



**HAL**  
open science

# Réseaux moléculaires et Chimie des Substances Naturelles : de l'isolement de composés inédits à de toutes nouvelles applications en synthèse biomimétique

Charlotte Alcover

## ► To cite this version:

Charlotte Alcover. Réseaux moléculaires et Chimie des Substances Naturelles : de l'isolement de composés inédits à de toutes nouvelles applications en synthèse biomimétique. Chimie organique. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS569 . tel-03506234

**HAL Id: tel-03506234**

**<https://theses.hal.science/tel-03506234>**

Submitted on 2 Jan 2022

**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.

# Réseaux moléculaires et Chimie des Substances Naturelles : de l'isolement de composés inédits à de toutes nouvelles applications en synthèse biomimétique

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

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à  
l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat: Chimie des Substances Naturelles

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 11 Décembre 2019, par

**Mme Charlotte ALCOVER**

Composition du Jury :

Mme Fanny ROUSSI Directrice de Recherches, ICSN (UPR CNRS 2301)	Présidente du jury
Mme Marie-Christine LALLEMAND Professeure, Université Paris Descartes (CiTCoM - UMR 8038)	Rapporteur
M. Olivier GROVEL Professeur, Université de Nantes (MMS - EA 2160)	Rapporteur
M. Mehdi BENIDDIR Maître de conférences, Université Paris-Sud (BioCIS - UMR 8076)	Co-Directeur de thèse
M. Erwan POUPON Professeur, Université Paris-Sud (BioCIS - UMR 8076)	Directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les Prs. Marie-Christine Lallemand et Olivier Grovel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Dr. Fanny Roussi de faire partie de mon jury en tant qu'examinatrice. Un très grand merci pour le temps que vous avez consacré à évaluer ce travail.

Toute ma gratitude va aussi incontestablement au Dr. Bruno Figadère, directeur de l'UMR, qui m'a accueillie dans l'équipe de Pharmacognosie – Chimie des Substances Naturelles dès ma 3<sup>e</sup> année de pharmacie, puis tous les ans jusqu'à ma thèse.

Ma reconnaissance va ensuite à tous ceux qui m'ont épaulée dans cette aventure, notamment au Dr. Laurent Evanno, pour les innombrables conseils qu'il m'a donnés, depuis l'acquisition de mon Vollhardt jusqu'à mon retour dans l'univers de *Geissospermum laeve*, pour sa gentillesse, sa pédagogie, sa disponibilité, son optimisme et son humilité ; et à Blandine Séon-Méniel, avec qui j'ai fait tant de manip et tant appris, qui a fait preuve de ces mêmes qualités. Tous les deux, vous avez toujours eu et aurez toujours mon respect et mon affection les plus sincères et entiers ;

À Kenza, que j'ai eu le plaisir d'encadrer, et avec et grâce à qui ma recherche du « Graal » de *Geissospermum* a commencé ;

À Karine Leblanc et Soumia Rharrabti, pour leur aide cruciale lors de la mise au point, et surtout lors de la réalisation des CLHP préparatives, qui se sont souvent avérées particulièrement délicates – au prix parfois de petites madeleines au chocolat ;

Au Dr. Guillaume Bernadat, pour sa disponibilité et son assistance très précieuses lors de nos séances de programmation sur Python, en vue de la simulation des spectres de dichroïsme circulaire ;

À Jean-Christophe Jullian et Jean-François Gallard pour le temps et les efforts consacrés à obtenir de magnifiques spectres RMN des *magnifiques* produits isolés ;

Ainsi qu'à Elisabeth Mouray et au Pr. Philippe Grellier pour la détermination de l'activité antipaludique de certains d'entre eux.

De la même façon, j'exprime un merci tout particulier au Dr. Valérie Tarrus-Flesch, sans qui mon penchant pour les substances naturelles n'aurait peut-être jamais vu le jour.

Mes pensées vont également aux autres membres du laboratoire auprès de qui j'ai évolué, et notamment au Dr. François Roblot, que je remercie infiniment de m'avoir enseigné à enseigner.



J'adresse bien-sûr tous mes remerciements à mes encadrants, le Pr. Erwan Poupon et le Dr. Mehdi A. Beniddir, pour leur sagesse, leur implication et leur disponibilité. Vous m'avez inculqué les valeurs primordiales d'un chercheur : l'intégrité, la rigueur, la passion. Vous avez toute mon estime et mon respect depuis mes premiers pas au laboratoire.

J'en reviens donc à Laurent, Blandine et toute la *team* « Bananojambon » - ou « Coolkids » : Samuel, Justine, Elodie, Coralie dite Cocorandom, Antoine, Anne et Marco (alias le Grand Meme), grâce à qui ces trois années se sont déroulées dans une formidable bonne ambiance, mais avant tout dans l'élégance et la distinction. Vous avez été comme ma seconde famille, et je crois que vous m'avez donné autant de conseils que de fous rires, deux armes inestimables pour une doctorante. Je n'oublierai aucun de ces moments qui sont trop nombreux pour être tous cités (il faudrait rédiger un manuscrit à part, intitulé « Remerciements aux Coolkids », cf. Samuel pour l'inspiration), aucune de ces plaisanteries si hilarantes qu'elles méritaient toutes le Calambour d'Or, aucun de ces GIF si raffinés qui sont gravés dans ma mémoire comme dans celle de mon portable... Tous ces souvenirs seront sans doute mes plus beaux cadeaux de départ, et j'espère sincèrement que même si chacun prend désormais sa propre route, il y subsistera toujours quelques croisements pour tous nous retrouver. À Pontoise maintenant, je vous y attends.

De la même manière, j'ai une très affectueuse pensée pour tous les amis que j'ai pu croiser à la faculté : Gaëla et notre groupe des « Jabanitos » (Gaëtan, Christine et Amélie) ; Chloé, Valentin, Simon, Caro et Marie ; Barbara, Charlène et Julie ; Florence et j'en passe, qui, chacun à leur façon, ont aussi participé à cette grande aventure.

Enfin, je remercie bien évidemment du fond du cœur mes parents et grands-parents, qui m'ont soutenue et encouragée durant ma thèse comme tout au long de mes études, par tous les moyens possibles :

Merci à ma Mamée pour ses gamelles aussi nombreuses qu'excellentes (car la nourriture spirituelle ne fait pas tout !), et pour son implication incroyable dans tout ce que j'entreprends ; à mon Papé pour ses conseils et tout ce qu'il m'a appris depuis la douce époque des devoirs à l'école primaire...

Merci à mes parents, pour l'éducation, l'ouverture d'esprit et les valeurs qu'ils m'ont inculqués, pour les sacrifices de toute sorte qu'ils ont fait pour moi, et pour le soutien qu'ils m'ont évidemment toujours apporté. Je pense notamment à la montée des cartons et meubles dans les trois étages de notre nouveau bâtiment.



Muchas gracias tambien a Betty y Enrique, mes très chers suegritos, qui m'ont eux aussi beaucoup soutenue malgré la distance et la différence de langue (car comme on peut le constater, hablo muy bien espagnol et mon vocabulaire est particulièrement fourni).

Et, *last but not least*, je remercie mon époux, mon meilleur ami, mon voisin de bureau et ancien mentor, Alexander Fox Ramos. Tout simplement, pour tout. Tu es mon soutien, ma bonne humeur, mon optimisme. Je t'aime.

Et à Niwy, Ninon et Loki aussi.





## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES .....	5
LISTE DES FIGURES .....	8
LISTE DES TABLEAUX .....	10
LISTE DES ABREVIATIONS .....	11
<b>INTRODUCTION GENERALE : VERS L'ANTICIPATION DE SUBSTANCES NATURELLES A PARTIR DE MATRICES COMPLEXES .</b>	<b>17</b>
REFERENCES DE L'INTRODUCTION GENERALE.....	19
<b>CHAPITRE I : RESEAUX MOLECULAIRES ET RE-EXPLORATION DE LA DIVERSITE CHIMIQUE VEGETALE : APPLICATION A L'ETUDE DE <i>PICRALIMA NITIDA</i> STAPF.....</b>	<b>23</b>
<b>1) Introduction bibliographique .....</b>	<b>23</b>
<b>a. Description générale de <i>P. nitida</i> .....</b>	<b>23</b>
<i>i. La plante, sa répartition et ses utilisations traditionnelles .....</i>	<i>23</i>
<i>ii. Études phytochimiques de <i>P. nitida</i> .....</i>	<i>24</i>
<b>b. Contexte de nos travaux .....</b>	<b>27</b>
<i>i. Émergence des réseaux moléculaires .....</i>	<i>27</i>
<i>ii. Application de la MIADB .....</i>	<i>27</i>
<b>2) Résultats et publication associée .....</b>	<b>28</b>
<b>a. Stratégie adoptée et purification des composés ciblés .....</b>	<b>28</b>
<b>b. Publication associée.....</b>	<b>32</b>
<i>i. Article.....</i>	<i>32</i>
<i>ii. Supporting Information .....</i>	<i>54</i>
<b>3) Vers l'hémisynthèse biomimétique de la serpentinine.....</b>	<b>94</b>
<b>a. Contexte et hypothèse de biosynthèse.....</b>	<b>94</b>
<b>b. Stratégie d'accès à la serpentinine .....</b>	<b>95</b>
<b>c. Résultats obtenus.....</b>	<b>96</b>
<i>i. Obtention de la geissoschizine.....</i>	<i>96</i>
<i>ii. Vers l'hémisynthèse de la serpentinine.....</i>	<i>96</i>
<b>4) Conclusions du chapitre &amp; critiques.....</b>	<b>100</b>
<b>5) Partie expérimentale .....</b>	<b>101</b>
<b>a. Extraction et hydrolyse de la geissospermine à partir de <i>G. laeve</i> .....</b>	<b>101</b>
<b>b. Composés synthétisés.....</b>	<b>106</b>





ANNEXES ASSOCIEES .....	116
REFERENCES DU CHAPITRE 1 .....	119
<b>CHAPITRE II : RESEAUX MOLECULAIRES ET SYNTHÈSE BIOMIMETIQUE : APPLICATION AUX ALCALOÏDES MARINS DE TYPE « 3-ALKYLPYPERIDINES »</b> .....	<b>125</b>
<b>1) Introduction bibliographique</b> .....	<b>125</b>
<b>a. Les alcaloïdes de la famille des « 3-alkylpipéridines »</b> .....	<b>125</b>
<i>i. Présentation des principaux composés</i> .....	125
<i>ii. Origines</i> .....	126
<i>iii. Activités biologiques</i> .....	126
<b>b. Hypothèses biogénétiques</b> .....	<b>126</b>
<i>i. Scénario de Baldwin</i> .....	126
<i>ii. Scénario de Marazano</i> .....	128
<i>iii. Scénario « unifié »</i> .....	130
<i>iv. Hypothèses sur l'origine des unités de départ (47, 48 et 52)</i> .....	131
<i>v. Études de biosynthèse</i> .....	131
<i>vi. Origine réelle des « manzamines »</i> .....	132
<b>c. « Défis » à relever</b> .....	<b>133</b>
<b>2) Travaux personnels</b> .....	<b>134</b>
<b>a. Objectifs des travaux</b> .....	<b>134</b>
<b>b. Stratégie d'application à la famille des « 3-alkylpipéridines »</b> .....	<b>134</b>
<i>i. Composés ciblés</i> .....	134
<i>ii. Stratégie d'annotation</i> .....	135
<i>iii. Évaluation des différents scénarios</i> .....	137
<i>iv. Évaluation approfondie du modèle « acroléine »</i> .....	138
<b>c. Résultats et composés synthétisés</b> .....	<b>140</b>
<i>i. « Sondes » moléculaires</i> .....	140
<i>ii. Synthèse et isolement du composé 66'</i> .....	140
<i>iii. Mécanisme de formation du composé 66'</i> .....	141
<b>3) Conclusions, ouvertures et critiques</b> .....	<b>144</b>
<b>4) Partie expérimentale</b> .....	<b>146</b>
<b>a. Synthèse des composés 64 et 65</b> .....	<b>146</b>
<i>i. Synthèse du pyridinium 64</i> .....	146
<i>ii. Composé 65</i> .....	146
<b>b. Isolement du composé 66' et analyses CLHP-SM/SM</b> .....	<b>153</b>



ANNEXES ASSOCIEES .....	165
REFERENCES DU CHAPITRE 2 .....	168
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>172</b>
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>174</b>
REFERENCES DU MANUSCRIT .....	176



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> « Workflow » d'annotation structurale.....	18
<b>Figure 2.</b> Photographie de <i>Picralima nitida</i> .....	23
<b>Figure 3.</b> Répartition de <i>P. nitida</i> .....	23
<b>Figure 4.</b> Fruits de <i>P. nitida</i> .....	23
<b>Figure 5.</b> Classification biogénétique des alcaloïdes indolo-monoterpéniques de Le Men et Taylor ..	24
<b>Figure 6.</b> Représentation et origine de trois alcaloïdes emblématiques de <i>P. nitida</i> : l'akuammine (6), l'akuammicine (7) et l'akuammigine (2).....	25
<b>Figure 7.</b> Structure de la serpentinine (8) .....	26
<b>Figure 8.</b> Comparaison des structures de l'akuammigine (2) et du monomère Sud de la serpentinine (8) .....	26
<b>Figure 9.</b> Réseaux moléculaires obtenus avant et après fractionnement et annotation (en vert : les nœuds de <i>P. nitida</i> non annotés, en orange : les composés identifiés par le GNPS - MIADB, en gris : les composés isolés lors de nos travaux).....	28
<b>Figure 10.</b> Structures de la serpentinine (8) et de la moandaensine (9).....	29
<b>Figure 11.</b> Composés isolés de <i>P. nitida</i> .....	31
<b>Figure 12.</b> Structures du monomère Sud de la serpentinine (8) et de la raubasine (15).....	94
<b>Figure 13.</b> Hydrolyse de la geissospermine (17) en geissoschizine (16) .....	94
<b>Figure 14.</b> Stratégie d'accès à la serpentinine (8) .....	95
<b>Figure 15.</b> Transformation du composé 18 en 19 et 24.....	96
<b>Figure 16.</b> Chromatogrammes CLHP-UV et -MS obtenus .....	97
<b>Figure 17.</b> Formation du composé 24 .....	98
<b>Figure 18.</b> Chromatogrammes CLHP-SM et -UV obtenus, et spectre SM du dimère formé .....	99
<b>Figure 19.</b> Schéma de fractionnement des écorces de <i>G. laeve</i> .....	101
<b>Figure 20.</b> Spectre <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de la geissoschizine (16) .....	104
<b>Figure 21.</b> Spectre <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de la geissoschizine (16).....	105
<b>Figure 22.</b> Spectre <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) du composé 24.....	109
<b>Figure 23.</b> Spectre <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) du composé 24.....	110
<b>Figure 24.</b> Spectre COSY (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) du composé 24.....	111
<b>Figure 25.</b> Spectre HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) du composé 24 .....	112
<b>Figure 26.</b> Spectre HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) du composé 24 .....	113
<b>Figure 27.</b> Spectre NOESY (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) du composé 24 .....	114
<b>Figure 28.</b> Corrélations COSY et HMBC du composé 24.....	115
<b>Figure 29.</b> Différents alcaloïdes de la famille des « 3-alkylpipéridines » .....	125
<b>Figure 30.</b> Répartition des éponges citées .....	126
<b>Figure 31.</b> Hypothèse de Baldwin et Whitehead .....	127
<b>Figure 32.</b> Dismutation du composé 49 en 51 .....	128
<b>Figure 33.</b> Formation de sels de pyridiniums selon l'hypothèse de Marazano.....	128
<b>Figure 34.</b> Hypothèse de Marazano .....	129
<b>Figure 35.</b> Scénario « unifié » .....	130
<b>Figure 36.</b> Formation de l'acroléine (47) et du malonaldéhyde (52) à partir d'acides gras insaturés	131
<b>Figure 37.</b> Biosynthèse de l'haminol-2 (57).....	132
<b>Figure 38.</b> Expériences de « feeding » avec de la tryptamine (59) ou du tryptophane (61).....	133



