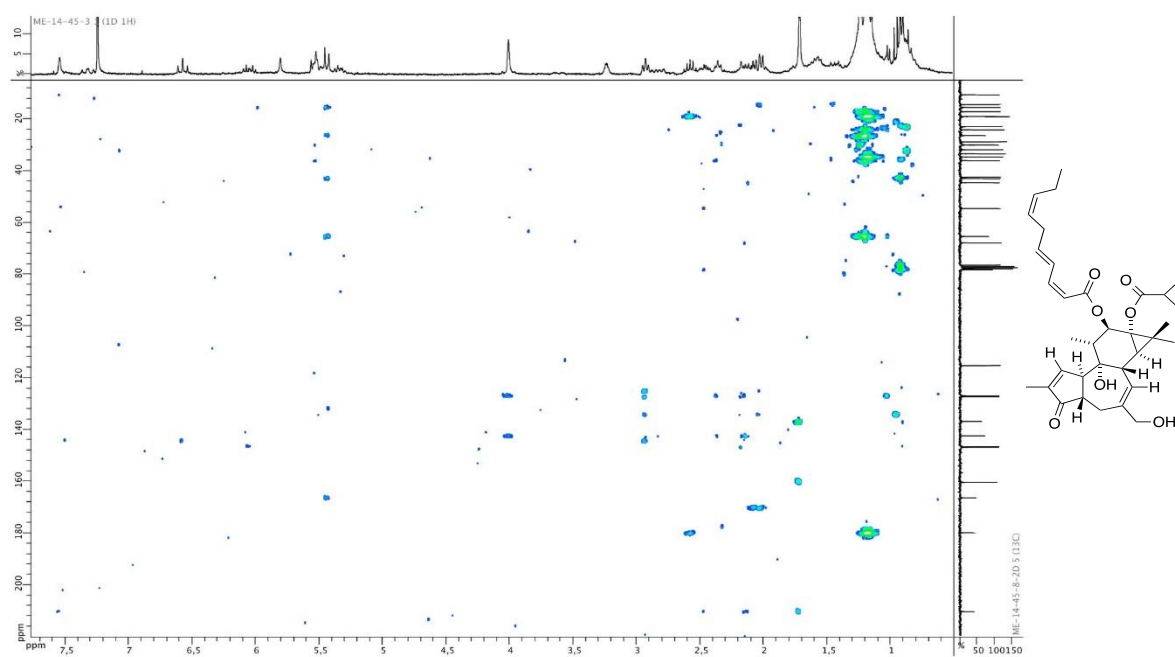
Figure S23. HSQC NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **23****Figure S24.** HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **23**

Figure S25. HRESIMS spectrum (TOF) of **23****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

640 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

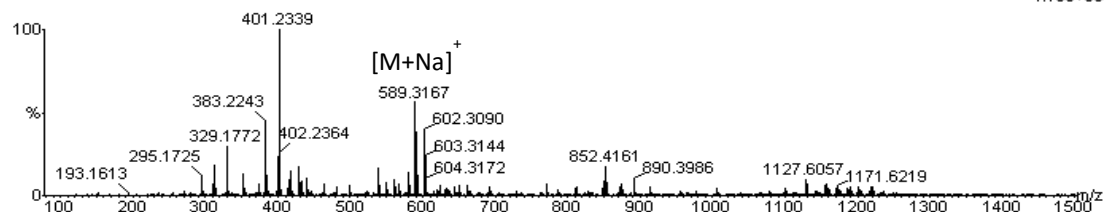
05-Feb-2016 10:32:16

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito28-2 725 (3.347)

1: TOF MS ES+

4.15e+003



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
589.3167	589.3165	0.2	0.3	14.5	303.7	0.8	C36 H45 O7
	589.3141	2.6	4.4	11.5	303.5	0.6	C34 H46 O7 Na [M+Na] ⁺

Figure S26. Table of Antiviral Activities of Compounds **20–23** against CHIKV in Vero Cells ^a

Compound	CHIKV		
	EC ₅₀ ^a	CC ₅₀ ^a	SI ^b
20	0.9 ± 0.1	5.2 ± 0.8	6
21	0.6 ± 0.6	25.8 ± 5.3	41
22	0.4 ± 0.02	13.4 ± 2.6	34
23	12.6 ± 8.4	46.2 ± 18.4	4
Chloroquine	11 ± 7	89 ± 28	8

^aData in μM . Values are the median \pm median absolute deviation calculated from at least three independent assays.

^bSI or window for antiviral selectivity calculated as CC₅₀ Vero/EC₅₀ CHIKV

FIGURES S1–S6 ISSUES DU SUPPORTING INFORMATION DE L'ARTICLE 4

Figure S1. Molecular networking from the MS/MS analysis of *Euphorbia pithyusa*.

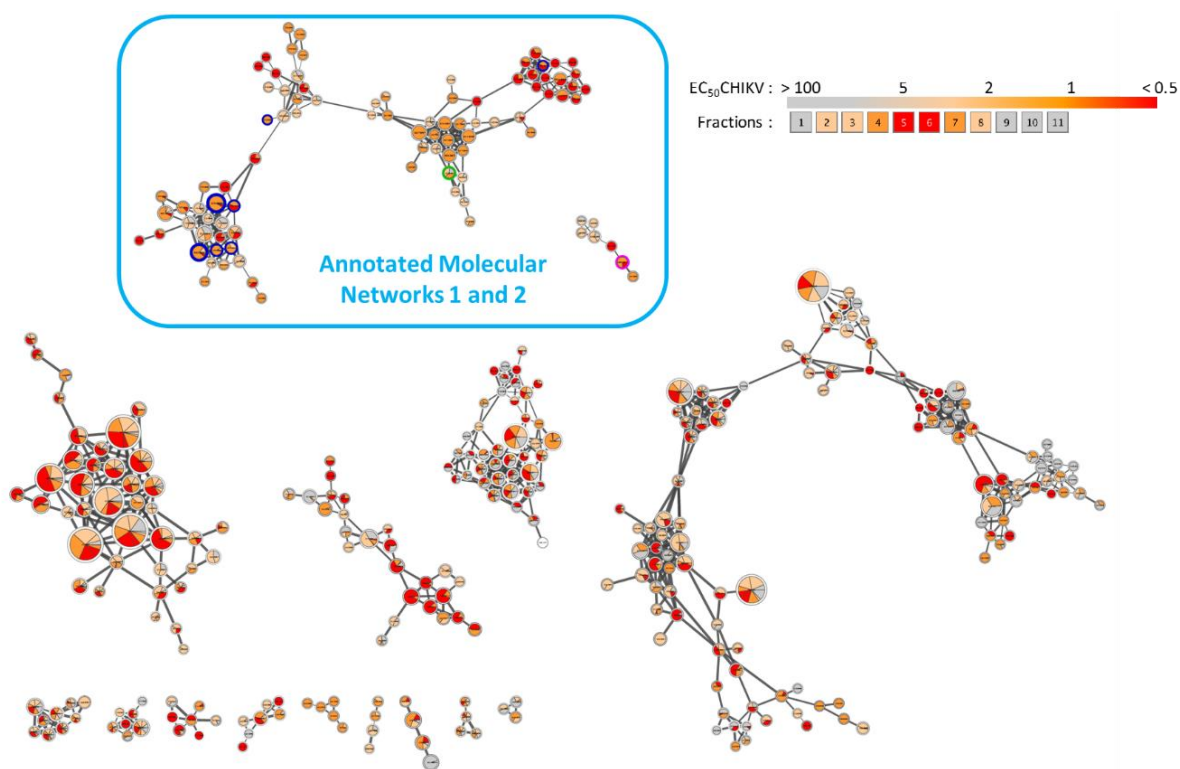


Figure S2. Extracted ion chromatogram of the premyrsinol ester **1** in LC-MS/MS with neutral loss and backbone fragment ions in zoom.

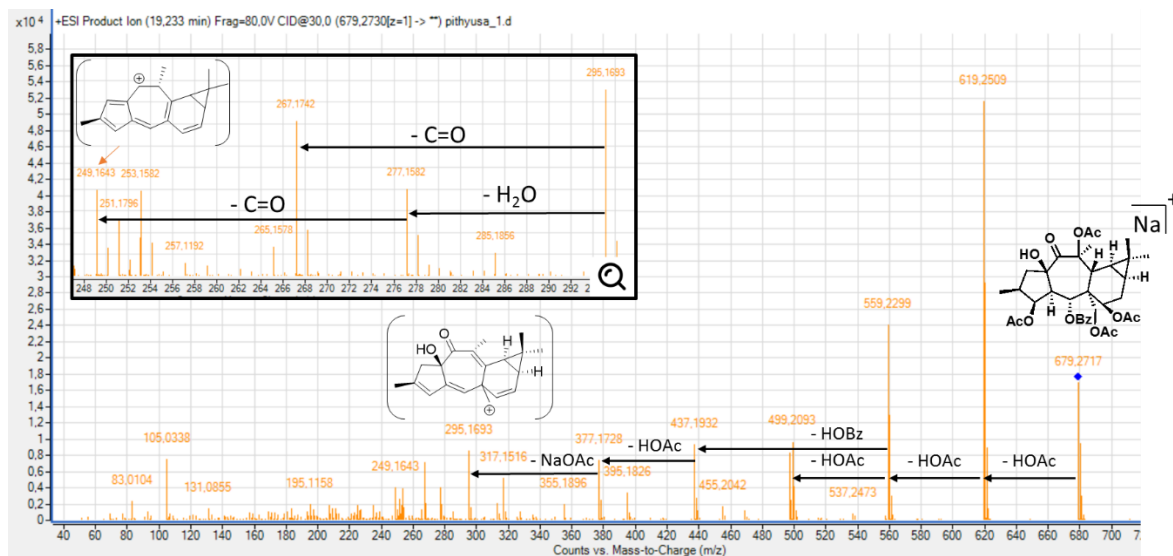


Figure S3. Extracted ion chromatogram of the myrsinol ester **8** in LC-MS/MS with neutral loss and backbone fragment ions in zoom.

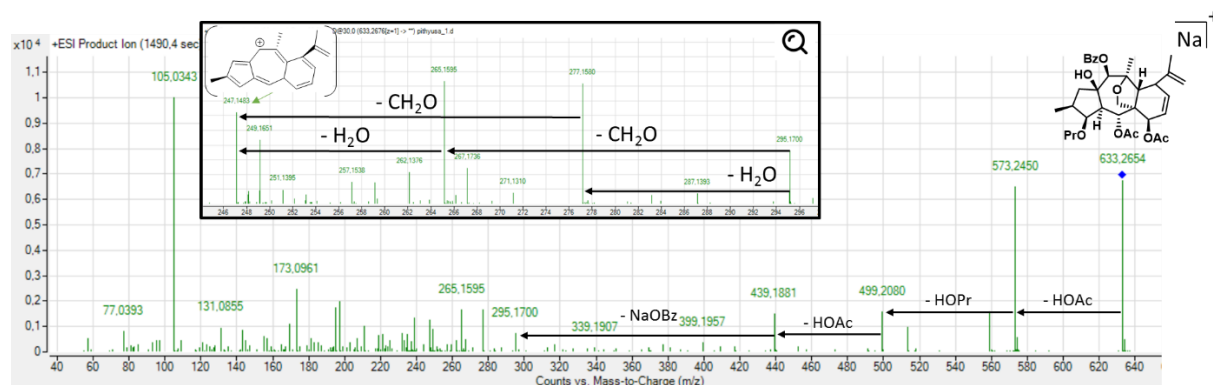


Figure S4. Extracted ion chromatogram of the nicotinoyl-premyrsinol ester **5**, in LC-MS/MS with neutral loss and characteristic backbone fragment ions surrounded in orange, and with ion corresponding to the protonated nicotinic acid surrounded in green.

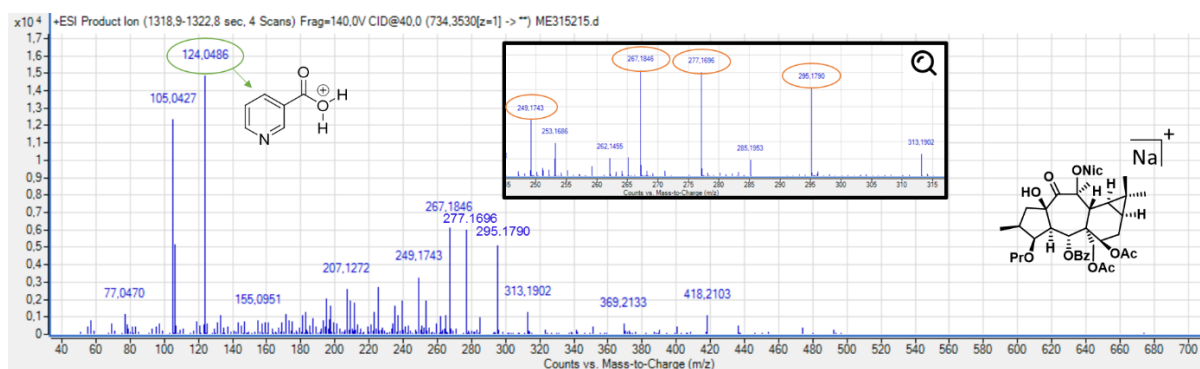


Figure S5. Extracted ion chromatogram of the dideoxyphorbol **10** in LC-MS/MS with neutral loss and backbone fragment ions in zoom.

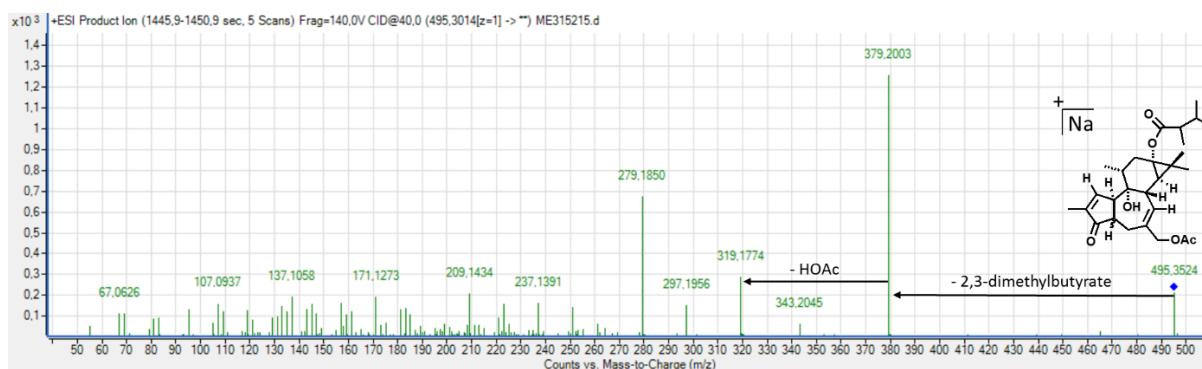
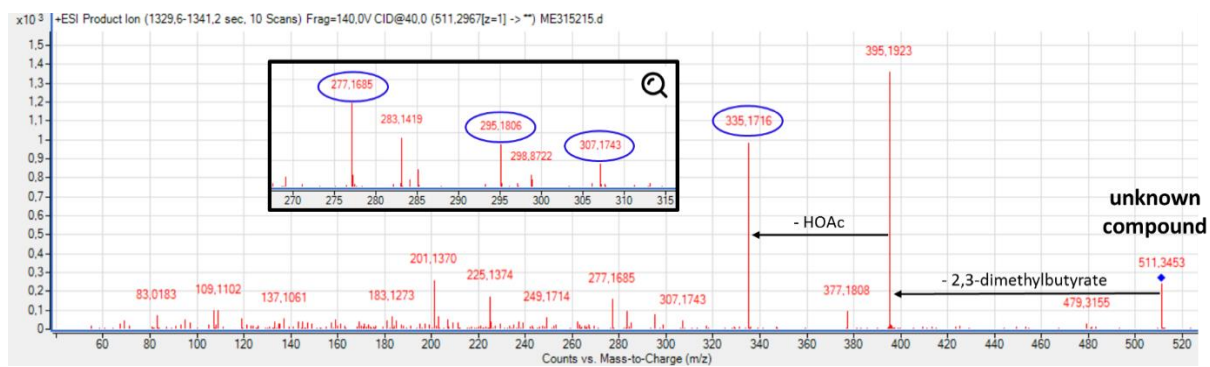


Figure S6. Extracted ion chromatogram of the unknown compound at m/z 511.3453, in LC-MS/MS with neutral loss and characteristic backbone fragment ions of deoxyphorbol esters surrounded in blue.



SUPPORTING INFORMATION DU
MANUSCRIT 5

Table S1. Comparative botanical characteristic of the two subspecies of *Euphorbia pithyusa* (ssp. *pithyusa* and ssp. *cupanii*)

subspecies	<i>pithyusa</i>	<i>cupanii</i>
biological type	chamephyte : initial ramification begins at a certain height from the ground, so that the plant assumes the appearance of a very branched bush	rhizomatous geophyte : simple upright branches, originating from the base, all originating from a bush with several stems
growth areas	sandy and rocky areas of the Mediterranean coast at low altitudes	upright shrub, uncultivated areas such as road borders, and the banks of river at various altitude
repartition	Steno-Mediterranean	Corso-Sardinia-Sicily
height	10 to 130 cm	Until 1 m
leaves	clamped on very branched stems, branches bearing groups of sterile branches ; leaves of the lower part of the stem are linear or lanceolate, glaucous, somewhat coriaceous, acute and with raised margins, while the upper leaves are larger and less dense	the rhizome of this species emits many branching ascending, glaucous, simple and devoid of leaves underneath ; leaves are of equal size, linear-lanceolate, increasing and arched in a vegetative period reflected during the flowering
cyathium	May to September umbel with 5 to 7 bifid rays	June to October Umbel with 5 to 10 bifid rays
glands	Yellow, crescent and shaped	Large, semi-lunar, yellow, lateral horns with a rounded apex
capsule	greenish and smooth	globose, ovoid, deeply furrowed and finely striated
seeds	dark and oval with small dimples	ovoid, finely alveolate with whitish areas superimposed on dark areas
number of chromosomes	2n = 28	2n = 36

Figure S2. *Euphorbia pithyusa* and *E. pithyusa* ssp. *cupanii* herbiums.**Table S3.** Crystal Data of Compounds **11d**, **11f**, **11h**, **12**, and **15b**

Identification code	Compound 11d	Compound 11f	Compound 11h	Compound 12	Compound 15b
Empirical formula	C ₄₀ H ₄₄ O ₁₁	C ₃₉ H ₄₃ NO ₁₁	C ₄₀ H ₄₄ NO ₁₁	C ₃₇ H ₄₆ O ₁₃	C ₃₈ H ₄₄ O ₁₀
Structure					
Formula weight	700.75	701.74	714.16	698.74	660.73
Temperature (K)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)
Wavelength (Å)	1.54187	1.54187	1.54187	1.54187	1.54187
Unit cell dimensions					
a (Å)	9.5854(9)	9.5382(3)	9.4658(6)	10.1182(2)	10.1182(2)
b (Å)	17.8136(17)	13.4084(4)	13.6587(8)	13.8736(2)	13.8736(2)
c (Å)	21.264(2)	28.913(2)	28.643(2)	24.3877(17)	24.3877(17)

Annexes

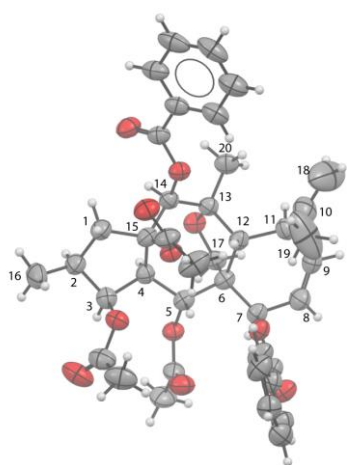
α (°)	90	90	90	90	90
β (°)	90	90	90	90	90
γ (°)	90	90	90	90	90
Volume (Å ³)	3697.7(3)	3630.9(6)	3703.3(4)	1837.3(3)	3423.4(3)
Z,	4,	4,	4,	2,	4,
Calcd Density (Mg/m ³)	1.259	1.284	1.282	1.263	1.282
Abs ^o coefficient (mm ⁻¹)	0.754	0.777	0.771	0.796	0.758
F(000)	1488	1488	1516	744	1408
Crystal size (mm)	0.36 x 0.20 x 0.20	0.25 x 0.11 x 0.08	0.06 x 0.03 x 0.02	0.60 x 0.36 x 0.26	0.46 x 0.25 x 0.10
θ range-data collection (°)	3.548 to 68.237	3.236 to 68.233	3.086 to 63.670	2.684 to 68.247	3.625 to 68.265
Limiting indices	-11 ≤ h ≤ 11, -15 ≤ k ≤ 16, -34 ≤ l ≤ 30	-9 ≤ h ≤ 11, -19 ≤ k ≤ 20, -25 ≤ l ≤ 25	-9 ≤ h ≤ 10, -15 ≤ k ≤ 15, -32 ≤ l ≤ 33	-14 ≤ h ≤ 14, -11 ≤ k ≤ 11, -20 ≤ l ≤ 18	-8 ≤ h ≤ 11, -16 ≤ k ≤ 16, -29 ≤ l ≤ 29
Reflect ^o collected/unique	44844 / 6764	32777 / 6529	31812 / 6042	35624 / 6592	32289 / 6200
R(int)	0.0541	0.0654	0.0976	0.0482	0.0458
Completeness to θ_{full} (%)	99.9	98.2	99.4	99.5	99.6
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents				
Max. and min. transmission	0.86 and 0.73	0.94 and 0.78	0.99 and 0.76	0.81 and 0.66	0.93 and 0.73
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2				
Data/restraints /parameters	6759 / 10 / 466	6525 / 0 / 466	6042 / 72 / 74	6583 / 1 / 461	6199 / 0 / 440
Goodness-of-fit on F^2	0.999	0.855	0.900	1.122	0.998
R1 [I>2 σ (I)]	0.0550,	0.0389,	0.0674,	0.0360,	0.0373,
wR2	0.1291	0.0659	0.1224	0.0883	0.0795
R1 (all data)	0.1448,	0.1198,	0.2273,	0.0479,	0.0958,

Annexes

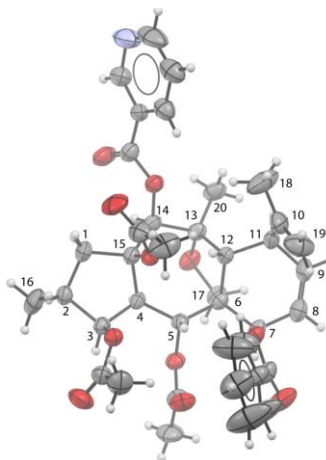
wR2	0.1937	0.0861	0.1822	0.1069	0.1127
Flack parameter	0.04(7)	0.09(8)	-0.07(16)	-0.04(5)	-0.19(7)
Extinction coefficient	n/a	n/a	n/a	0.0044(4)	n/a
Largest Δ peak & hole (e. \AA^3)	0.181 and -0.232	0.156 and -0.152	0.188 and -0.245	0.182 and -	0.183 and -
				0.181	0.191

Figure S4. Ortep View of Compounds **11d**, **11f**, **11h**, **12**, and **15b**.

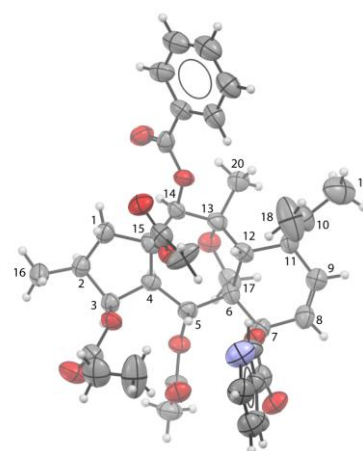
Ortep view of **11d** (CCDC number: 1518591)



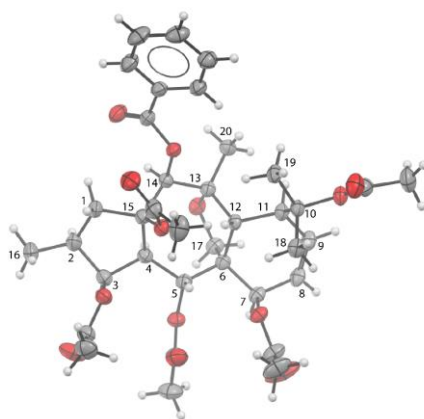
Ortep view of **11f** (CCDC number: 1518592)



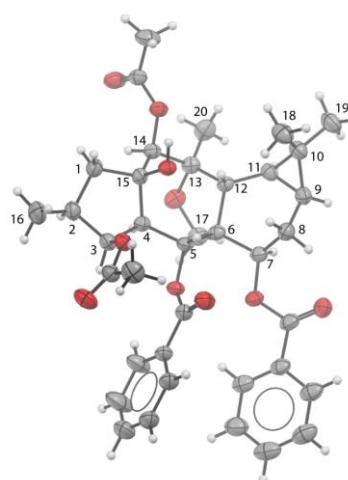
Ortep view of **11h** (CCDC number: 1518593)



Ortep view of **12** (CCDC number: 1518594)



Ortep view of **15b** (CCDC number: 1518590)



Annexes

Table S5. ^1H NMR Data for Compounds **11a**, **11h**, **13** (500 MHz) and **11b**, **11c**, **12** (300 MHz) in CDCl_3 at 300 K, δ_{H} in ppm, J in Hz.

Pos.	11a	11b	11c	11h	Pos.	12	13
1 α	2.96, dd (16.2, 10.3)	2.96, dd (16.2, 10.3)	2.61, dd (14.9, 10.2)	2.85, dd (16.0, 10.8)	1 α	2.75, dd (16.0, 10.9)	2.76, d (16.2)
1 β	2.68, dd (16.2, 9.2)	2.70, dd (16.2, 9.2)	1.53, dd (14.9, 10.2)	2.68, dd (16.0, 9.0)	1 β	2.57, dd (16.0, 9.4)	2.37, d (16.2)
2	2.23, m	2.23, m	2.15, m	2.18, m	2	2.12, m	-
3	5.25, t (3.5)	5.25, t (3.5)	5.23, t (3.7)	5.28, t (3.6)	3	5.23, t (2.3)	5.66, d (4.4)
4	2.96, dd (10.1, 3.5)	2.96, dd (10.1, 3.5)	2.99, dd (11.3, 3.7)	3.19, dd (11.1, 3.6)	4	3.07, dd (11.1, 3.7)	3.21, dd (11.1, 4.4)
5	4.23, dd (10.1, 2.7)	4.23, dd (10.1, 2.7)	6.08, dd (11.3, 1.3)	6.04, dd (11.1, 1.1)	5	5.87, d (11.1)	5.97, d (11.1)
7	5.63, d (6.6)	5.65, d (6.3)	4.82, d (6.4)	5.11, d (6.4)	7	4.87, d (6.2)	4.91, d (6.9)
8	6.21, ddd (9.7, 6.6, 1.4)	6.21, ddd (9.7, 6.3, 1.4)	6.10, ddd (9.5, 6.5, 1.3)	6.25, ddd (9.8, 6.4, 1.5)	8	6.13, ddd (10.0, 6.6, 1.3)	6.17, ddd (10.0, 6.9, 1.5)
9	5.84, dd (9.7, 5.0)	5.84, dd (9.7, 5.0)	5.83, dd (9.6, 5.7)	5.90, dd (9.8, 5.6)	9	5.94, dd (10.0, 5.6)	5.92, dd (10.0, 5.8)
11	3.28, dd (5.0, 4.1)	3.28, dd (5.0, 4.1)	3.16, dd (5.7, 3.5)	3.27, dd (5.6, 3.5)	11	3.31, dd (5.6, 3.5)	3.17, dd (5.8, 3.5)
12	3.25, d (4.1)	3.25, d (4.1)	3.86, d (3.5)	3.47, d (3.5)	12	3.13, d (3.5)	3.40, d (3.5)
14	5.21, s	5.21, s	5.19, s	5.28, br s	14	5.33, br s	
16	0.89, d (6.8)	0.89, d (6.8)	0.85, d (6.8)	0.80, d (6.8)	16	0.80, d (6.7)	1.60, s
17a	4.20, d (12.0)	4.20, d (12.0)	4.18, d (8.8)	4.11, d (8.6)	17a	4.01, d (8.9)	3.99, d (9.2)
17b	3.48, d (12.0)	3.49, d (12.0)	3.58, d (8.8)	3.60, dd (8.6, 1.5)	17b	3.44, dd (8.9, 1.2)	3.48, d (9.2)
18a	4.92, br s	4.92, br s	4.86, br s	4.87, br s	18	1.46, br s	1.58, s
18b	4.87, br s	4.87, br s	4.74, br s	4.11, br s			
19	1.91, s	1.92, s	1.93, s	1.91, s	19	1.73, s	1.53, s
20	1.29, s	1.29, s	1.30, s	1.31, s	20	1.24, s	1.42, s
3-OR ₁	1.69, s	2.08, q (7.6)	1.96, s	2.12, q (7.5)	2-Obz		7.91, d (7.7)
		0.67, t (7.6)		0.93, t (7.5)			7.40, t (7.7)
5-OR ₂	3.85, br s	3.94, br s	7.88, d (7.5)	1.94, s			7.52, t (7.7)
			7.39, t (7.5)		3-OAc	2.01, s	1.96, s
			7.51, t (7.5)		5-OAc	1.94, s	1.97, s
7-OR ₃	8.01, d (7.6)	8.00, d (7.6)	2.12, s	9.17, br s	7-OAc	1.95, s	2.12, s
	7.38, t (7.6)	7.38, t (7.6)		8.75, br s	10-OAc	2.15, s	2.15, s
	7.53, t (7.6)	7.53, t (7.6)		8.33, br d (7.6)	14-OBz	7.86, d (7.4)	
				7.44, m		7.39, t (7.4)	

Annexes

14-OR ₄	7.94, d (7.6)	7.94, d (7.6)	8.09, d (7.4)	7.94, d (7.4)		7.53, t (7.4)	
	7.41, t (7.6)	7.41, t (7.6)	7.45, t (7.4)	7.42, t (7.4)	15-OAc	1.95, s	1.94, s
	7.55, t (7.6)	7.55, t (7.6)	7.58, t (7.4)	7.56, t (7.4)			
15-OR ₅	2.02, s	2.02, s	2.75, br s	2.20, s			

Table S6. ¹H NMR Data for Compounds **14a**, **15a**, **15b** (500 MHz) and **14b**, **14c**, **15c** (300 MHz) in CDCl₃ at 300 K (δ_{H} in ppm, J in Hz).

Pos.	14a	14b	14c	15a	15b	15c
1 α	2.66, dd (15.5, 11.1)	3.35, dd (14.6, 9.9)	3.36, dd (18.0, 12.0)	2.58, dd (14.6, 10.5)	2.46, dd (14.6, 10.1)	2.59, dd (14.5, 10.2)
1 β	1.75, dd (15.5, 6.8)	1.48, m	1.47, m	1.53, dd (14.6, 10.1)	1.48, dd (14.6, 10.1)	1.52, dd (14.5, 9.8)
2	2.17, m	2.16, m	2.18, m	2.12, m	2.02, m	2.11, m
3	5.32, dd (5.0, 4.1)	5.23, t (4.5)	5.28, t (4.5)	5.16, t (3.8)	4.98, t (3.6)	5.18, br t (3.3)
4	3.11, dd (10.8, 4.1)	2.54, dd (10.4, 4.5)	2.54, dd (12.4, 4.5)	3.07, dd (10.5, 3.8)	2.98, dd (10.4, 3.6)	3.07, dd (10.3, 3.3)
5	5.93, dd (10.8, 1.3)	6.06, d (10.4)	6.06, d (12.4)	5.94, d (10.5)	5.94, d (10.4)	5.92, d (10.3)
7	4.70, dd (11.0, 2.7)	4.77, dd (10.2/2.9)	4.78, dd (10.2, 2.9)	4.67, dd (11.1, 2.6)	4.80, dd (11.1, 2.9)	4.66, dd (10.9, 1.9)
8 α	1.87, m	1.88, m	1.88, m	1.84, m	2.00, m	1.84, m
8 β	1.45, m	1.46, m	1.49, m	1.43, m	1.68, m	1.42, m
9	1.03, m	1.01, m	1.01, m	0.96, m	0.90, m	0.96, dd (17.0, 8.3)
11	0.65, dd (9.6, 7.2)	0.73, m	0.73, m	0.63, dd (9.5, 7.8)	0.68, dd (9.5, 7.5)	0.63, dd (8.3, 7.5)
12	3.06, d (7.2)	2.78, d (6.6)	2.80, d (7.4)	3.48, d (7.8)	3.39, d (7.5)	3.48, d (7.5)
14	-	-	-	5.15, s	4.93, s	5.14, br s
16	0.90, d (7.2)	0.85, d (7.0)	0.85, d (7.0)	0.79, d (6.8)	0.77, d (6.8)	0.78, d (7.0)
17a	4.52, d (9.6)	4.27, d (9.9)	4.25, d (11.7)	4.52, d (9.3)	4.59, d (9.5)	4.51, d (9.3)
17b	3.87, d (9.6)	3.87, d (9.9)	3.86, d (11.7)	3.73, dd (9.3, 0.9)	3.91, dd (9.5, 1.1)	3.73, br d (9.3)
18	1.02, s	1.05, s	1.05, s	1.08, s	1.09, s	1.08, s
19	1.04, s	1.08, s	1.08, s	1.22, s	1.15, s	1.21, s
20	1.38, s	1.51, s	1.51, s	1.27, s	1.26, s	1.27, s
3-OR ₁	2.12, s	2.12, s	2.45, q (7.5)	2.13, s	2.08, s	2.49, q (7.4)

Annexes

			1.21, t (7.5)			1.16, t (7.4)
5-OBz	7.97, d (7.4)	7.90, d (8.0)	7.90, d (8.0)	7.96, d (7.4)	7.57, d (7.3)	7.95, d (7.3)
	7.41, t (7.4)	7.40, t (8.0)	7.40, t (8.0)	7.41, t (7.4)	7.03, t (7.3)	7.41, t (7.3)
	7.53, t (7.4)	7.52, t (8.0)	7.52, t (8.0)	7.51, t (7.4)	7.20, t (7.3)	7.52, t (7.3)
7-OAc or 7-OR ₂	1.26, s	1.35, s	1.36, s	1.29, s	7.52, d (7.3)	1.28, s
					7.02, t (7.3)	
					7.20, t (7.3)	
14-OR ₃				8.08, d (7.6)	2.15, s	8.07, d (7.5)
				7.47, t (7.6)		7.47, t (7.5)
				7.58, t (7.6)		7.59, t (7.5)
15-OR ₂ or OH	3.19, br s	2.13, s	2.13, s	2.74, br s	2.78, br s	2.77, br s

Table S7. ¹³C NMR Data for Compounds **11a**, **11h**, **13**, **14a**, **15a**, **15b** (125 MHz), and **11b**, **11c**, **12**, **14b**, **14c**, **15c**, (75 MHz), (CDCl₃ at 300 K, δ_C in ppm).