<b>Figure 39.</b> Unités sélectionnées et squelettes ciblés .....	135
<b>Figure 40.</b> Fragmentation des squelettes ciblés par le CFM-ID .....	136
<b>Figure 41.</b> Composés <b>64</b> et <b>65</b> synthétisés.....	136
<b>Figure 42.</b> Réseau moléculaire correspondant au criblage des unités de départ.....	137
<b>Figure 43.</b> Possible réaction de <i>retro</i> -Diels-Alder du composé <b>66</b> en conditions de spectrométrie de masse tandem .....	138
<b>Figure 44.</b> Réseau moléculaire correspondant au criblage de conditions réactionnelles .....	139
<b>Figure 45.</b> Synthèse des composés <b>64</b> et <b>65</b> .....	140
<b>Figure 46.</b> Composé <b>66</b> attendu et observé.....	141
<b>Figure 47.</b> Voie de formation attendue du composé <b>66</b> .....	141
<b>Figure 48.</b> Voie de formation supposée du composé <b>66'</b> formé.....	142
<b>Figure 49.</b> Réseau moléculaire correspondant au second criblage de conditions réactionnelles (représentées dans le tableau précédent) .....	143
<b>Figure 50.</b> Formation du sel de Zincke ( <b>71</b> ) et de l'aminopentadiène ( <b>70</b> ) .....	145
<b>Figure 51.</b> Spectre $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) du composé <b>64</b> .....	148
<b>Figure 52.</b> Spectre $^{13}\text{C}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz) du composé <b>64</b> .....	149
<b>Figure 53.</b> Spectre $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) du composé <b>65</b> .....	151
<b>Figure 54.</b> Spectre $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) du composé <b>65</b> .....	152
<b>Figure 55.</b> Schéma de fractionnement du mélange réactionnel.....	153
<b>Figure 56.</b> Spectre $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé <b>66'</b> .....	156
<b>Figure 57.</b> Spectre $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) du composé <b>66'</b> .....	157
<b>Figure 58.</b> Spectre COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé <b>66'</b> .....	158
<b>Figure 59.</b> Spectre HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé <b>66'</b> .....	159
<b>Figure 60.</b> Spectre HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé <b>66'</b> .....	160
<b>Figure 61.</b> Spectre HSQC-TOCSY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé <b>66'</b> .....	161
<b>Figure 62.</b> Spectre NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) du composé <b>66'</b> .....	162
<b>Figure 63.</b> Corrélations HSQC-TOCSY, COSY, NOESY et HMBC du composé <b>66'</b> .....	163
<b>Figure 64.</b> Agrandissement de la <b>Figure 42</b> (réseau moléculaire correspondant au criblage des unités de départ : <b>47</b> , <b>52</b> , <b>62</b> et <b>63</b> ) .....	165
<b>Figure 65.</b> Agrandissement de la <b>Figure 44</b> (réseau moléculaire correspondant au criblage des conditions réactionnelles, pour le mélange acroléine – butylamine – hexanal) .....	166
<b>Figure 66.</b> Agrandissement de la <b>Figure 49</b> (réseau moléculaire correspondant au second criblage de conditions réactionnelles, après modification de l'ordre d'ajout des unités de départ).....	167



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Composés isolés de <i>P. nitida</i> .....	116
<b>Tableau 2.</b> Criblage des unités de départ .....	137
<b>Tableau 3.</b> Criblage de conditions réactionnelles .....	139
<b>Tableau 4.</b> Adaptation du mode opératoire .....	142



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>AIM</b>	Alcaloïde Indolo-Monoterpénique
<b>APG</b>	« <i>Angiosperm Phylogeny Group</i> »
<b>CFM-ID</b>	« <i>Competitive Fragmentation Modeling for metabolite Identification</i> »
<b>CLHP</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>COSY</b>	« <i>Correlation Spectroscopy</i> »
<b>DAD</b>	« <i>Diode Array Detector</i> »
<b>DBE</b>	« <i>Double Bond Equivalent</i> »
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DMAP</b>	Diméthylaminopyridine
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>ECD</b>	« <i>Electronic Circular Dichroism</i> »
<b>ESI</b>	« <i>Electrospray Ionization</i> »
<b>GNPS</b>	« <i>Global Natural Products Social molecular networking</i> »
<b>HMBC</b>	« <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> »
<b>HRMS</b>	« <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> »
<b>HSQC</b>	« <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> »
<b>IC<sub>50</sub></b>	« <i>half maximal Inhibitory Concentration</i> »
<b>MIADB</b>	« <i>Monoterpene Indole Alkaloids DataBase</i> »
<b>MOPS</b>	acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
<b>PCR</b>	« <i>Polymerase Chain Reaction</i> »
<b>Q-TOF</b>	« <i>Quadrapôle – Time Of Flight</i> »
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>ROESY</b>	« <i>Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> »
<b>SM</b>	Spectrométrie de Masse
<b>TFA</b>	« <i>Trifluoroacetic Acid</i> »
<b>TFAA</b>	« <i>Trifluoroacetic Anhydride</i> »
<b>TLC</b>	« <i>Thin Layer Chromatography</i> »
<b>TOCSY</b>	« <i>Total Correlation Spectroscopy</i> »
<b>UV</b>	Ultra-Violets





*"We are all smart. Distinguish yourself by being kind."*

Charles Gordon







---

# INTRODUCTION GÉNÉRALE :

## VERS L'ANTICIPATION DE SUBSTANCES NATURELLES A PARTIR DE MATRICES COMPLEXES

---





## INTRODUCTION GENERALE : VERS L'ANTICIPATION DE SUBSTANCES NATURELLES A PARTIR DE MATRICES COMPLEXES

Les métabolites « spécialisés » ou « secondaires », bien que traditionnellement mis en opposition au vital métabolisme « primaire », sont souvent tout aussi indispensables aux organismes les produisant qu'à l'Humanité. En effet, outre leur rôle de défense ou de communication, ils sont hautement représentés dans notre arsenal thérapeutique actuel, tels quels ou bien en tant que source d'inspiration pour les chimistes médicinaux.<sup>1,2</sup>

Toutefois, la découverte de nouvelles entités naturelles est un processus particulièrement long et coûteux. De fait, outre les difficultés d'approvisionnement en matière première, l'identification complète d'un composé implique à la fois son isolement, sa caractérisation structurale par RMN, mais également la détermination de sa structure tridimensionnelle (grâce à la diffraction aux rayons X ou par des techniques chiroptiques).<sup>2</sup>

Afin de réserver ce processus aux molécules inédites, il faut réussir le plus tôt possible à détecter les composés connus dans les matrices étudiées : c'est tout l'enjeu de l'**annotation** (c'est-à-dire l'identification partielle mais rapide de composés) et de la **déréplication** (autrement dit, l'application de l'annotation en vue d'écarter les molécules déjà connues du processus d'isolement).<sup>2</sup>

Grâce à sa sensibilité inégalée et à l'avènement de l'ère du « *big data* », la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse tandem (CLHP-SM/SM) s'est imposée comme l'un des outils de référence dans cette démarche. En effet, son utilisation implique bien souvent le recours à des méthodes de traitement informatiques, de par la quantité considérable de données générées.<sup>2</sup>

La technique des **réseaux moléculaires**<sup>3,4</sup> consiste notamment en la comparaison et l'organisation des spectres SM/SM obtenus sous forme de « *clusters* », en fonction de leur similarité, mais ne permet pas, en soi, d'annoter des métabolites. Des outils complémentaires, présentés sur la **Figure 1**, ont ainsi été créés afin de relier les données spectrales à des structures candidates, ou bien à tout autre type d'information (activité biologique, filtre taxonomique...).

<sup>1</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **2016**, *79*, 629-661.

<sup>2</sup> Rutz, A.; Dounoue-Kubo, M.; Ollivier, S.; Bisson, J.; Bagheri, M.; Saesong, T.; Nejad Ebrahimi, S.; Ingkaninan, K.; Wolfender, J.-L.; Allard, P.-M., Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation. *bioRxiv* **2019**, 702308.

<sup>3</sup> 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., Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *Journal of Natural Products* **2013**, *76*, 1686-1699.

<sup>4</sup> Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Natural Product Reports* **2019**, *36*, 960-980.



Parmi les méthodes d'annotation structurale se trouvent des **bases de données expérimentales** comme celle du site même de GNPS<sup>5</sup> (« *Global Natural Products Social Molecular Networking* »), sur lequel les spectres SM/SM de plus de 70 000 composés ont été déposés par diverses équipes ; des **bases de données in silico** comme l'ISDB,<sup>6</sup> regroupant les quelques 221 771 produits naturels référencés dans le *Dictionary of Natural Products* ; mais également certains **algorithmes** comme MS2LDA,<sup>7</sup> qui identifie et rassemble les composés présentant un châssis commun, ou Metwork,<sup>8</sup> qui permet de propager l'annotation à partir d'une molécule connue, grâce à des transformations (bio-)chimiques sélectionnées.

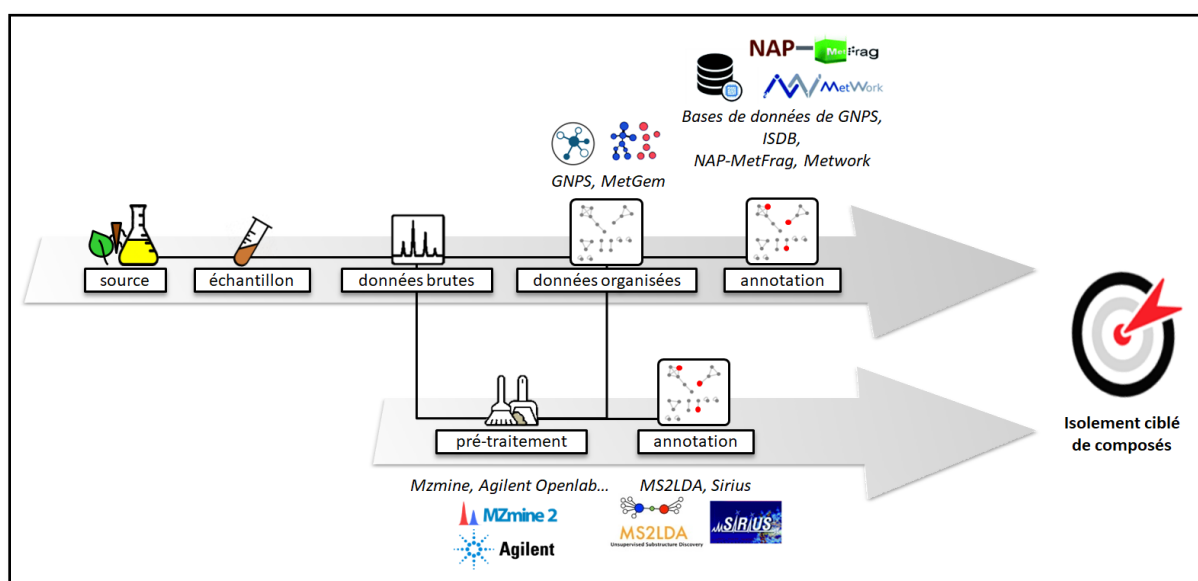


Figure 1. « Workflow » d'annotation structurale

La plupart accessibles gratuitement, ce sont donc autant d'outils à la libre disposition du chercheur en chimie des substances naturelles désirant employer une stratégie efficace de déréplication.

Ce manuscrit sera divisé en **deux principaux chapitres** : le premier démontrera la pertinence de l'utilisation de ces techniques pour l'étude de sources naturelles déjà étudiées, en l'occurrence *Picralima nitida*, une plante de la famille des Apocynaceae ; dans le second, les outils modernes de déréplication seront confrontés à de la **synthèse biomimétique en mélanges complexes**, autour des **alcaloïdes de type « manzamine »**.

<sup>5</sup> <https://gnps.ucsd.edu/>.

<sup>6</sup> Allard, P.-M.; Péresse, T.; Bisson, J.; Gindro, K.; Marcourt, L.; Pham, V. C.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L., Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Analytical Chemistry* **2016**, *88*, 3317-3323.

<sup>7</sup> van der Hoof, J. J. J.; Wandy, J.; Barrett, M. P.; Burgess, K. E. V.; Rogers, S., Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 13738-13743.

<sup>8</sup> Beauxis, Y.; Genta-Jouve, G., MetWork: a web server for natural products anticipation. *Bioinformatics* **2018**, *35*, 1795-1796.



## REFERENCES DE L'INTRODUCTION GENERALE

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **2016**, *79*, 629-661.
2. Rutz, A.; Dounoue-Kubo, M.; Ollivier, S.; Bisson, J.; Bagheri, M.; Saesong, T.; Nejad Ebrahimi, S.; Ingkaninan, K.; Wolfender, J.-L.; Allard, P.-M., Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation. *bioRxiv* **2019**, 702308.
3. 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.; Deboni, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C., Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *Journal of Natural Products* **2013**, *76*, 1686-1699.
4. Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Natural Product Reports* **2019**, *36*, 960-980.
5. <https://gnps.ucsd.edu/>.
6. Allard, P.-M.; Péresse, T.; Bisson, J.; Gindro, K.; Marcourt, L.; Pham, V. C.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L., Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Analytical Chemistry* **2016**, *88*, 3317-3323.
7. van der Hooft, J. J. J.; Wandy, J.; Barrett, M. P.; Burgess, K. E. V.; Rogers, S., Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 13738-13743.
8. Beauxis, Y.; Genta-Jouve, G., MetWork: a web server for natural products anticipation. *Bioinformatics* **2018**, *35*, 1795-1796.





---

**CHAPITRE I :**  
**RÉSEAUX MOLÉCULAIRES ET RÉ-**  
**EXPLORATION DE LA DIVERSITÉ**  
**CHIMIQUE VÉGÉTALE :**  
**APPLICATION À L'ÉTUDE DE**  
***PICRALIMA NITIDA* STAPF**

---







# CHAPITRE I : RESEAUX MOLECULAIRES ET RE-EXPLORATION DE LA DIVERSITE CHIMIQUE VEGETALE : APPLICATION A L'ETUDE DE *PICRALIMA NITIDA* STAPF

## 1) Introduction bibliographique

### a. Description générale de *P. nitida*

#### i. *La plante, sa répartition et ses utilisations traditionnelles*

*Picralima nitida* (Figure 2) est une plante appartenant à la famille des **Apocynaceae** (ordre des Gentianales), selon la classification de l'APG IV (« *Angiosperms Phylogeny Group* » – 2016)<sup>9</sup>, qui a la particularité d'être la seule espèce de son genre. Elle pousse sous forme de grands arbres, dans les forêts de pays d'Afrique tropicale et équatoriale tels que le Gabon, la Côte d'Ivoire ou le Ghana (voir Figure 3), où elle porte principalement le nom vernaculaire d'« akuamma ».<sup>10</sup>



Figure 2. Photographie de *Picralima nitida*

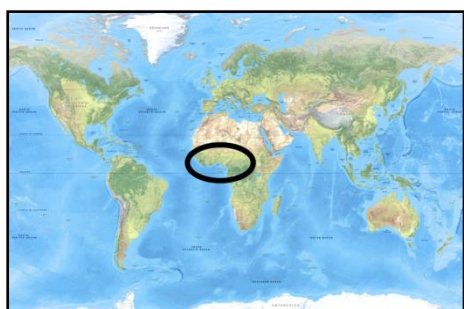


Figure 3. Répartition de *P. nitida*

Elle y est utilisée dans de nombreux remèdes traditionnels : ses graines sont données par voie orale, après avoir été broyées avec un peu d'eau, contre les fièvres palustres<sup>11</sup>, et possèdent des propriétés anesthésiques locales, remarquées dès les toutes premières études de la plante, puisque les auteurs avaient à l'époque coutume de goûter les végétaux.<sup>10</sup>

Les fruits (Figure 4) sont mis à macérer dans du vin de palme, celui-ci étant alors utilisé comme fébrifuge, après avoir absorbé les « principes amers » de la plante. Les feuilles sont employées comme antibactérien, notamment dans des cas d'otites. Enfin, les racines ou les écorces broyées s'utilisent contre diverses affections pulmonaires.<sup>11,12</sup>



Figure 4. Fruits de *P. nitida*

<sup>9</sup> The Angiosperm Phylogeny, G., An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2009**, *161*, 105-121.

<sup>10</sup> Ledouble, G., *Alcaloïdes du Picralima nitida* STAPF. Faculté de pharmacie de l'Université de Paris, 1964.

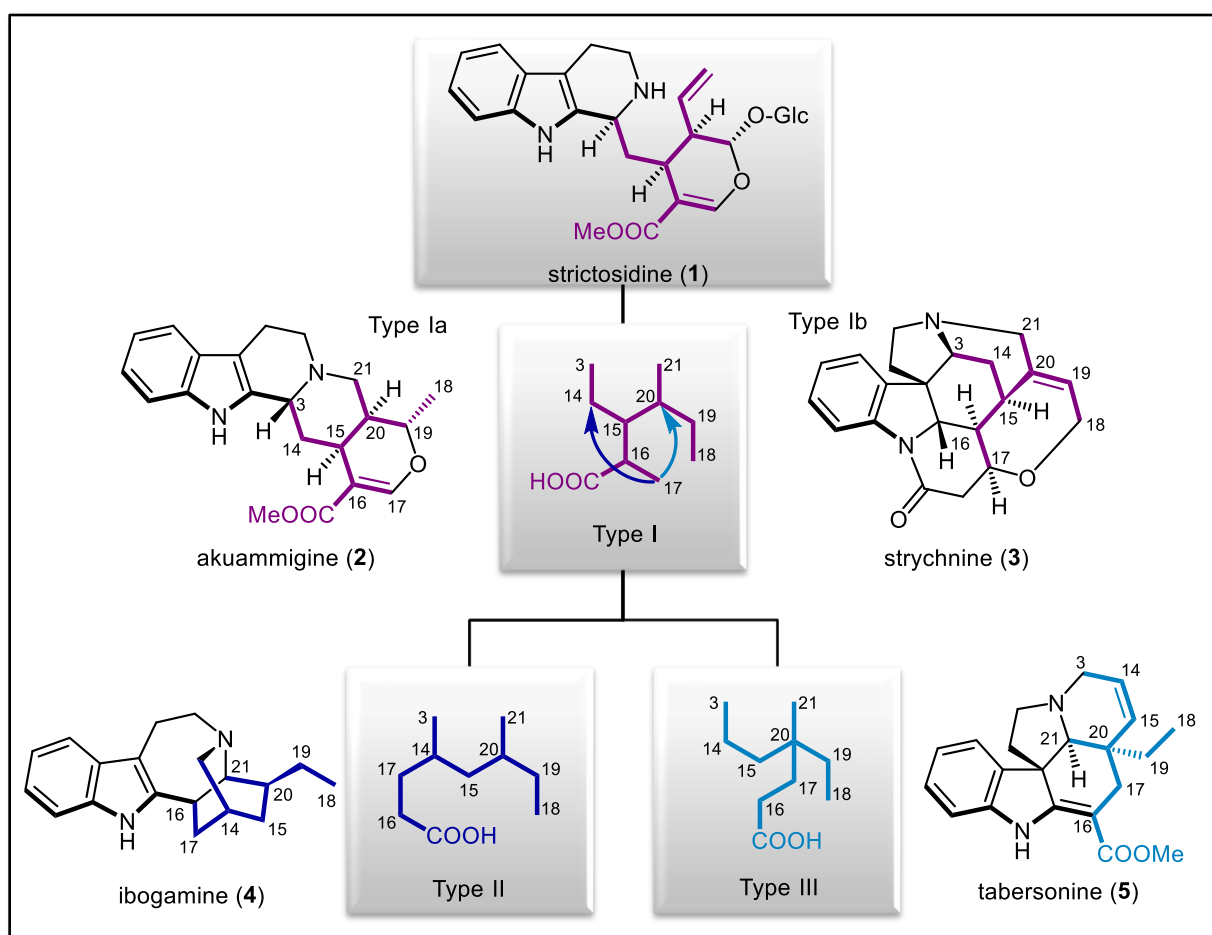
<sup>11</sup> Hamet, R., Sur une drogue remarquable de l'Afrique tropicale, le "*Picralima nitida*" (Stapf) Th. et H. Durand. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* **1951**, 465-485.

<sup>12</sup> Erharuyi, O.; Falodun, A.; Langer, P., Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Picralima nitida* (Apocynaceae) in tropical diseases: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2014**, *7*, 1-8.

ii. Études phytochimiques de *P. nitida*

Suite à l'observation de ces utilisations traditionnelles, des travaux ont rapidement été entrepris pour tenter de découvrir les composés actifs de la plante. Ce sont surtout ses **propriétés antipaludiques** qui lui ont valu de susciter l'intérêt des scientifiques ; il était même alors pensé que *P. nitida* supplanterait un jour le quinquina, et qu'une industrie entière naîtrait de son exploitation.<sup>11</sup>

Les études phytochimiques commencent donc dès le début des années 1920, avec E. Clinquart, mais aucune molécule n'est réellement isolée et caractérisée jusqu'aux travaux de T. Henry et T. Sharp en 1927. Le duo nomme alors les premiers composés d'après le nom vernaculaire de la plante.<sup>13,14</sup> Tous s'avèrent être des **alcaloïdes indolo-monoterpéniques**, c'est pourquoi la **Figure 5**, ci-dessous, est consacrée à la présentation de cette grande classe chimique et à sa classification<sup>15</sup>.



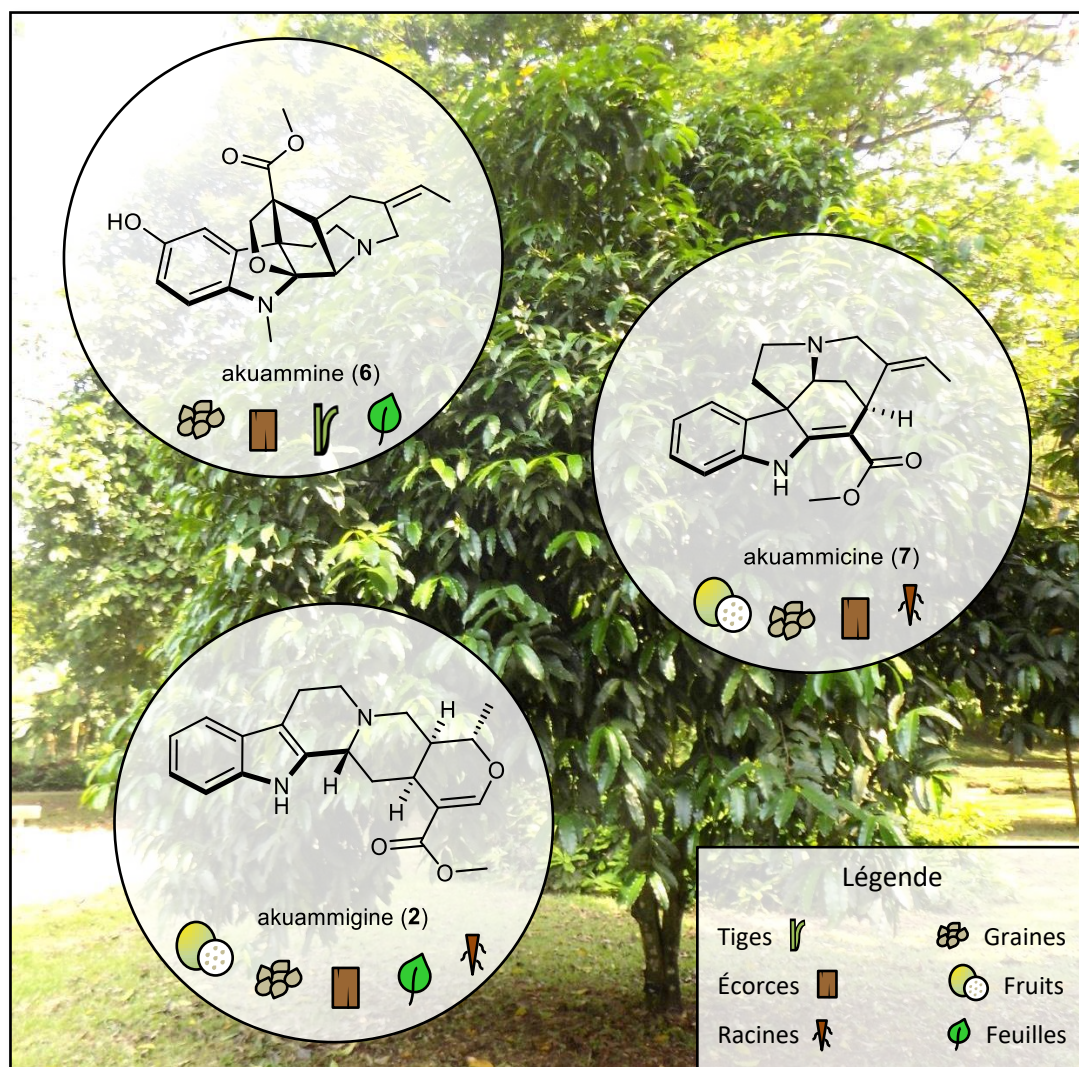
**Figure 5.** Classification biogénétique des alcaloïdes indolo-monoterpéniques de Le Men et Taylor

<sup>13</sup> Henry, T. A.; Sharp, T. M., CCLIV.-The alkaloids of *Picalima klaineana*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1927**, 1950-1959.

<sup>14</sup> Henry, T. A., 415. The alkaloids of *Picalima klaineana*, Pierre. Part II. *Ibid.* **1932**, 2759-2768.

<sup>15</sup> Le Men, J.; Taylor, W. I., A uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia* **1965**, *21*, 508-510.

Jusqu'aux années 1990, *P. nitida* est l'objet de nombreuses études ; et au total, une vingtaine de molécules en est extraite.<sup>12</sup> Par souci de concision, seules trois d'entre elles sont présentées dans la **Figure 6** suivante, l'ensemble étant exposé dans le **Tableau 1**, en annexe de ce chapitre.



**Figure 6.** Représentation et origine de trois alcaloïdes emblématiques de *P. nitida* : l'akuammine (6), l'akuammicine (7) et l'akuammigine (2)

Outre ces composés, trois « dimères », et cinq autres alcaloïdes dont le nom, la formule brute, la masse, la structure et la provenance sont inconnus, ont également été isolés et brevetés par l'équipe d'Iwu et Klayman en 1994.<sup>16</sup> Le seul *bis*-indole obtenu par cette équipe qui soit aujourd'hui identifiable est la **serpentinine (8)**, historiquement isolée de *Rauwolfia serpentina*, dont la structure – révisée et obtenue par RX – est montrée dans la **Figure 7** ci-après.<sup>17</sup>

<sup>16</sup> Iwu, M. M.; Klayman, D. L.; Jackson, J. E.; Tally, J. D.; Andersen, S. L., Alkaloids of *Picralima nitida* used for treatment of protozoal diseases. In US5290553A, 1994.

<sup>17</sup> Irie, H.; Ishizuka, K.; Kawashima, S.; Masaki, N.; Osaki, K.; Shingu, T.; Uyeo, S.; Kaneko, H.; Naruto, S., X-Ray crystallographic determination of the structure of the alkaloid serpentinine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1972**, 871-871.

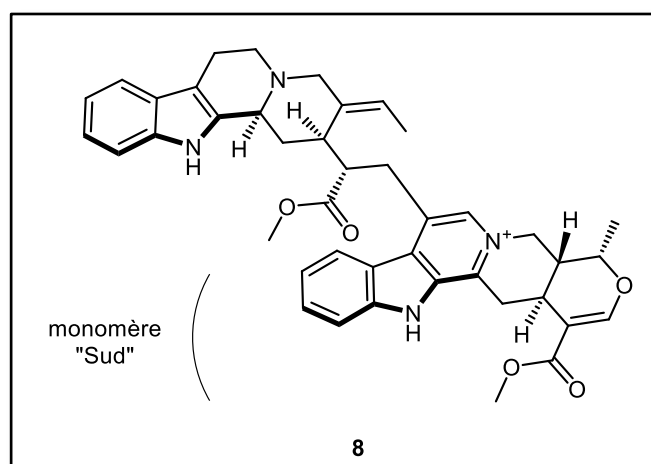


Figure 7. Structure de la serpentinine (8)

On remarque aisément une forte ressemblance entre le monomère « Sud » de la serpentinine (8) et l'akuammigine (2) précédemment présentée (Figure 8). Outre le degré d'oxydation, la principale différence réside en la stéréochimie du carbone 20 ou 20' (selon la numérotation de Le Men et Taylor). Il nous semblait étonnant que la plante produise un dimère de série épimère de l'akuammigine ; nous avons donc gardé à l'esprit cette curiosité tout au long de nos travaux.

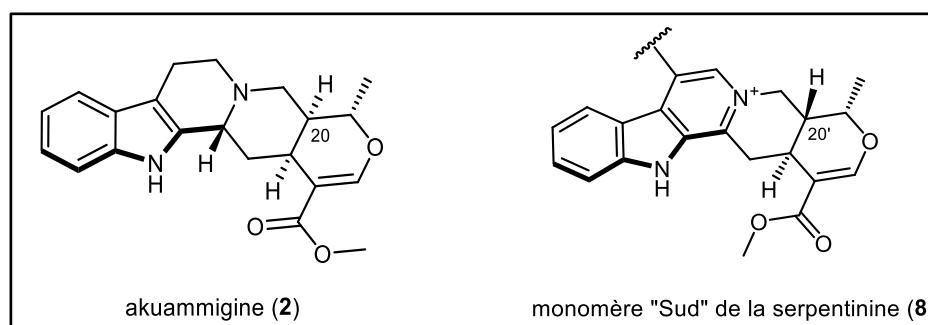


Figure 8. Comparaison des structures de l'akuammigine (2) et du monomère Sud de la serpentinine (8)

Quant aux autres dimères évoqués dans les travaux d'Iwu et Klayman, *a priori* nouveaux, ils ne sont que nommés (« akuacristine » et « picramimine »). Aucune structure correspondant à ces noms n'a pu être retrouvée dans les bases de données ou les ouvrages à notre disposition.

Il est cependant mentionné dans plusieurs travaux, notamment ceux de Guy Ledouble, qu'une partie de l'extrait semblait « trop polaire » pour être étudiée à l'époque.<sup>10</sup> Une trop forte polarité, ou bien l'instabilité de potentiels *bis*-indoles dans les conditions d'extraction, sont peut-être autant de raisons pour lesquelles ils n'ont effectivement pas été observés dans les précédentes études de *Picralima*.



Il faut aussi souligner que toutes les parties de la plante n'ont pas été pareillement étudiées : les graines sont très largement utilisées en médecine traditionnelle, et ont par conséquent été l'objet de la majorité des travaux. Viennent ensuite les fruits et les racines, également employés en thérapeutique populaire. Enfin, les parties aériennes (écorces, mais surtout tiges et feuilles) n'ont été l'objet que de peu d'études, et sont donc probablement encore intéressantes à explorer.

## **b. Contexte de nos travaux**

### *i. Émergence des réseaux moléculaires*

Comme évoqué dans l'introduction générale de ce manuscrit, la démarche d'isolement et de caractérisation de substances naturelles s'est considérablement transformée ces dernières années, grâce à l'essor des techniques de **déréplication** et d'**annotation**. L'apparition d'outils bio-informatiques, comme le « **molecular networking** », a permis de nettement accélérer la visualisation de la diversité chimique de toute matrice complexe, tel un extrait végétal.

Lors de la popularisation de cette technique dans le milieu des années 2010, le laboratoire a ainsi pu développer une thématique de « ré-exploration » de plantes de l'ordre des Gentianales ; et dans ce cadre, son application à l'étude de *P. nitida* était particulièrement inévitable. En effet, elle nous a permis d'imaginer le potentiel de cette plante dès la première analyse CLHP-SM/SM, notamment grâce à l'utilisation conjointe de notre base de données spectrales d'alcaloïdes indolo-monoterpéniques, la **MIADB** (« *Monoterpene Indole Alkaloids DataBase* »)<sup>18</sup>, présentée ci-dessous.

### *ii. Application de la MIADB*

Créée au laboratoire afin de pallier le manque de représentants de cette famille sur la base de données du GNPS, la MIADB regroupe à l'heure actuelle les spectres SM/SM de **172 alcaloïdes indolo-monoterpéniques (AIMs)**, isolés ou synthétisés par diverses équipes à travers le monde. Ceux-ci couvrant une large diversité structurale, la base de données est devenue au fil de son développement un outil applicable à l'étude de toute Gentianale à AIMs.

Ainsi, dans le cadre de notre exploration des parties aériennes de *Picralima nitida*, l'information précédemment obtenue sur notre réseau moléculaire a pu être complétée par une annotation expérimentale pertinente.

<sup>18</sup> Fox Ramos, A. E.; Le Pogam, P.; Fox Alcover, C.; Ootogo N'Nang, E.; Cauchie, G.; Hazni, H.; Awang, K.; Bréard, D.; Echavarren, A. M.; Frédérich, M.; Gaslonde, T.; Girardot, M.; Grougnet, R.; Kirillova, M. S.; Kritsanida, M.; Lémus, C.; Le Ray, A.-M.; Lewin, G.; Litaudon, M.; Mambu, L.; Michel, S.; Miloserdov, F. M.; Muratore, M. E.; Richomme-Peniguel, P.; Roussi, F.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Collected mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research. *Scientific Data* **2019**, *6*, 15.



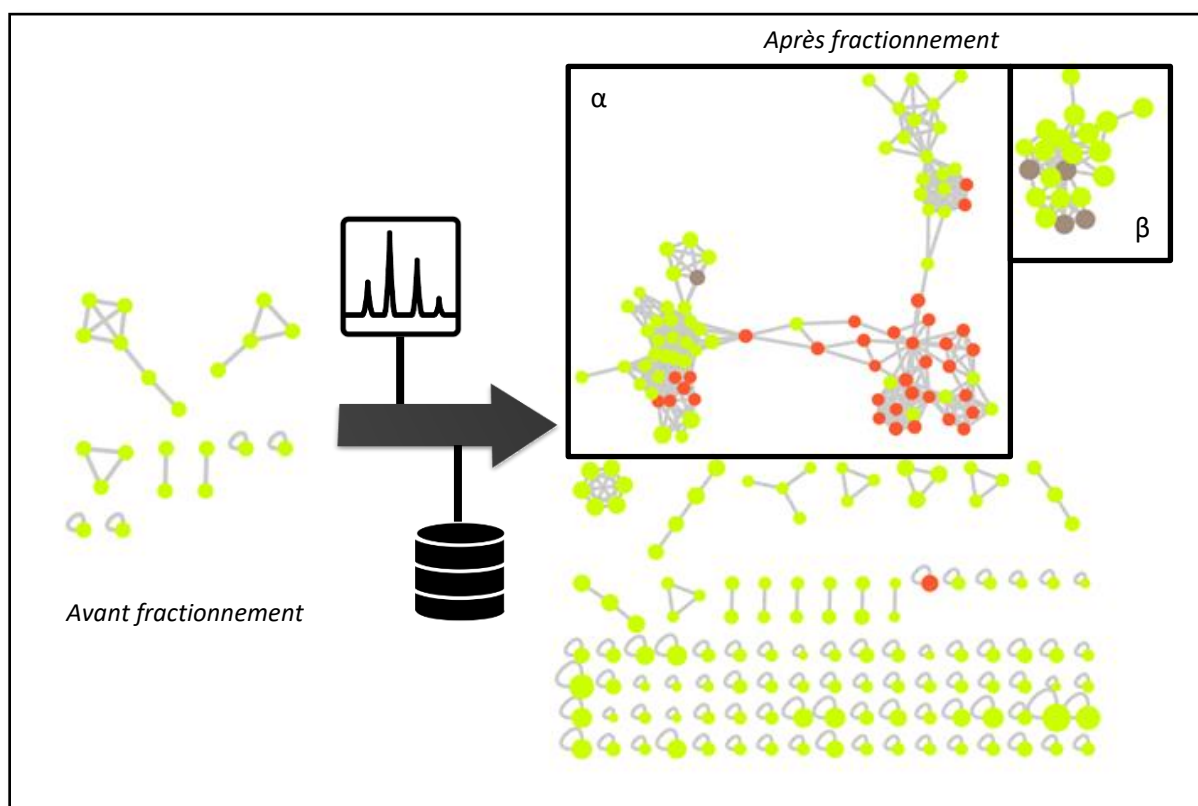
## 2) Résultats et publication associée

Dans la partie suivante du manuscrit sera présenté **l'article associé à ces travaux**, en cours de soumission ; précédé de quelques détails concernant la stratégie et l'isolement des composés, non inclus dans la publication pour plus de concision.