Pos.	11a	11b	11c	11h	Pos.	12	13	Pos.	14a	14b	14c	15a	15b	15c
1	43.6	43.6	51.3	44.1		43.2	47.7	1	46.4	42.3	42.3	51.8	51.8	51.8
2	36.2	36.2	36.4	37.0		36.8	88.0	2	33.9	35.4	35.6	36.1	36.5	36.0
3	80.9	80.3	79.1	77.0		77.2	78.8	3	79.3	77.5	77.5	79.3	79.7	79.1
4	55.0	54.7	51.6	52.2		52.1	49.6	4	52.5	53.7	53.9	53.1	53.6	53.1
5	66.4	66.2	70.3	69.7		69.2	68.9	5	68.4	68.4	68.4	68.6	69.0	68.5
6	54.3	54.3	55.2	54.9		54.4	55.7	6	54.7	54.2	54.1	53.5	53.4	53.5
7	65.7	65.6	64.1	65.8		63.3	63.7	7	77.0	77.2	77.2	77.1	77.5	77.2
8	123.2	123.2	123.9	123.7		124.8	125.4	8	25.2	24.3	24.2	25.4	25.9	25.3
9	133.6	133.6	133.5	134.7		131.4	131.0	9	24.8	24.1	24.1	24.6	24.4	24.7
10	147.9	147.7	147.6	147.3		85.9	85.7	10	20.3	19.2	19.2	20.1	20.0	20.3
11	42.1	41.9	41.5	42.0		41.3	44.3	11	16.9	17.6	17.6	17.6	17.5	17.6
12	40.3	40.3	39.5	41.0		37.6	38.9	12	41.3	41.3	41.3	39.3	39.4	39.4

Annexes

13	89.4	89.4	89.7	90.0		90.4	92.1	13	88.4	88.5	88.5	86.2	86.4	86.3
14	82.2	82.2	82.4	82.2		82.7	200.9	14	202.8	202.9	202.9	82.3	82.4	82.3
15	90.8	90.6	80.8	90.3		90.6	89.3	15	88.3	90.4	90.4	80.7	80.6	80.7
16	14.3	14.3	14.8	14.4		14.2	19.9	16	15.8	15.1	15.1	15.1	15.4	15.1
17	68.6	68.6	69.3	69.6		69.6	70.8	17	74.8	73.4	73.4	73.1	73.4	73.1
18	112.7	112.7	112.0	113.2		23.3	25.4	18	28.3	28.3	28.3	28.4	28.9	28.5
19	20.6	20.6	21.1	21.1		24.6	21.9	19	15.6	16.2	16.2	16.0	16.1	16.0
20	24.6	24.6	24.1	24.7		25.1	21.0	20	29.4	20.4	20.4	23.3	23.8	23.4
3-OR ₁	172.2	167.9	170.1	174.5	2-Obz		165.3	3-OR ₁	169.9	170.7	173.6	170.1	170.0	173.3
	24.1	27.5	21.3	28.2			130.8		21.3	21.2	28.1	21.4	21.7	28.0
		8.95		9.28			129.8				9.3			9.3
5-OR ₂			164.9	169.7			128.6	5-OBz	165.1	164.9	164.9	165.1	164.8	165.1
			130.0	20.9			133.2		130.5	130.3	130.4	130.9	130.0	130.9
			129.6		3-OAc	171.1	170.8		129.8	129.8	129.8	129.8	130.2	129.8
			128.6			21.2	21.2		128.8	128.8	128.8	128.8	128.5	128.7
			133.1		5-OAc	169.4	169.4		133.5	133.5	133.5	133.3	132.9	133.3
7-OR ₃	165.6	165.3	170.6	164.6		22.7	21.1	7-OAc or 7-OR ₂	170.9	170.6	170.6	171.0	164.2	170.9
	129.1	129.5	21.4	150.9	7-OAc	170.6	170.6		21.0	21.1	21.1	21.1	129.8	21.1
	128.9	131.9		129.8		21.0	21.4						130.1	
	128.1	128.5		137.9	10-OAc	167.8	169.3						128.5	
	132.6	133.6		123.4		23.0	21.6						133.0	
				153.4	14-OBz	166.4		14-OR ₃				166.0	170.8	166.0
14-OR ₄	165.7	165.7	166.1	166.3		129.6						130.1	21.6	130.1
	129.4	131.9		129.4		130.1						129.8		130.0
	130.3	130.0		130.3		128.4						128.8		128.8
	129.7	128.5		128.9		133.4						133.5		133.5
	132.8	133.3		133.7	15-OAc	170.5	170.5	15-OR ₂ or OH		170.6	170.2			
15-OR ₅	167.8	167.8		168.4		21.3	22.7			22.0	20.4			
	22.6	22.6		22.7										

Annexes

Table S8. ^1H and ^{13}C NMR Data for Compounds **16a–c** and **17** (600 MHz) in CDCl_3 at 300 K.

pos.	16a		16b		16c		17	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	7.59, br d (10.4)	161.0	7.59, br s	161.0	7.58, br d (10.4)	161.0	7.65, br s	160.6
2		133.0		133.0		133.0		135.2
3		209.1		209.1		209.1		204.9
4		73.9		73.9		73.9		73.2
5 α	2.47, t (19.0)	38.7	2.47, t (19.0)	38.7	2.47, t (18.2)	38.7	6.88, s	138.1
5 β	2.51, t (19.0)		2.51, t (19.0)		2.50, t (18.2)			
6		140.5		140.5		140.5		148.5
7	5.68, d (4.9)	129.4	5.68, br d (5.0)	129.4	5.68, br d (5.6)	129.4		201.5
8	3.23, m	39.4	3.23, m	39.4	3.22, m	39.4	3.72, d (5.0)	55.8
9		78.4		78.4		78.4		75.6
10	3.24, d (7.4)	56.4	3.25, d (7.4)	56.4	3.24, d (7.4)	56.4	2.21, m	60.1
11	2.15, m	43.5	2.15, m	43.5	2.15, m	43.5	3.30, br t (2.3)	43.5
12	5.44, d (9.8)	76.9	5.46, d (9.8)	76.9	5.43, d (10.3)	76.9	5.46, d (9.8)	76.3
13		65.4		65.4		65.4		65.7
14	1.04, br s	36.5	1.02, br s	36.5	1.05, br s	36.5	1.80, d (5.3)	30.3
15		26.4		26.4		26.4		25.3
16	1.26, s	16.8	1.26, s	17.2	1.25, s	16.8	1.21, s	17.8
17	1.20, s	23.9	1.20, s	24.1	1.19, s	23.9	1.18, s	24.2
18	0.89, d (6.4)	14.3	0.88, d (6.4)	14.3	0.87, d (6.4)	14.3	0.93, d (6.4)	15.2
19	1.76, d (8.2)	10.2	1.75, d (8.2)	10.2	1.75, d (8.2)	10.2	1.82, d (1.8)	11.0
20a	4.03, d (12.9)	68.2	4.03, d (12.9)	68.2	4.02, d (12.5)	68.2	4.38, d (14.0)	64.5
20b	3.98, d (12.9)		3.98, d (12.9)		3.97, d (12.5)		4.27, d (14.0)	
14-OR		167.0		167.0		167.0		167.0
1'	5.84, d (15.4)	121.2	5.84, d (15.4)	121.2	5.53, d (11.3)	115.3	5.53, d (11.3)	115.3
2'	7.58, dd (15.4, 11.1)	140.1	7.58, dd (15.4, 11.1)	140.1	6.54, t (11.3)	145.9	6.55, t (11.3)	145.9
3'	6.11, t (11.1)	126.7	6.11, t (11.1)	126.7	7.30, t (11.3, 15.2)	127.0	7.30, t (11.3, 15.2)	127.0
4'	5.86, dd (11.1, 7.4)	121.2	5.86, dd (11.1, 7.4)	121.2	6.06, ddd (15.2, 7.4, 7.1)	146.3	6.07, ddd (15.2, 7.4, 7.1)	146.3

Annexes

5'	2.26, m	28.5	2.26, m	28.5	2.16, m	33.1	2.16, m	33.1
6'	1.39, m	29.2	1.39, m	29.2	1.40, m	29.1	1.40, m	29.1
7'	1.27, m	31.6	1.27, m	31.6	1.26, m	30.1	1.26, m	28.5
8'	1.26, m	22.9	1.26, m	22.9	1.26, m	28.5	1.26, m	30.1
9'	0.86, t (7.0)	11.8	0.86, t (6.4)	11.8	0.85, t (6.4)	14.2	0.85, t (6.7)	14.2
13-OiBu or MeBu		179.7		178.7		179.7	-	179.7
	2.57, q (7.0)	34.4	2.37, qt (6.9, 7.7)	41.5	2.57, q (7.0)	34.4	2.59, q (7.0)	34.4
	1.18, d (7.0)	18.8	1.12, d (6.9)	16.5	1.18, d (7.0)	18.8	1.18, d (7.0)	18.8
	1.15, d (7.0)	18.7	1.72, qdd (7.6, 7.7, 7.7)	26.4	1.15, d (7.0)	18.7	1.19, d (7.0)	18.7
			1.44, qdd (7.6, 7.7, 7.7)					
			0.92, t (7.6)	11.9				

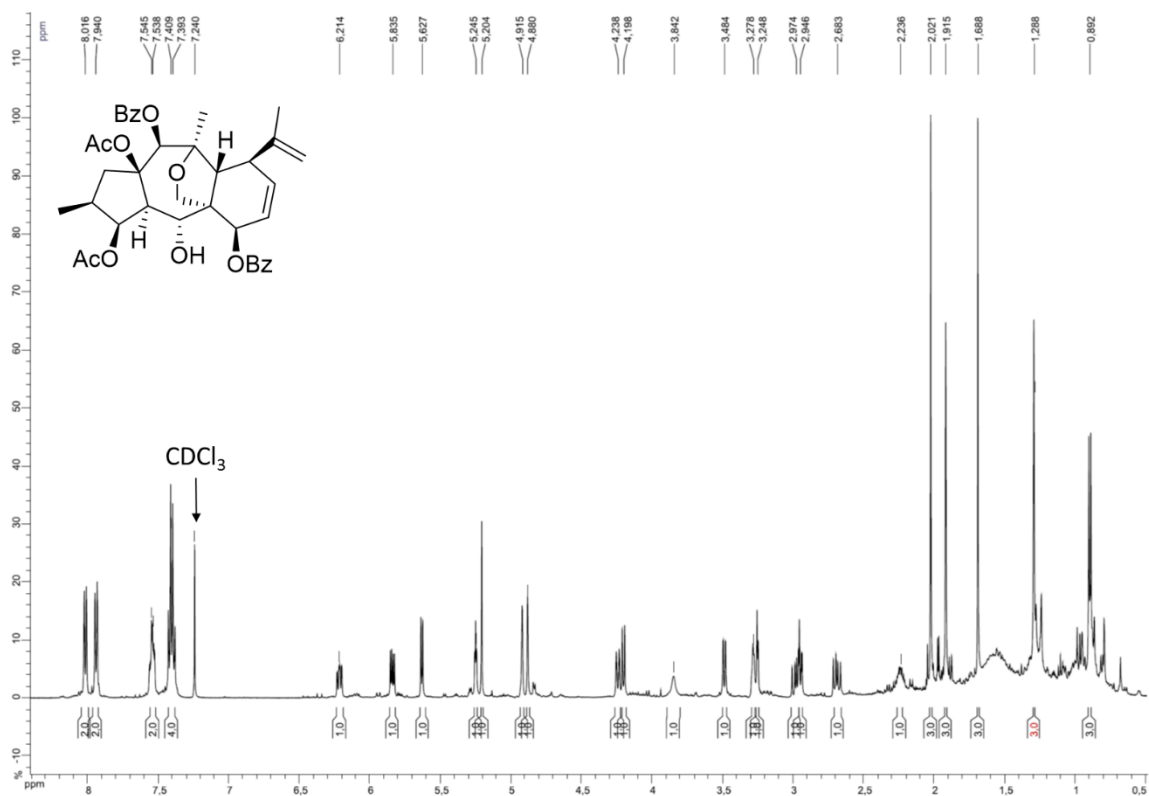
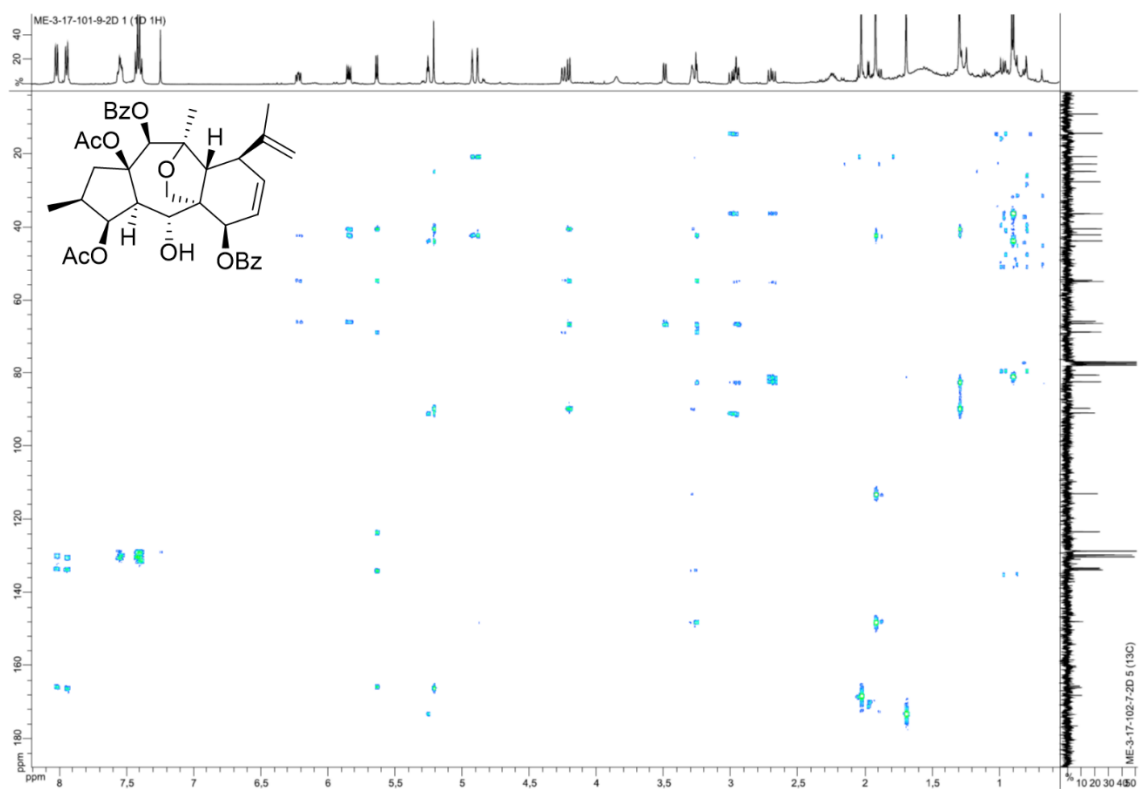
Figure S9. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **11a****Figure S10.** HMBC NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **11a**

Figure S11. HRESIMS spectrum (TOF) of **11a****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotopic peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

832 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

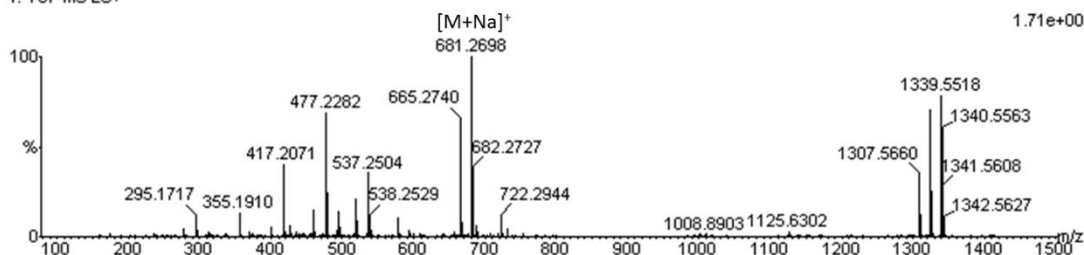
08-Jan-2016 16:31:00

1: TOF MS ES+

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito24-2 686 (3.196)

1.71e+004



Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
681.2698	681.2700	-0.2	-0.3	20.5	340.3	0.9	C40 H41 O10
	681.2676	2.2	3.2	17.5	340.1	0.6	C38 H42 O10 Na [M+Na] ⁺
	681.2665	3.3	4.8	-1.5	342.1	2.7	C22 H49 O23

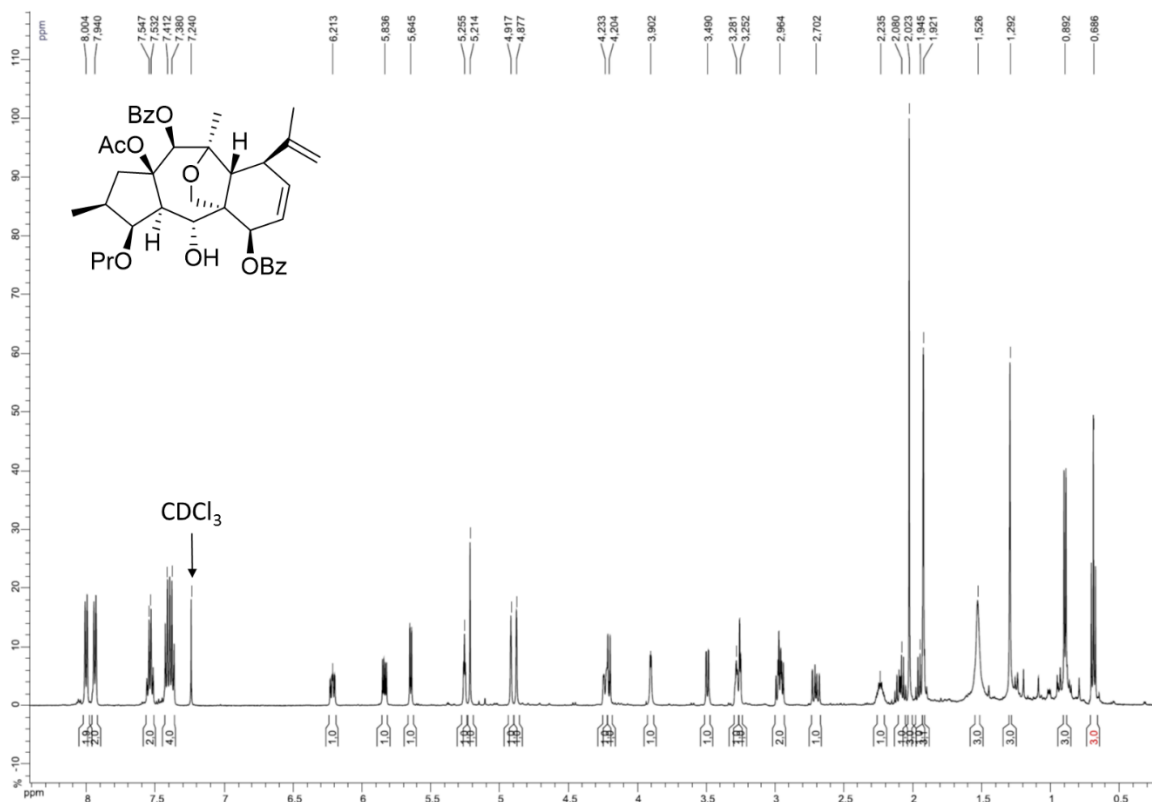
Figure S12. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **11b**

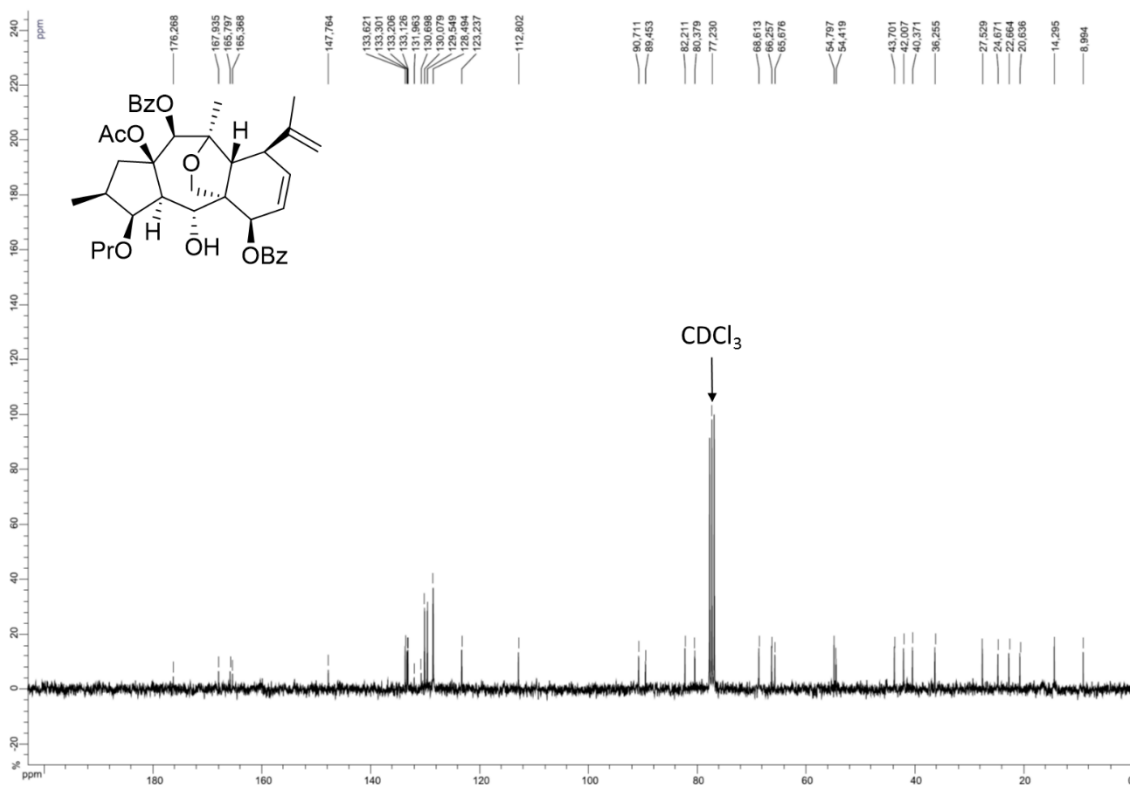
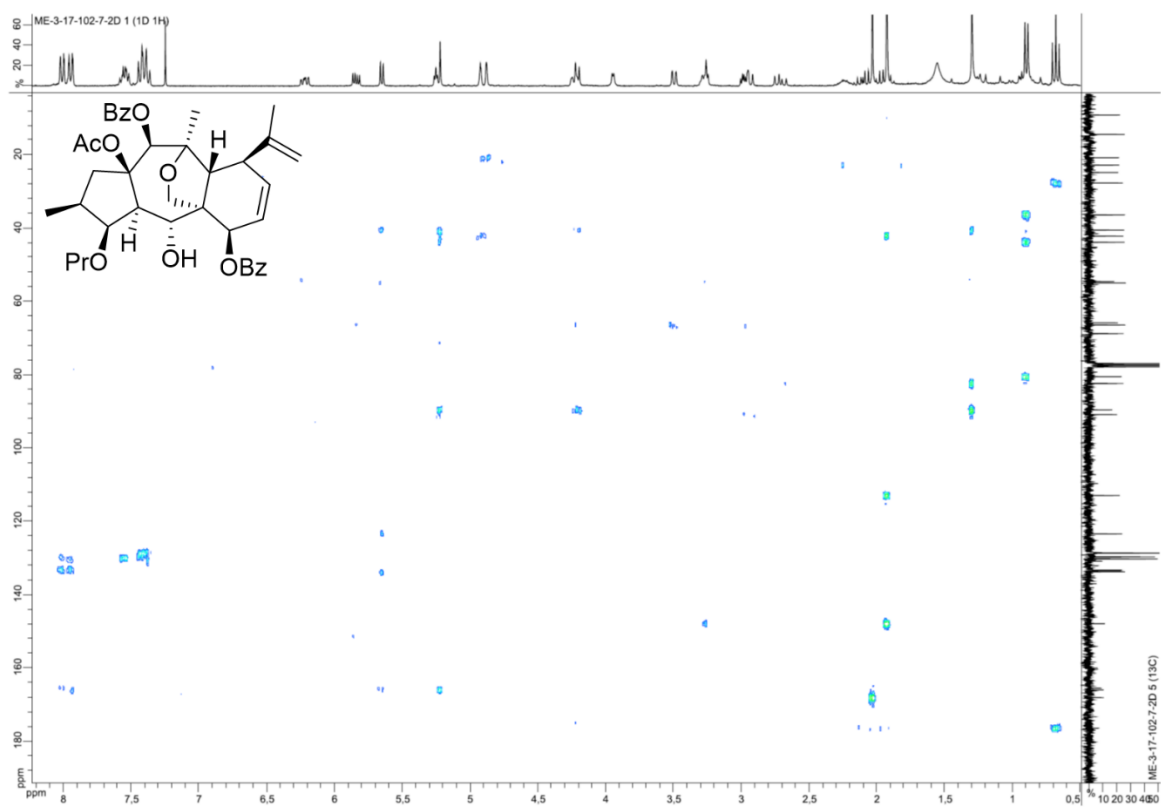
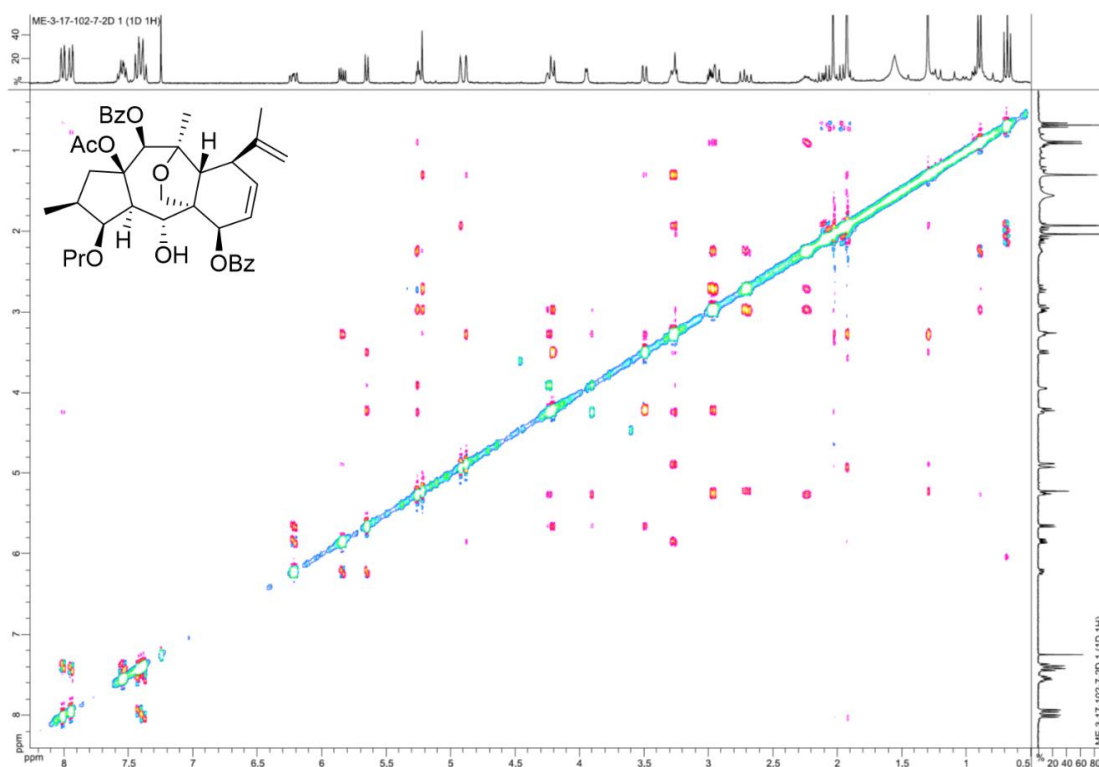
Figure S13. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **11b****Figure S14.** HMBC NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **11b**

Figure S15. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **11b****Figure S16.** HRESIMS spectrum (TOF) of **11b****Elemental Composition Report**

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

863 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

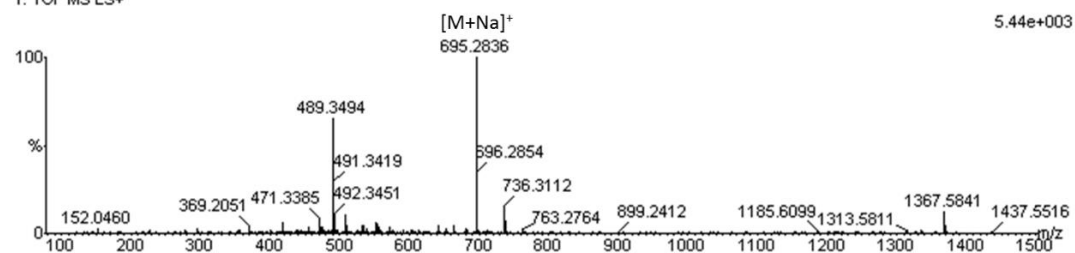
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

05-Feb-2016 11:18:15

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito29-1 748 (3.454)

1: TOF MS ES+



Minimum:

Maximum:

5.0 5.0

-1.5 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
695.2836	695.2832	0.4	0.6	17.5	243.3	3.3	C39 H44 O10 Na [M+Na] ⁺
	695.2821	1.5	2.2	-1.5	240.1	0.0	C23 H51 O23
	695.2856	-2.0	-2.9	20.5	245.0	4.9	C41 H43 O10

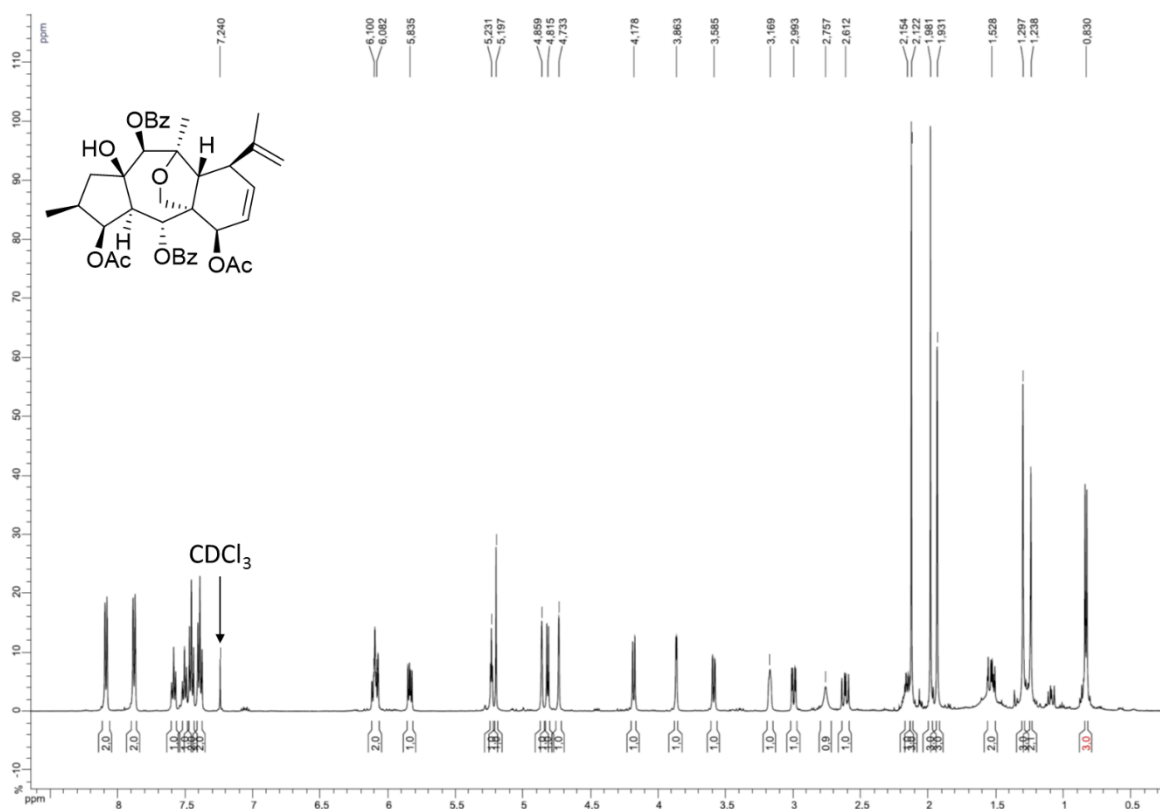
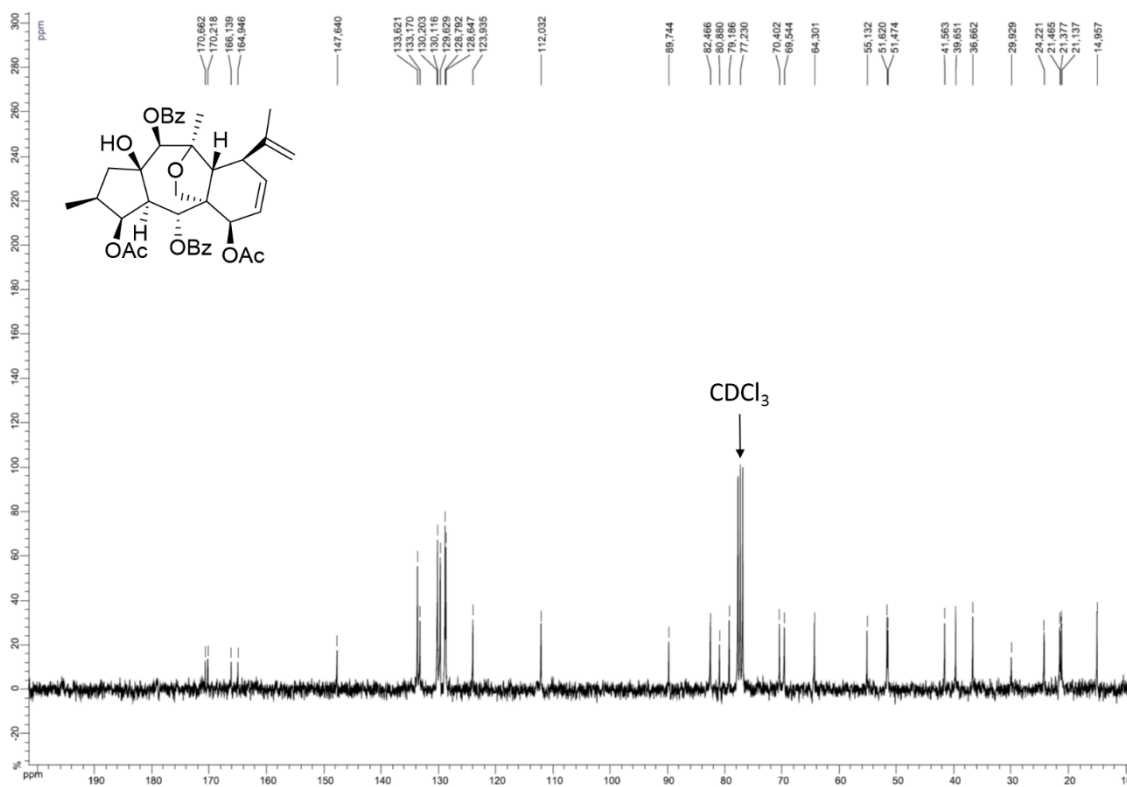
Figure S17. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **11c****Figure S18.** ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **11c**