### a. Stratégie adoptée et purification des composés ciblés

Par souci de cohérence avec les remèdes traditionnels, nous avons décidé de réaliser une extraction éthanolique à froid de *P. nitida* (qui fut néanmoins comparée à un extrait alcaloïdique classique – leurs compositions semblaient sensiblement identiques). Après la première analyse CLHP-SM/SM, nous avons remarqué que notre macéré semblait ne contenir que quelques molécules très majoritaires, et donc être d'une diversité chimique apparente assez limitée. Cependant, les rapports  $m/z$  des principaux pics ne correspondaient pas à ceux des composés connus dans la plante.

La visualisation de cet extrait par réseau moléculaire (**Figure 9**) s'est révélée plus exhaustive après le premier fractionnement (chromatographie flash), mais surtout après annotation par notre base de données sur le GNPS :



**Figure 9.** Réseaux moléculaires obtenus avant et après fractionnement et annotation  
(en vert : les nœuds de *P. nitida* non annotés, en orange : les composés identifiés par le GNPS - MIADB,  
en gris : les composés isolés lors de nos travaux)

Le « cluster »  $\alpha$ , d'après ses nombreux recouvrements avec la MIADB, semblait surtout riche en monomères connus ; *a contrario*, le « cluster »  $\beta$  s'est révélé particulièrement intéressant : en effet, il comportait un grand nombre de **nœuds à hauts  $m/z$** , dont un pouvant tout à fait correspondre à la **serpentinine (8)** ( $m/z$  685.337). Souhaitant éclaircir la question de la stéréochimie du composé sous-jacent, nous avons décidé d'entreprendre son isolement.

De plus, cette « serpentinine » semblait entourée de nombreux analogues, or les alcaloïdes indolo-monoterpéniques dimériques arborant ce type de squelette sont extrêmement rares (la **moandaensine (9, Figure 10)**, isolée d'une espèce de *Strychnos*, en est le seul autre représentant).<sup>19</sup>

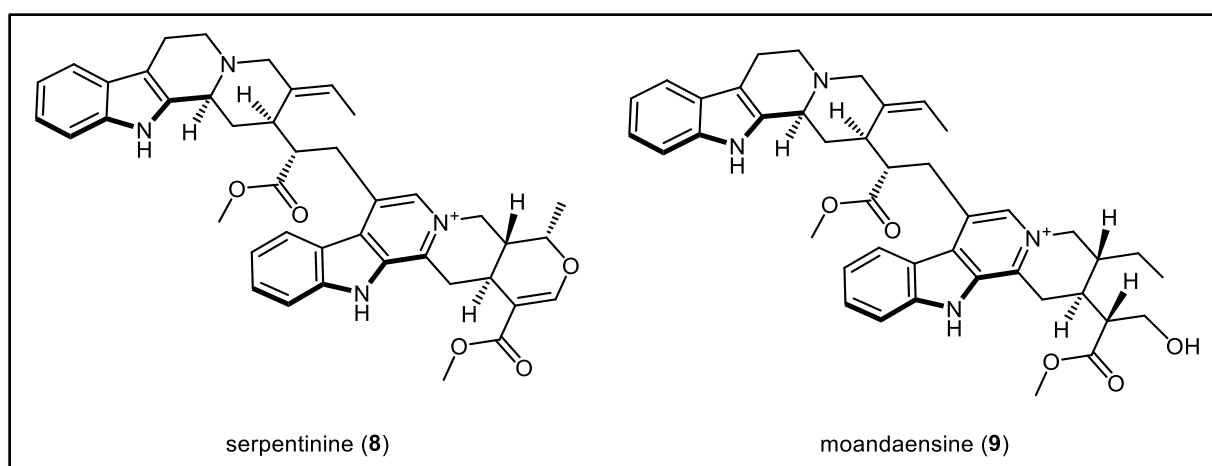


Figure 10. Structures de la serpentinine (8) et de la moandaensine (9)

La probabilité d'y trouver des composés nouveaux étant donc importante, c'est dans ce « cluster »  $\beta$  que nous avons concentré nos démarches d'isolement.

De nombreux obstacles ont été rencontrés lors de cette étude. En effet, les alcaloïdes de *Picralima* se sont révélés particulièrement difficiles à isoler, notamment à cause d'une **forte instabilité**. Les fractions changeaient parfois d'aspect avant d'être soumises à une chromatographie préparative. De même, certains produits ont nécessité des conditions CLHP très spécifiques pour leur purification (gradient considérablement lent et recours à l'acide trifluoroacétique), se confondant sinon sous forme d'un **pic unique** dans les conditions « classiques ».

L'élucidation structurale s'est également avérée complexe : ces composés étant **très peu solubles** dans les solvants deutérés usuels, la plupart des signaux  $^1\text{H}$  étaient larges, et donc les corrélations COSY et HMBC très faibles. De plus, certains produits se dégradent au fil des essais de solubilisation.

<sup>19</sup> Verpoorte, R.; Frédérick, M.; Delaude, C.; Angenot, L.; Dive, G.; Thépenier, P.; Jacquier, M.-J.; Zèches-Hanrot, M.; Lavaud, C.; Nuzillard, J.-M., Moandaensine, a dimeric indole alkaloid from *Strychnos moandaensis* (Loganiaceae). *Phytochemistry Letters* **2010**, *3*, 100-103.



Néanmoins, après de nombreuses étapes de purification, cinq composés (**10** à **14**, voir **Figure 11**) ont pu être isolés et entièrement caractérisés. Quelques détails concernant l'élucidation structurale par RMN 1D et 2D se trouvent dans le corps de la publication, dans la partie suivante.

Leur **stéréochimie** a été tout aussi difficile à assigner : la configuration relative a été déterminée par une étude approfondie des corrélations ROESY, or certains protons ont des déplacements chimiques très proches, compliquant forcément notre analyse. La configuration absolue, quant à elle, a été résolue en comparant les spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux à des spectres calculés.

Pour ce faire, il nous a tout d'abord fallu apprendre les bases du **langage de programmation Python**. Nous avons ainsi pu modéliser en 3D les composés **10**, **12** et **14**, grâce au logiciel **Chimera**. Pour chaque liaison C-C possédant un libre degré de rotation, un panel représentatif de rotamères a été généré, puis minimisé avec le logiciel **Gaussian**, nous menant ainsi aux conformères les plus stables. Le spectre de dichroïsme de ces composés optimisés a ensuite été simulé par Gaussian ; bien que cela ne soit pas détaillé dans l'article, l'ensemble de ces démarches a nécessité beaucoup de temps et de puissance de calcul.



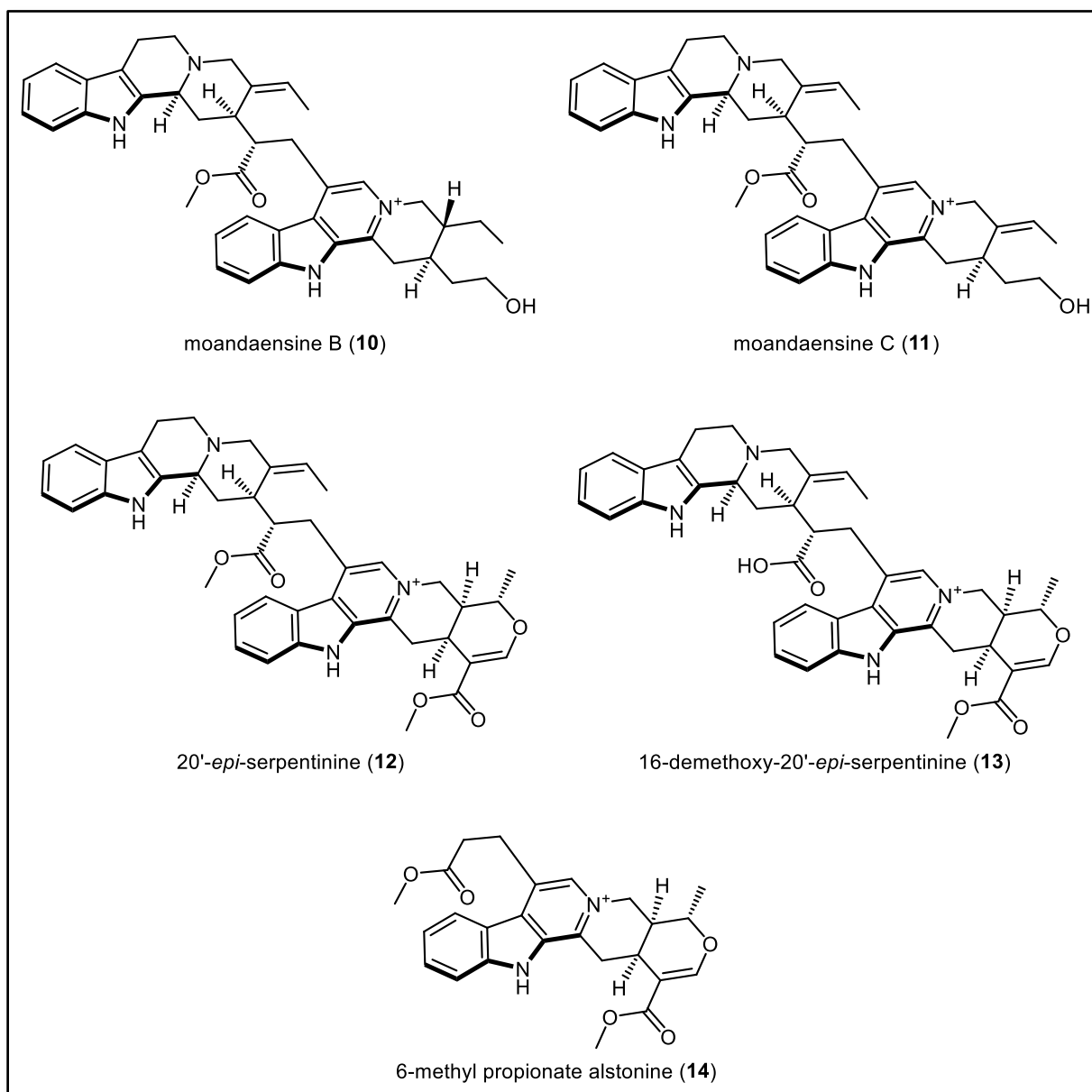


Figure 11. Composés isolés de *P. nitida*

Dans la partie suivante seront donc présentés : tout d'abord, le corps de l'article tel qu'il sera soumis au *Journal of Natural Products*, puis le « *Supporting Information* » associé. Les composés, figures et tableaux y ont leur propre numérotation. Seules les références sont rassemblées en fin de chapitre.

**b. Publication associée***i. Article*

# Molecular Networking Reveals Serpentine Bisindole Alkaloids Derivatives from the Good Old *Picralima nitida*

Charlotte Alcover,<sup>†</sup>

<sup>†</sup> Équipe “Chimie des substances naturelles” BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université  
Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

**ABSTRACT:** Five new monoterpene indole alkaloids (**1–5**) have been isolated from the aerial parts of *Picralima nitida*. Their structures were elucidated by analysis of their HRMS and NMR spectroscopic data; their absolute configurations were deduced from the comparison of experimental and theoretically calculated ECD spectra. In addition, two known compounds (**6–7**), previously undescribed in the *Picralima* genus, has also been purified. The isolation workflow was guided by a molecular networking-based dereplication strategy. Finally, twenty-three compounds were dereplicated from the *P. nitida* ethanolic extract and fractions network, and were assigned with various levels of identification confidence. The antiparasitic activities against *Plasmodium falciparum* as well as the cytotoxic activity against the MRC-5 cell line were determined for compounds **1–7**.



## INTRODUCTION

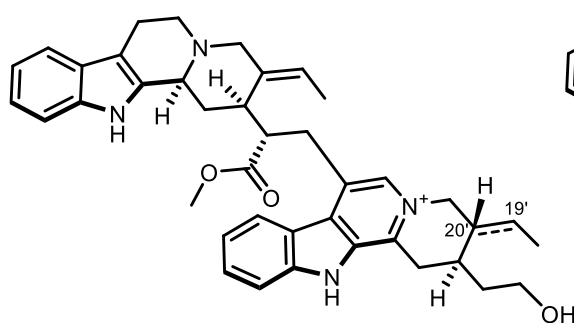
Since the beginning of twentieth century, Apocynaceae plants have drawn the interest of phytochemists for their content in monoterpene indole alkaloids, a therapeutically important class of natural products.<sup>20,21</sup> However, due to a limited spectroscopic instrumentation, a considerable number of these compounds have remained without biological evaluation, sometimes neither assigned structure.

*Picralima nitida* is an emblematic Apocynaceae plant native to tropical Africa, which has been extensively studied through its widespread traditional use as antimalarial agent.<sup>11</sup> Indeed, from Ivory Coast to Ghana, where the tree is distributed, the seeds are commonly taken in the form of a paste, crushed with a little water, to treat fevers. Since the first investigations in 1927 by Henry and Sharp,<sup>13</sup> about twenty monoterpene indole alkaloids have been isolated from *P. nitida*, such as akuammine, akuammigine, akuammicine or picraline.<sup>12</sup> Nevertheless, among those compounds, only one, described as serpentinine<sup>17</sup> in a patent,<sup>16</sup> showed a moderate antiplasmodial activity. Furthermore, the latter is also the only dimeric alkaloid discovered in the plant, which has attracted our interest, regarding the ability of Apocynaceae to biosynthesize bisindolic compounds. Though, only few phytochemical studies have been carried out on the plant's aerial parts, which could explain the lack of active or dimeric compounds' isolation up to now.

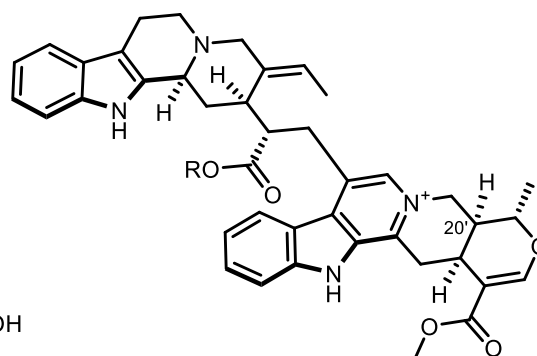
Our experience in the re-investigation of previously studied Gentianales plants taught us that much unique specialized metabolites structures remain to be discovered.<sup>22,23,24,25</sup> In this regard, and in addition to the details outlined above, we endeavored toward the streamlined reinvestigation of the aerial parts of *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.; using molecular networking.<sup>26</sup>



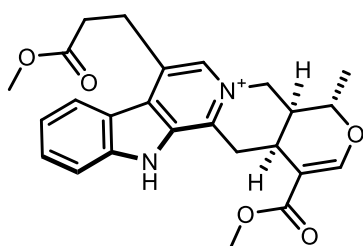
The present report describes the dereplication of known alkaloids from the dried aerial parts of *P. nitida*, as well as the MS/MS guided isolation, structure elucidation, and evaluation of antiparasitic and cytotoxic activities of five new alkaloids (**1-5**), along with the known 3,4,5,6-dehydrogeissoschizol (**6**)<sup>27</sup> and 10-hydroxygeissoschizol (**7**).<sup>28</sup>



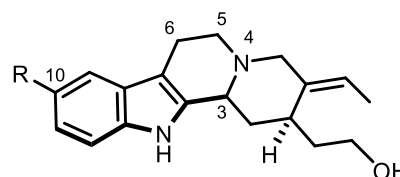
moandaensine B (**1**)  
moandaensine C (**2**):  $\Delta^{19(20')}$



20'-*epi*-serpentine (**3**): R = Me  
16-demethoxy-20'-*epi*-serpentine (**4**): R = H



6-methyl propionate alstonine (**5**)



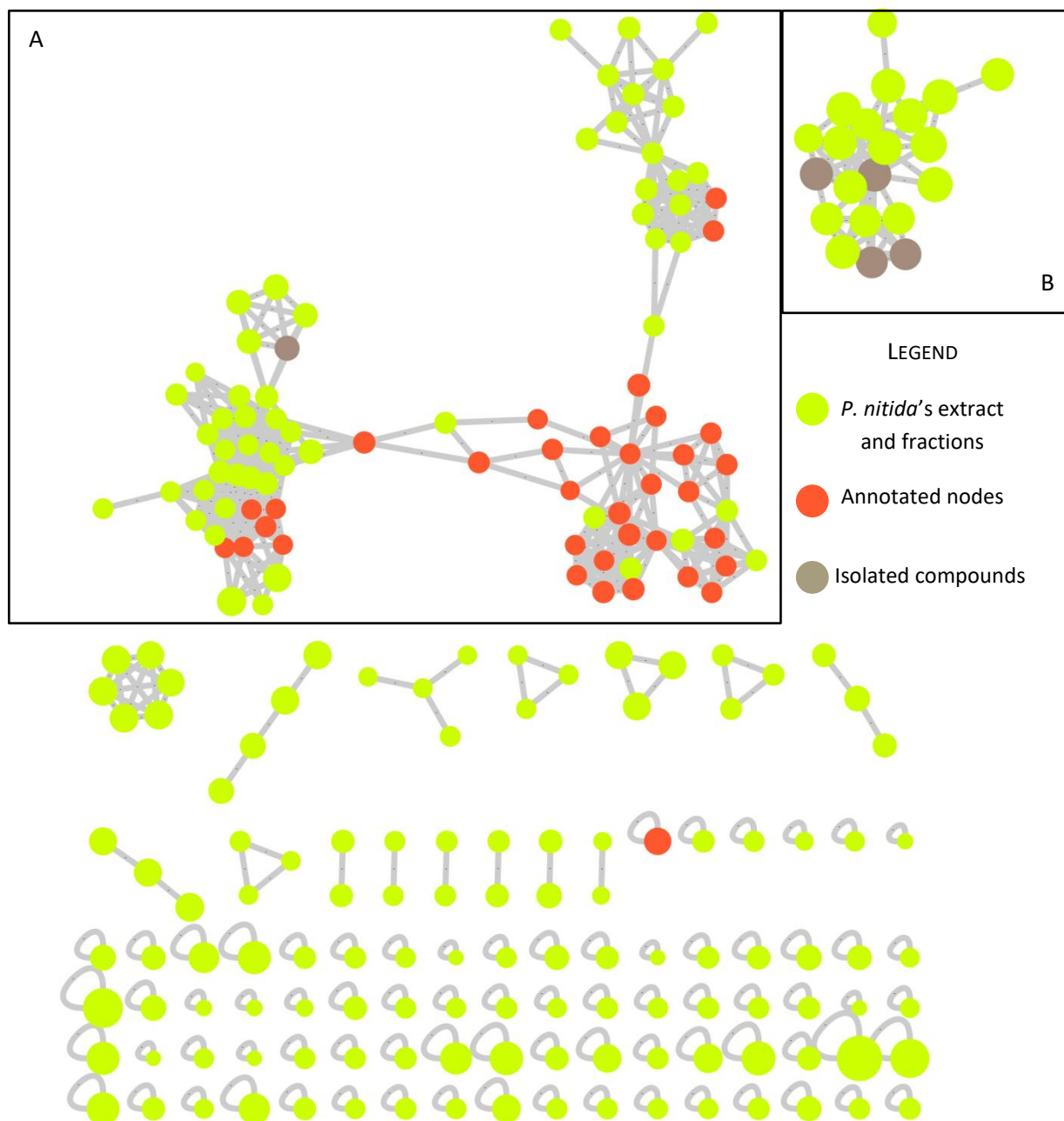
3,4,5,6-dehydrogeissoschizol (**6**): R = H,  $\Delta^{3(4),5(6)}$   
10-hydroxygeissoschizol (**7**): R = OH

## RESULTS AND DISCUSSION

**Molecular Networking-Based Prioritization of the Isolation Workflow.** In order to prioritize the isolation of previously undescribed monoterpene indole alkaloids, the ethanolic extract and fractions of the aerial parts of *P. nitida* were profiled by HPLC-HRMS/MS (positive-ion mode), and the obtained data were organized by molecular networking. The latter was subsequently dereplicated against the MIADB (Monoterpene Indole Alkaloids DataBase)<sup>18</sup>, hosted by the GNPS.<sup>29</sup>

In the molecular network depicted in Figure 1, the experimental data of *P. nitida* ethanolic extract and fractions are represented by light green circles; the annotated nodes are shown as orange ones. The molecular networking-based dereplication process afforded 19 hits (Table S2, Supporting Information), with 3 of them being previously described in the plant (akuammicine, akuammigine and pericine). Remarkably, an examination of the annotated network revealed the presence of a cluster (**B**, Figure 1) of particular interest, due to the absence of matches with the MIADB. Consequently, several nodes of this cluster were targeted for isolation, regarding their putative novelty. In addition, some nodes, located in the unannotated region of cluster A, were likewise targeted. Ultimately, LC-DAD-MS analysis of *P. nitida* chromatographic fractions showed that only few of these compounds could be isolated in amounts suitable for full structure elucidation. Thus, the isolation workflow was directed toward compounds **1-5** ( $m/z$  631.3628, 629.3477, 685.3410, 671.3247 and 435.1923). Finally, the known 3,4,5,6-tetrahydrogeissoschizol (**6**) and 10-hydroxygeissoschizol (**7**) were targeted as well, for biological evaluations.





**Figure 1.** Full molecular network realized using MS/MS data from the ethanolic extract and the fractions from the aerial parts of *Picralima nitida*. Details for clusters A and B are presented in Figure S1 and S2, Supporting Information.

**HRMS-Based Dereplication.** Molecular formulas of the aforementioned selected compounds were generated using MassHunter<sup>®</sup> software. The results of their search against the *Dictionary of Natural Products* (DNP)<sup>30</sup> and Reaxys<sup>®31</sup> databases are summarized in Table S4, Supporting Information. According to this database search: (i) 13 and 9 isomers exist for compounds **1** and **2**, respectively. None has been described in the genus *Picralima*; (ii) two hits (serpentinine, and 3-oxovoafrine B, an aspidosperma-aspidosperma bisindole alkaloid isolated from cell suspension cultures of *Voacanga africana*) could be proposed for compound **3**. The first assignment seems to be more likely, since serpentinine is mentioned in the patent of *P. nitida*;<sup>16</sup> (iii) no hit was proposed for compounds **4** and **5**.

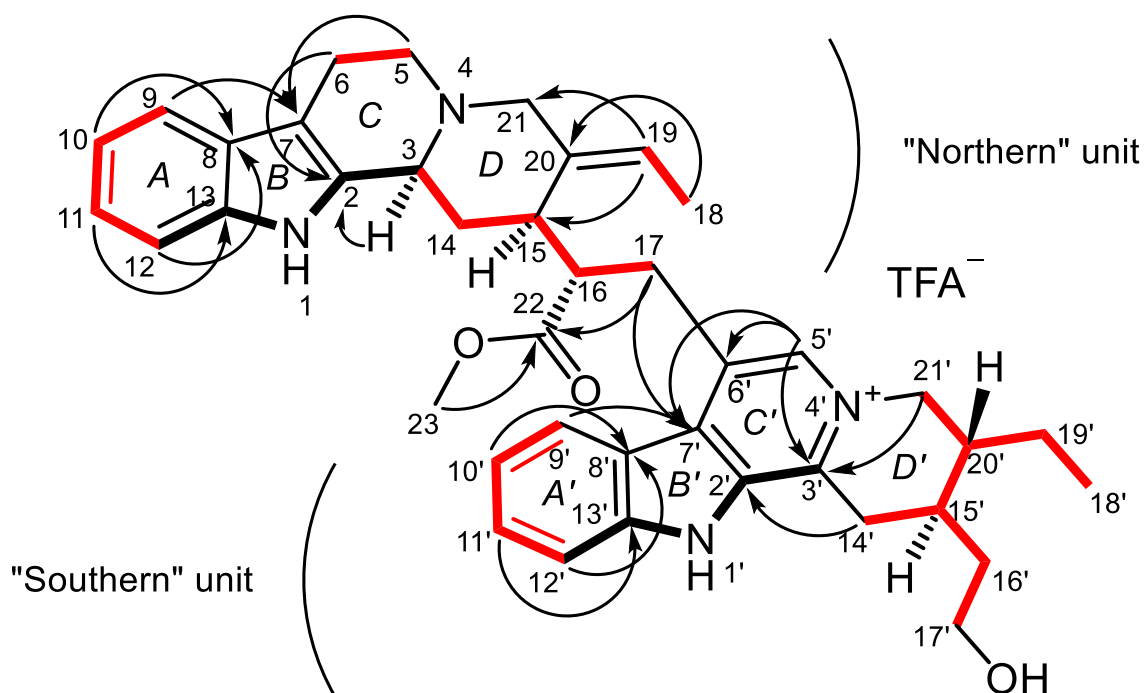
### Structure Elucidation.

- **Compound 1** was obtained as a yellow amorphous solid,  $[\alpha]_D^{23} -20$  (*c* 0.05, MeOH). The IR spectrum showed typical absorption bands at  $\nu_{\max}$  3331, 2921, 1700, 1629, 1591, 1437, 1331, 1187, 1165, 1123 and 764  $\text{cm}^{-1}$ . The UV spectrum showed absorption maxima at 208, 224, 256, 306, and 368 nm, suggesting a  $\beta$ -carbolinium chromophore.<sup>32</sup> HRESIMS indicated a  $[\text{M}^+]$  ion peak at  $m/z$   $[\text{M}^+]$  631.3628 consistent with the molecular formula,  $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_3^+$  (20 DBE). The eight aromatic protons, observed on the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, at  $\delta_{\text{H}}$  8.03 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 7.85 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.81 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz), 7.50 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.45 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz), 7.33 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.09 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.00 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), as well as the downfield singlet at  $\delta_{\text{H}}$  8.37 (1H, s) supported the presence of an unsubstituted indole ring along with a disubstituted  $\beta$ -carbolinium moiety. This feature is likewise observed in serpentinine-like bisindole alkaloids.<sup>6</sup> Moreover, the characteristic C-6'-C-17 bridge, commonly encountered in the serpentinine-like compounds, was confirmed by the HMBC correlation from H<sub>2</sub>-17 to C-7' (Figure 2). Nevertheless, the signals corresponding to an ethylidene side chain at  $\delta_{\text{H}}$  [6.24 (1H, q,  $J =$





6.9 Hz), 1.87 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz)] and an ethyl group at  $\delta_{\text{H}}$  [1.43 (1H, m), 1.23 (1H, m), 0.96 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz)] rather prompted us to speculate that **1** might possess a moandaensine-like skeleton.<sup>19</sup> The planar structure of the entire molecule was then deduced from comprehensive analysis of COSY, HSQC and HMBC spectra. Thus, **1** was considered as the assembly of the indolic “Northern” monomer and of the  $\beta$ -carbolinium “Southern” moiety.



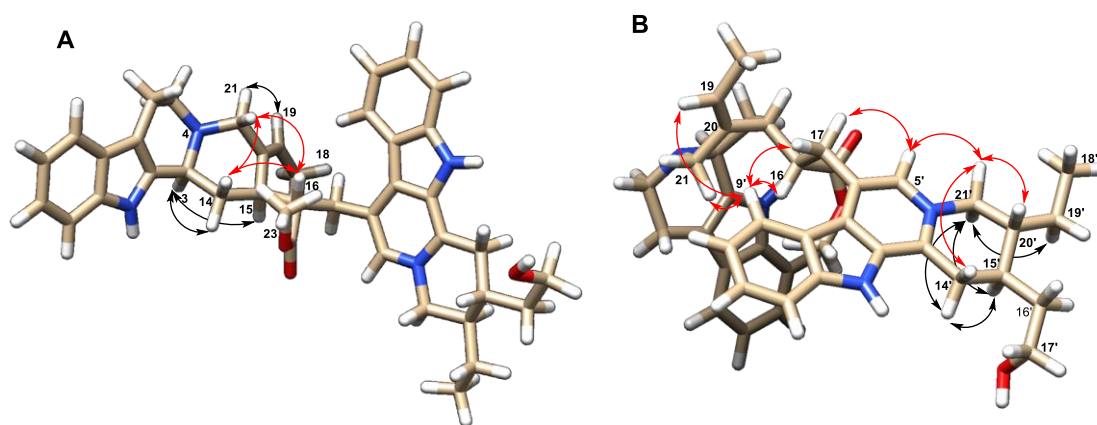
**Figure 2.** Structure of moandaensine B (**1**).

The relative stereochemistry of each monoterpene indole unit was assigned by ROESY correlations,  $J$ -coupling data, and supported by the use of molecular modeling. H-15 was assumed, for biogenetic reasons, to be  $\alpha$  in both monomeric units.<sup>19</sup> In the “Northern” moiety, the ROESY cross-peaks observed between H-3, H-14b and H-15 indicated the cofacial orientation of these hydrogens (Figure 3-A, black arrows). Moreover, as observed in both DFT-optimized 3D models of **1** and moandaensine<sup>19</sup>, the *cis*-conformation adopted by the C/D quinolizidine ring implicates the proximity of the N-4 lone pair with H-3,



explaining the high chemical shift value of the latter (4.71 ppm).<sup>19,33</sup> On the other hand, the ROESY correlations observed between H-14a, H-16 and H-21a (red arrows) placed these protons on the opposite face. Furthermore, the ROESY crosspeaks observed between H-19/H-21b and H<sub>3</sub>-18/H-15 established the *E*-configuration of the ethylidene side chain. The relative stereochemistry of this unit was consequently assigned as (3*S*\*, 15*R*\*, 16*S*\*).

In the “Southern” unit, ROESY correlations observed between H-17a, H-5', H-21'a, H-14'a, and H-20' (red arrows) suggested that they were all cofacial and assigned as  $\beta$  oriented. The strong intensity of correlations between H-14'b, H-15', H-19' and H-21'b indicated that they were  $\alpha$  oriented (Figure 3-B, black arrows). Thus, the relative configuration of this unit was established as (15'*R*\*, 20'*R*\*).<sup>19</sup>

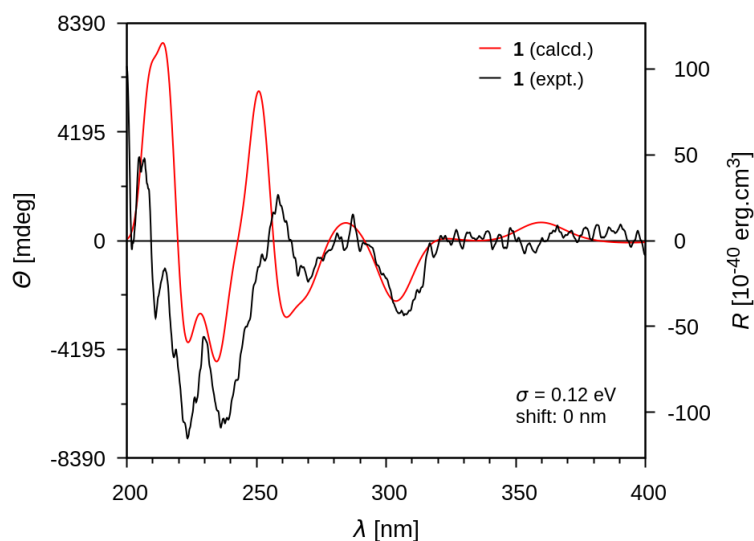


**Figure 3.** Selected ROESY correlations for **1**.

In order to determine the absolute configuration of **1**, its experimental ECD spectrum was compared with a computationally derived theoretical spectrum (Figure 4). The absolute configuration of **1** was assigned as (3*S*, 15*R*, 16*S*, 15'*R*, 20'*R*). The compound was given the trivial name moandaensine B (**1**). **1** has, therefore, the same absolute configuration as moandaensine. Nevertheless, the *J* coupling constant values measured in **1** between [H-14'ax, H-15', *J* = 8.1 Hz], and [H-20', H-21'ax, *J* = 7 Hz] (Table 2) are different to those reported by Verpoorte *et al.* Further analysis of the DFT-optimized 3D



model of **1** revealed that cycle D' adopted a half chair conformation, instead of a boat conformation as in moandaensine (Figure S6, Supporting Information). Notably, a similar case of anomalous  $J$  coupling constant value has also been reported for turbinatine, a corynanthean-type indole alkaloid, and was further explained by the twist-boat conformation adopted by the D ring.<sup>34</sup>



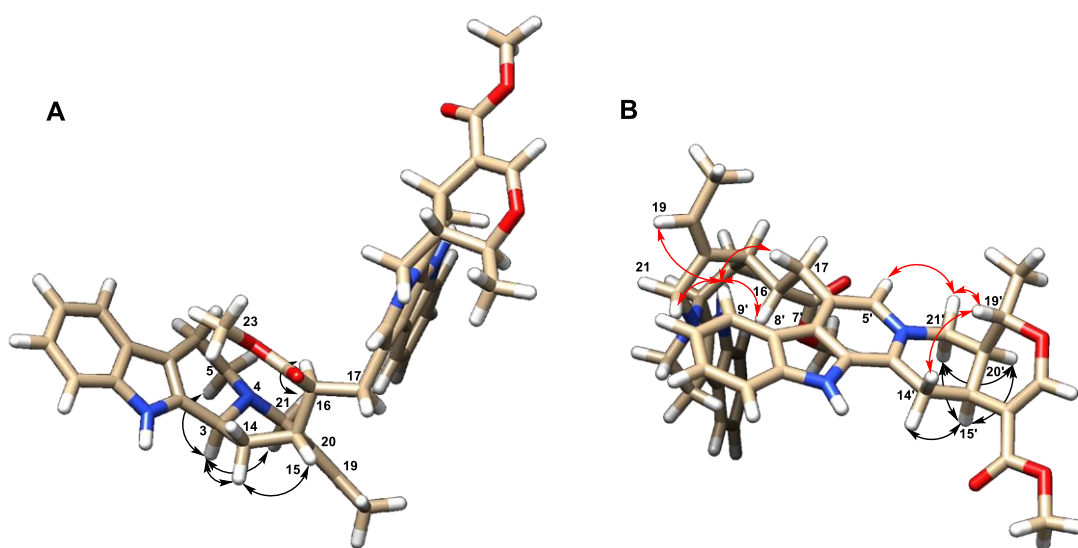
**Figure 4.** ECD spectra of **1** (experimental and calculated at the B3LYP/6-31G\* level).