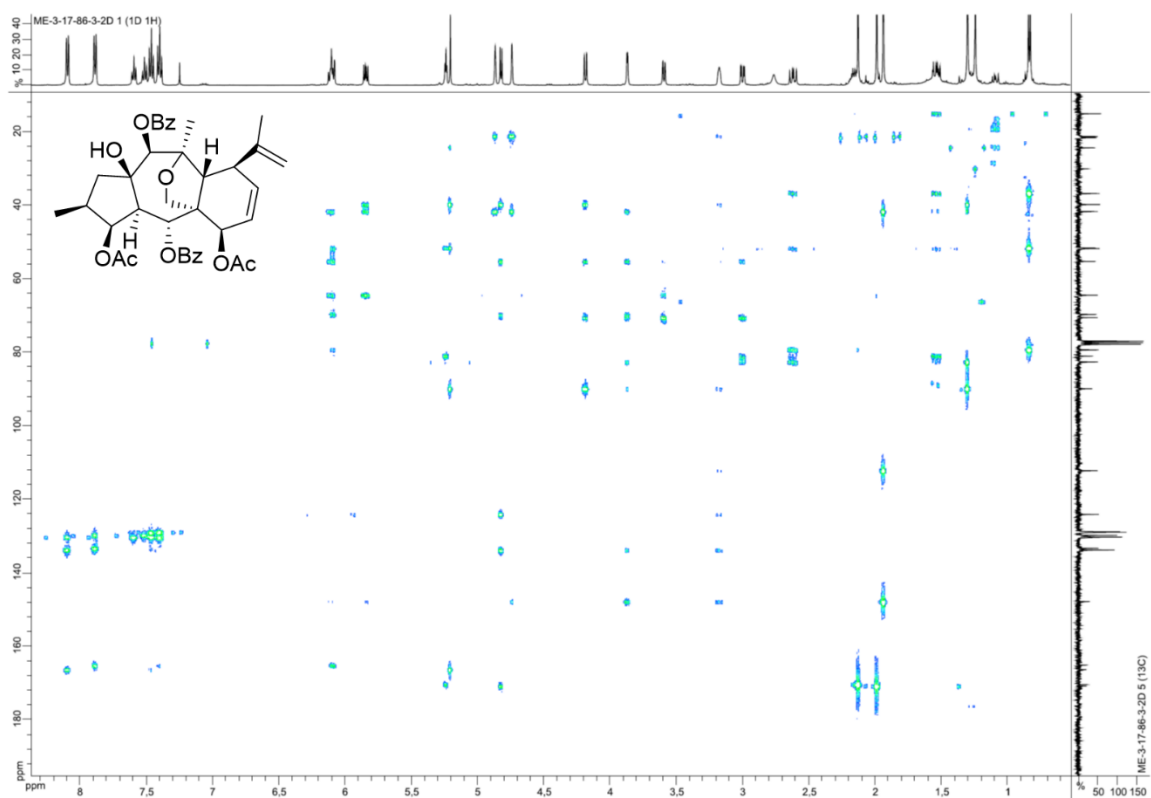
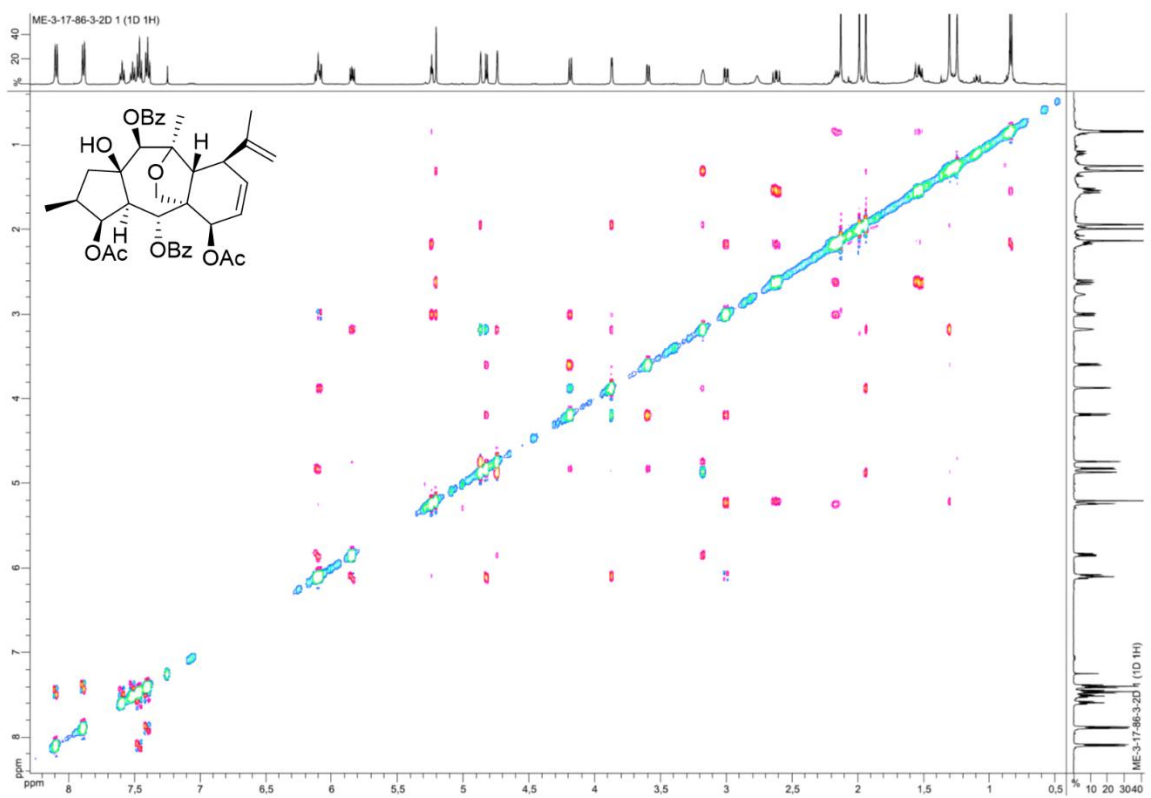
Figure S19. HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **11c****Figure S20.** ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **11c**

Figure S21. HRESIMS spectrum (TOF) of **11c****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

832 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

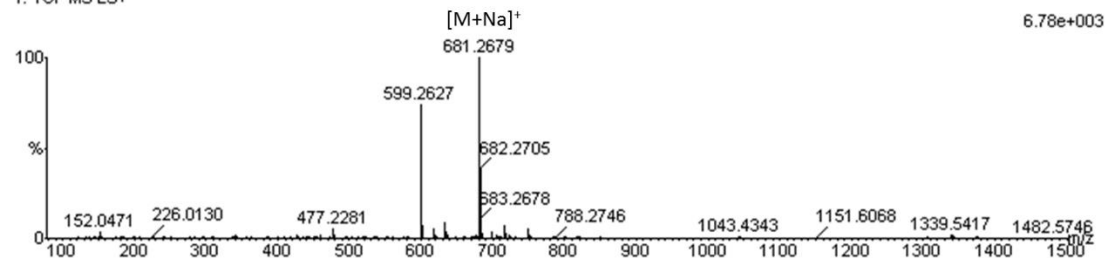
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

08-Jan-2016 17:50:07

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito25-4 709 (3.312)

1: TOF MS ES+



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
681.2679	681.2676	0.3	0.4	17.5	217.1	0.0	C38 H42 O10 Na [M+Na] ⁺
	681.2665	1.4	2.1	-1.5	226.1	9.1	C22 H49 O23
	681.2700	-2.1	-3.1	20.5	220.7	3.6	C40 H41 O10

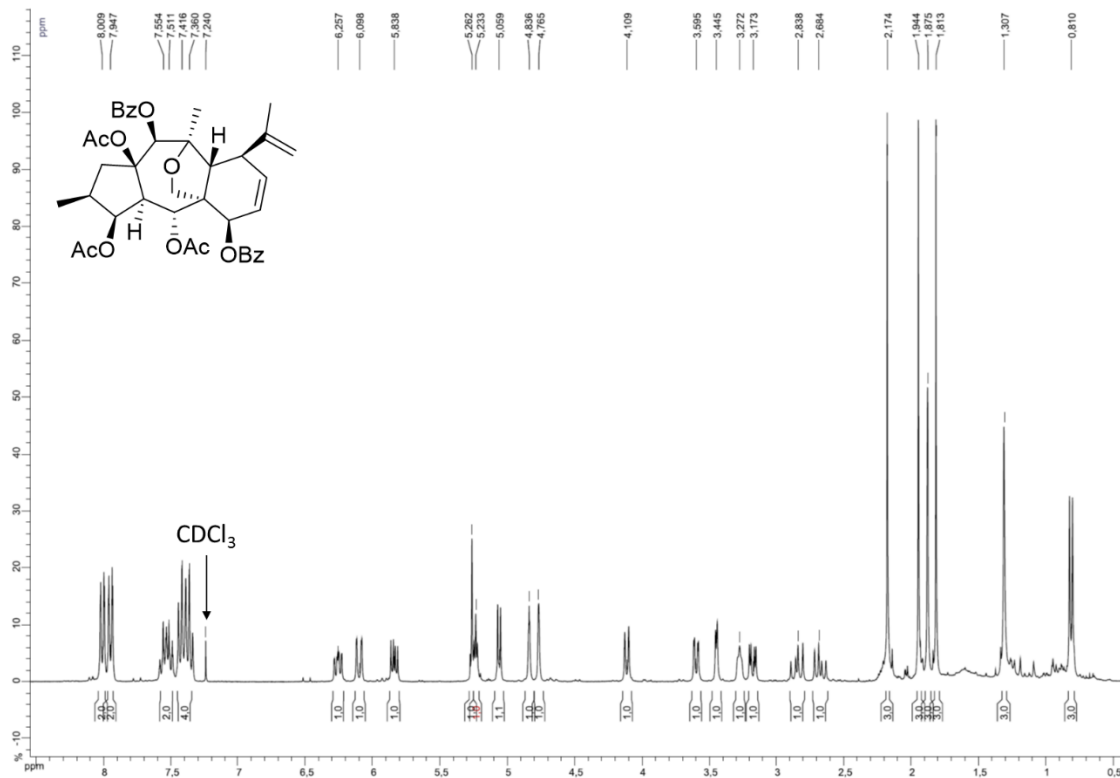
Figure S22. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **11d**

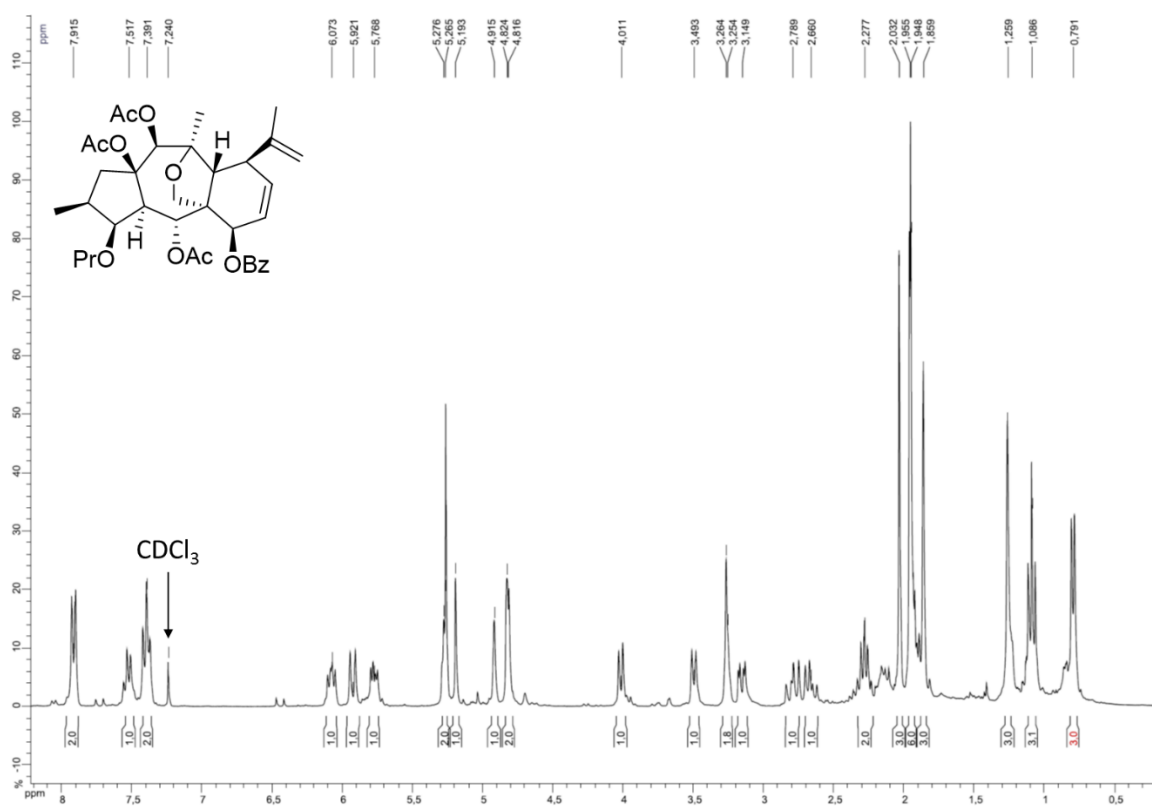
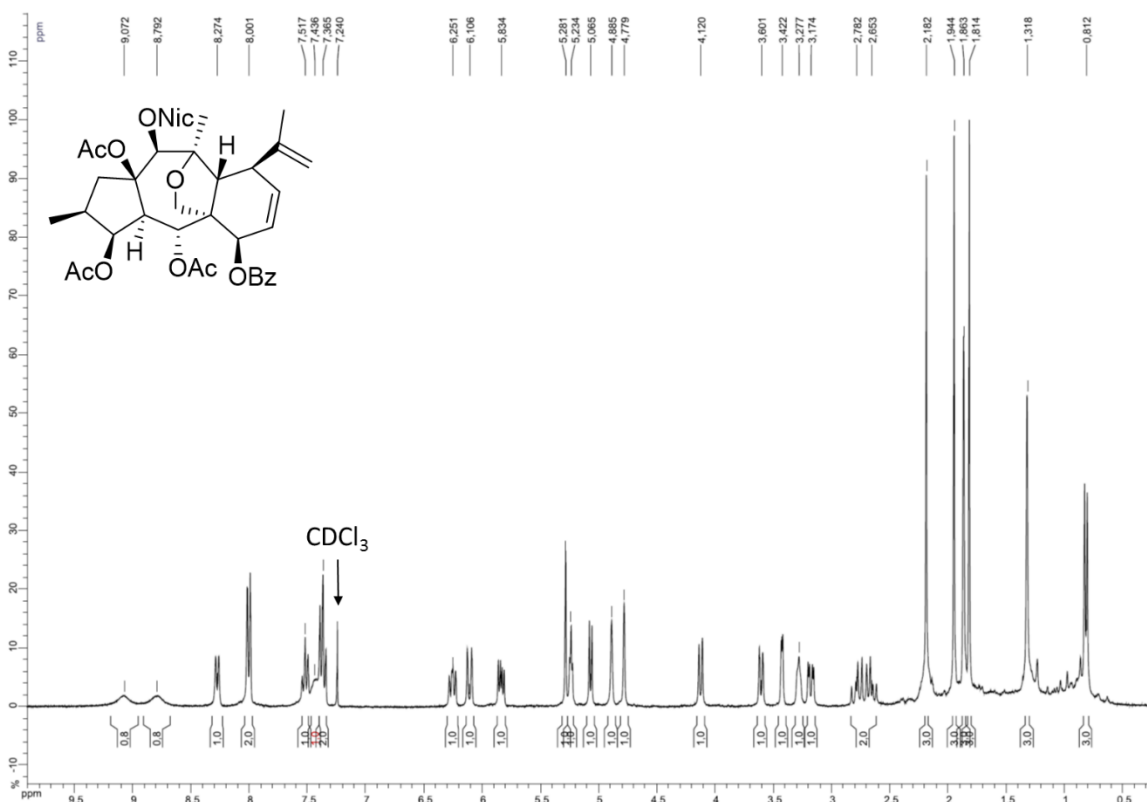
Figure S23. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **11e****Figure S24.** ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **11f**

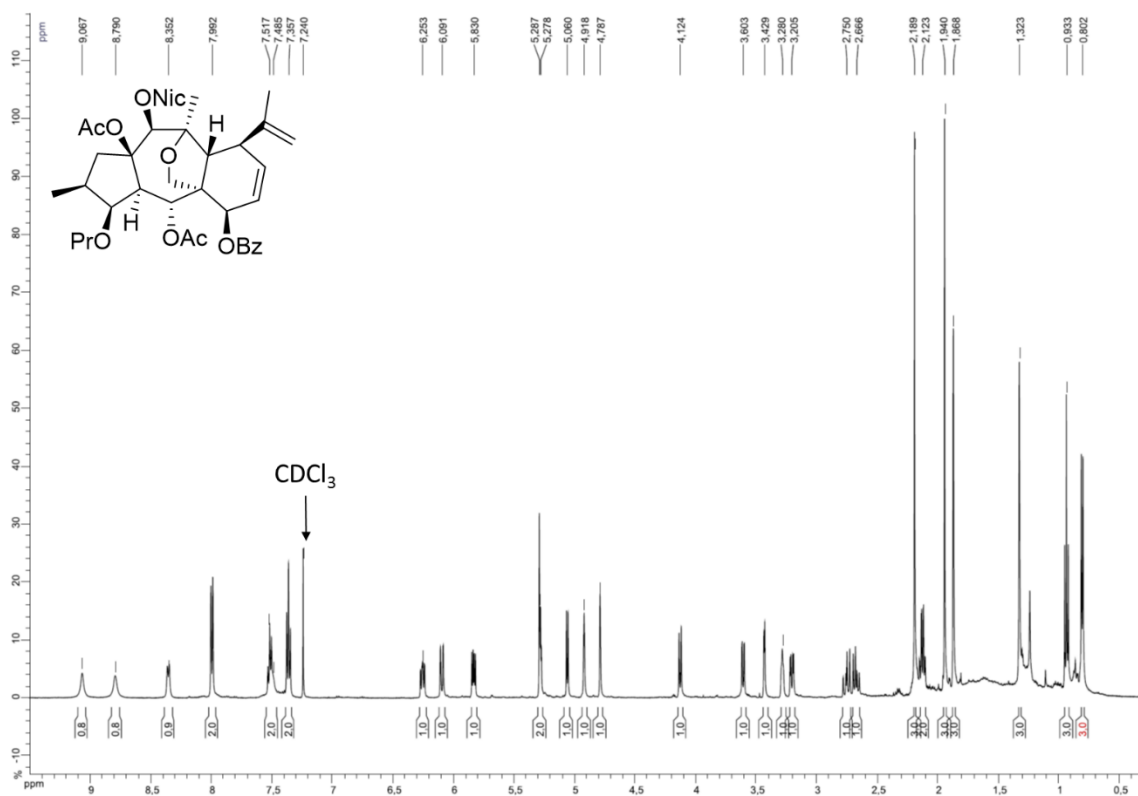
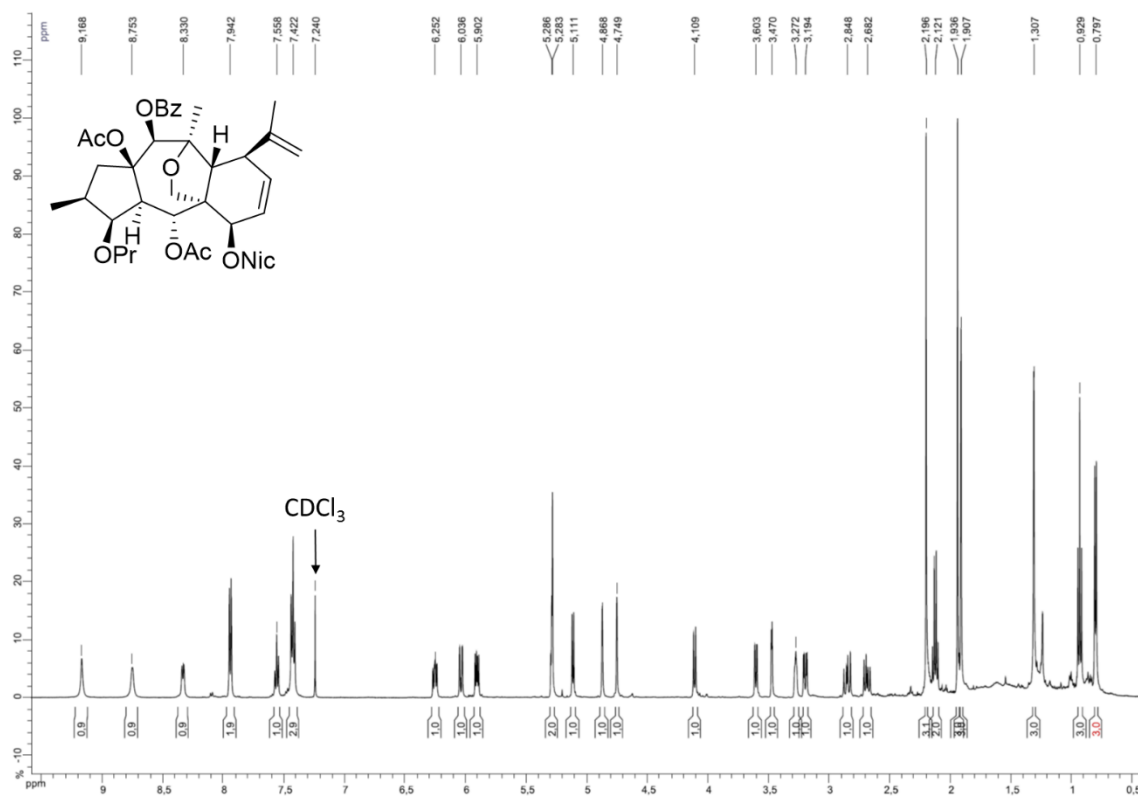
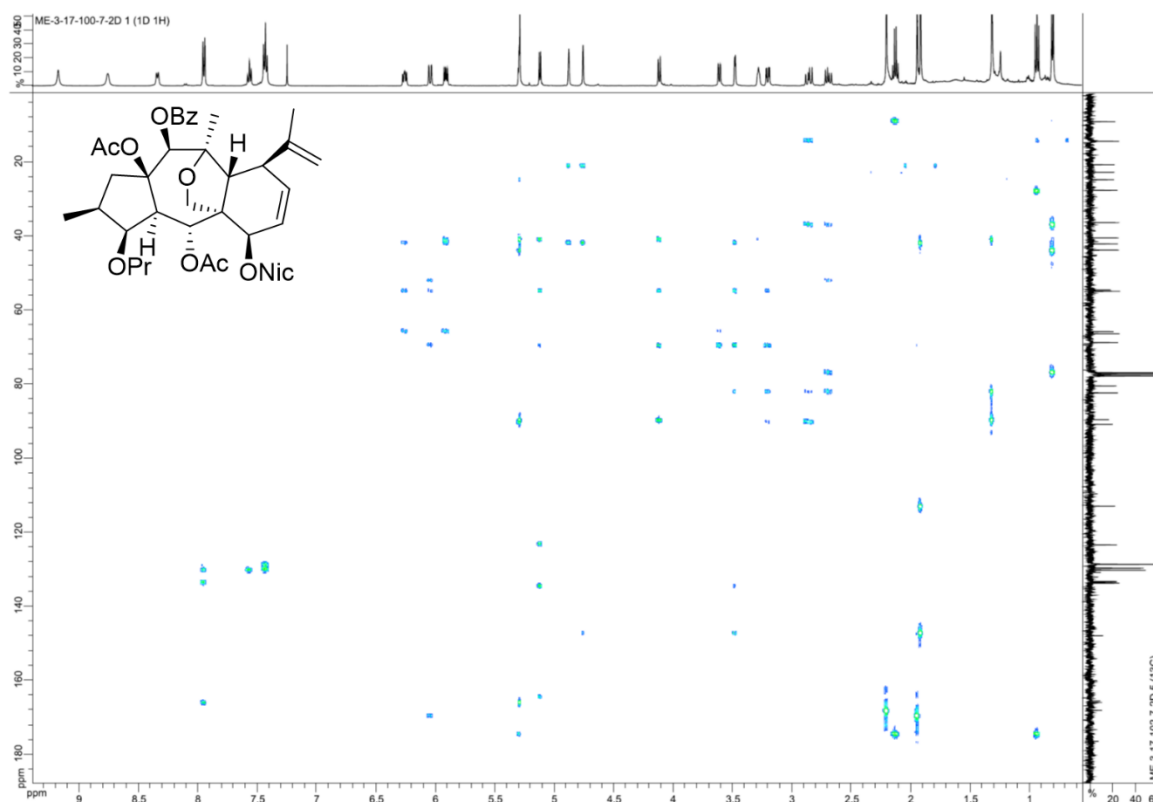
Figure S25. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **11g****Figure S26.** ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **11h**

Figure S27. HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **11h****Figure S28.** HRESIMS spectrum (TOF) of **11h****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

952 formula(e) evaluated with 4 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

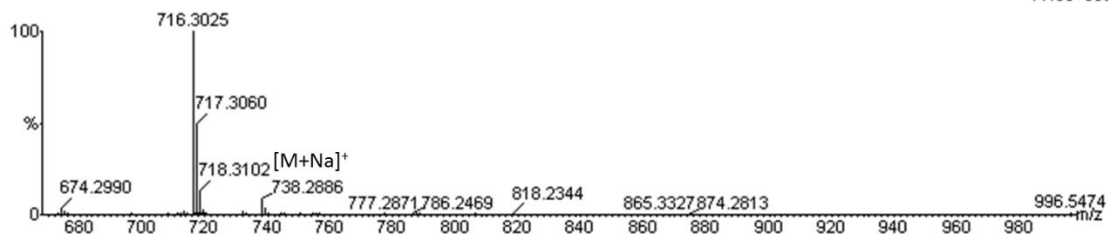
08-Jan-2016 16:53:33

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito24-4 670 (3.143)

1: TOF MS ES+

7.49e+003



Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5

Mass Calc. Mass mDa PPM DBE i-FIT i-FIT (Norm) Formula

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
738.2886	738.2890	-0.4	-0.5	18.5	102.4	0.8	C40 H45 N 011 [M+Na] ⁺
	738.2879	0.7	0.9	-0.5	102.3	0.6	Na
	738.2914	-2.8	-3.8	21.5	105.7	4.1	C24 H52 N 024
	738.2856	3.0	4.1	30.5	107.0	5.4	C42 H44 N 011
							C49 H40 N 06

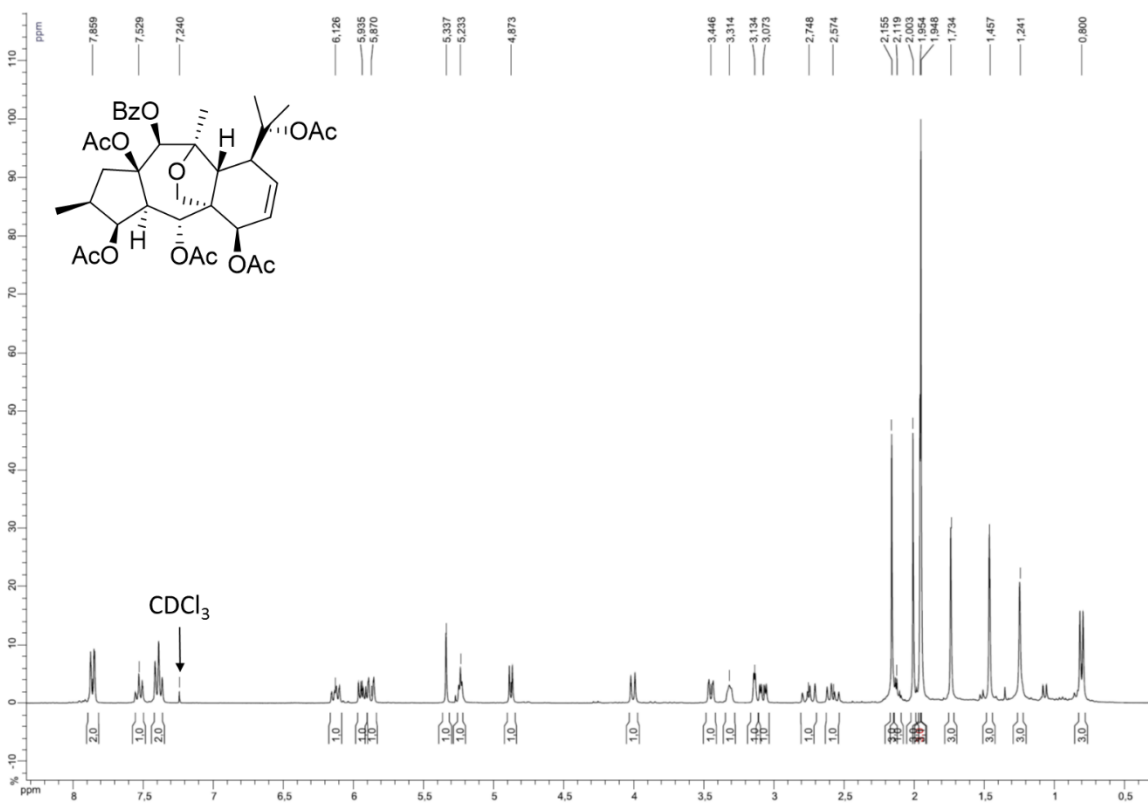
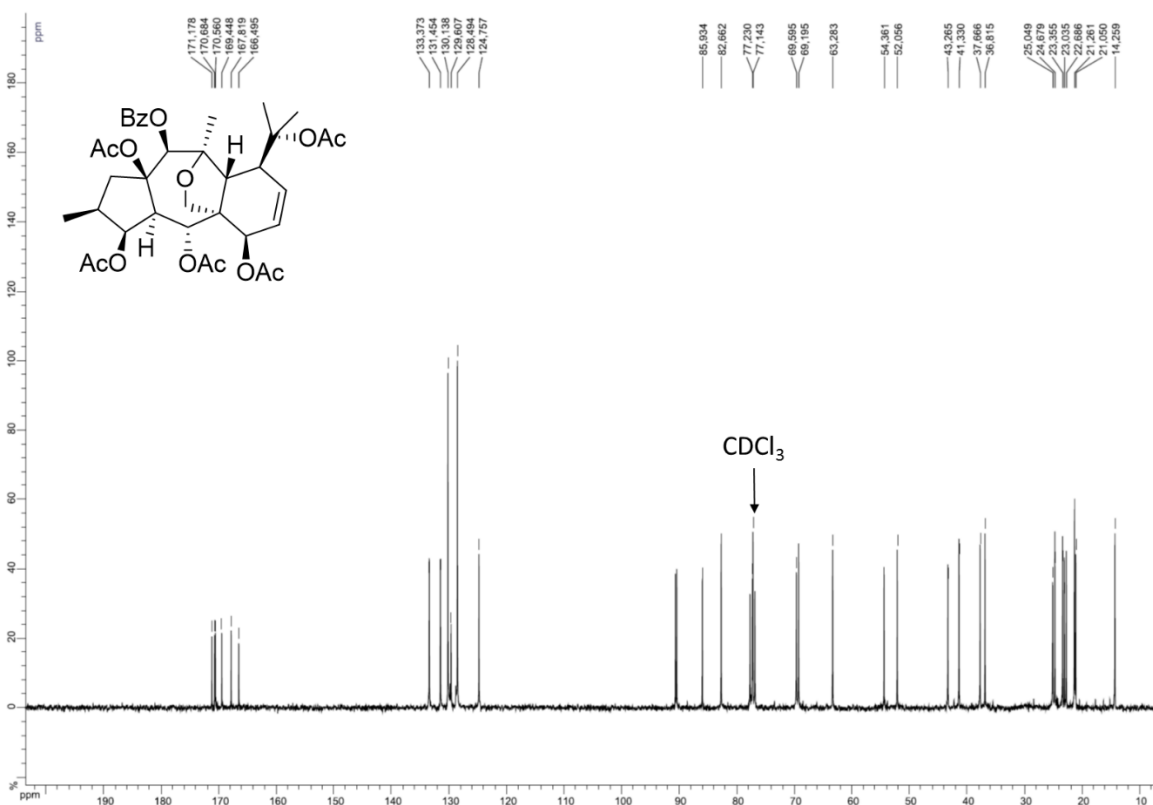
Figure S29. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **12****Figure S30.** ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **12**