- **Compound 2** was isolated as a yellow amorphous solid. The HRESIMS of the positive-ion peak [ $M^+$ ] at  $m/z$  629.3477 established the molecular formula as  $C_{40}H_{45}N_4O_3^+$  (21 DBE), indicating a molecular weight of 2 mass units lower than **1**. In its  $^1H$  NMR spectrum (Table 2), the signals observed closely matched those of moandaensine B (**1**). The main differences between **1** and **2** were the presence of signals for an ethylidene group at  $\delta_H$  1.68 and 5.80 in **2**, and the absence of those corresponding to the ethyle side chain of **1**. These observations, in combination with a thorough analysis of COSY, HSQC and HMBC data, supported the assignment of compound **2** as 19,20 dehydro moandaensine B and was given the trivial name of moandaensine C (**2**). The relative configuration of **2** was determined to be identical with that of **1** on the basis of the similarity of the ROESY correlations, and its



absolute configuration was determined by comparing its experimental ECD curve with the spectrum of **1** (Figure S4, Supporting Information).

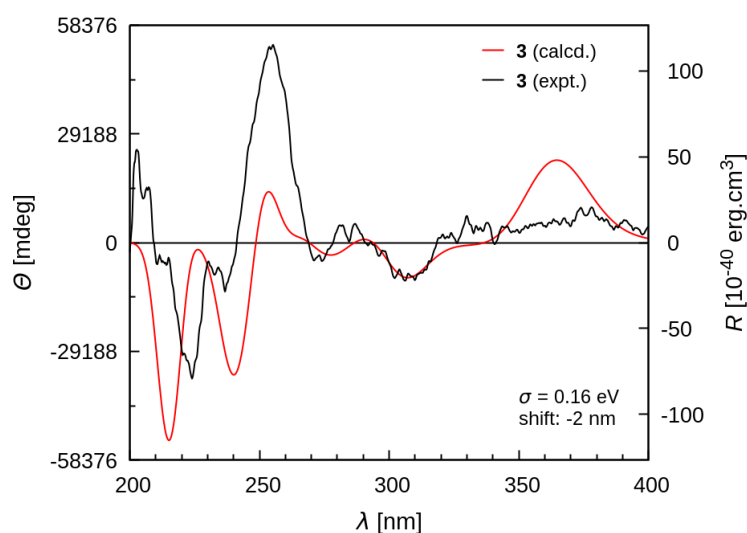
- **Compound 3** was obtained as a dark brown amorphous solid, with  $[\alpha]_{D}^{18.0} +53.6$  ( $c$  0.056, MeOH). The UV spectrum showed absorption maxima at 226, 256, 309 and 368 nm, characteristic of the  $\beta$ -carbolinium chromophore. The HRESIMS of the positive-ion peak  $[M^+]$  at  $m/z$  685.3410 established the molecular formula as  $C_{42}H_{45}N_4O_5^+$  (23 DBE), matching that of serpentinine (**8**). An examination of the ROESY spectrum of **3** revealed that the stereochemistry of the “Northern” moiety was identical with that of **1**. However, the C/D quinolizidine ring is in a *trans*-conformation, conversely to **1**. In this conformation the N-4 lone pair is opposed to H-3 (Figure 5-A), explaining the much lower chemical shift of the latter (3.66 ppm instead of 4.71 in **1**). Concerning the “Southern” unit, ROESY correlations observed between H-5', H-21'a, H-14'a, and H-19' (red arrows) suggested that they were all cofacial and were assigned as  $\beta$  oriented, whereas the cross-peaks between H-14'b, H-15', H-20' and H-21'b indicated that they were  $\alpha$  oriented, as the configuration of H-15 is once more assumed to be  $\alpha$  (Figure 5-B, black arrows). These correlations allowed to assign the relative stereochemistry of **3** as (3*S*\*, 15*R*\*, 16*S*\*, 15'*S*\*, 19'*S*\*, 20'*S*\*).



**Figure 5.** Selected ROESY correlations for **3**.



Finally, in order to determine the absolute configuration of **3**, its experimental ECD spectrum was compared with a computationally derived theoretical spectrum (Figure 6). The absolute configuration of **3** was consequently assigned as (3*S*, 15*R*, 16*S*, 15'*S*, 19'*S*, 20'*S*). The compound was identified as the new natural product 20'-*epi*-serpentinine (**3**).

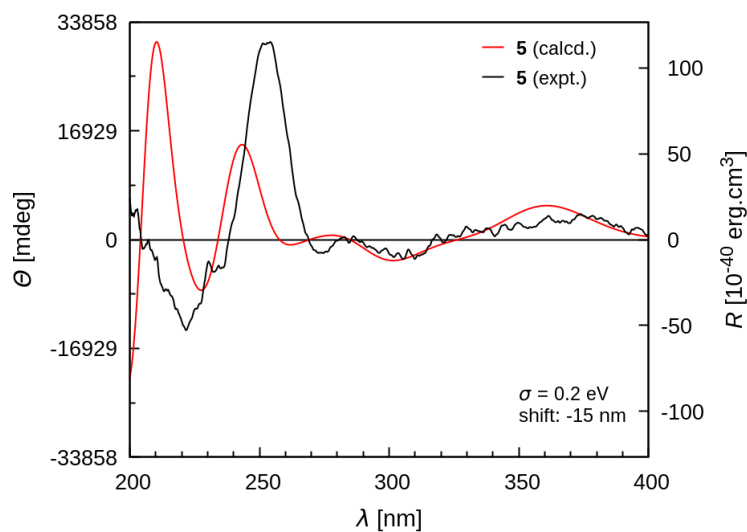


**Figure 6.** ECD spectra of **3** (experimental and calculated at the B3LYP/6-31G\* level).

- **Compound 4** was isolated as a yellow amorphous solid. The HRESIMS of the positive-ion peak [ $M^+$ ] at  $m/z$  671.3247 established the molecular formula as  $C_{41}H_{43}N_4O_5^+$  (23 DBE), indicating a molecular weight of 14 mass units lower than **3**. In its  $^1H$  NMR spectrum (Table 2), the signals observed closely matched those of 20'-*epi*-serpentinine (**3**). The main difference between **3** and **4** was the absence of the signal at  $\delta_H$  51.4, corresponding to the  $H_3-23'$  in **4**. This observation in combination with a thorough analysis of COSY, HSQC and HMBC data, supported the assignment of compound **4** as 16-demethoxy-20'-*epi*-serpentinine (**4**). The relative configuration of **4** was determined to be identical with that of **3** on the basis of the similarity of the ROESY correlations, and its absolute configuration was assigned by comparing its experimental ECD curve with the spectrum of **3** (Figure S5, Supporting Information).



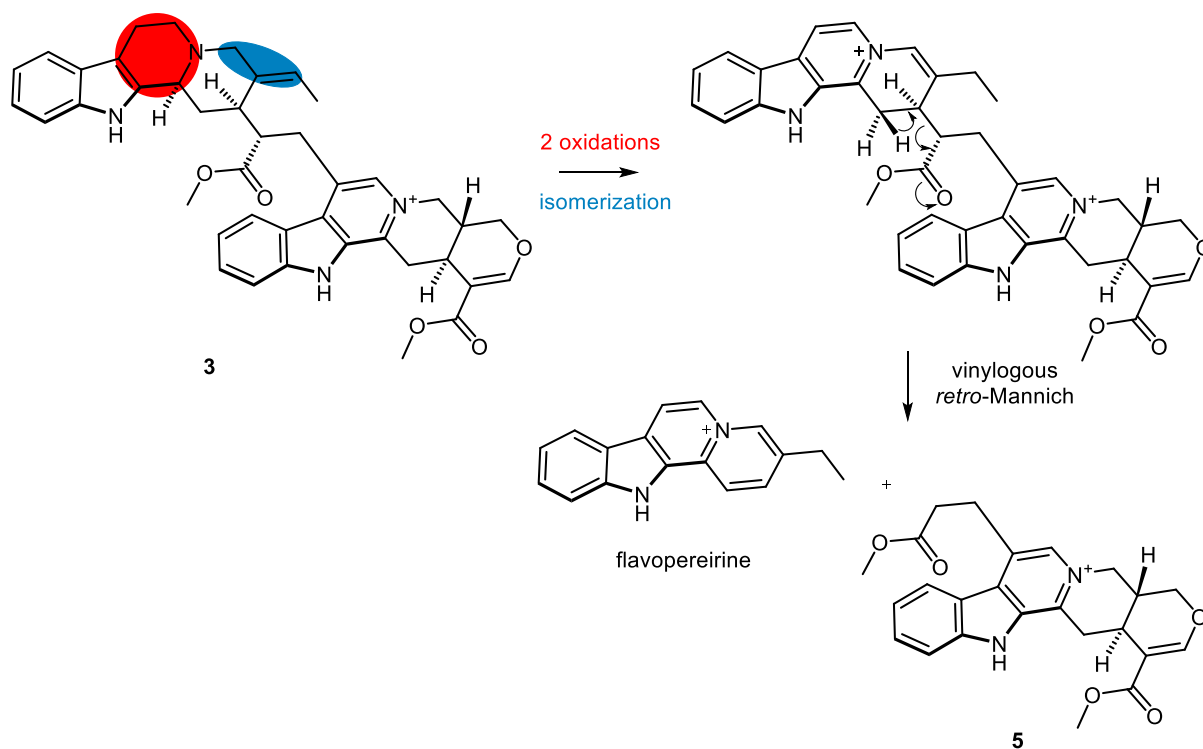
- Compound 5** was isolated as a dark brown amorphous solid. The HRESIMS of the positive-ion peak  $[M^+]$  at  $m/z$  435.1923 established the molecular formula as  $C_{25}H_{27}N_2O_5^+$  (14 DBE). In its  $^1H$  NMR spectrum (Table 3), some signals closely matched those of 20'-*epi*-serpentinine (**3**), especially from its “Southern” part. A thorough analysis of COSY, HSQC and HMBC data, supported the assignment of compound **5** as 6-methyl propionate alstonine (**5**). The relative configuration of **5** was assumed to be identical with that of the “Southern” part of **3** on the basis of the similarity of the ROESY correlations (Figure 7). Its absolute configuration was then established by comparing its experimental ECD curve with a computationally derived theoretical spectrum (Figure 8), and determined as (15*S*, 19*S*, 20*S*).



**Figure 7.** ECD spectra of **5** (experimental and calculated at the B3LYP/6-31G\* level).



It is strongly plausible that **5** might be a degradation product, originating from **3**. Its formation mechanism is proposed as shown in Figure 8.



**Figure 8.** Formation of compound **5**.



**Table 1.**  $^{13}\text{C}$  NMR Data for **1-4** in  $\text{DMSO-}d_6$ 

C	<b>1</b> <sup>a</sup>	<b>2</b> <sup>a</sup>	<b>3</b> <sup>b</sup>	<b>4</b> <sup>a</sup>
2	128.7	128.7	135.8	129.0
3	52.7	52.7	53.1	53.0
5	47.6	47.6	50.9	50.5
6	17.9	17.9	20.6	19.5
7	105.7	105.7	105.9	105.9
8	125.4	125.4	126.4	126.8
9	118.2	118.2	117.5	117.3
10	119.0	119.0	118.2	118.1
11	122.0	122.0	120.4	120.1
12	111.4	111.5	110.9	110.8
13	136.3	136.3	136.1	135.9
14	28.2	28.3	31.9	31.2
15	36.6	36.4	35.8	36.1
16	47.9	47.9	49.7	49.2
17	31.4	31.5	32.1	31.8
18	14.3	14.3	13.4	13.3
19	133.8	133.7	122.8	122.2
20	128.1	128.1	134.4	136.3
21	54.3	54.1	58.1	56.1
22	172.9	173.0	173.9	175.8
23	51.7	51.6	51.4	
2'	133.6	133.7	134.6	143.3
3'	140.1	139.4	138.6	137.3
5'	131.9	130.9	130.9	131.2
6'	128.8	129.2	128.7	133.3
7'	128.6	128.9	129.1	135.5
8'	119.0	119.1	119.3	119.3
9'	123.7	123.7	123.6	123.6
10'	121.8	121.9	121.0	121.2
11'	131.0	131.1	130.4	130.5
12'	113.3	113.3	113.9	113.0
13'	143.3	143.4	144.8	144.4
14'	28.6	28.7	28.6	28.1
15'	31.8	29.2	25.3	25.2
16'	37.3	36.7	108.6	108.2
17'	57.9	57.9	155.0	154.8
18'	10.8	13.3	18.0	17.8
19'	24.4	124.3	70.5	70.4
20'	39.5	133.3	34.9	34.8
21'	56.6	59.1	53.5	53.6
22'			166.6	166.3
23'			51.2	51.0

<sup>a</sup> Data recorded at 125 MHz. <sup>b</sup> Data recorded at 150 MHz.





**Table 2.**  $^1\text{H}$  NMR Data for **1-4** in  $\text{DMSO-}d_6$ 

H	<b>1</b> <sup>a</sup>	<b>2</b> <sup>a</sup>	<b>3</b> <sup>b</sup>	<b>4</b> <sup>a</sup>
3	4.71, m	4.71, bd (10.0)	3.66, t (7.2)	3.91, m
5	3.57, m; 3.64, m	3.57, m; 3.63, m	2.60, m; 3.07, m	2.81, m; 3.09, m
6	2.91, m; 2.99, m	2.89, m; 2.98, m	2.59, m; 2.68, m	2.60, m; 2.79, m
9	7.45, d (7.7)	7.44, d (7.9)	7.30, d (7.9)	7.32, d (7.9)
10	7.00, t (7.5)	6.99, t (7.5)	6.89, t (7.5)	6.91, t (7.4)
11	7.09, t (7.5)	7.09, t (7.5)	6.96, t (7.3)	6.97, t (7.4)
12	7.33, d (8.0)	7.32, d (8.0)	7.23, d (7.9)	7.25, d (8.0)
14	2.25, m; 2.50, m	2.24, m; 2.51, m	1.73, m; 2.39, m	2.15, m; 2.28, m
15	3.49, m	3.48, m	3.37, m	3.24, m
16	3.07, td (10.5; 3.0)	3.04, td (10.0; 3.0)	3.35, m	2.90, td (10.5, 3.6)
17	3.34, m; 3.58, m	3.38, m; 3.56, m	3.18, m; 3.56, dd (13.5, 3.4)	3.28, m
18	1.87, d (6.9)	1.86, d (6.9)	1.82, d (6.7)	1.86, t (6.7)
19	6.24, q (6.9)	6.22, q (6.7)	5.79, q (6.7)	5.75, q(6.7)
21	3.91, bd (11.7); 4.26, d (11.7)	3.90, m ; 4.24, d (11.8)	3.28, m; 3.87, m	3.18, m; 3.72, m
23	3.40, s	3.34, s	3.29, s	
5'	8.37, s	8.35, s	8.23, s	8.09, s
9'	8.03, d (8.2)	8.05, d (8.1)	8.15, d (8.3)	8.12, d (8.0)
10'	7.50, t (7.5)	7.49, t (7.5)	7.42, t (7.7)	7.39, td (6.9, 2.0)
11'	7.81, t (7.1)	7.81, t (7.5)	7.74, t (7.6)	7.71, m
12'	7.85, d (8.3)	7.84, d (8.0)	7.83, d (8.3)	7.72, m
14'	3.20, dd (17.4, 8.1); 3.72, dd (17.0, 6.4)	3.48, m; 3.86, dd (16.4; 6.6)	3.37, m; 4.05, dd (18.3, 7.3)	3.19, m; 3.90, m
15'	2.01, m (6.5)	3.25, m	3.19, m	3.01, m
16'	1.46, m; 1.73, m	1.44, m; 1.72, m		
17'	3.59, m	3.56, m	7.64, s	7.62, s
18'	0.96, t (7.3)	1.68, d (6.9)	1.35, d (6.2)	1.34, d (5.9)
19'	1.23, m; 1.43, m	5.80, q (6.8)	3.84, m	3.80, m
20'	1.89, m		2.42, m	2.30, m
21'	4.47, dd (13.7; 7.0); 4.69, dd (13.7; 5.0)	5.21, q (14.8)	4.74, dd (14.7, 2.0); 4.89, dd (14.7, 4.4)	4.48, bd (14.7); 4.60, bd (14.7)
23'			3.72, s	3.68, s
NH-1	11.14, bs	11.13, bs	10.79, bs	11.60, bs
NH-1'	13.25, bs	13.30, bs	ND	ND
OH-17'	ND	ND		

<sup>a</sup> Data recorded at 500 MHz. <sup>b</sup> Data recorded at 600 MHz



**Table 3.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopic Data of **5** in  $\text{DMSO-}d_6$ 

<b>5</b>		
position	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ <sup>b</sup>
2		146.7
3		138.7
5	8.33, s	128.8
6		129.9
7		129.8
8		119.7
9	8.28, d (8.2)	123.9
10	7.37, td (7.4, 1.8)	120.7
11	7.69, td (7.4, 1.7)	129.8
12	7.82, d (8.2)	114.6
13		146.5
14	3.39, dd (18.2, 8.6); 4.08, dd (18.2, 7.6)	28.4
15	3.17, m	25.5
16		108.5
17	7.67, s	155.0
18	1.39, d (6.0)	18.0
19	3.86, m	70.6
20	2.47, m	35.0
21	4.71, dd (14.1, 2.2); 4.93, dd (14.1, 3.3)	53.5
22		166.6
23	3.73, s	51.2
24	3.55, t (7.4)	25.7
25	2.92 t (7.6)	32.3
26		172.1
27	3.64, s	51.6
NH-1	ND	

<sup>a</sup> Data recorded at 400 MHz. <sup>b</sup> Data recorded at 100 MHz.

**Biological Testing of Alkaloids 1-7.** The purified compounds were evaluated *in vitro* for their antiparasitic activity against the chloroquine resistant strain of *Plasmodium falciparum* (FcB1), as well as for their cytotoxic activity against the MRC-5 (human fetal lung fibroblast) cell line (Table 4). Compounds **1-5** showed moderate antiparasitic activities, and no cytotoxic activity. The known compounds 3,4,5,6-tetrahydrogeissoschizol (**6**) and 10-hydroxygeissoschizol (**7**) showed only weak activities and cytotoxicities.



**Table 4.** IC<sub>50</sub> values (μM) of the Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Compounds 1-7<sup>a</sup>

compound	<i>P. falciparum</i> train FcB1	MRC-5
<b>1</b>	8.7 ± 0.4	>50
<b>2</b>	9.5 ± 0.7	>50
<b>3</b>	2.6 ± 0.3	>50
<b>4</b>	5.2 ± 2.0	>50
<b>5</b>	3.0 ± 0.0	nd
<b>6</b>	19.5 ± 0.7	>50
<b>7</b>	99 ± 0.0	>50
standard <sup>b</sup>	0.05 ± 0.02	0.00052 ± 0.00005

<sup>a</sup> Values are mean ± standard errors of three independent experiments.

<sup>b</sup> Chloroquine (FcB1); paclitaxel (MRC-5)

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Optical rotations were measured at 20 °C on a Polar 32 polarimeter. UV and ECD spectra were measured at 25 °C on a JASCO J-810 spectropolarimeter. IR spectra were recorded with a Perkin-Elmer® type 257 spectrometer. The NMR spectra were recorded on Bruker AM-400 (400 MHz), AM-500 (500 MHz) and AM-600 (600 MHz) NMR spectrometers, using DMSO-*d*<sub>6</sub> as solvent. The solvent signals were used as references. Sunfire® (150 × 19 mm, i.d. 5 μm and 150 × 30 mm, i.d. 5 μm; Waters), X-Select® (150 × 19 mm, i.d. 5 μm; Waters) and Synergi® (150 × 19 mm, i.d. 5 μm; Phenomenex) preparative C<sub>18</sub> columns were used for preparative HPLC separations using a Waters Delta Prep equipped with a binary pump (Waters 2525) and a UV-visible diode array detector (190-600 nm, Waters 2996). Silica 330 g and 40 g Grace® cartridges were used for flash chromatography using an Armen Instrument – Spot Liquid Chromatography Flash apparatus. Chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich.

**Plant Material.** The aerial parts of *Picralima nitida* were collected in Ivory Coast, in Agboville region, by Dr. Faustin Kabran in July 2015. The botanical identification was



confirmed by Henry Tehe (CSRS, Ivory Coast). A voucher specimen has been deposited at the CSRS (PN-TEHE-Agboville-PY1).

**Extraction and Isolation.** The air-dried and powdered aerial parts of *P. nitida* (1.5 kg) were extracted with EtOH (3 × 3 L, 4 h each, 20 °C, atmospheric pressure). This crude extract was concentrated under a vacuum at 38 °C to yield 51 g of residue.

This residue was subjected to flash chromatography using a Silica 330 g Grace<sup>®</sup> cartridge, with a gradient of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (100:0 to 0:100) and then of MeOH-mixture of H<sub>2</sub>O (49.5%), acetone (49.5%) and formic acid (1%) (100:0 to 20:80), at 80 mL/min, to afford twenty fractions F1-F20, according to their TLC profiles.

Fraction F6 (607.0 mg) went through three identic preparative HPLC separations, with a Sunfire<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column (150 × 30 mm), using a gradient of MeOH-H<sub>2</sub>O with 0.2% formic acid (20:80 to 60:40), at 42 mL/min, to afford 20'-*epi*-serpentinine (**3**, 40.6 mg, yield 0.0027 %), and 6'-methyl propionate alstonine (**5**, 6.8 mg, yield 0.00045 %).

Fraction F7 (14.1 g) was fractioned by flash chromatography, using a Silica 40 g Grace<sup>®</sup> cartridge, with a gradient of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (100:0 to 0:100) and then of MeOH-mixture of H<sub>2</sub>O (49.5%), acetone (49.5%) and formic acid (1%) (100:0 to 50:50), at 36 mL/min, to afford twelve fractions F7.1-F7.12, according to their TLC profiles. Fraction F7.7 (280.5 mg) was subjected to a preparative HPLC, with an X-Select<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column (150 × 19 mm), using a gradient of ACN-H<sub>2</sub>O with 0.2% formic acid (10:90 to 30:70), at 23 mL/min, to give 3,4,5,6-tetrahydrogeissoschizol (**6**, 1.3 mg, yield 0.000087 %) and a mixture of two compounds. The latter (18.2 mg) went through another preparative HPLC, using a Synergi<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column (150 × 19 mm), with a gradient of ACN-H<sub>2</sub>O with 0.2% TFA (25:75 to 35:65), at 21 mL/min, to afford moandaensine B (**1**, 12.7 mg, yield 0.00085 %) and C (**2**, 3.9 mg, yield 0.00026 %).



Fraction 10 (402.5 mg) went through a preparative HPLC, using a Sunfire<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column (150 × 19 mm), with a gradient of ACN-H<sub>2</sub>O with 0.2% formic acid (5:95 to 15:85), at 21 mL/min, to give 10-hydroxygeissoschizol (**7**, 8.1 mg, yield 0.00054 %).

Fraction F14 (570.0 mg) was subjected to a preparative HPLC, using a Sunfire<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column (150 × 30 mm), with a gradient of MeOH-H<sub>2</sub>O with 0.2% formic acid (30:70 to 50:50), at 42 mL/min, to afford 20'-*epi*-serpentinine B (**4**, 110.2 mg, yield 0.0073 %).

*moandaensine B (1)*: yellow amorphous solid;  $[\alpha]_{\text{D}}^{23.0} -20$  (*c* 0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 208 (8.6), 224 (8.5), 256 (8.3), 306 (8.0), 368 (7.6) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  3331, 2921, 1700, 1629, 1591, 1437, 1331, 1187, 1165, 1123 and 764 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see Table 2 and 3; HRESIMS  $m/z$  [M<sup>+</sup>] 631.3628 (calcd for C<sub>40</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>, 631.3643).

*moandaensine C (2)*: yellow amorphous solid;  $[\alpha]_{\text{D}}^{22.7} -60$  (*c* 0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 223 (8.6), 259 (8.3), 290 (8.1), 307 (8.1), 371 (7.6) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  3331, 2921, 1700, 1629, 1591, 1437, 1331, 1187, 1165, 1123 and 764 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see Table 2 and 3; HRESIMS  $m/z$  [M<sup>+</sup>] 629.3477 (calcd for C<sub>40</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>, 629.3486).

20'-*epi*-serpentinine (**3**): dark brown amorphous solid;  $[\alpha]_{\text{D}}^{18.0} +53.6$  (*c* 0.056, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 226 (9.6), 256 (9.5), 309 (9.2), 368 (8.6) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  3332, 2919, 1701, 1633, 1589, 1437, 1332, 1190, 1166, 1126 and 766 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see Table 2 and 3; HRESIMS  $m/z$  [M<sup>+</sup>] 685.3410 (calcd for C<sub>42</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>, 685.3384).

16-*demethoxy*-20'-*epi*-serpentinine (**4**): brown amorphous solid;  $[\alpha]_{\text{D}}^{18.1} +13.9$  (*c* 0.072, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 222 (9.0), 257 (8.9), 309 (8.6), 370 (8.1) nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  3330, 2920, 1703, 1633, 1590, 1434, 1330, 1192, 1167, 1126 and 765 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see Table 2 and 3; HRESIMS  $m/z$  [M<sup>+</sup>] 671.3247 (calcd for C<sub>41</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>, 671.3228).

6-*methyl propionate alstonine (5)*: dark brown amorphous solid;  $[\alpha]_{\text{D}}^{17.5} +44.4$  (*c* 0.045, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (8.9), 231 (8.8), 253 (8.8), 308 (8.5), 370 (7.9) nm; IR



$\nu_{\max}$  2933, 1712, 1644, 1582, 1438, 1336, 1186, 1166, 1125 and 753  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see Table 4; HRESIMS  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ] 435.1923 (calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5^+$ , 435.1914).

**Mass Spectrometry Analysis.** Samples were analyzed using an Agilent LC-MS system comprising an Agilent 1260 infinity HPLC coupled to an Agilent 6530 Q-TOF-MS equipped with an ESI source operating with a positive polarity. A Sunfire analytical  $\text{C}_{18}$  column ( $150 \times 2.1$  mm; i.d. 3.5  $\mu\text{m}$ , Waters) was used, with a flow rate of 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  and a linear gradient from 5% B (A:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1% formic acid, B: MeOH) to 100% B over 30 min. ESI conditions were set with the capillary temperature at 320  $^\circ\text{C}$ , source voltage at 3.5 kV and a sheath gas flow rate of 10 L/min. The divert valve was set to waste for the first 3 min. There were four scan events: positive MS, window from  $m/z$  100-1200, then three data-dependent MS/MS scans of the first, second, and third most intense ions from the first scan event. MS/MS settings were three fixed collision energies (30, 50 and 70 eV), default charge of 1, minimum intensity of 5000 counts, and isolation width of  $m/z$  1.3. In the positive-ion mode, purine  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  ion ( $m/z$  121.050873) and the hexakis(1*H*,1*H*,3*H*-tetrafluoropropoxy)phosphazene  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_{24}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}_3$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  ion ( $m/z$  922.009798) were used as internal lock masses. Full scans were acquired at a resolution of 11000 (at  $m/z$  922). A permanent MS/MS exclusion list criterion was set to prevent oversampling of the internal calibrant.

**MZmine 2 Data-Preprocessing Parameters and Molecular Networking.** The network was created using the HPLC-HRMS/MS data from the ethanolic extract of the aerial parts of *P. nitida*. The MS/MS data files were converted from the .d (Agilent) standard data-format to .mzXML format using the MSConvert software, part of the ProteoWizard package.<sup>35</sup> All .mzXML were then processed using MZmine 2 v32<sup>36</sup>. The mass detection was realized keeping the noise level at 1.0 E5. The ADAP chromatogram builder was used using a minimum group size of scans of 4, a group intensity threshold of 1.0 E5, a minimum highest



intensity of  $1.0 \times 10^5$  and  $m/z$  tolerance of 0.02 Da (or 15 ppm).<sup>37</sup> The ADAP wavelets deconvolution algorithm was used with the following standard settings: S/N threshold = 70, minimum feature height = 3, coefficient/area threshold = 5, Peak duration range 0.02 - 2.0 min, RT wavelet range 0.02 - 0.2. MS/MS scans were paired using a  $m/z$  tolerance range of 0.02 Da and RT tolerance range of 1.0 min. Isotopes were grouped using the isotopic peaks grouper algorithm with a  $m/z$  tolerance of 0.02 Da (or 15 ppm) and a RT tolerance of 1.0 min. Peak alignment was performed using the join aligner module ( $m/z$  tolerance = 0.02 Da (or 15 ppm), weight for  $m/z$  = 2, weight for RT = 2, absolute RT tolerance 1.0 min). The peak list was gap-filled with the same RT and  $m/z$  range gap filler module ( $m/z$  tolerance of 0.02 Da (or 15 ppm)). Eventually, the .mgf preclustered spectral data file and its corresponding .csv metadata file (for RT, areas and formulas integration) were exported using the dedicated “Export for GNPS” and “Export to CSV file” built-in options. The converted data-files were processed using the molecular networking method developed by Dorrestein and co-workers,<sup>38</sup> through the online workflow at GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). The obtained molecular network was analyzed and visualized using Cytoscape (ver 3.0.3).<sup>39</sup> The resulting analysis and parameters for the network can be accessed via this link:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2987e45c81114ec88a6a75e8a35918c1>

(crude extract + fractions). The data was clustered with a parent mass tolerance of 0.02 Da and a MS/MS fragment ion tolerance of 0.02 Da to create consensus spectra. A network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.6 and more than 6 matched peaks. Further edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 50 most similar nodes. The spectra in the network were then searched against GNPS' spectral libraries. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.6 and at least 6 matched peaks.



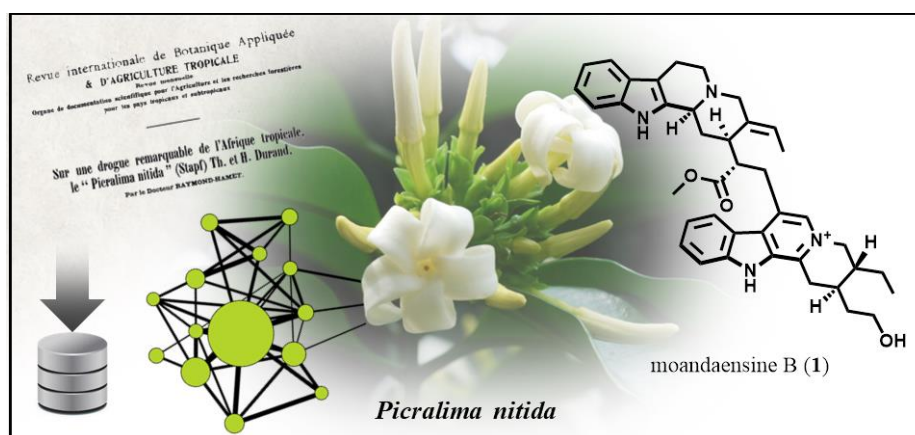
**Computational Methods.** See S7, Supporting Information.

**Biological Assays.** See Experimental Method S8, Supporting Information.

## ASSOCIATED CONTENT

NMR spectra of compounds **1-5** as well as the model coordinates of the most stable conformation of **1**, **3**, and **5** are available free of charge *via* the Internet <http://pubs.acs.org>.

## GRAPHICAL ABSTRACT





ii. Supporting Information

# Molecular Networking Reveals Serpentinine Bisindole Alkaloids Derivatives from the Good Old *Picralima nitida*

Charlotte Alcover,<sup>†</sup>

<sup>†</sup> Équipe “Chimie des substances naturelles” BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France,