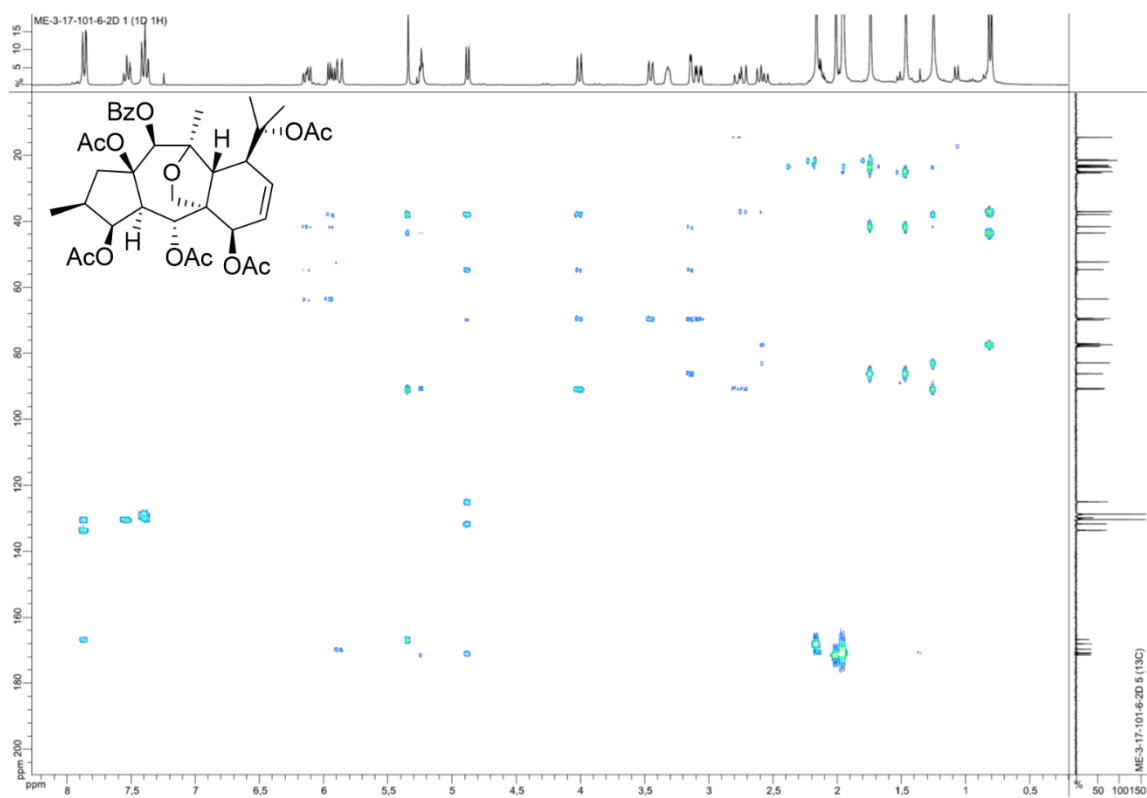
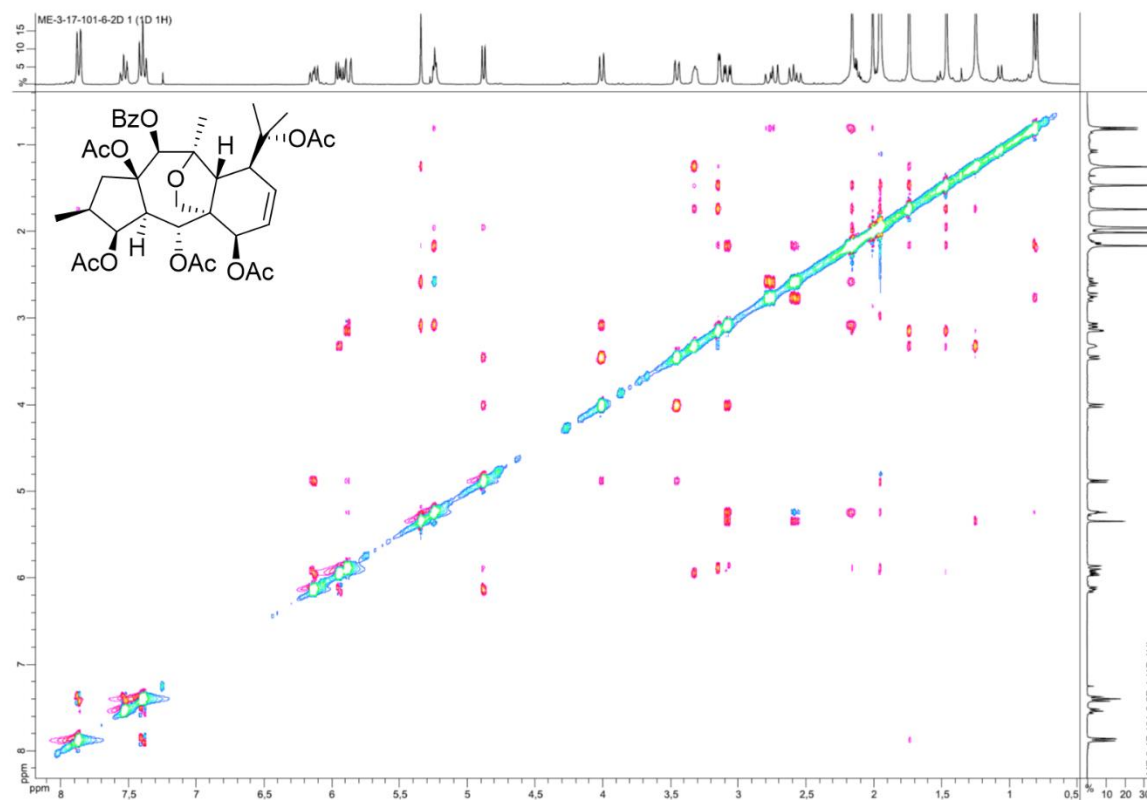
Figure S31. HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **12****Figure S32.** ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **12**

Figure S33. HRESIMS spectrum (TOF) of **12****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotopic peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

918 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

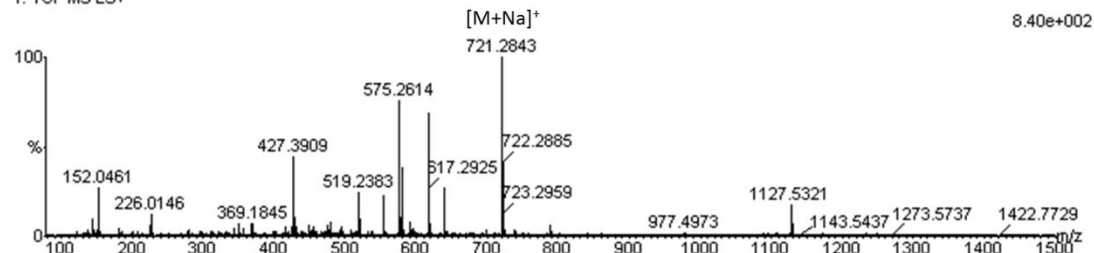
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

08-Jan-2016 16:19:44

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito24-1 691 (3.214)

1: TOF MS ES+



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
721.2843	721.2836	0.7	1.0	14.5	120.8	0.9	C37 H46 O13 Na [M+Na] ⁺
	721.2860	-1.7	-2.4	17.5	120.4	0.5	C39 H45 O13
	721.2871	-2.8	-3.9	36.5	127.9	8.1	C55 H38 Na

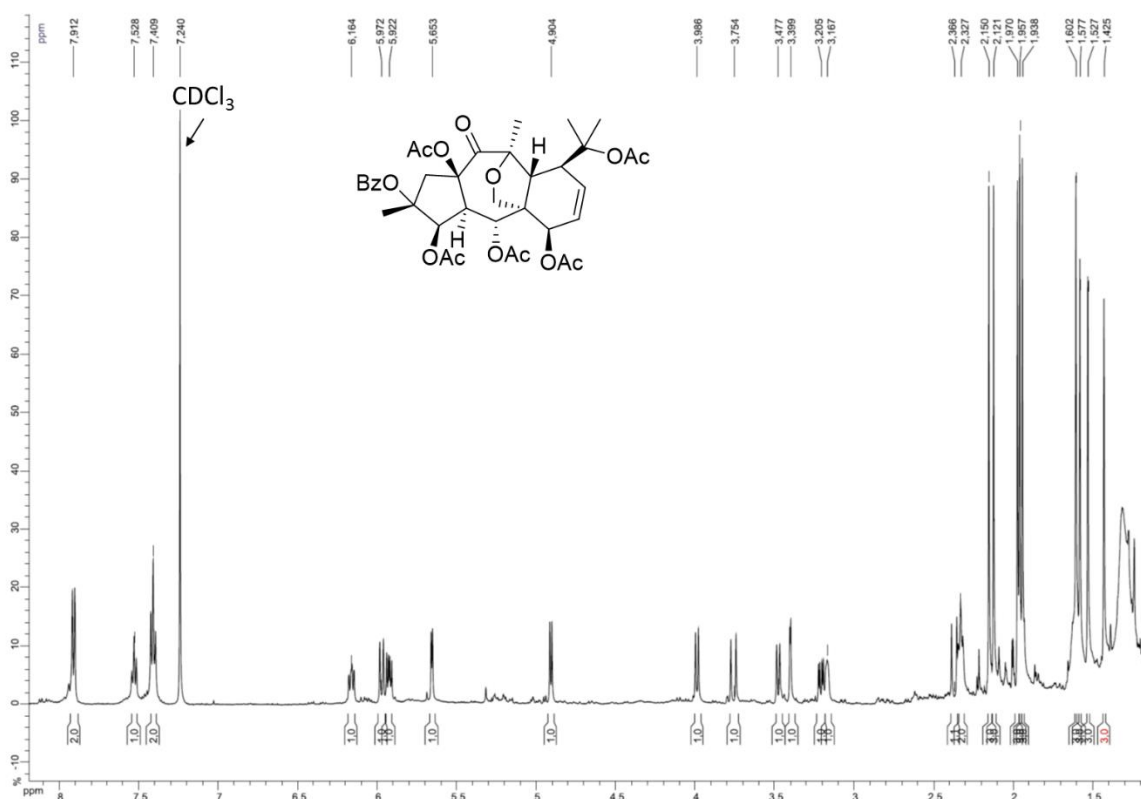
Figure S34. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **13**

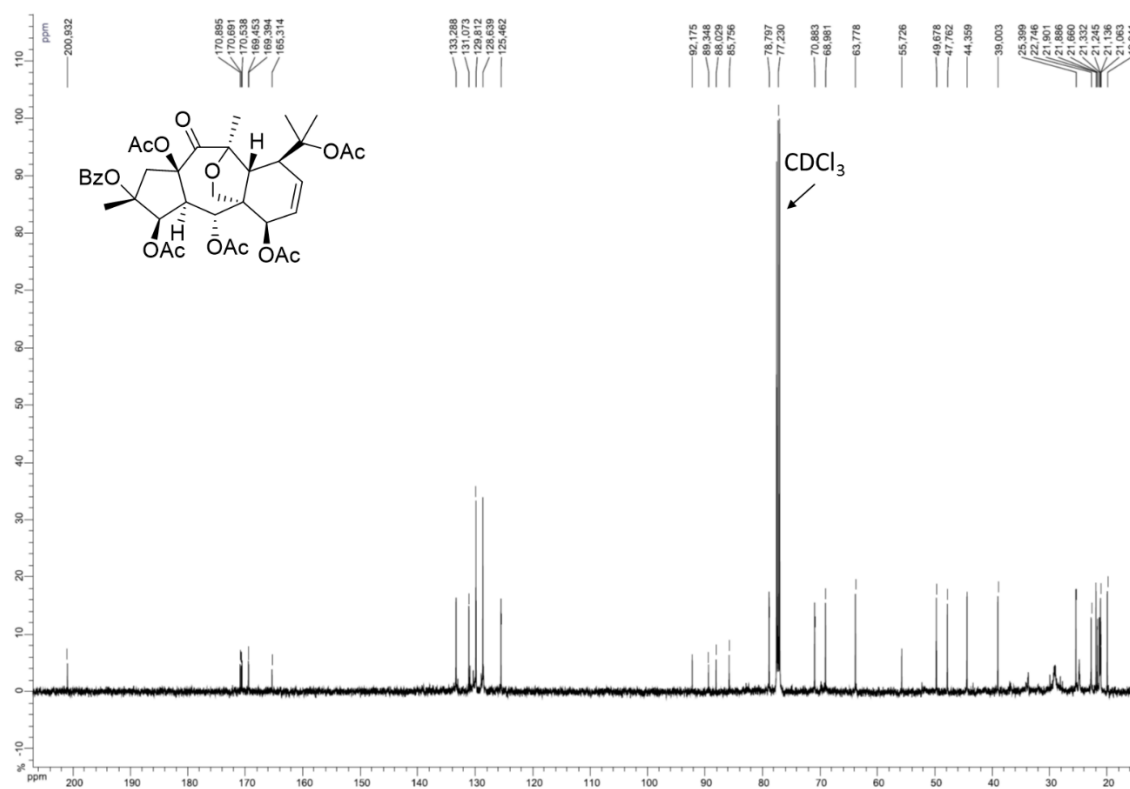
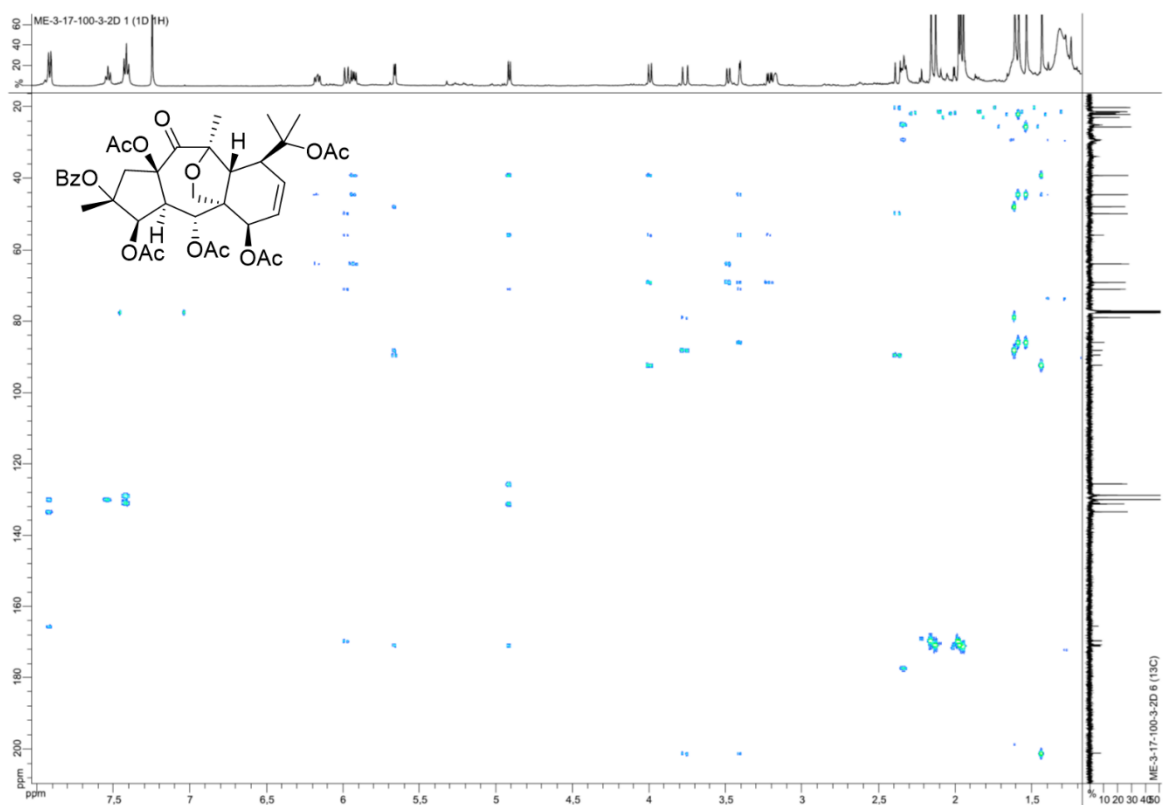
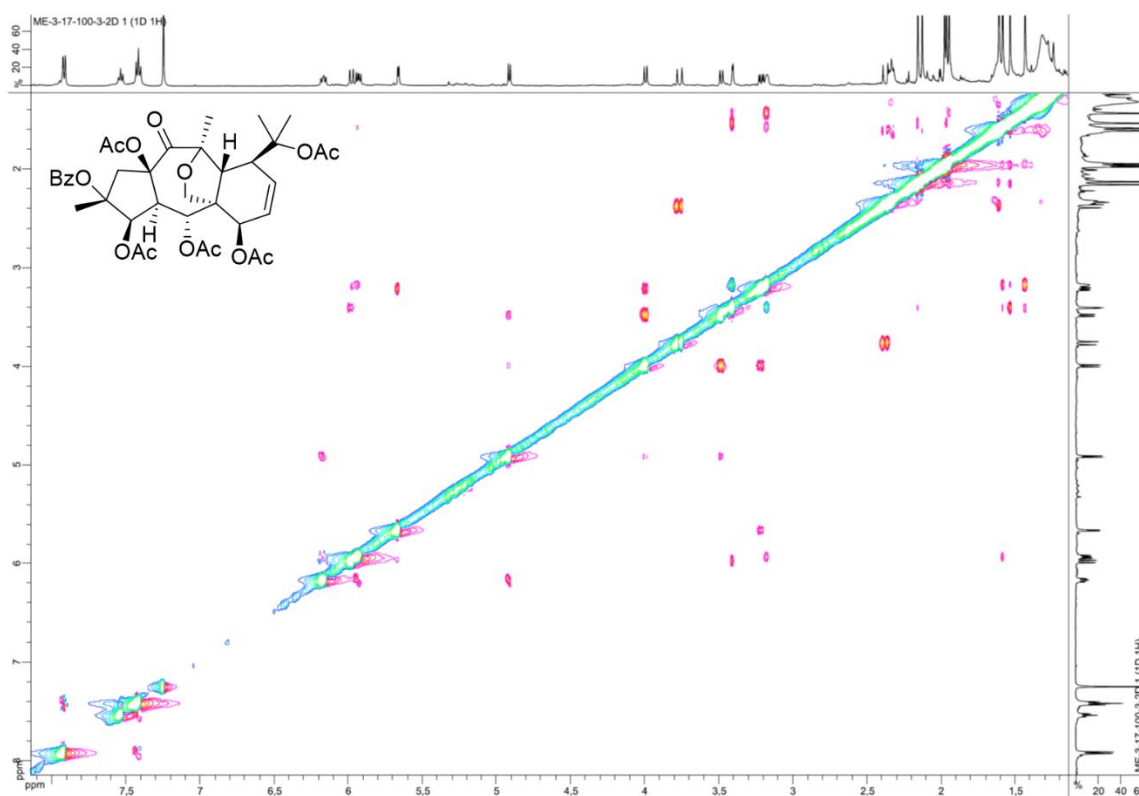
Figure S35. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **13****Figure S36.** HMBC NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **13**

Figure S37. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **13****Figure S38.** HRESIMS spectrum (TOF) of **13****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

948 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

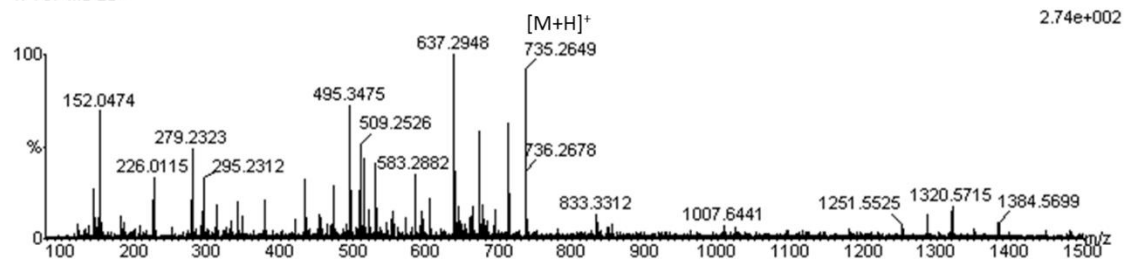
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

08-Jan-2016 15:22:33

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito23-2 684 (3.159)

1: TOF MS ES+



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
735.2649	735.2653	-0.4	-0.5	18.5	111.8	0.6	C39 H43 O14 [M+H] ⁺
	735.2664	-1.5	-2.0	37.5	115.1	3.9	C55 H36 O Na
	735.2629	2.0	2.7	15.5	112.1	0.9	C37 H44 O14 Na

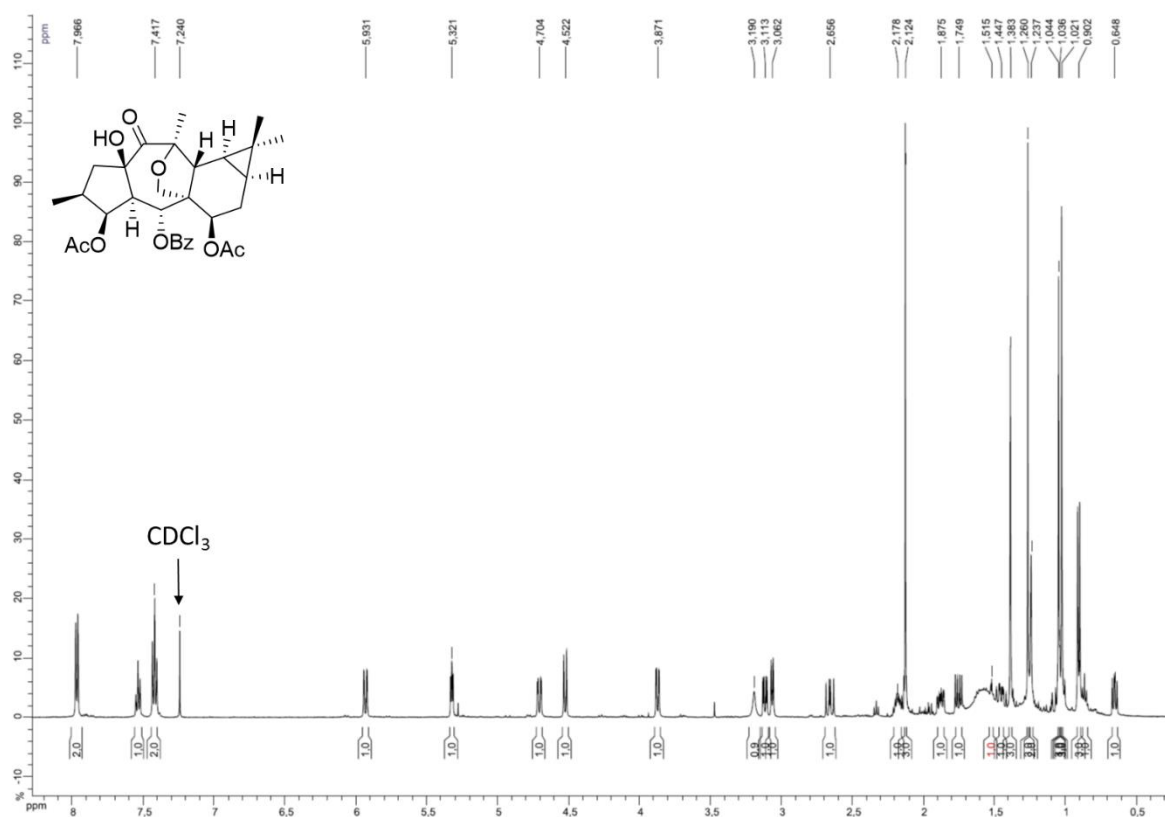
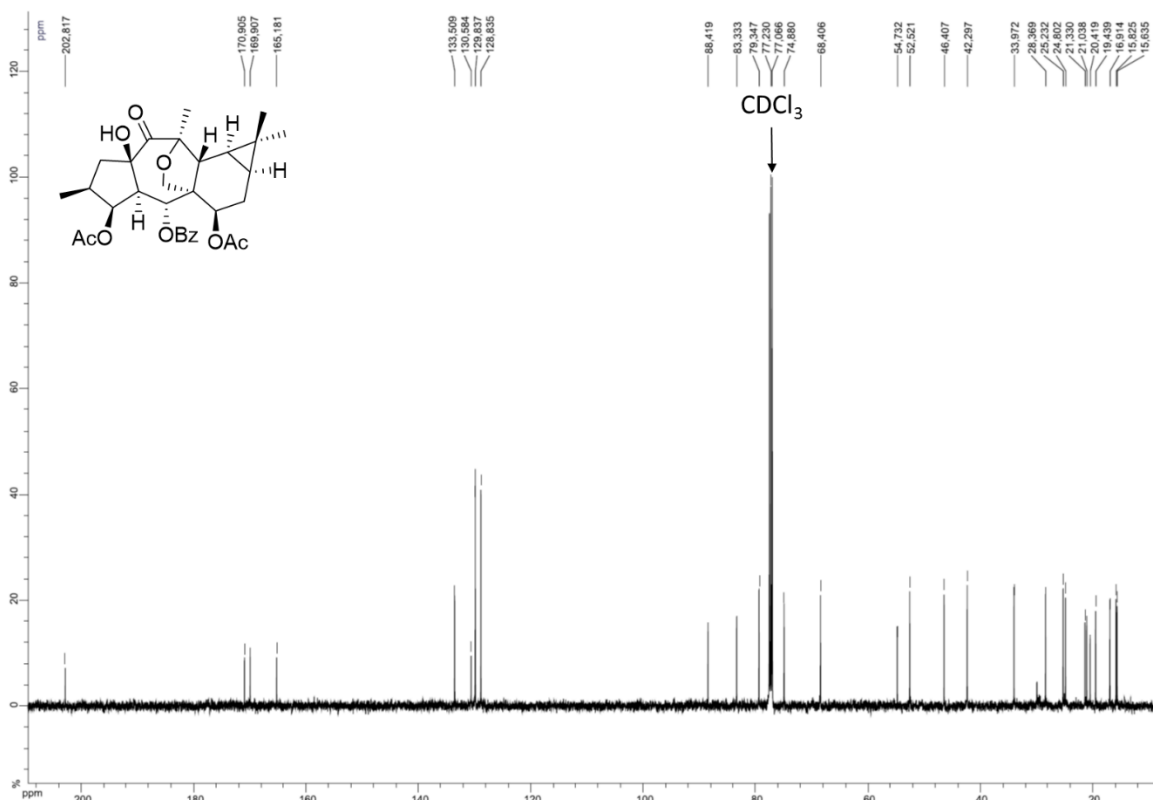
Figure S39. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **14a****Figure S40.** ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 125 MHz) of **14a**

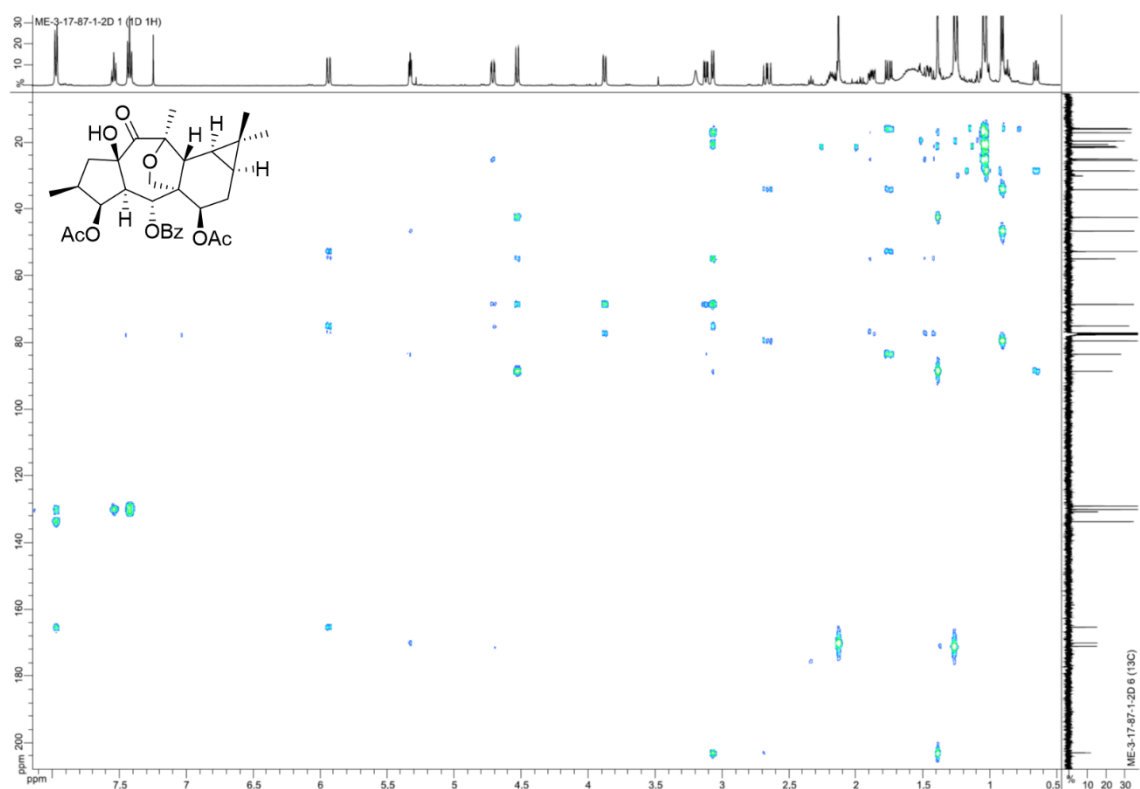
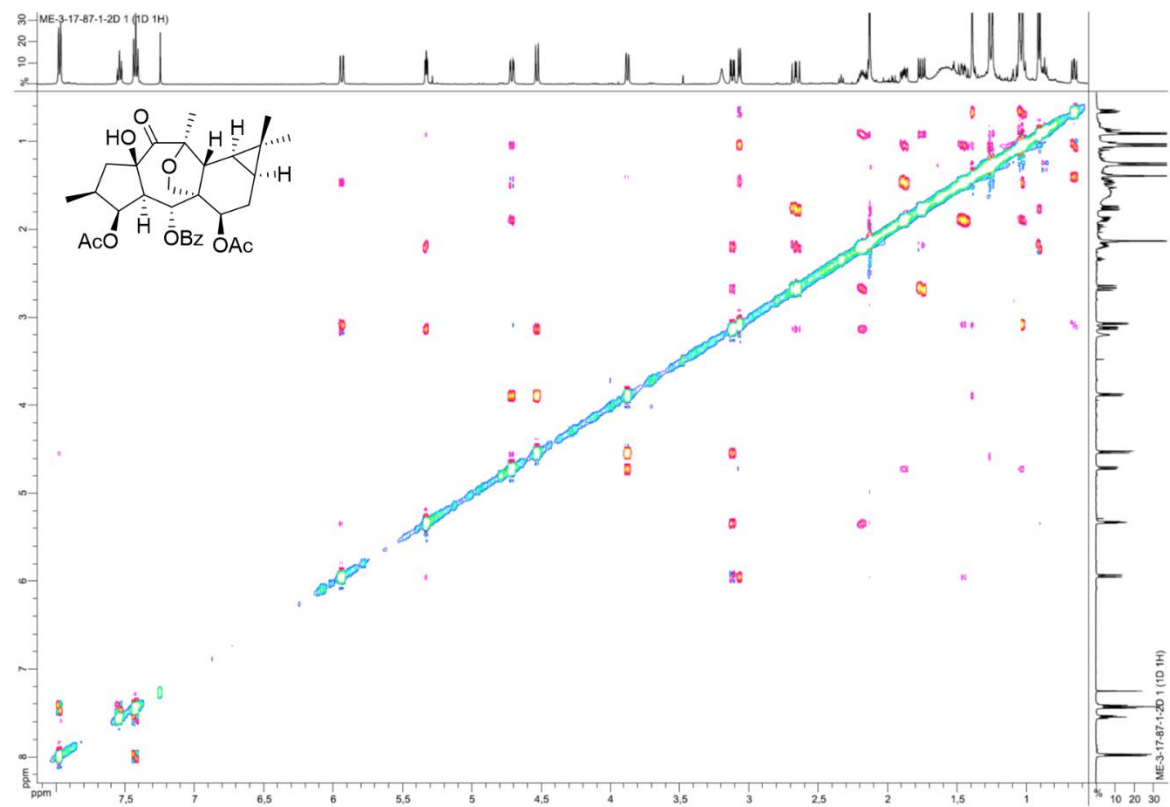
Figure S41. HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **14a****Figure S42.** ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **14a**

Figure S43. HRESIMS spectrum (TOF) of **14a****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

307 formula(e) evaluated with 2 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 O: 0-50 Na: 0-1

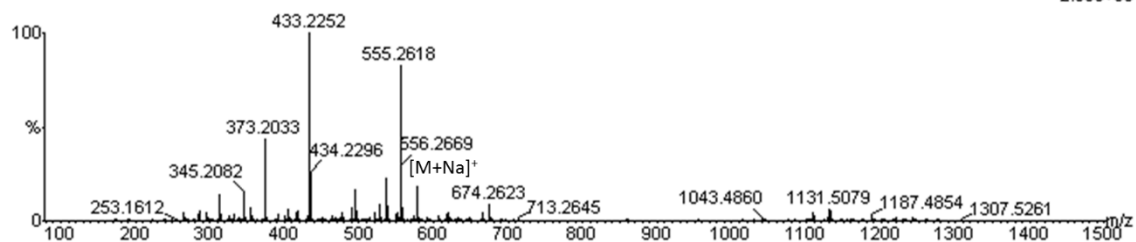
30-May-2015 4:7:7

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito18-2 632 (2.786)

1: TOF MS ES+

2.33e+004



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
577.2434	577.2414	2.0	3.5	12.5	267.5	0.4	C31 H38 O9 Na [M+Na] ⁺
	577.2438	-0.4	-0.7	15.5	268.3	1.2	C33 H37 O9

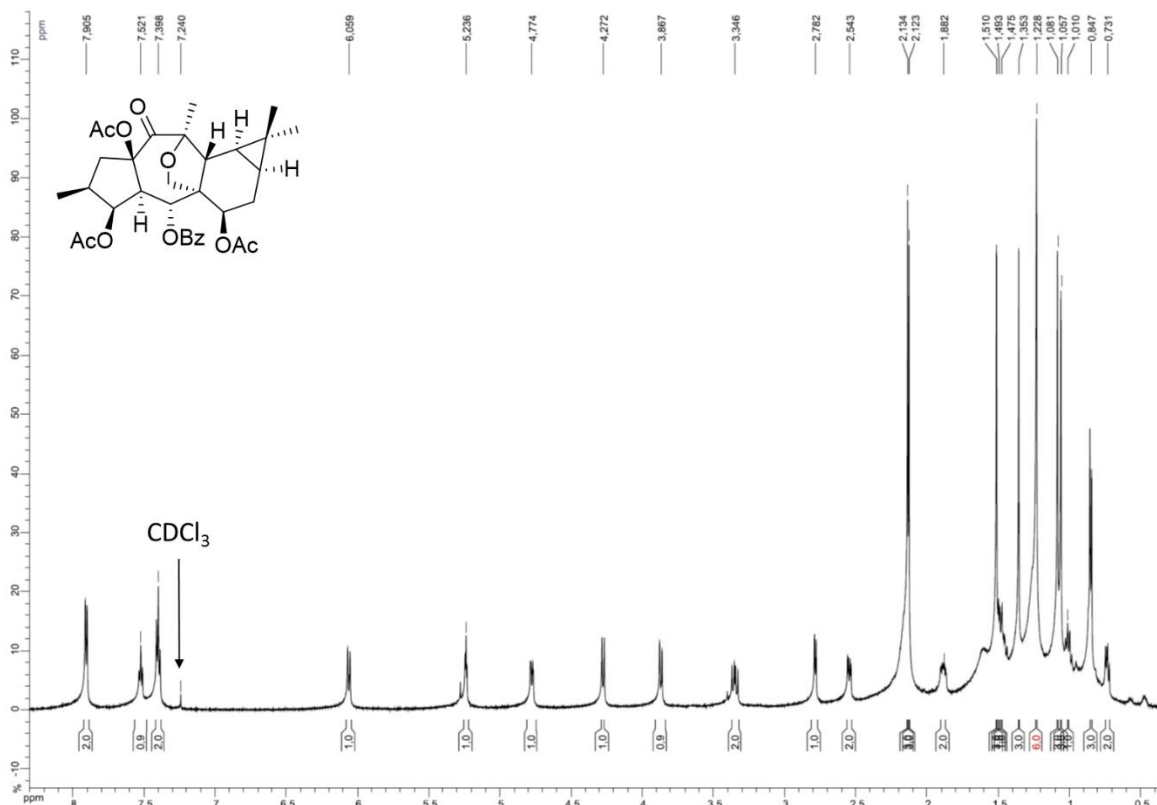
Figure S44. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **14b**

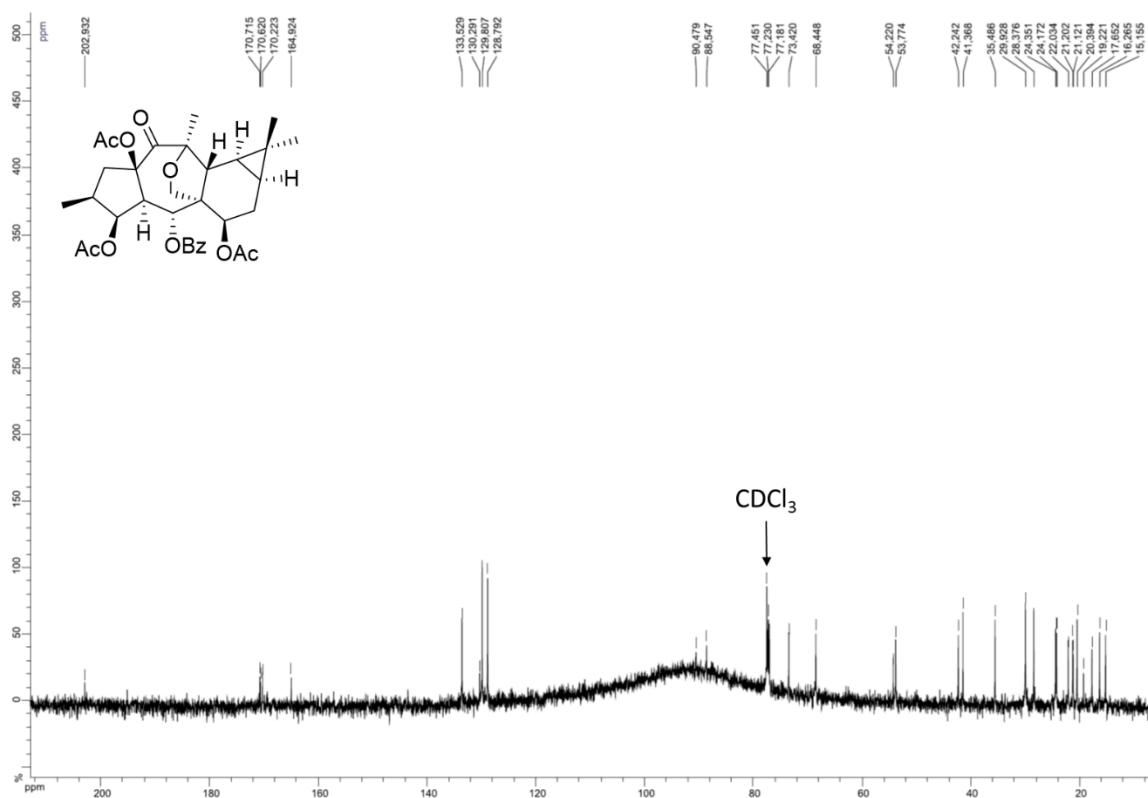
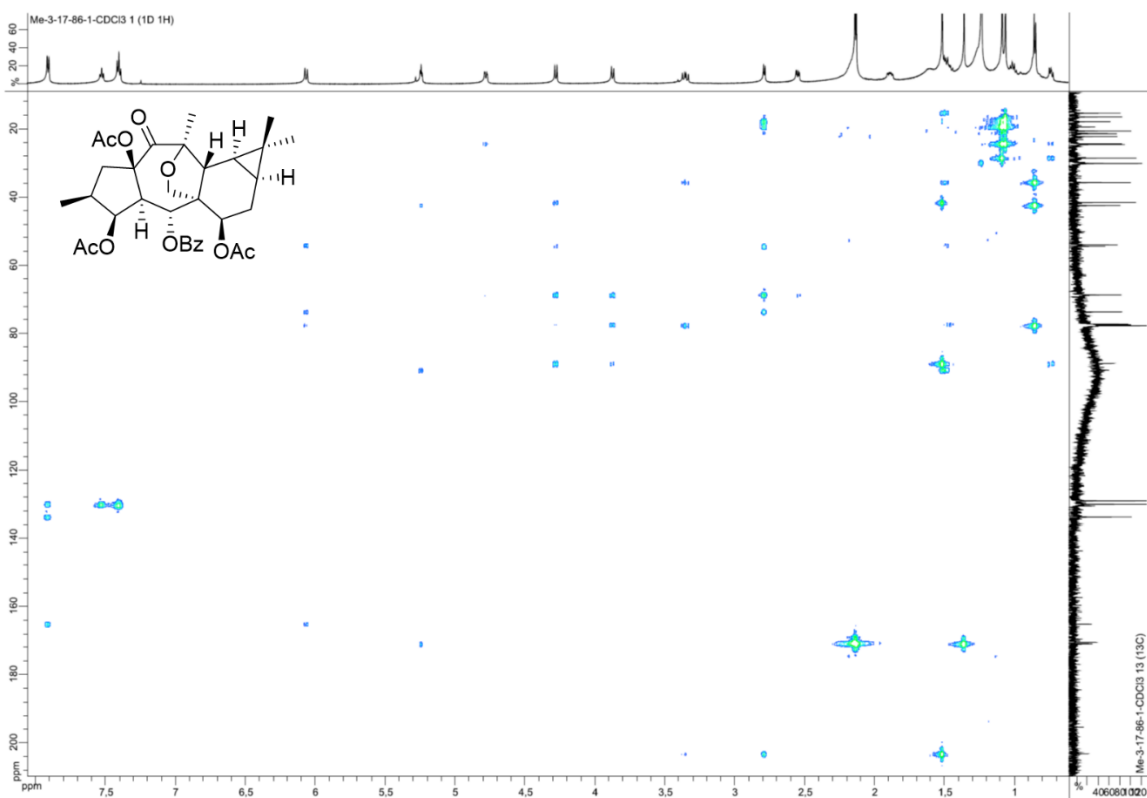
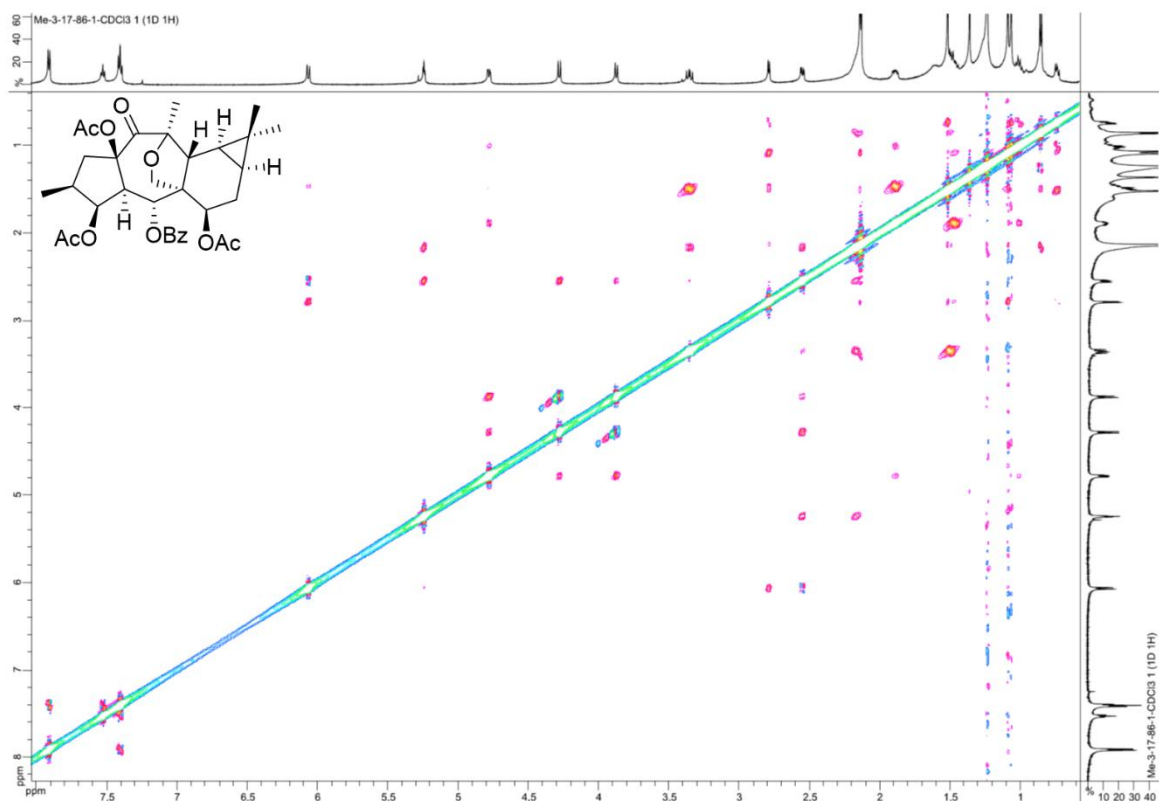
Figure S45. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **14b****Figure S46.** HMBC NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **14b**

Figure S47. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **14b****Figure S48.** HRESIMS spectrum (TOF) of **14b****Single Mass Analysis**

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

361 formula(e) evaluated with 4 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

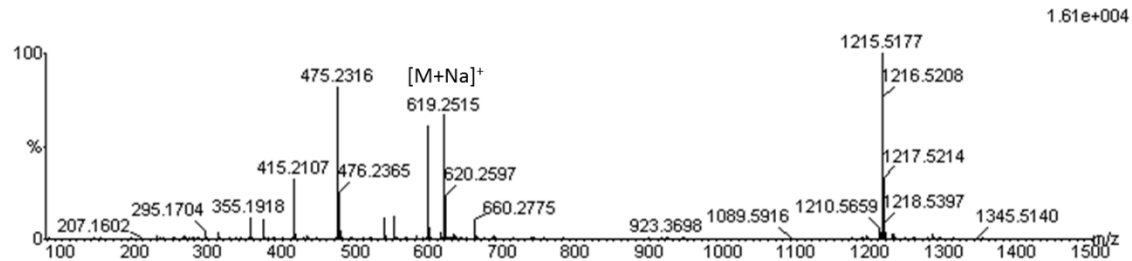
C: 0-60 H: 0-100 O: 0-50 Na: 0-1

28-May-2015 3:4:8

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito17-1 670 (2.946)

1: TOF MS ES+



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
619.2515	619.2519	-0.4	-0.6	13.5	374.3	0.1	C33 H40 O10 Na [M+Na] ⁺
	619.2543	-2.8	-4.5	16.5	376.9	2.7	C35 H39 O10
	619.2484	3.1	5.0	25.5	383.2	9.0	C42 H35 O5
	619.2460	5.5	8.9	22.5	381.6	7.4	C40 H36 O5 Na

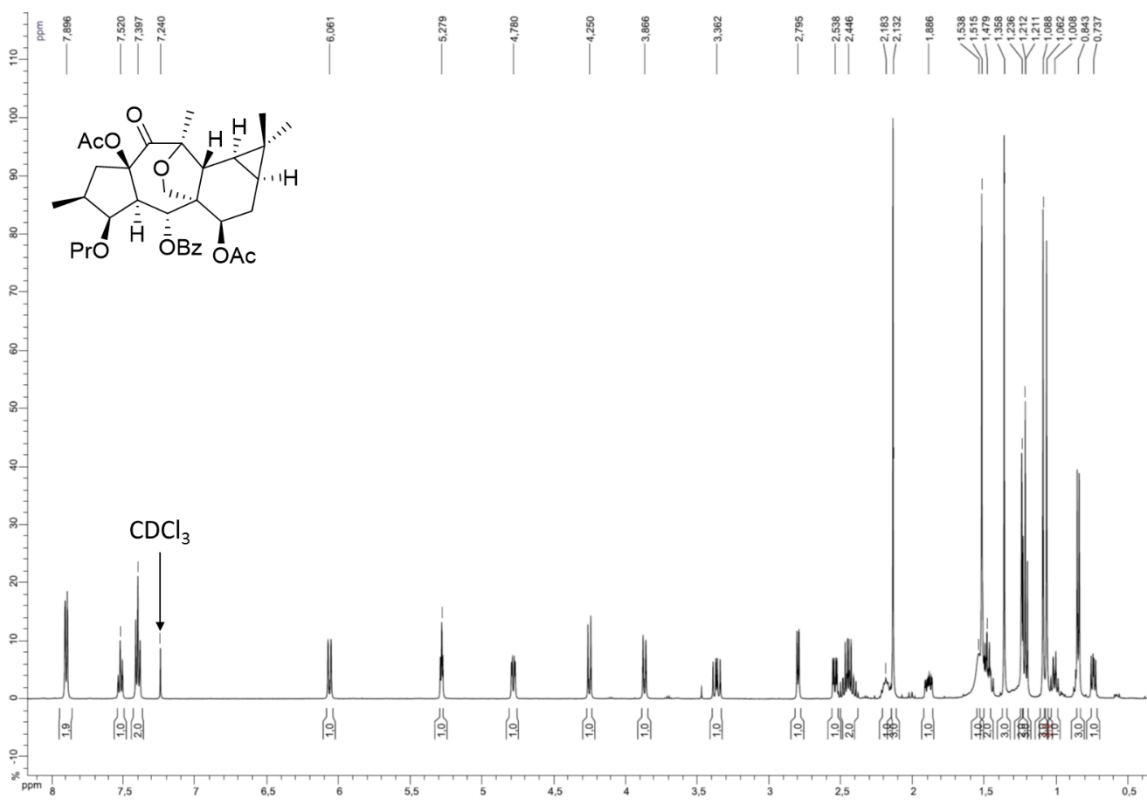
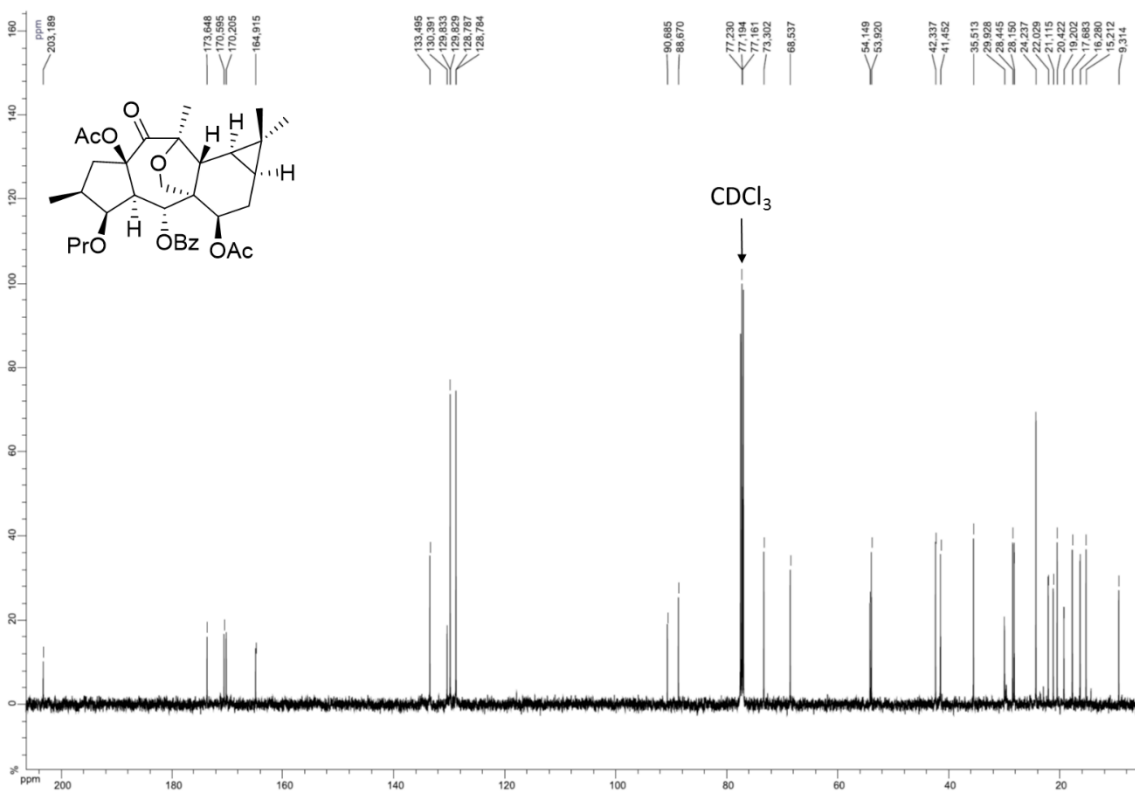
Figure S49. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **14c****Figure S50.** ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **14c**

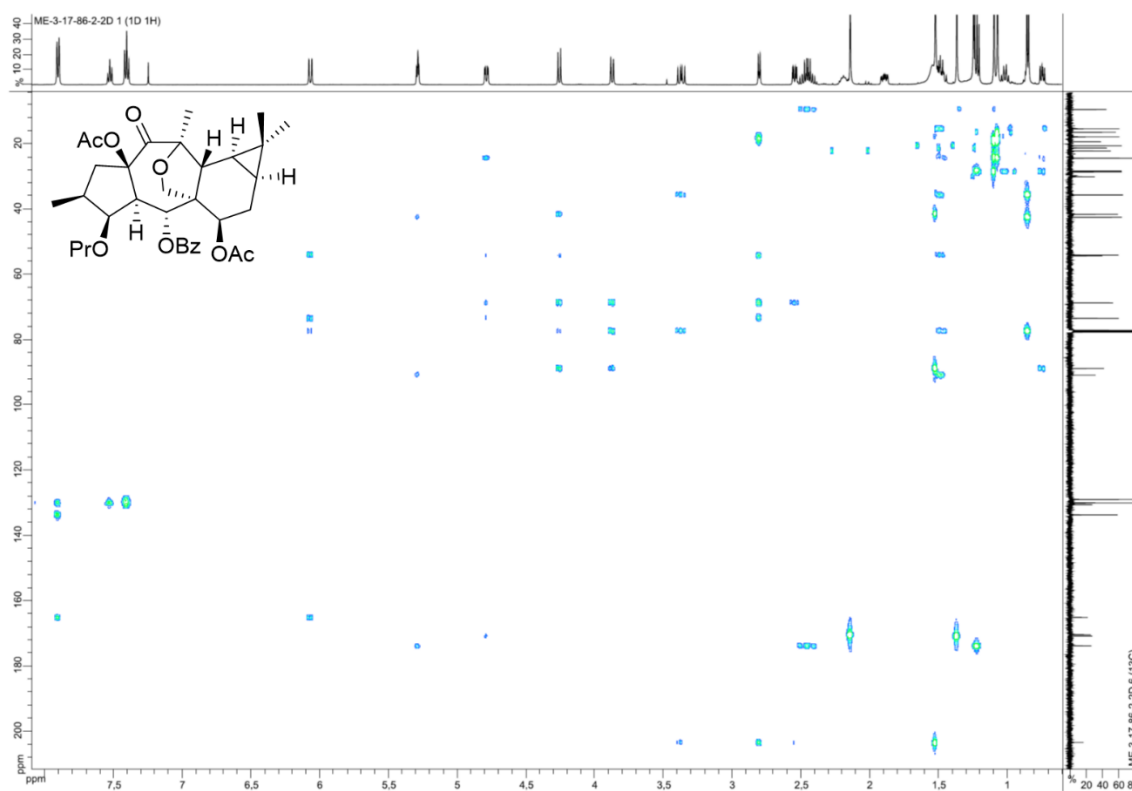
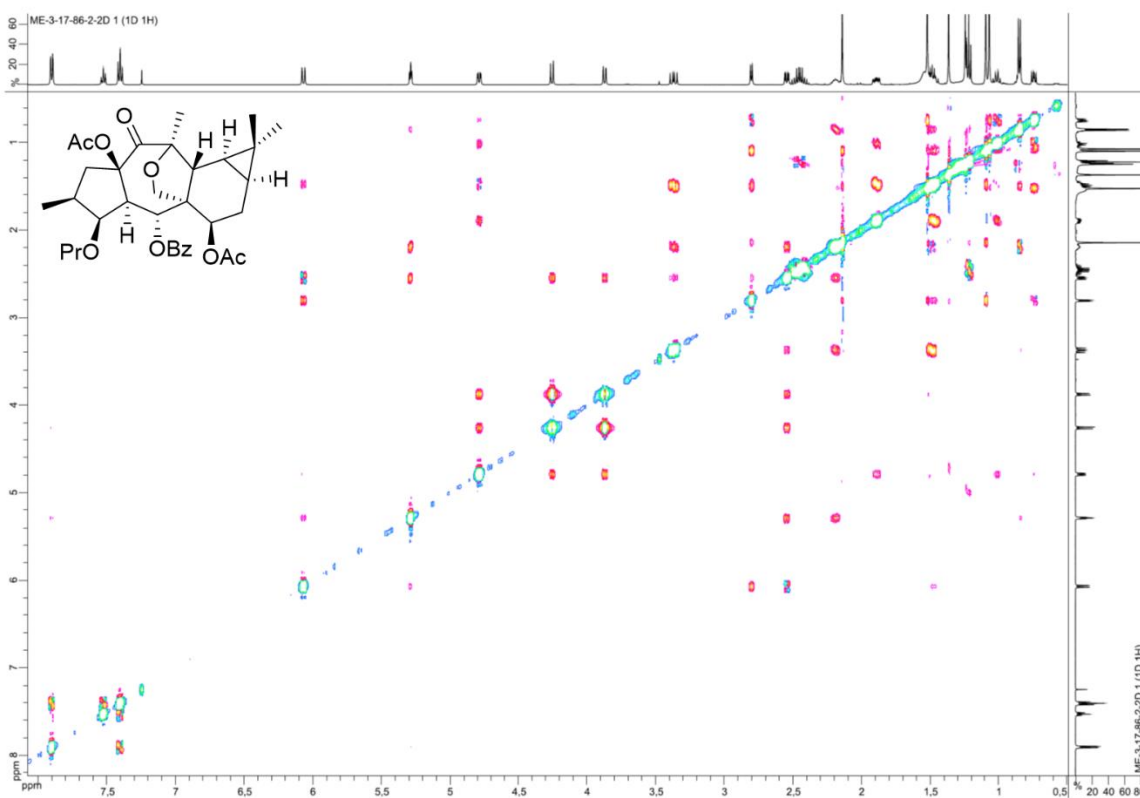
Figure S51. HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **14c****Figure S52.** ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **14c**

Figure S53. HRESIMS spectrum (TOF) of **14c****Single Mass Analysis**

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

363 formula(e) evaluated with 5 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 O: 0-50 Na: 0-1

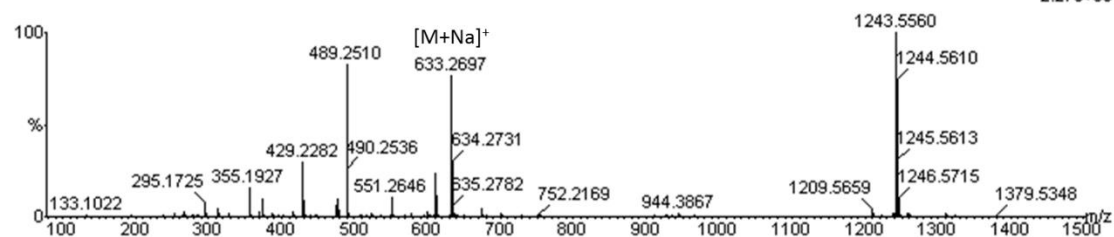
27-May-2015 8:4:6

LCT Premier XE KE483

ROUSSl_esposito16-4 696 (3.057)

1: TOF MS ES+

2.27e+004



Minimum:

Maximum: 5.0 10.0 -1.5

Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
633.2697	633.2700	-0.3	-0.5	16.5	381.0	1.7	C36 H41 O10
	633.2676	2.1	3.3	13.5	379.6	0.3	C34 H42 O10 Na [M+Na] ⁺
	633.2734	-3.7	-5.8	4.5	383.8	4.5	C27 H46 O15 Na
	633.2641	5.6	8.8	25.5	386.6	7.3	C43 H37 O5
	633.2758	-6.1	-9.6	7.5	382.6	3.3	C29 H45 O15

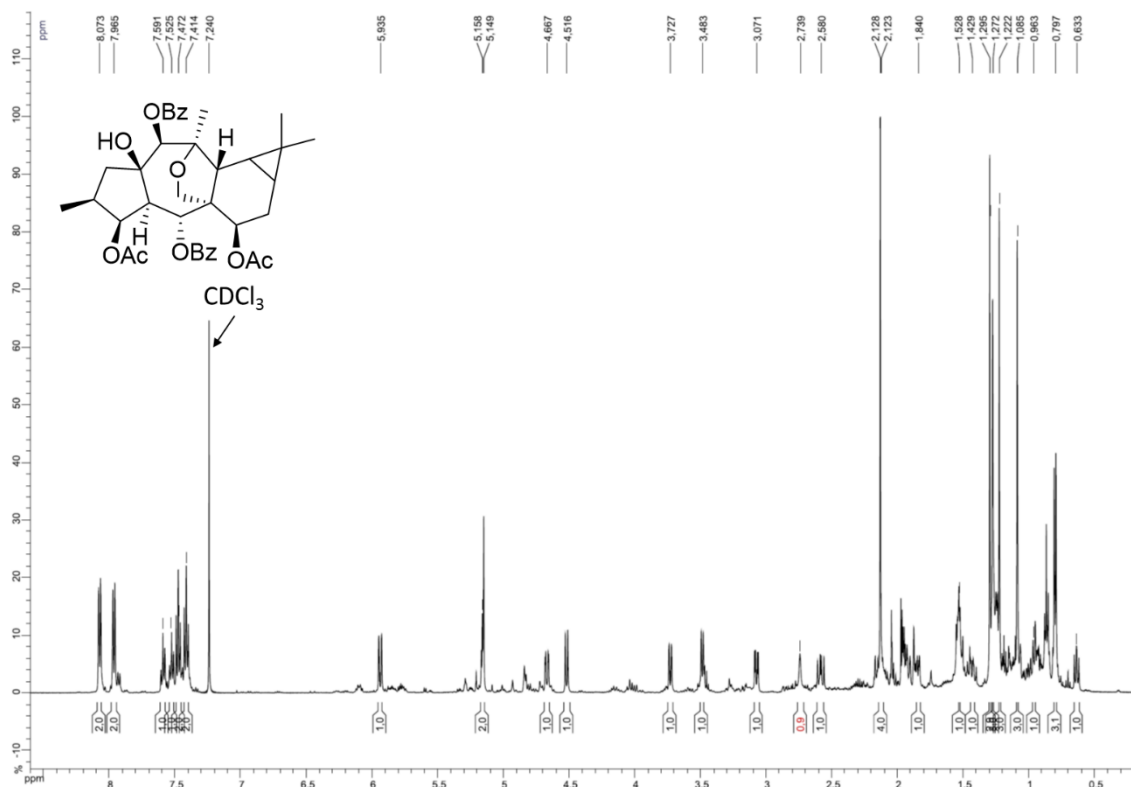
Figure S54. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **15a**

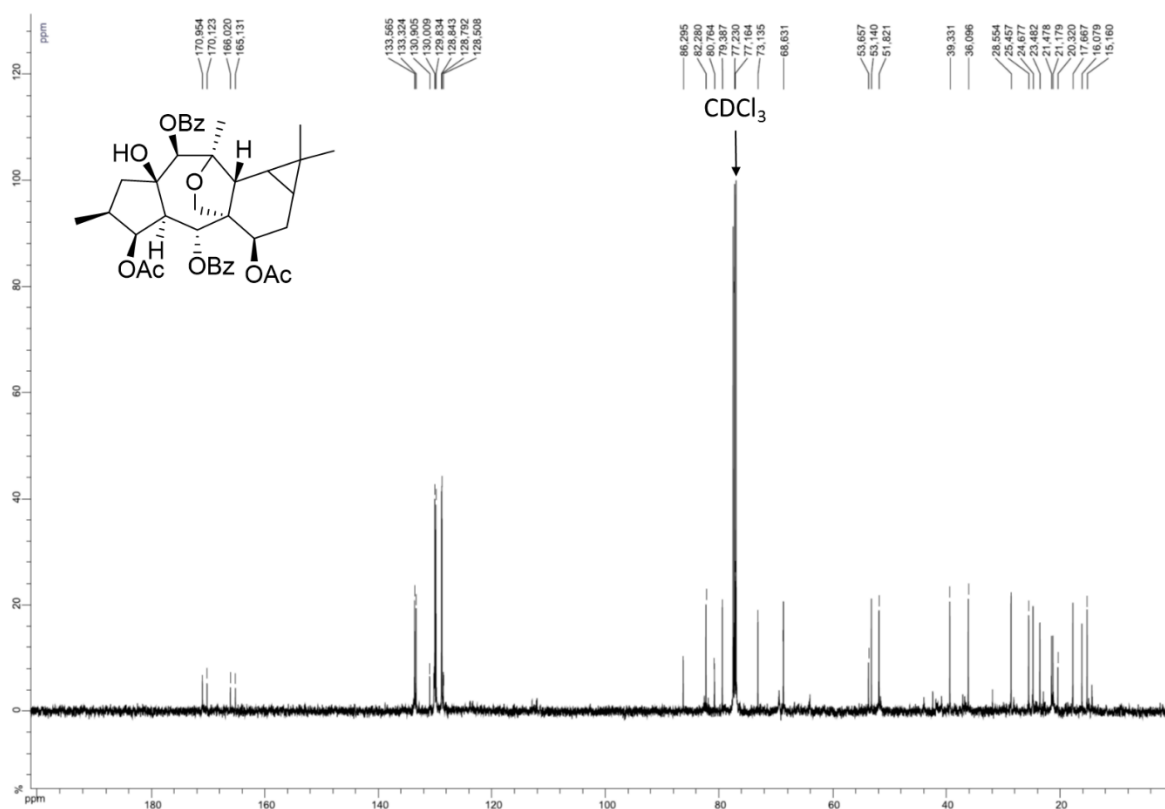
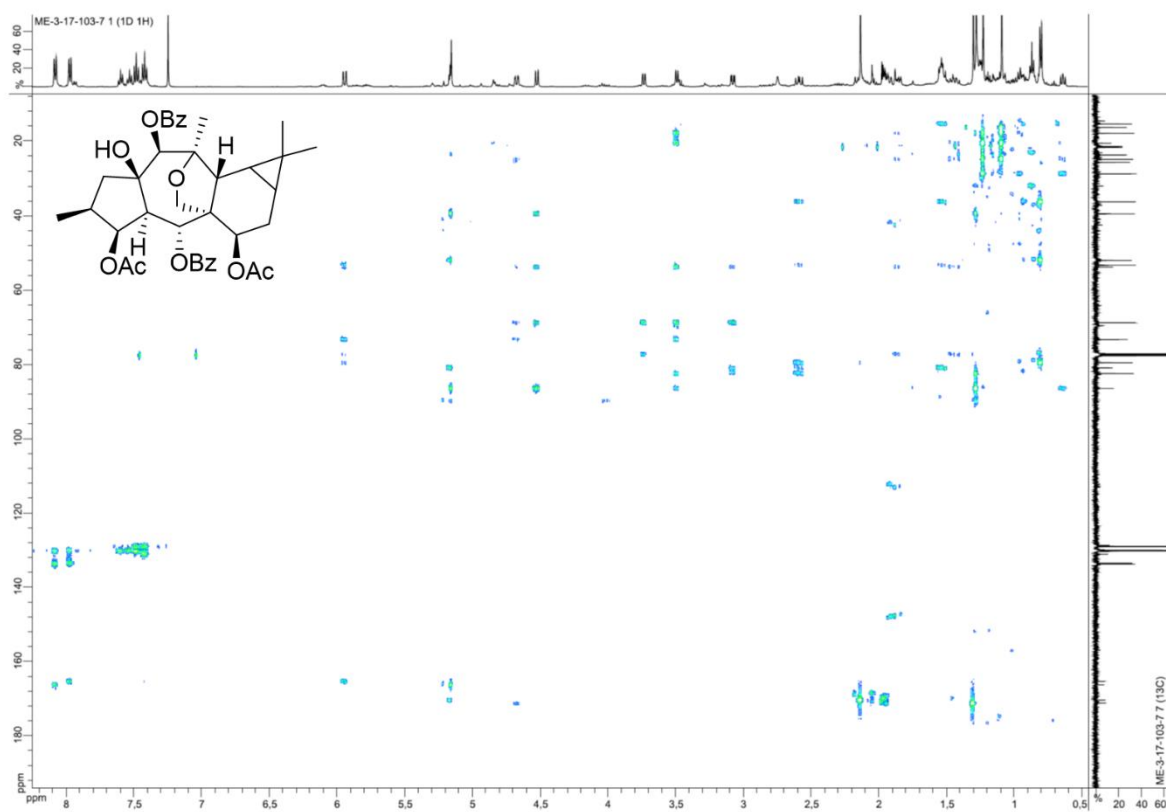
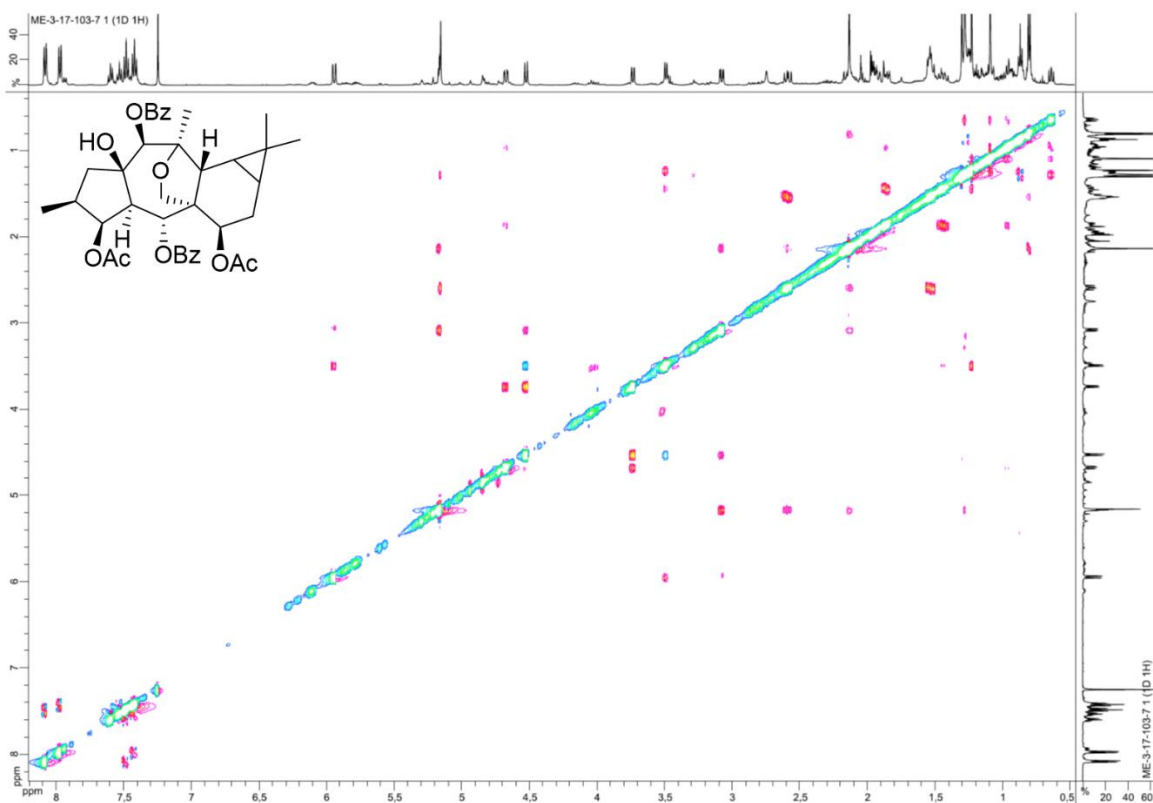
Figure S55. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 125 MHz) of **15a****Figure S56.** HMBC NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **15a**

Figure S57. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **15a****Figure S58.** HRESIMS spectrum (TOF) of **15a****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

836 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

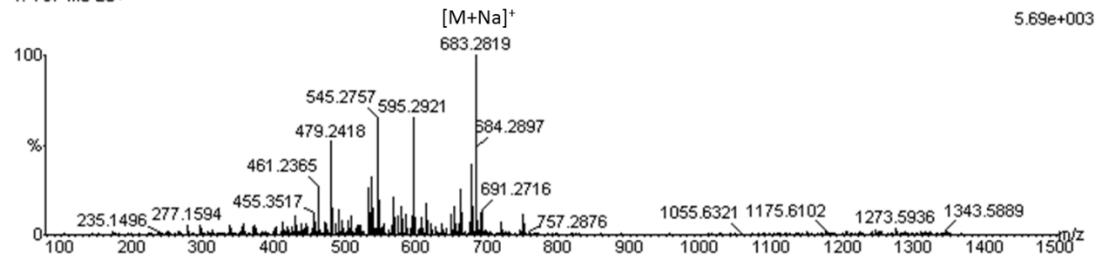
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

16-Feb-2016 11:10:16

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito30-5 684 (3.198)

1: TOF MS ES+



Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5

5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
------	------------	-----	-----	-----	-------	--------------	---------

683.2819	683.2832	-1.3	-1.9	16.5	290.6	0.4	C ₃₈ H ₄₄ O ₁₀ Na [M+Na] ⁺
	683.2797	2.2	3.2	28.5	291.4	1.1	C ₄₇ H ₃₉ O ₅

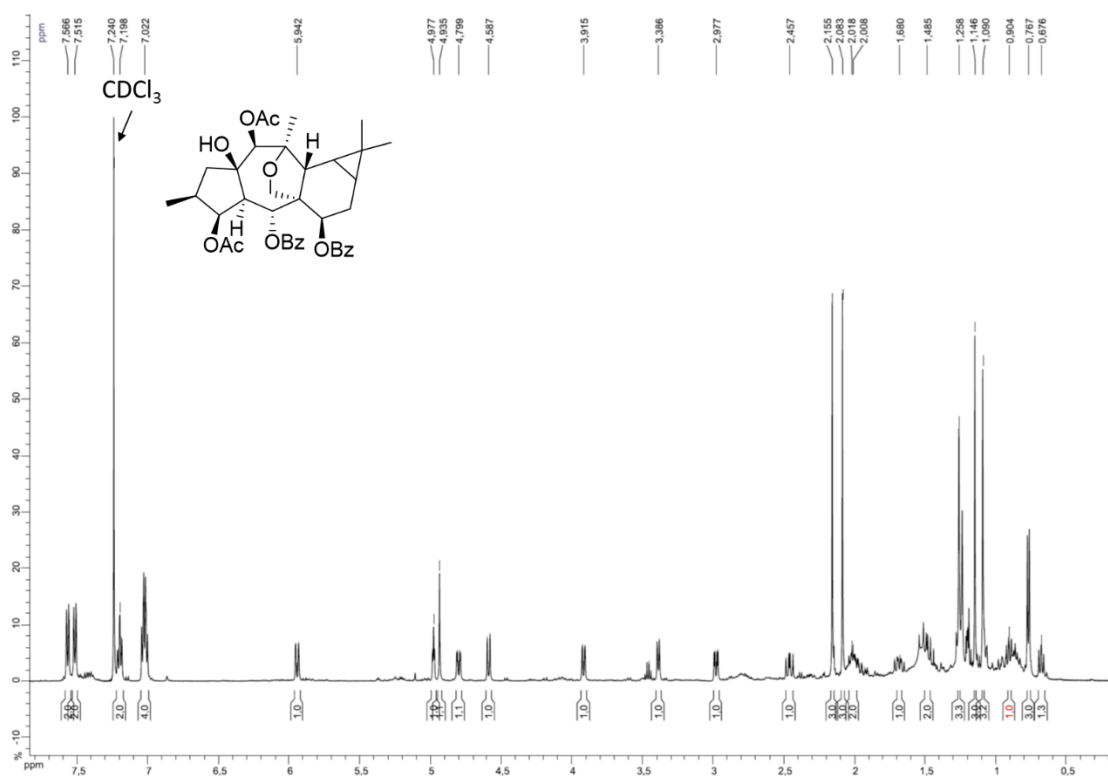
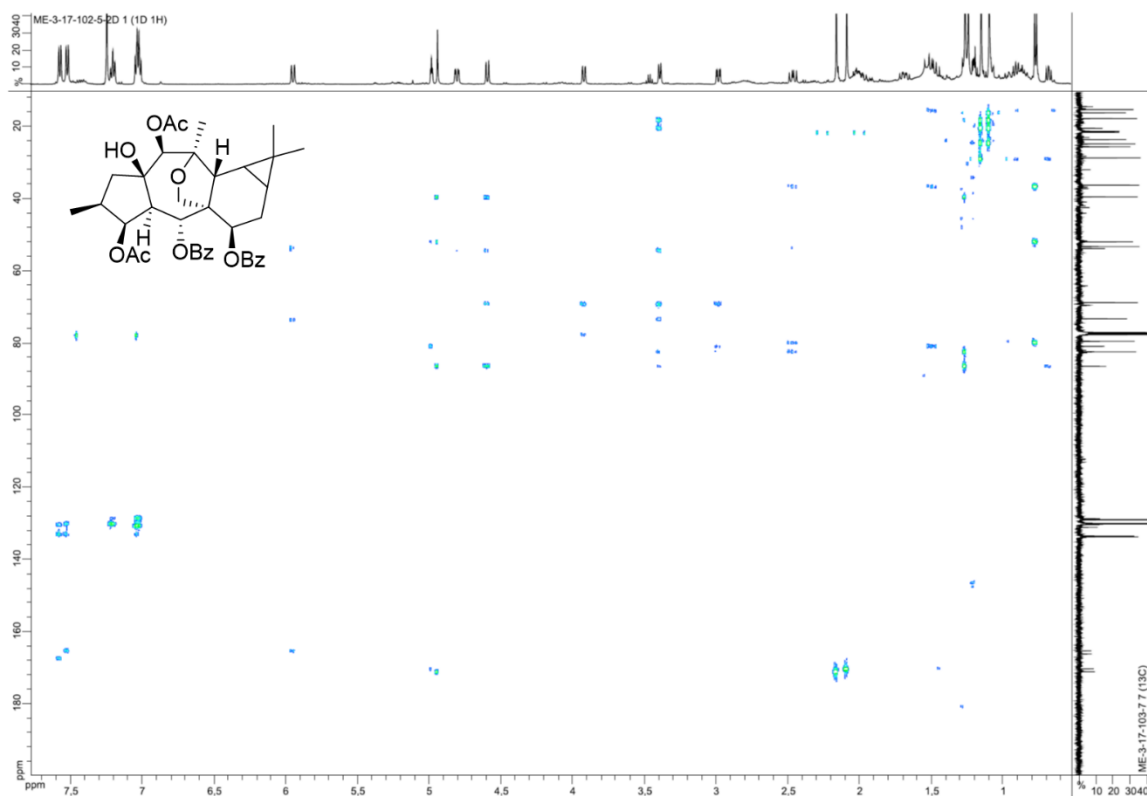
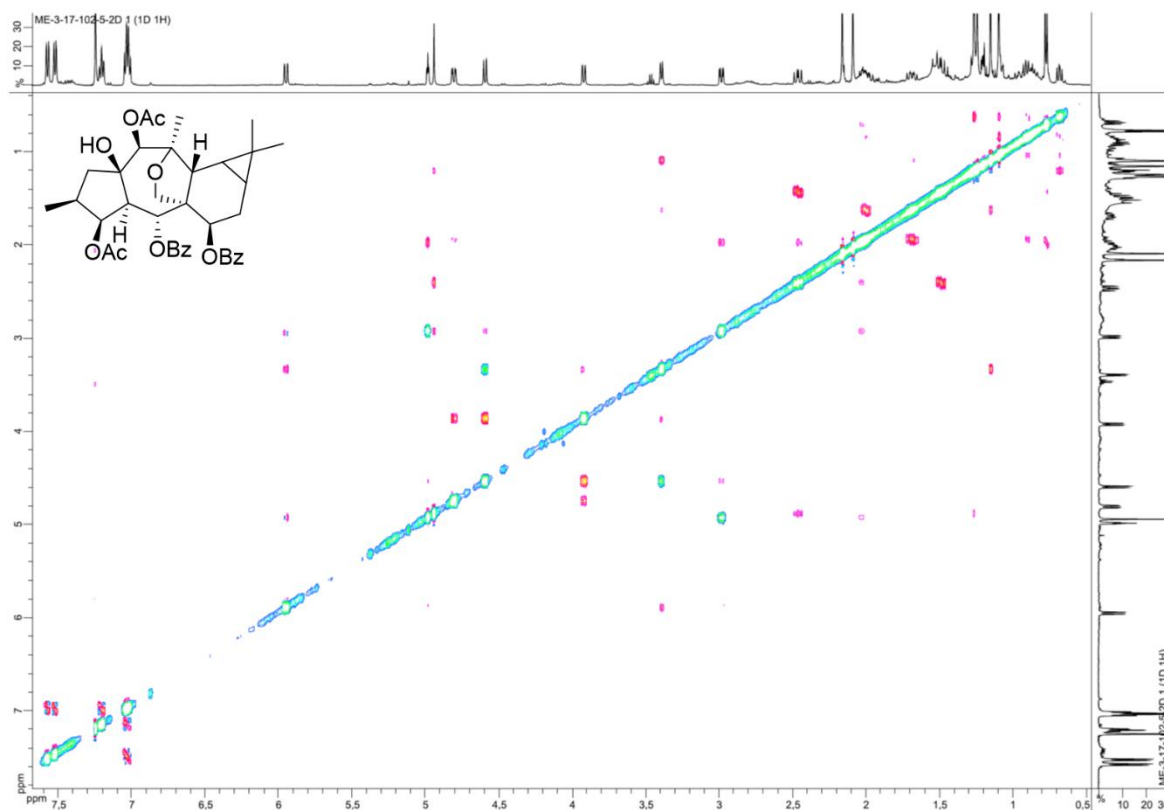
Figure S59. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **15b****Figure S60.** HMBC NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **15b**

Figure S61. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **15b****Figure S62.** HRESIMS spectrum (TOF) of **15b****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

836 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

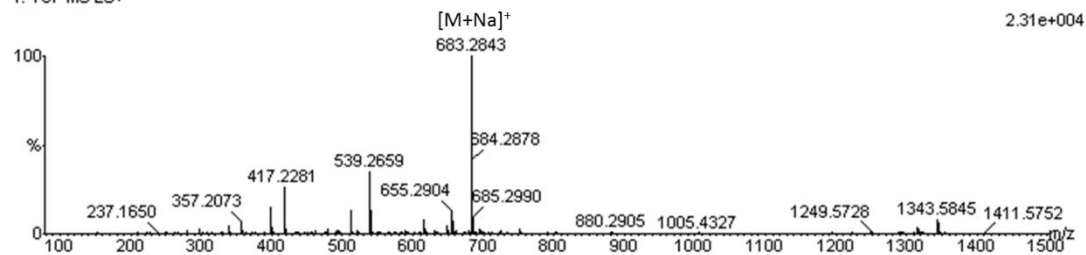
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

08-Jan-2016 15:56:25

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito23-5 677 (3.170)

1: TOF MS ES+



Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
683.2843	683.2832	1.1	1.6	16.5	338.4	0.2	C38 H44 O10 Na [M+Na] ⁺
	683.2856	-1.3	-1.9	19.5	340.1	1.9	C40 H43 O10

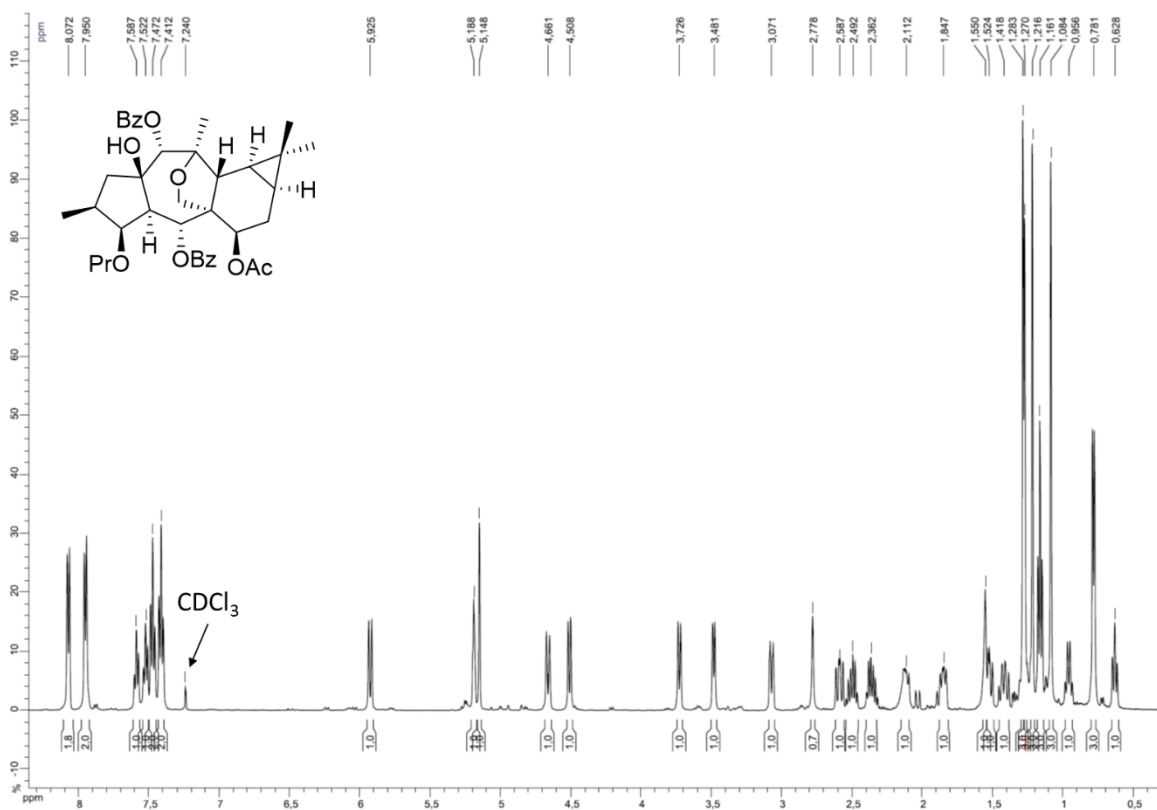
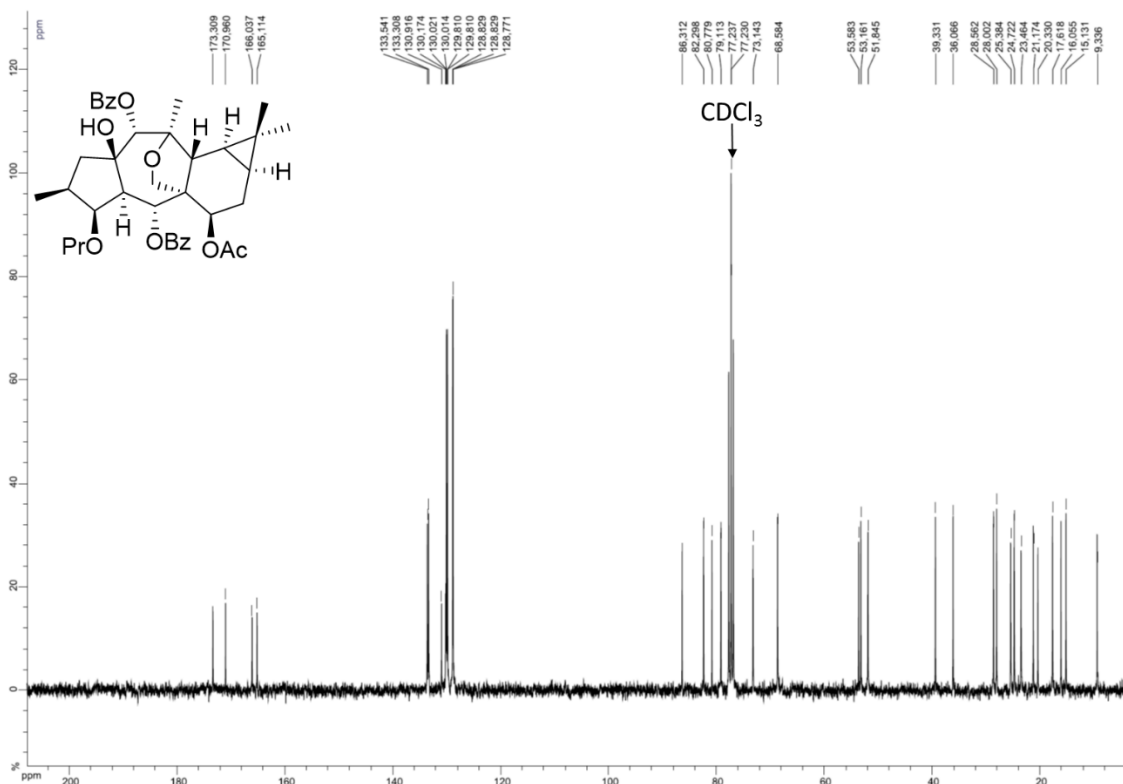
Figure S63. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of **15c****Figure S64.** ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **15c**

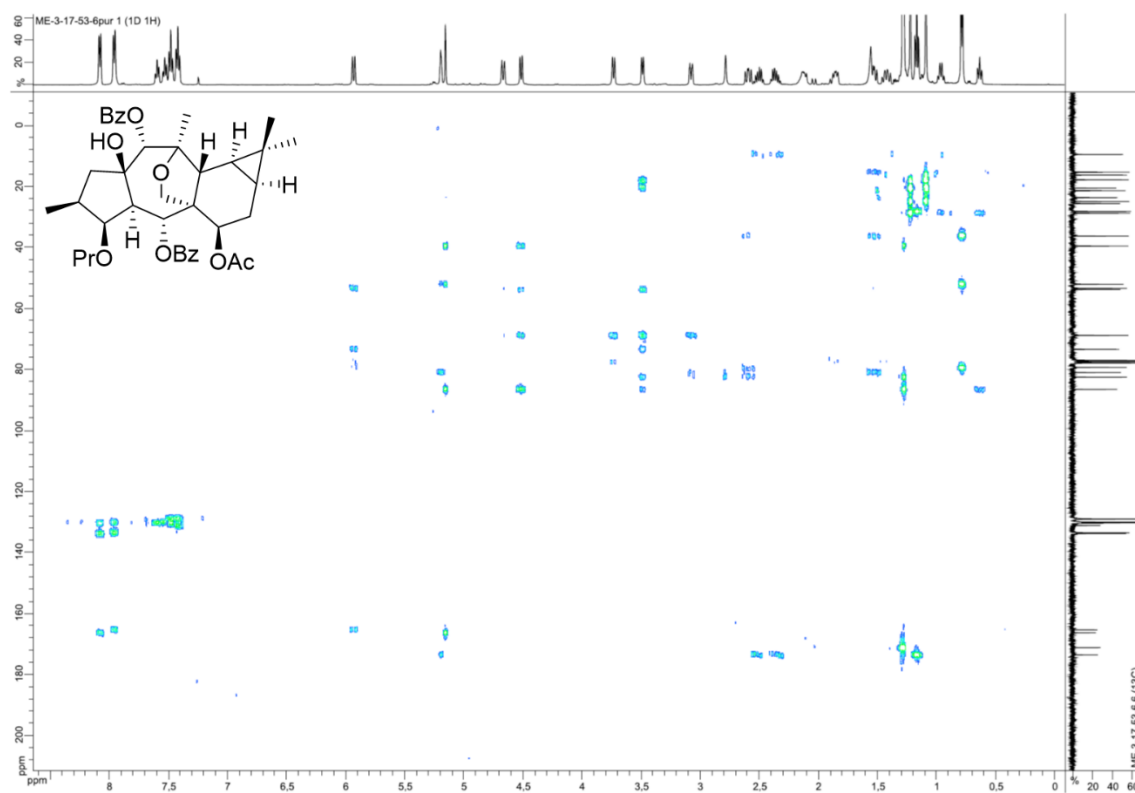
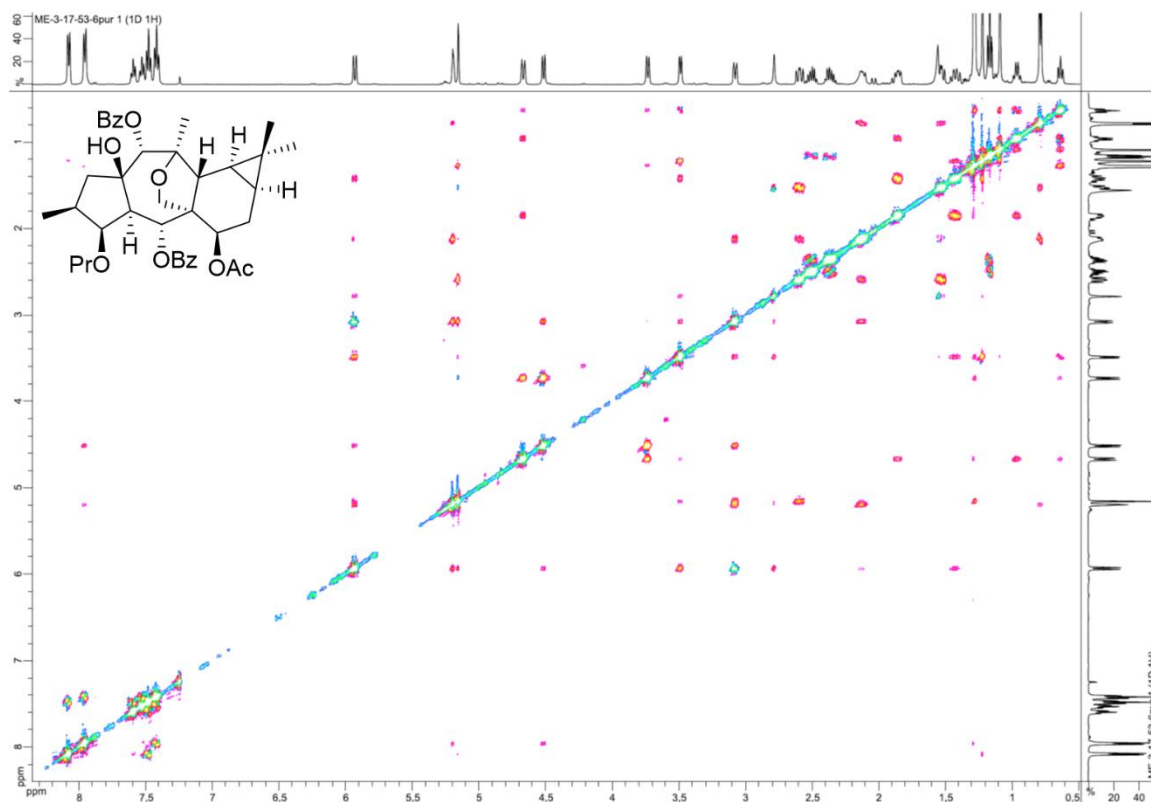
Figure S65. HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **15c****Figure S66.** ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 500 MHz) of **15c**

Figure S67. HRESIMS spectrum (TOF) of **15c****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

436 formula(e) evaluated with 3 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-300 O: 0-50 Na: 0-1

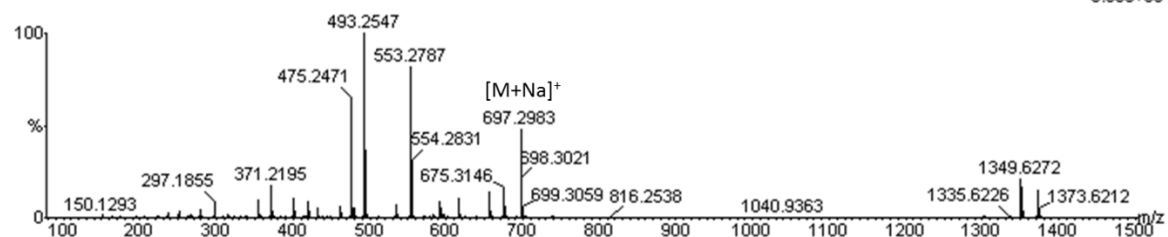
27-Apr-2015 20:11:07

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_espostof13-4 761 (3.332)

1: TOF MS ES+

3.89e+004



Minimum:

Maximum:

	-1.5	5.0	5.0	50.0
--	------	-----	-----	------

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
697.2983	697.2989	-0.6	-0.9	16.5	339.1	0.8	C39 H46 O10 Na [M+Na] ⁺
	697.2954	2.9	4.2	28.5	342.4	4.0	C48 H41 O5
	697.3013	-3.0	-4.3	19.5	339.0	0.7	C41 H45 O10

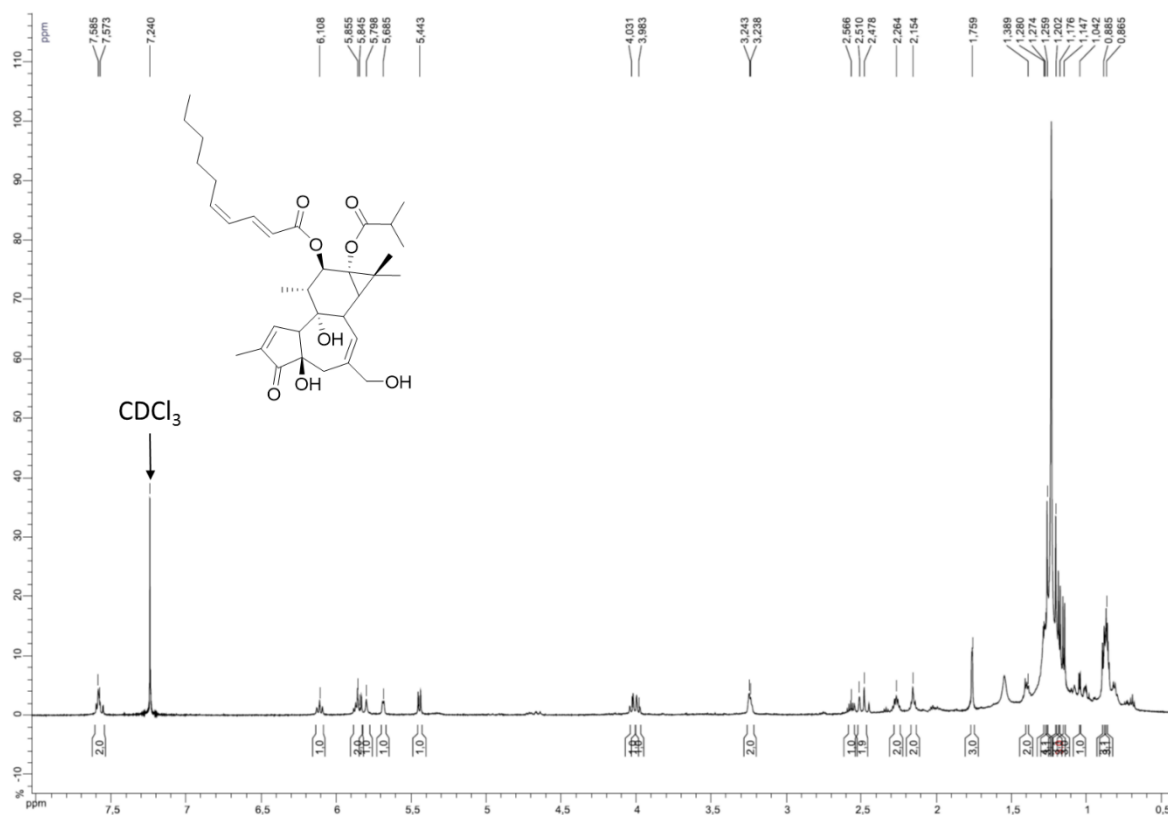
Figure S68. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16a**

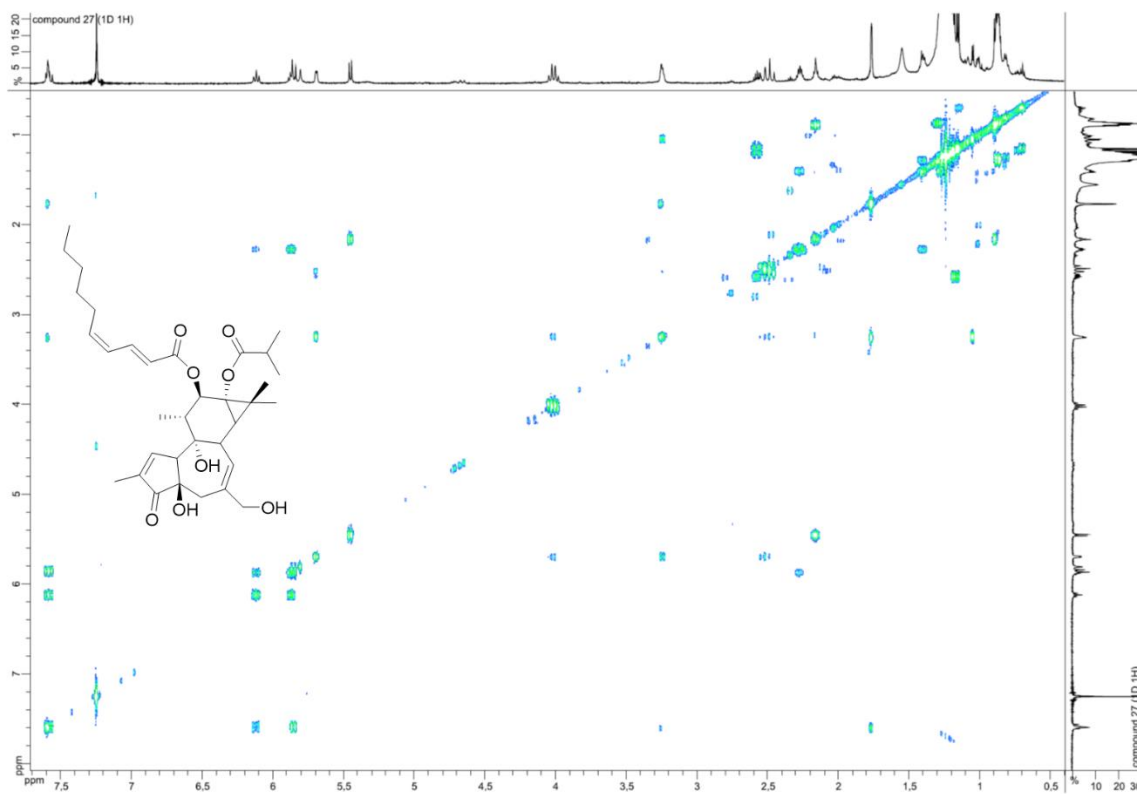
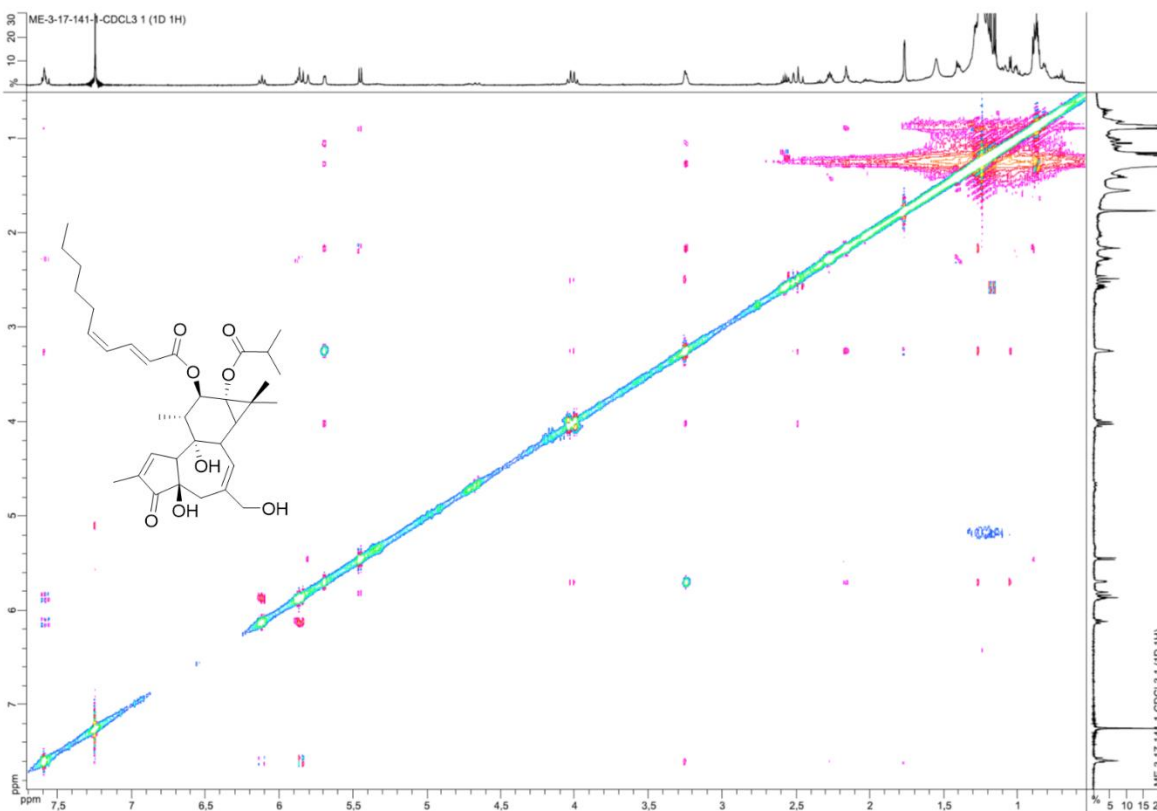
Figure S69. COSY NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16a****Figure S70.** ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16a**

Figure S71. HRESIMS spectrum (TOF) of **16a****Single Mass Analysis**

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

677 formula(e) evaluated with 5 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

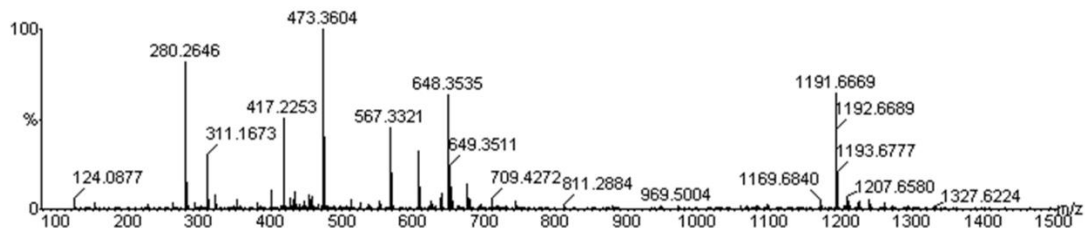
29-Apr-2016 6:9:2

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito45-3 711 (3.313)

1: TOF MS ES+

3.82e+003



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
607.3246	607.3247	-0.1	-0.2	10.5	190.3	0.5	C34 H48 O8 Na [M+Na] ⁺
	607.3271	-2.5	-4.1	13.5	191.5	1.7	C36 H47 O8
	607.3212	3.4	5.6	22.5	194.5	4.7	C43 H43 O3
	607.3188	5.8	9.6	19.5	193.5	3.7	C41 H44 O3 Na
	607.3306	-6.0	-9.9	1.5	191.4	1.6	C27 H52 O13 Na

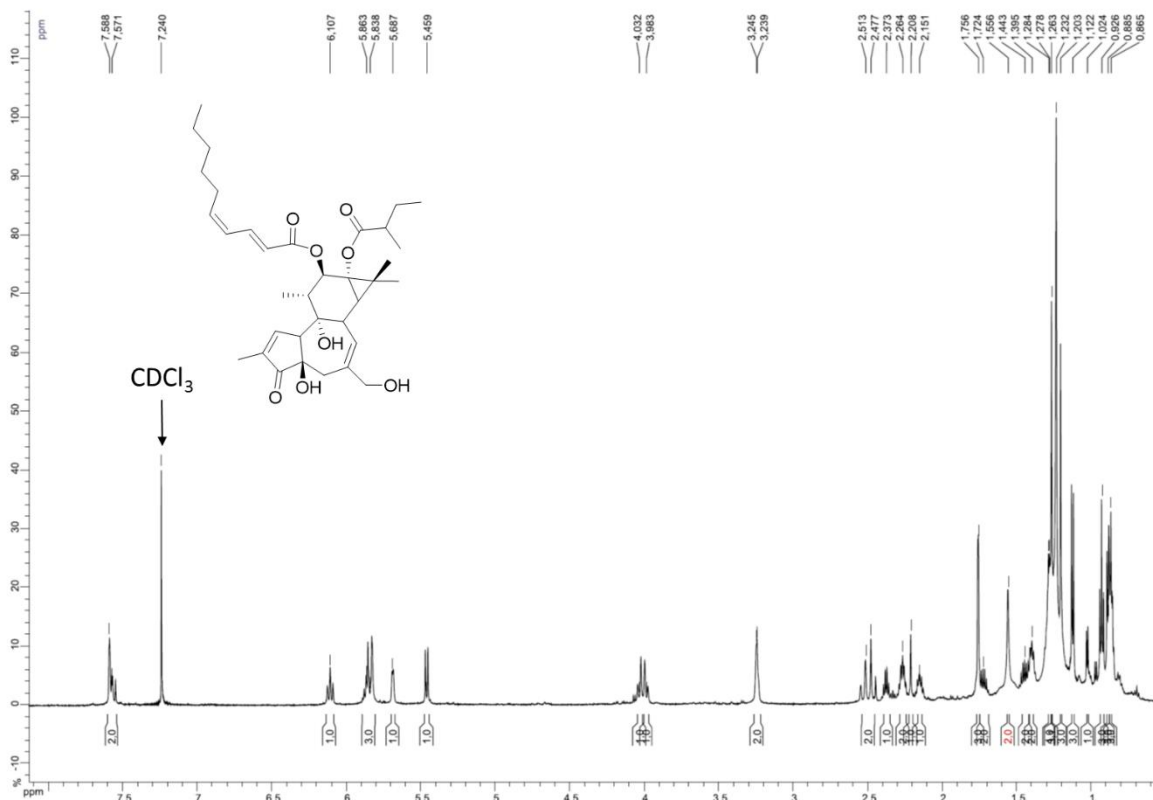
Figure S72. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16b**

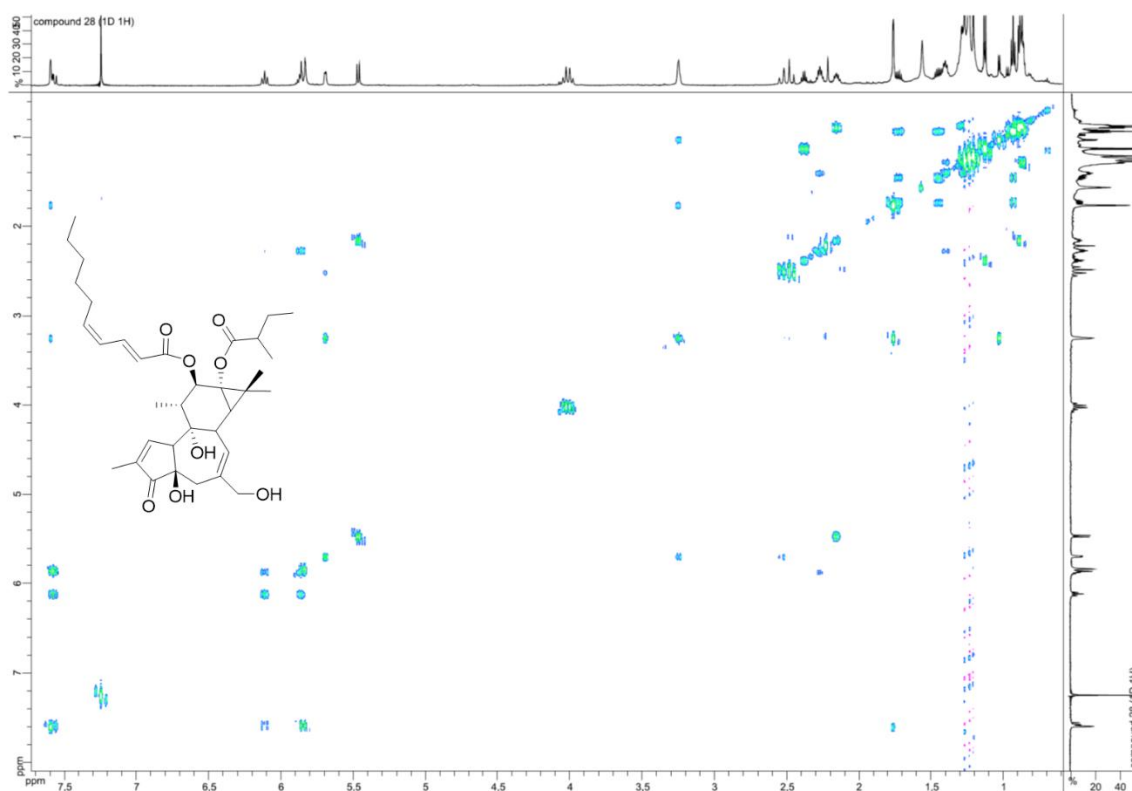
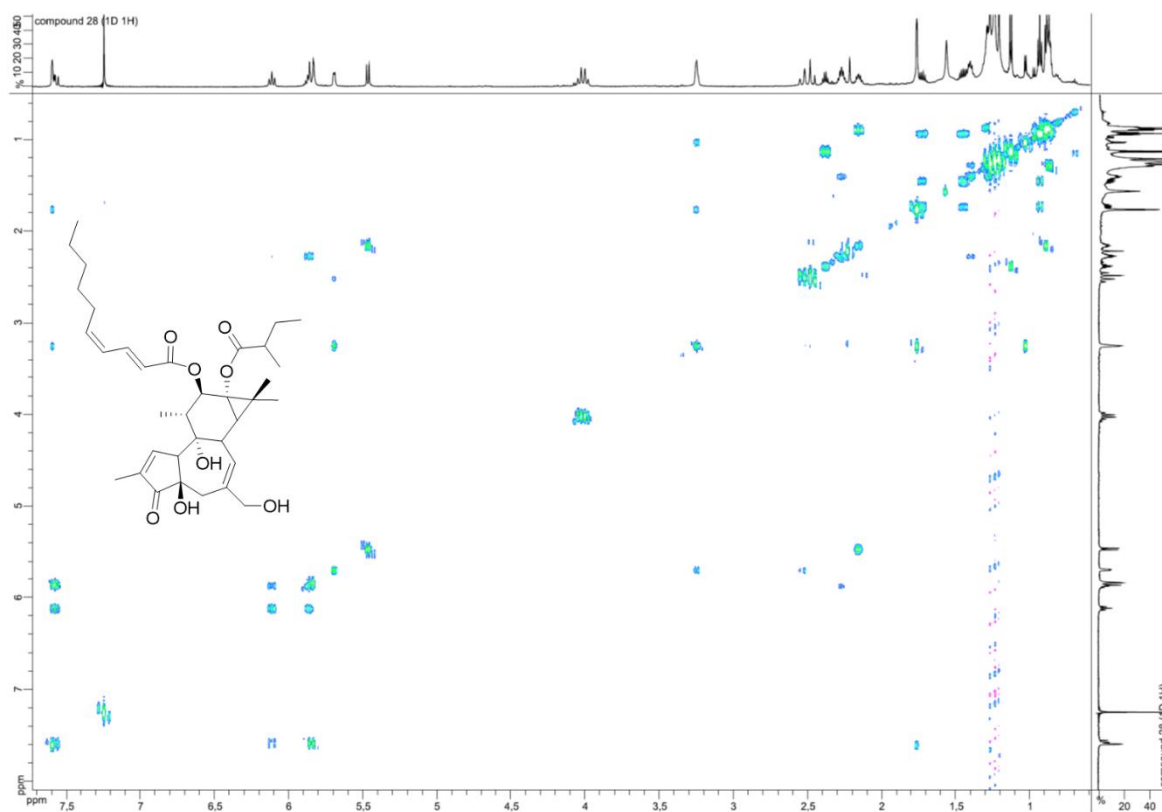
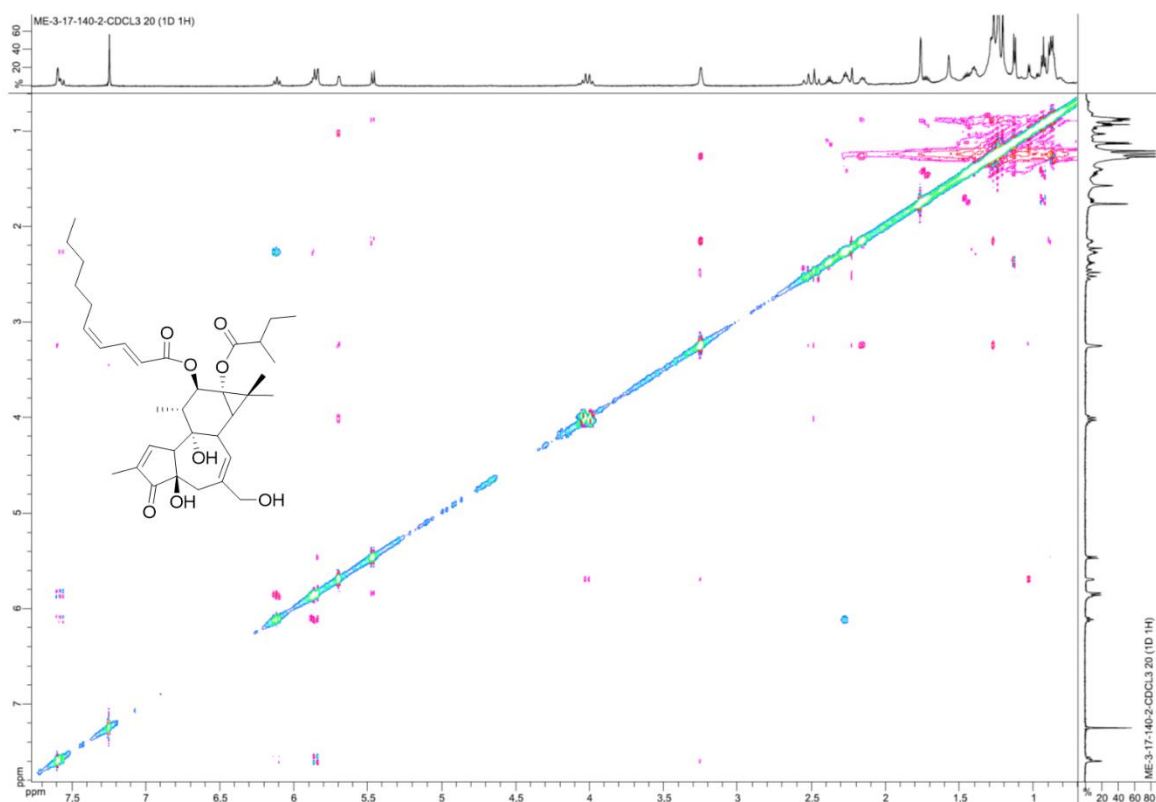
Figure S73. COSY NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16b****Figure S74.** HMBC NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16b**

Figure S75. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16b****Figure S76.** HRESIMS spectrum (TOF) of **16b****Single Mass Analysis**

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

705 formula(e) evaluated with 4 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

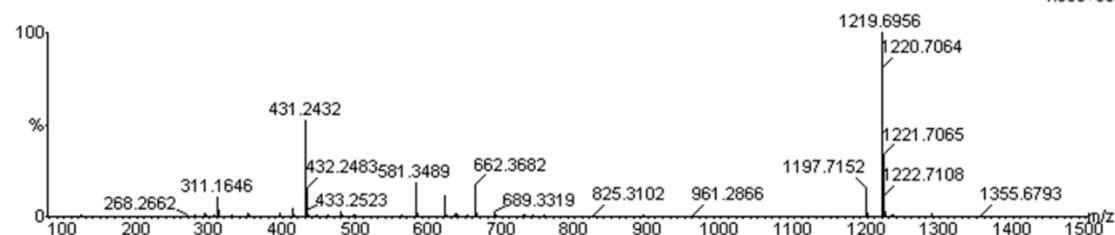
29-Apr-2016 6:6:0

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito45-1 727 (3.388)

1: TOF MS ES+

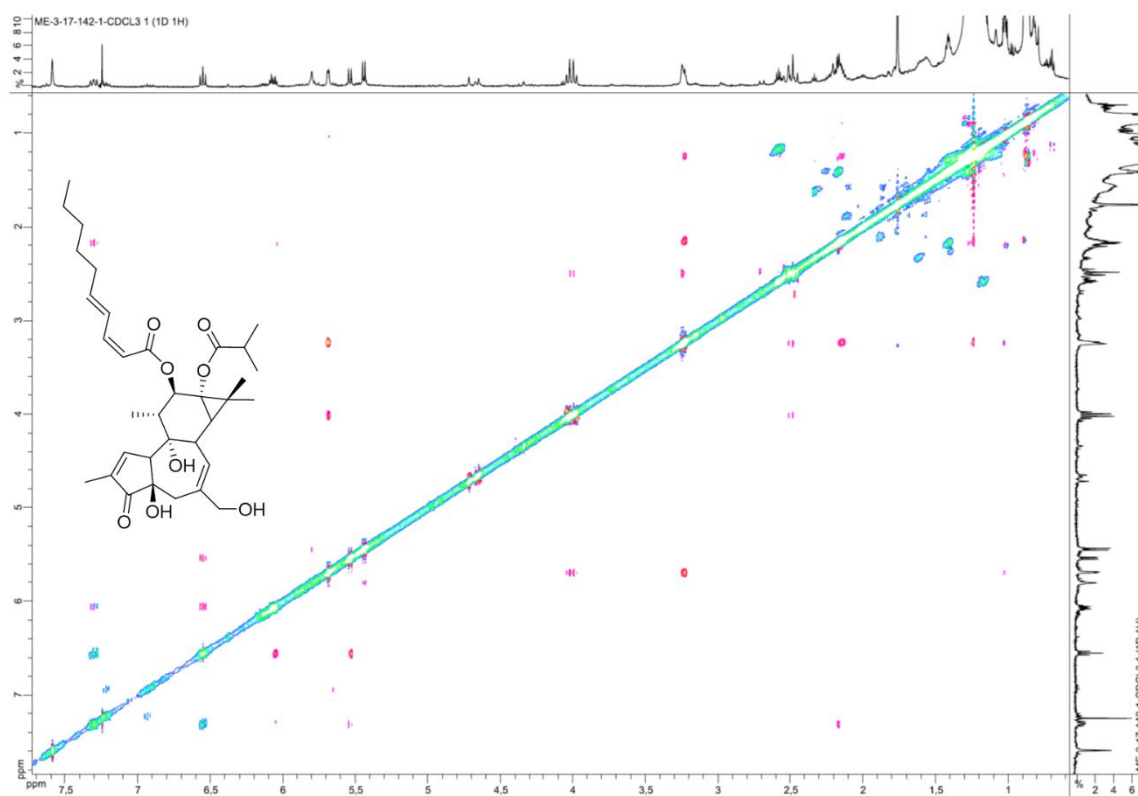
4.38e+004



Minimum:

Maximum: 5.0 10.0 -1.5 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
621.3422	621.3427	-0.5	-0.8	13.5	314.5	2.3	C37 H49 O8
	621.3403	1.9	3.1	10.5	312.3	0.1	C35 H50 O8 Na [M+Na] ⁺
	621.3462	-4.0	-6.4	1.5	315.6	3.4	C28 H54 O13 Na
	621.3369	5.3	8.5	22.5	319.8	7.6	C44 H45 O3

Figure S79. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **16c****Figure S80.** HRESIMS spectrum (TOF) of **16c****Single Mass Analysis**

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

677 formula(e) evaluated with 4 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

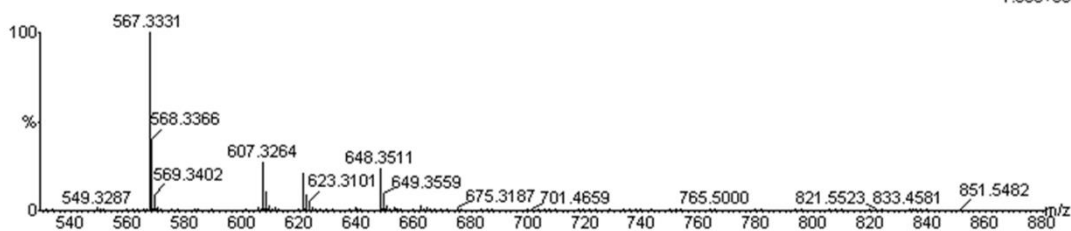
02-May-2016 3:7:3

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito46-2 717 (3.322) Cm (716:721)

1: TOF MS ES+

1.06e+005



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
607.3264	607.3271	-0.7	-1.2	13.5	794.6	0.3	C36 H47 O8
	607.3247	1.7	2.8	10.5	799.1	4.8	C34 H48 O8 Na [M+Na] ⁺
	607.3306	-4.2	-6.9	1.5	795.8	1.5	C27 H52 O13 Na
	607.3212	5.2	8.6	22.5	799.9	5.6	C43 H43 O3

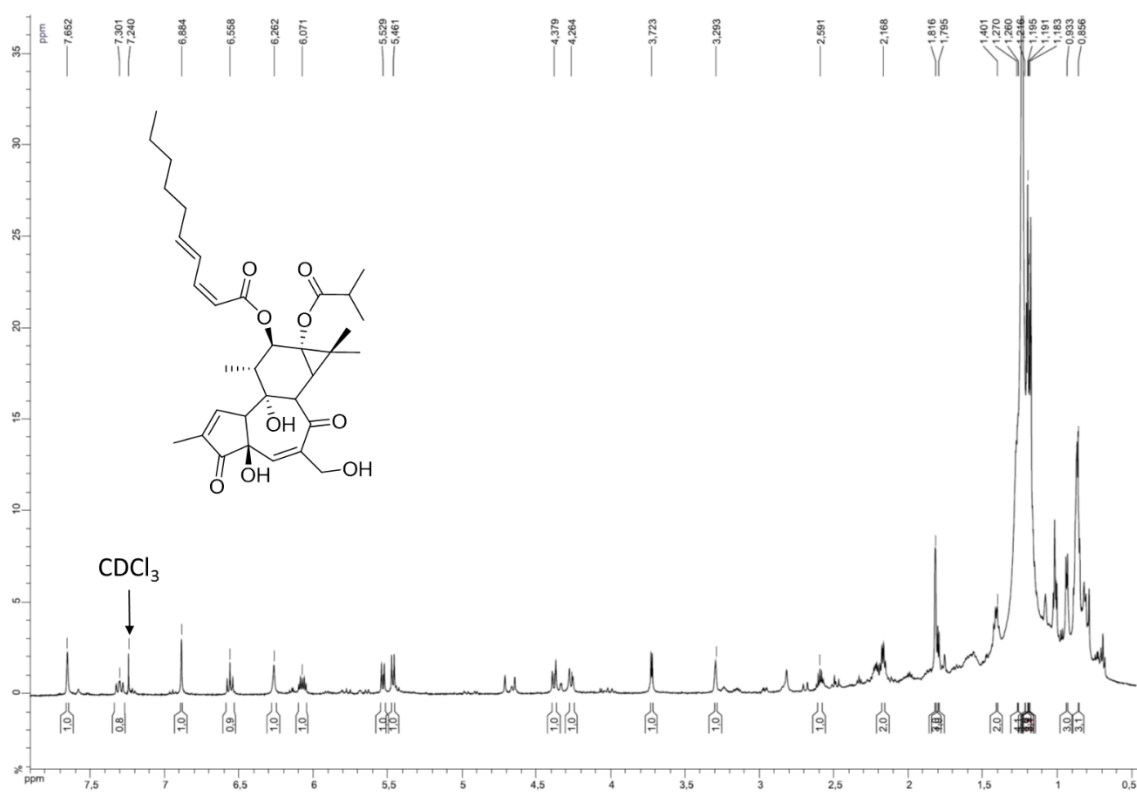
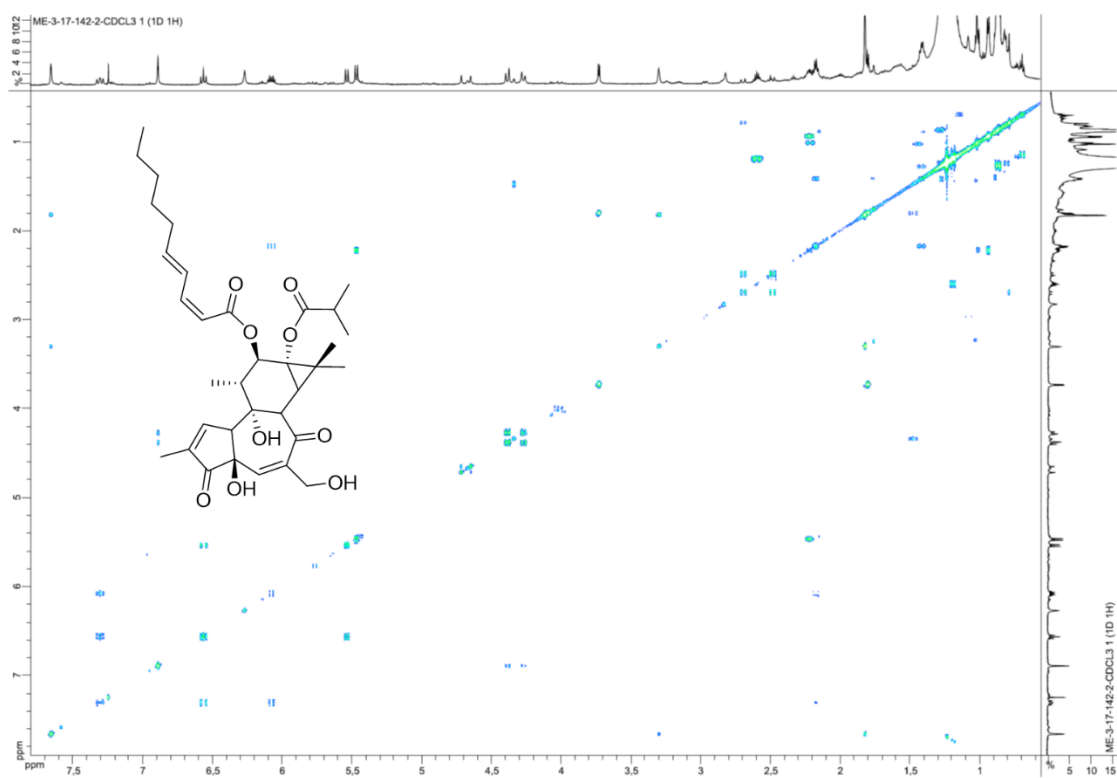
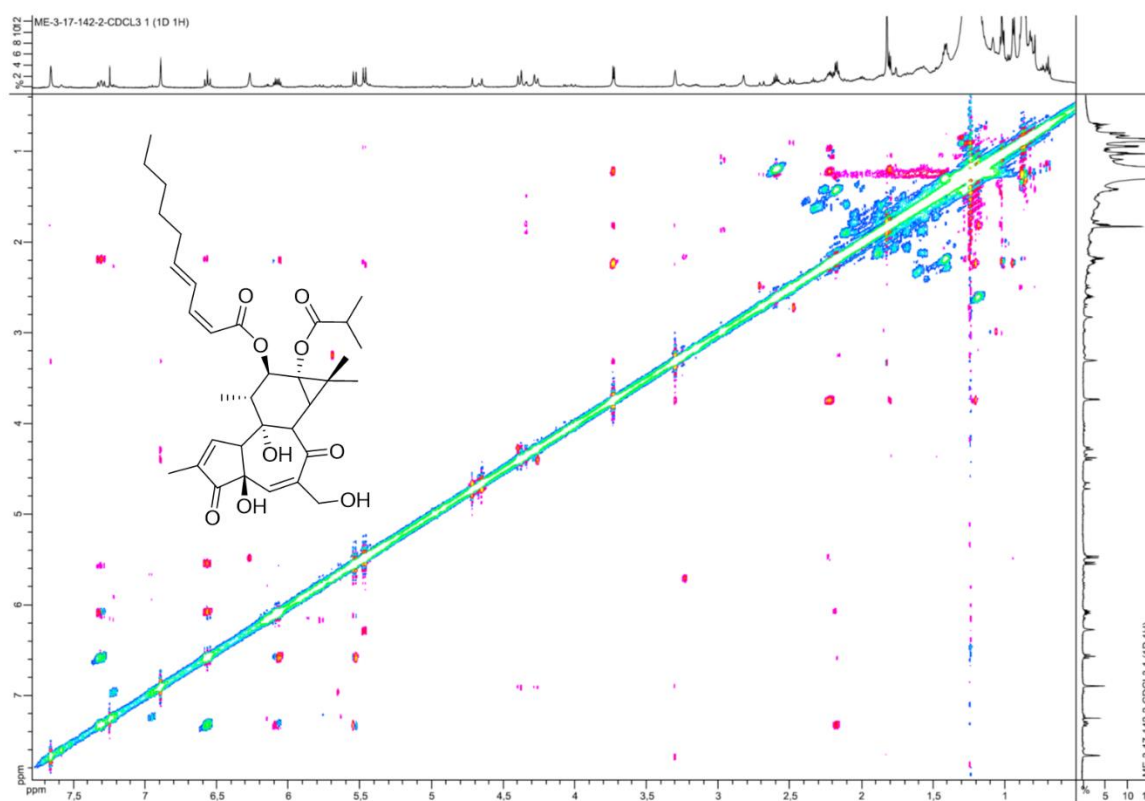
Figure S81. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 600 MHz) of **17****Figure S82.** COSY NMR spectrum (CDCl_3 , 600 MHz) of **17**

Figure S83. ROESY NMR spectrum (CDCl₃, 600 MHz) of **17****Figure S84.** HRESIMS spectrum (TOF) of **17****Single Mass Analysis**

Tolerance = 3.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

704 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

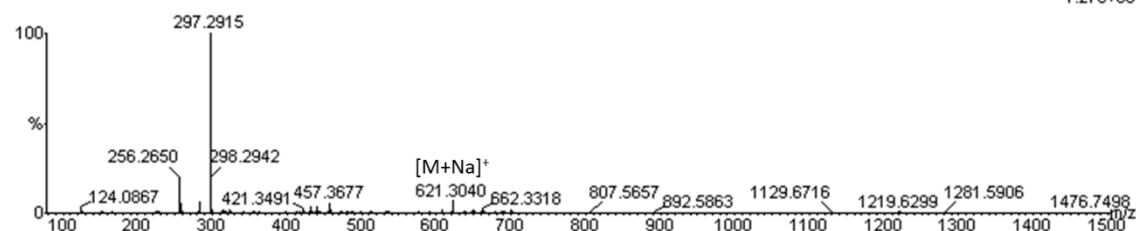
02-May-2016 3:3:4

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito46-1 744 (3.460)

1: TOF MS ES+

1.27e+004



Minimum:

Maximum: 5.0 3.0 -1.5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
621.3040	621.3040	0.0	0.0	11.5	163.8	0.0	C34 H46 O9 Na [M+Na] ⁺

FIGURES ANNEXES DE LA PARTIE F DES RESULTATS

Figure 1. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **1**

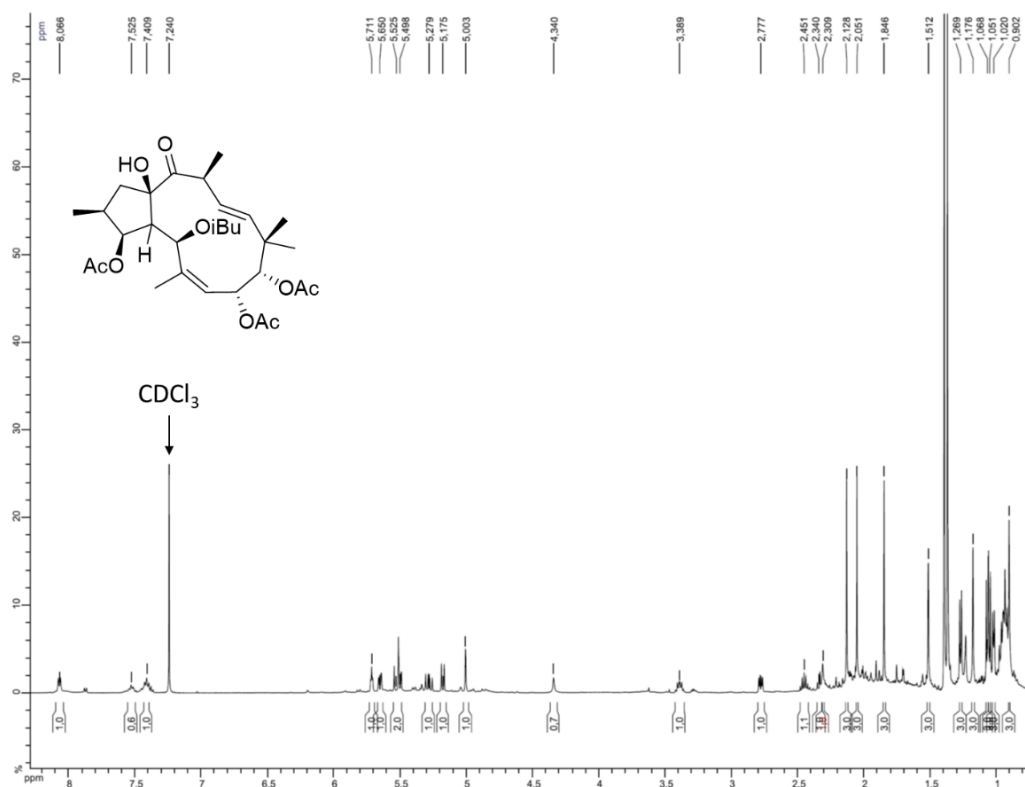


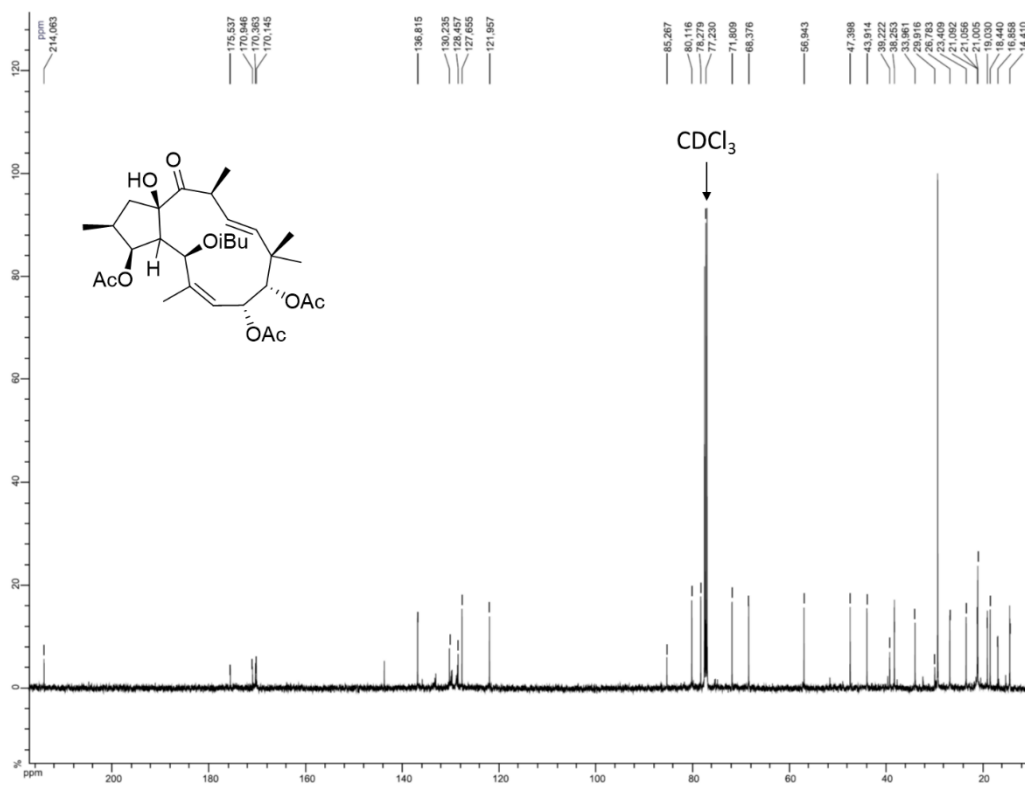
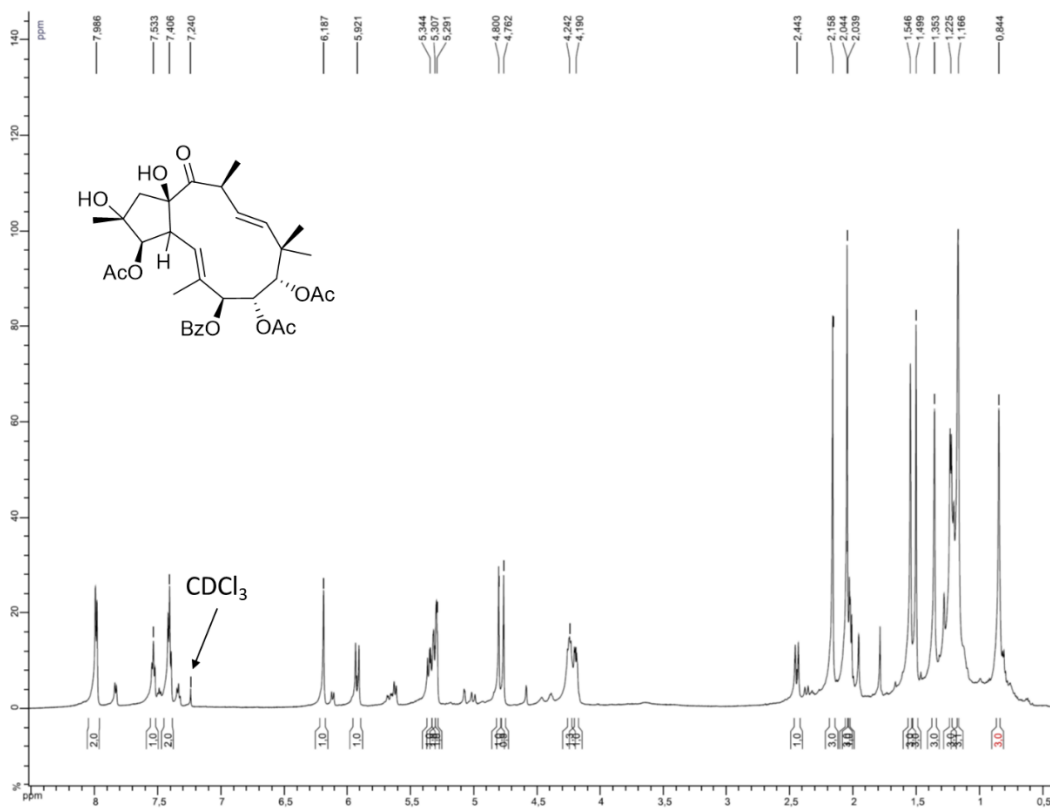
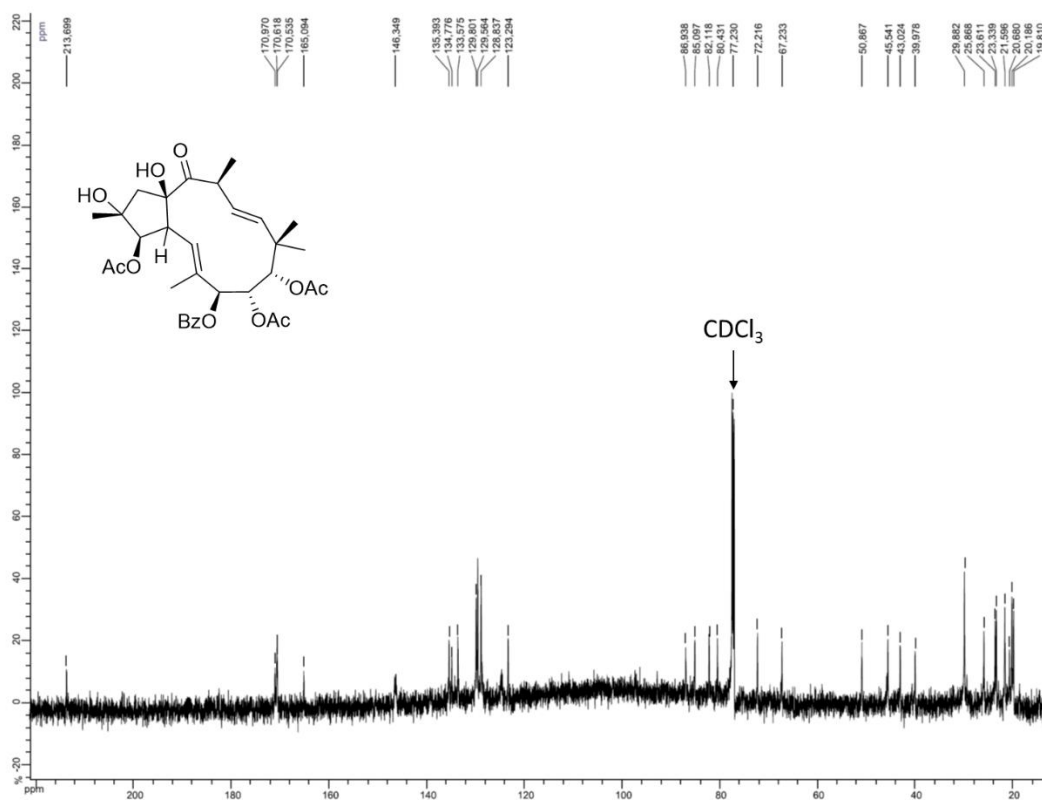
Figure 2. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 125 MHz) of **1****Figure 3.** ^1H NMR spectrum at 226 K (CDCl_3 , 600 MHz) of **2**

Figure 4. ^{13}C NMR spectrum at 226 K (CDCl_3 , 150 MHz) of **2****Figure 5.** HRESIMS spectrum (TOF) of **2****Single Mass Analysis**

Tolerance = 7.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

738 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

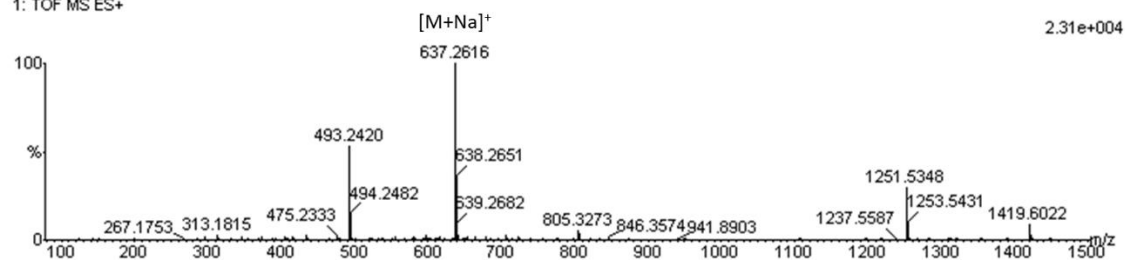
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

06-Jul-2016 11:17:27

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito55-1 561 (2.619)

1: TOF MS ES+



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
637.2616	637.2625	-0.9	-1.4	12.5	390.1	0.4	C33 H42 O11 Na [M+Na] ⁺
	637.2590	2.6	4.1	24.5	397.0	7.2	C42 H37 O6
	637.2649	-3.3	-5.2	15.5	390.9	1.1	C35 H41 O11

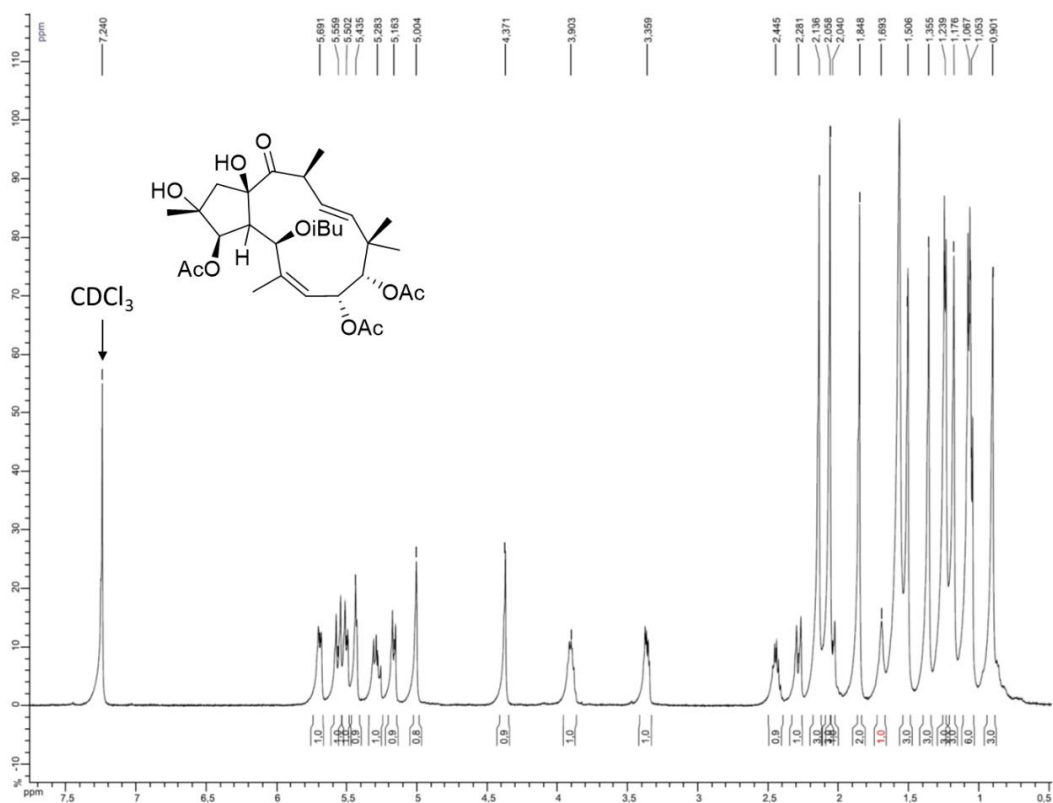
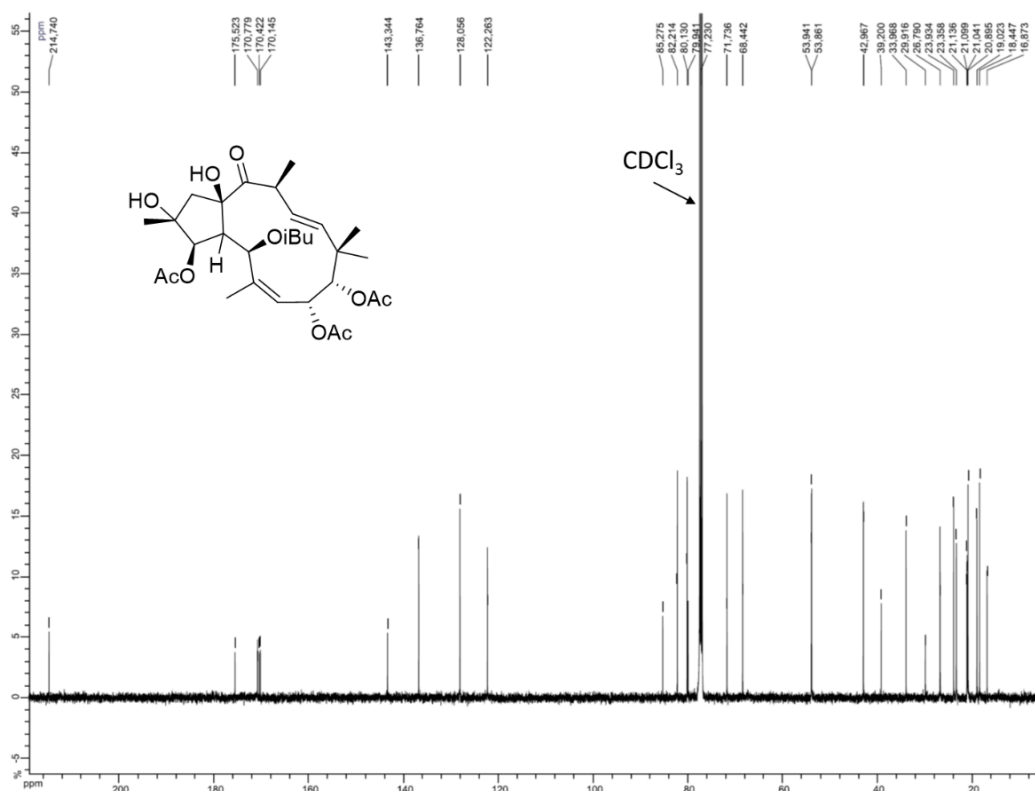
Figure 6. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 500 MHz) of **3****Figure 7.** ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 125 MHz) of **3**

Figure 8. HRESIMS spectrum (TOF) of **3****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

668 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

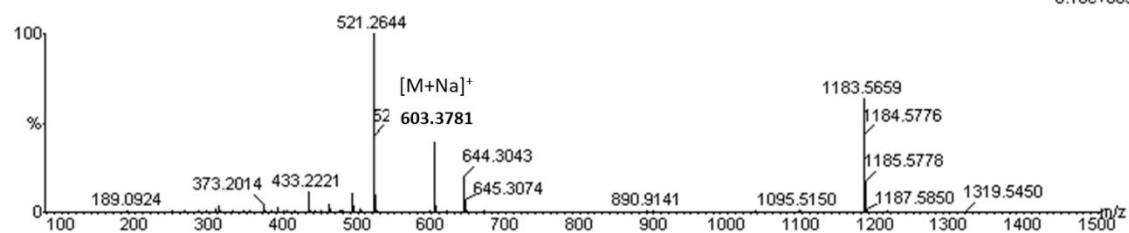
06-Jul-2016 11:30:46

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito55-2 515 (2.410) Cm (512:521)

1: TOF MS ES+

6.18e+005



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
603.2781	603.2781	0.0	0.0	8.5	1059.1	0.2	C30 H44 O11 Na [M+Na] ⁺
	603.2805	-2.4	-4.0	11.5	1060.6	1.7	C32 H43 O11

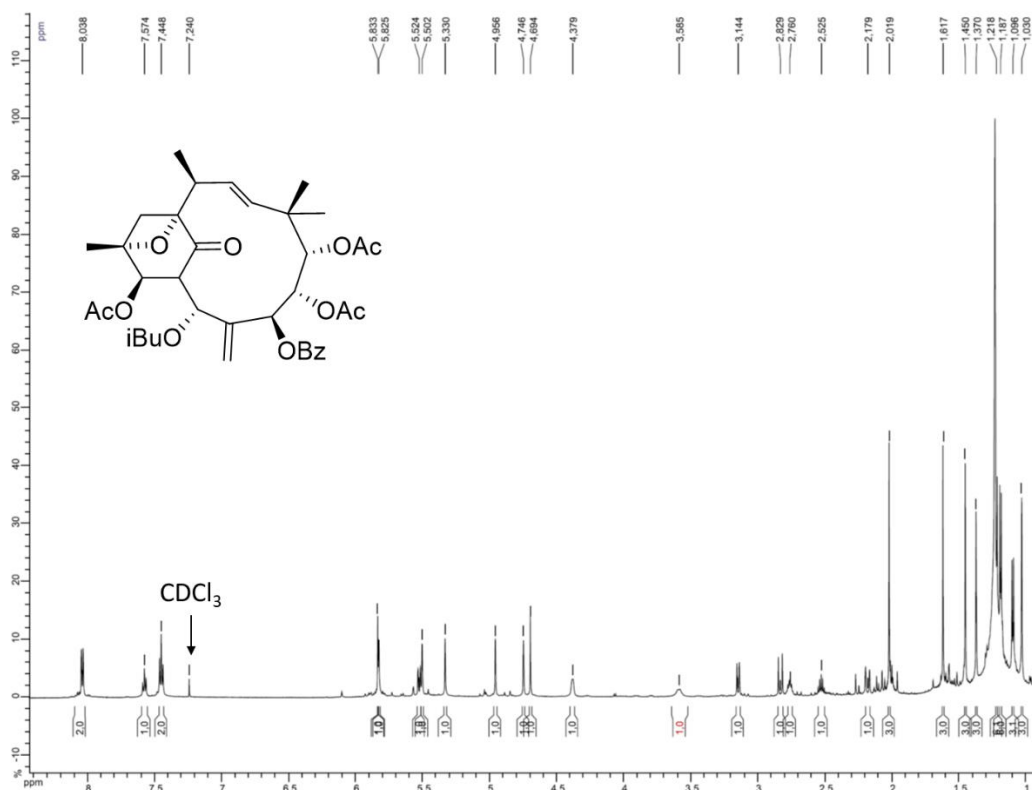
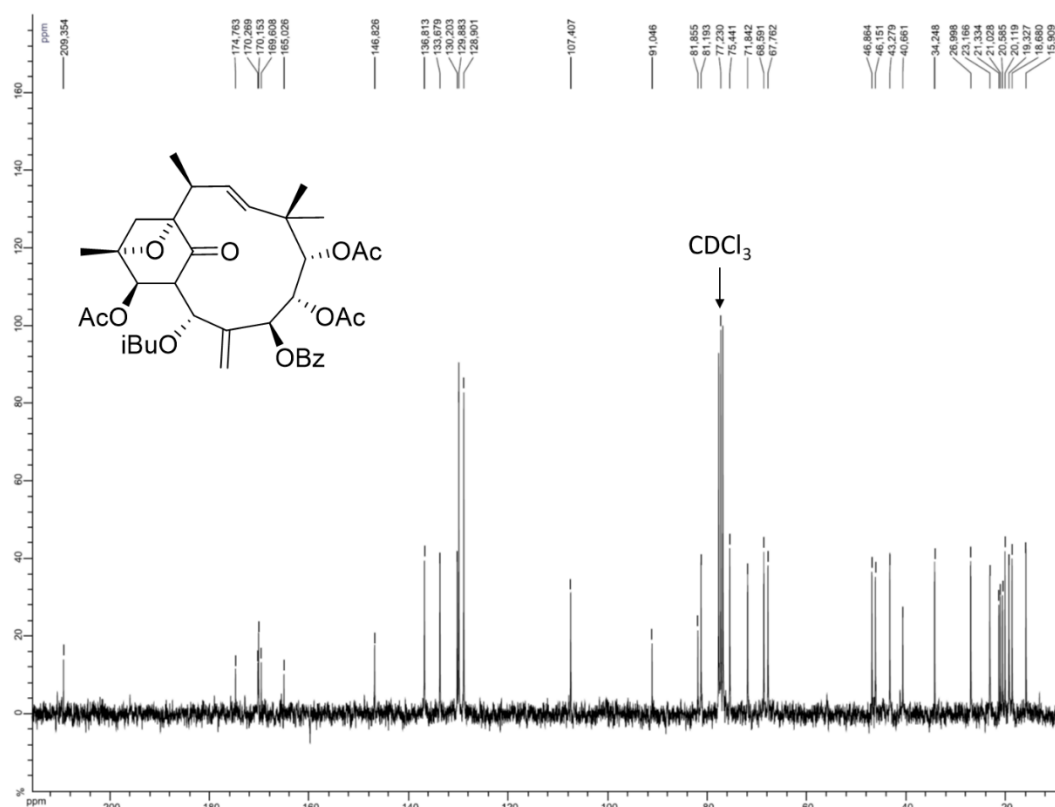
Figure 9. ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of **4**

Figure 10. ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) of **4****Figure 11.** HRESIMS spectrum (TOF) of **4****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

882 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

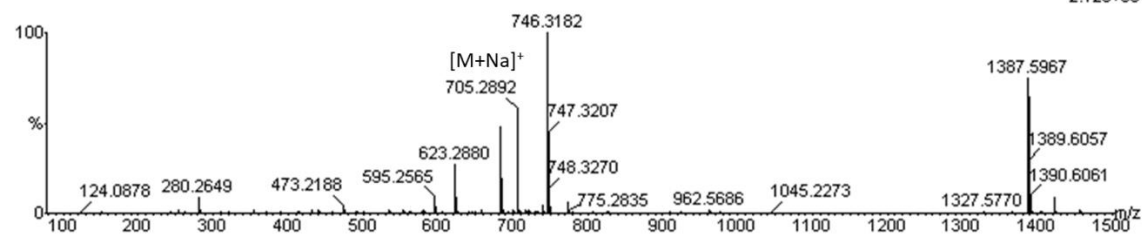
06-Jul-2016 12:16:19

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito56-1 704 (3.249)

1: TOF MS ES+

2.12e+004



Minimum: -1.5
Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
705.2892	705.2887	0.5	0.7	14.5	329.9	1.1	C37 H46 O12 Na [M+Na] ⁺
	705.2911	-1.9	-2.7	17.5	329.3	0.4	C39 H45 O12

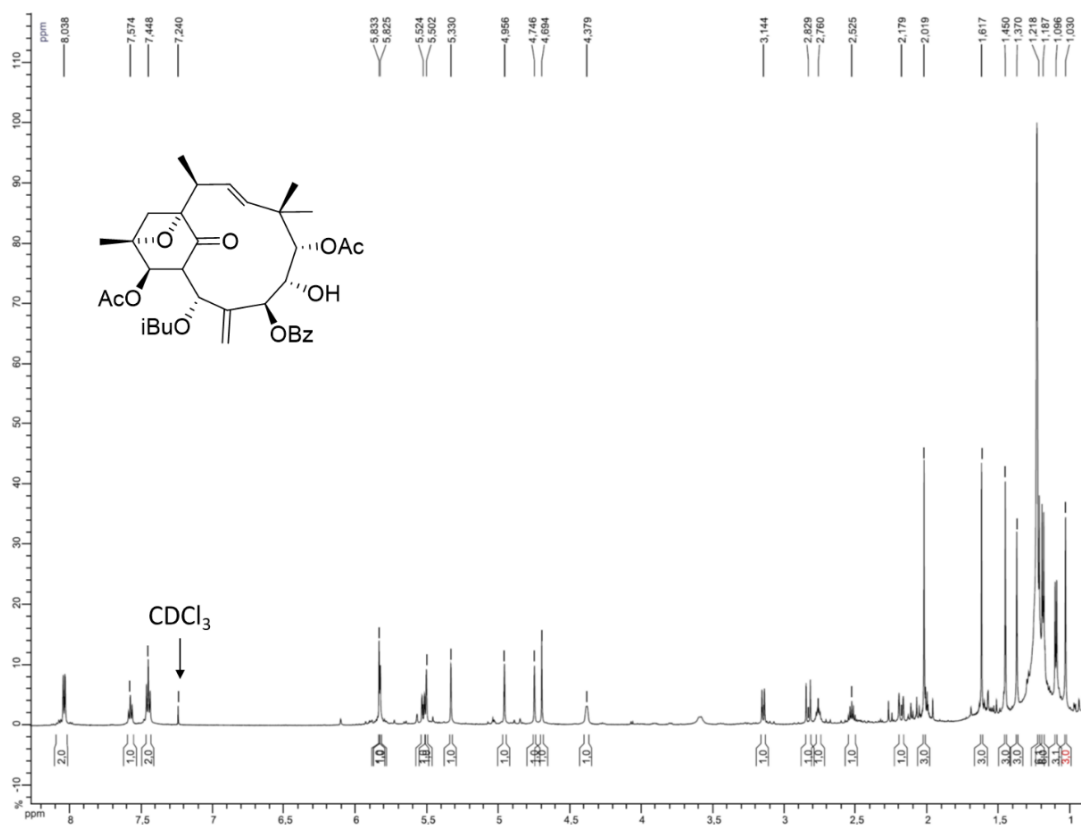
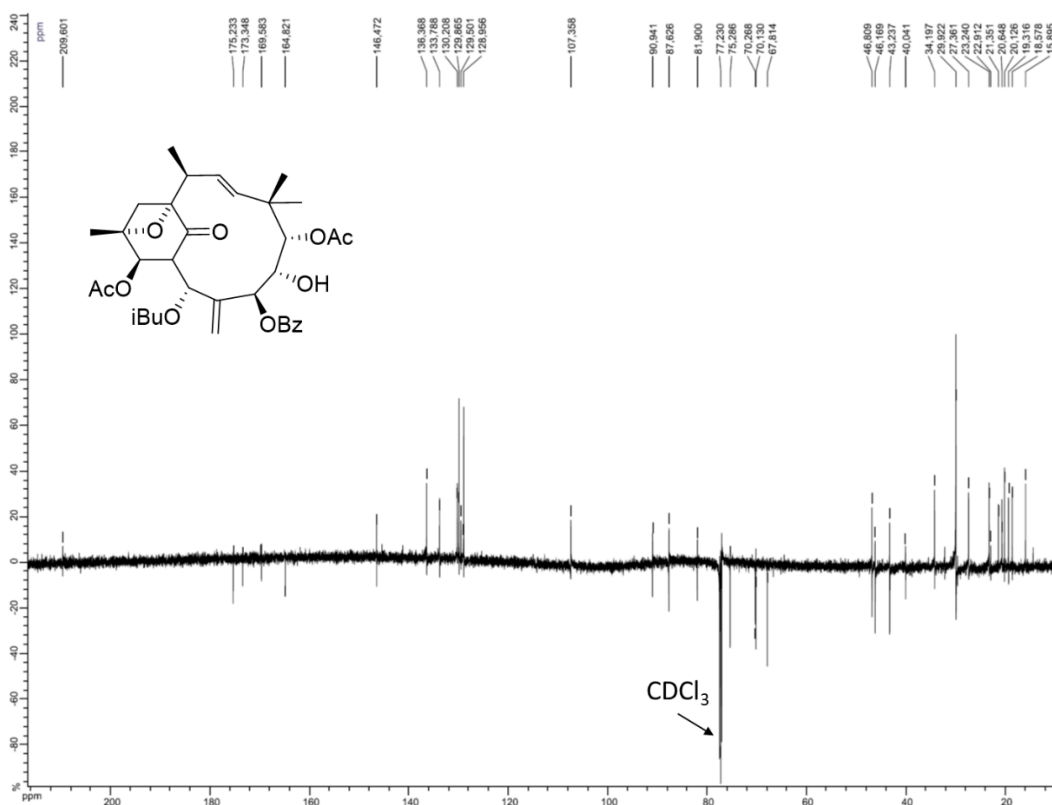
Figure 12. ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 600 MHz) of **5****Figure 13.** ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 150 MHz) of **5**

Figure 14. HRESIMS spectrum (TOF) of **5****Single Mass Analysis**

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 9

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

796 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

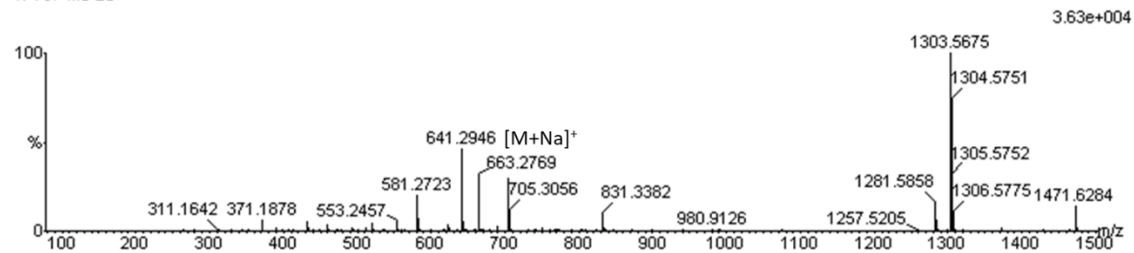
C: 0-60 H: 0-100 N: 0-1 O: 0-50 Na: 0-1

06-Jul-2016 11:53:19

LCT Premier XE KE483

ROUSSI_esposito55-4 653 (3.024)

1: TOF MS ES+



Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5

5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
663.2769	663.2781	-1.2	-1.8	13.5	375.2	0.1	C35 H44 O11 Na [M+Na] ⁺
	663.2747	2.2	3.3	25.5	378.1	2.9	C44 H39 O6