## Table of contents

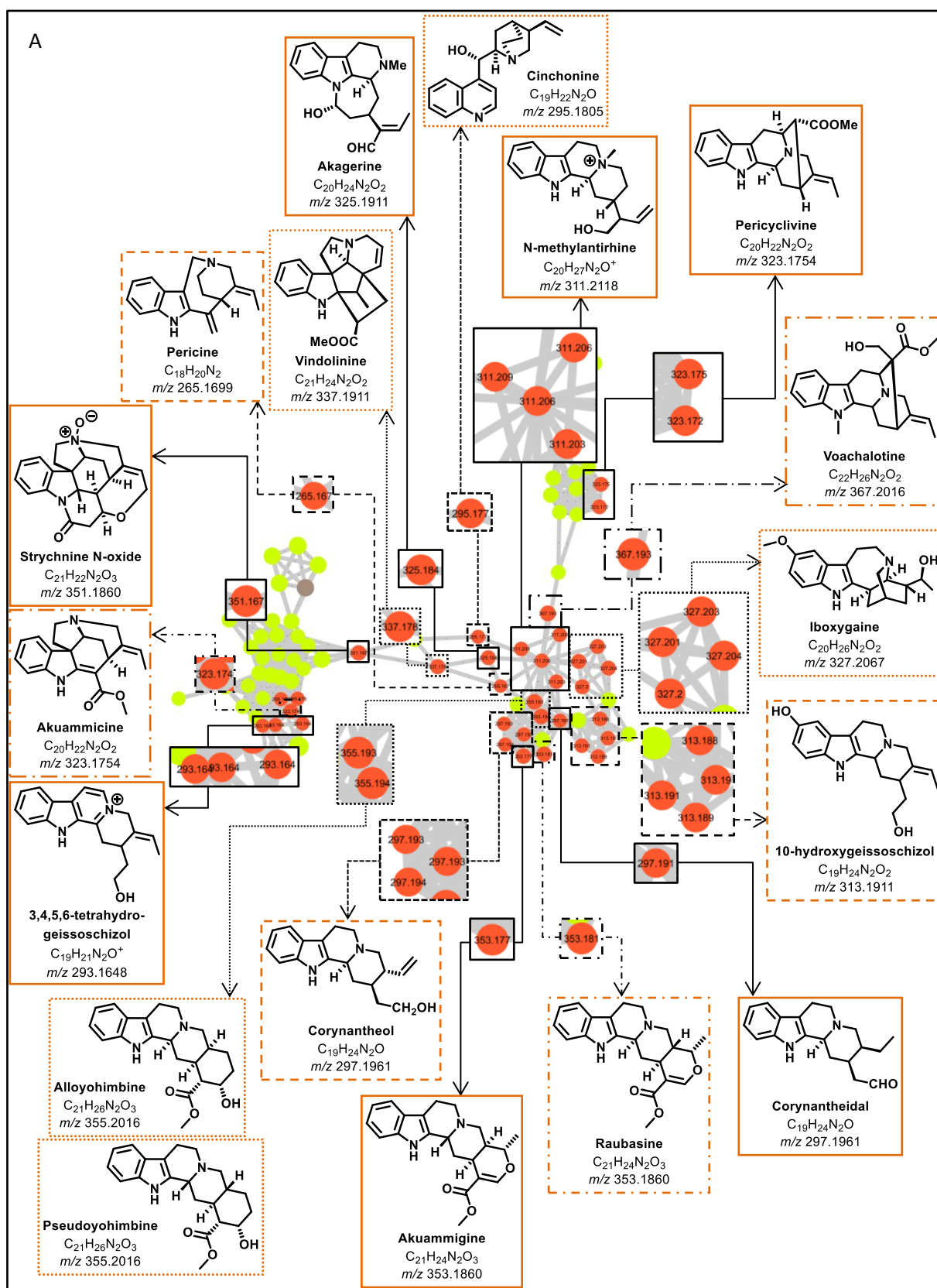
<b>Figure S1.</b>	Molecular network: Cluster A .....	57
<b>Table S2.</b>	Dereplicated Compounds Against the MIADB-GNPS.....	58
<b>Figure S3.</b>	Molecular network: Clusters A and B .....	59
<b>Table S4.</b>	HRMS-based dereplication – Selected compounds.....	59
<b>Figure S5.</b>	Comparison between the experimental ECD spectra of 1 and 2 .....	60
<b>Figure S6.</b>	Comparison between the experimental ECD spectra of 3 and 4 .....	60
<b>Figure S7.</b>	Comparison of 3D models of <b>1</b> and moandaensine .....	61
<b>S8.</b>	Computational methods .....	61
<b>Experimental Method S9.</b>	Biological Assays .....	62
<b>Figure S10.</b>	<sup>1</sup> H NMR Spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine B ( <b>1</b> ) .....	64
<b>Figure S11.</b>	<sup>13</sup> C NMR Spectrum (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine B ( <b>1</b> ) .....	65
<b>Figure S12.</b>	COSY spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine B ( <b>1</b> ).....	66
<b>Figure S13.</b>	HSQC spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine B ( <b>1</b> ).....	67
<b>Figure S14.</b>	HMBC spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine B ( <b>1</b> ) .....	68
<b>Figure S15.</b>	ROESY spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine B ( <b>1</b> ) .....	69
<b>Figure S16.</b>	<sup>1</sup> H NMR spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine C ( <b>2</b> ) .....	70
<b>Figure S17.</b>	<sup>13</sup> C NMR spectrum (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine C ( <b>2</b> ).....	71
<b>Figure S18.</b>	COSY spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine C ( <b>2</b> ).....	72
<b>Figure S19.</b>	HSQC spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine C ( <b>2</b> ).....	73
<b>Figure S20.</b>	HMBC spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine C ( <b>2</b> ) .....	74
<b>Figure S21.</b>	ROESY spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of moandaensine C ( <b>2</b> ) .....	75
<b>Figure S22.</b>	<sup>1</sup> H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>3</b> ).....	76
<b>Figure S23.</b>	<sup>13</sup> C NMR spectrum (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>3</b> ).....	77
<b>Figure S24.</b>	COSY spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>3</b> ) .....	78
<b>Figure S25.</b>	HSQC spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>3</b> ) .....	79
<b>Figure S26.</b>	HMBC spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>3</b> ).....	80
<b>Figure S27.</b>	ROESY spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>3</b> ).....	81
<b>Figure S28.</b>	<sup>1</sup> H NMR spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 16-demethoxy-20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>4</b> ) 82	
<b>Figure S29.</b>	<sup>13</sup> C NMR spectrum (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 16-demethoxy-20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>4</b> ) 83	
<b>Figure S30.</b>	COSY spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 16-demethoxy-20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>4</b> )... 84	
<b>Figure S31.</b>	HSQC spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 16-demethoxy-20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>4</b> )... 85	
<b>Figure S32.</b>	HMBC spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 16-demethoxy-20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>4</b> ).. 86	



<b>Figure S33.</b>	ROESY spectrum (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 16-demethoxy-20'- <i>epi</i> -serpentinine ( <b>4</b> )	87
<b>Figure S34.</b>	<sup>1</sup> H NMR spectrum (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 6-methyl propionate alstonine ( <b>5</b> ).....	88
<b>Figure S35.</b>	<sup>13</sup> C NMR spectrum (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 6-methyl propionate alstonine ( <b>5</b> ).....	89
<b>Figure S36.</b>	COSY spectrum (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 6-methyl propionate alstonine ( <b>5</b> ) .....	90
<b>Figure S37.</b>	HSQC spectrum (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 6-methyl propionate alstonine ( <b>5</b> ) .....	91
<b>Figure S38.</b>	HMBC spectrum (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 6-methyl propionate alstonine ( <b>5</b> ) .....	92
<b>Figure S39.</b>	NOESY spectrum (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of 6-methyl propionate alstonine ( <b>5</b> ).....	93



Figure S1. Molecular network: Cluster A



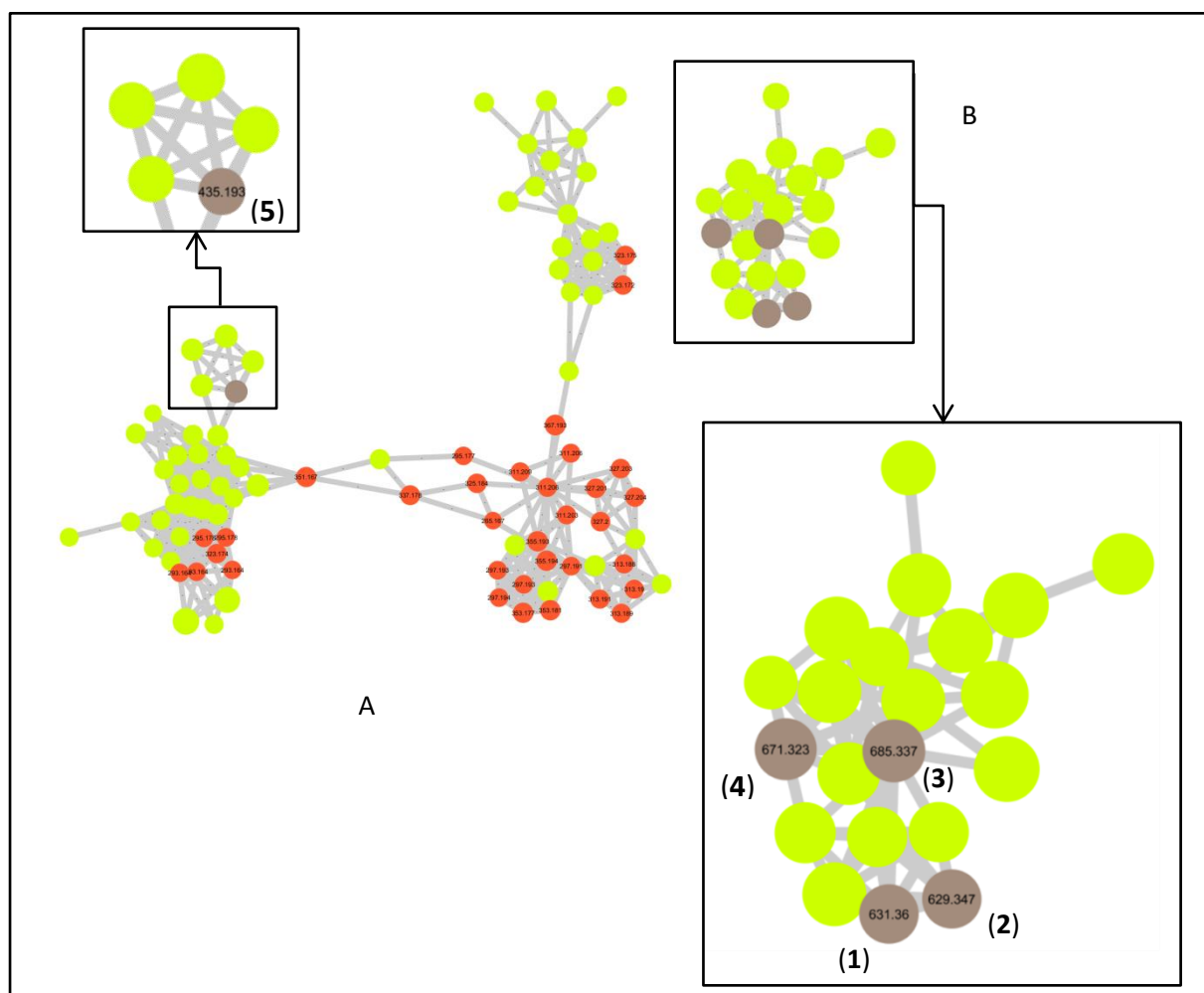
**Figure S1.** Cluster A of the full molecular network of the ethanolic extract and fractions from the aerial parts of *Picralima nitida*, with the dereplicated compounds.



**Table S2.** Dereplicated Compounds Against the MIADB-GNPS

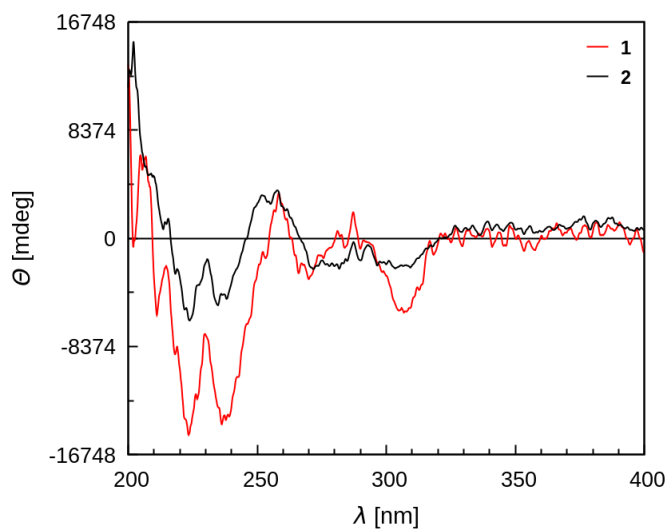
Compounds	Score	$\Delta$ RT (min)	Identification level <sup>40</sup>
10-hydroxy-geissoschizol	0.91	7.43	2
3,4,5,6-tetrahydro-geissoschizol	0.93	1.88	1
akagerine	0.79	1.57	1
akuammicine	0.69	7.57	2
akuammigine	0.95	4.41	2
alloyohimbine	0.86	1.41	1
cinchonine	0.75	/	2
corynantheidal	0.91	1.02	1
corynantheol	0.93	2.69	2
iboxygaine	0.67	1.15	1
<i>N</i> -methyl antirrhine	0.85	5.95	2
pericine	0.88	11.78	2
pericyclivine	0.74	0.05	1
pseudoyohimbine	0.83	14.26	2
strictosamide	0.91	8.55	2
strychnine- <i>N</i> -oxide	0.61	/	2
raubasine	0.88	3.48	2
vindolinine	0.65	11.99	2
voachalotine	0.73	5.77	2



**Figure S3.** Molecular network: Clusters A and B**Figure S3.** Cluster A and B of the full molecular network of the ethanolic extract and fractions from the aerial parts of *Picralima nitida*.**Table S4.** HRMS-based dereplication – Selected compounds**Table S4:** Dereplication of the selected compounds against DNP and Reaxys<sup>®</sup> databases

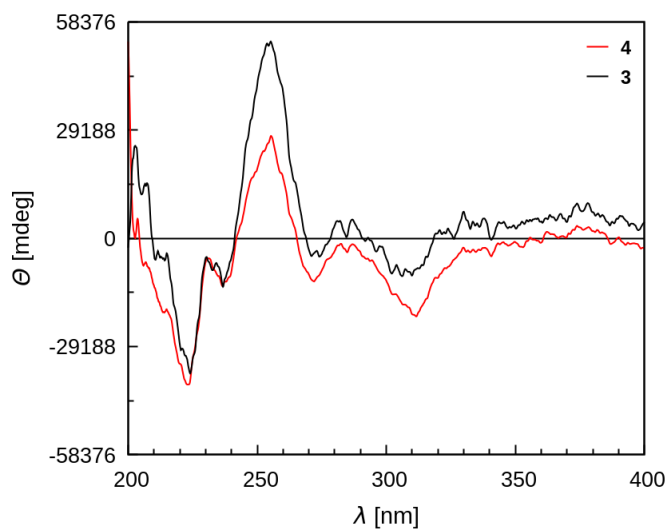
compounds	species	measured $m/z$	exact $m/z$	hits	molecular formula
1	[M <sup>+</sup> ]	631.3628	631.3643	13 hits - Not described in <i>P. nitida</i>	C <sub>40</sub> H <sub>47</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>
2	[M <sup>+</sup> ]	629.3477	629.3486	9 hits - Not described in <i>P. nitida</i>	C <sub>40</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>
3	[M <sup>+</sup> ]	685.3410	685.3384	2 hits - serpentinine and 3-oxovoafrine B	C <sub>42</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>
4	[M <sup>+</sup> ]	671.3247	671.3228	No hits	C <sub>41</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>
5	[M <sup>+</sup> ]	435.1923	435.1914	No hits	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>

**Figure S5.** Comparison between the experimental ECD spectra of 1 and 2



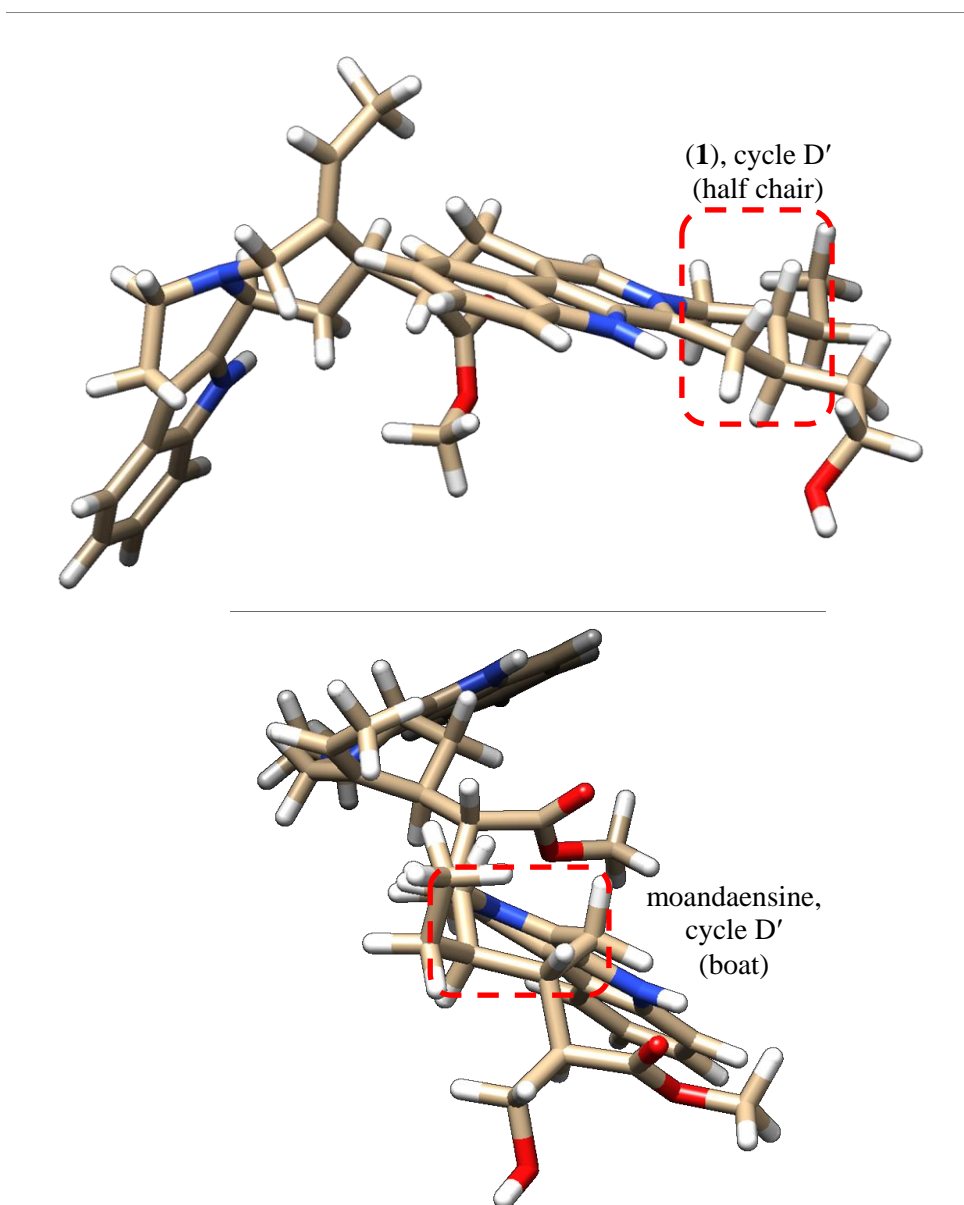
**Figure S5.** Comparison between the experimental ECD spectra of compounds **1** (red) and **2** (black), in methanol

**Figure S6.** Comparison between the experimental ECD spectra of 3 and 4



**Figure S6.** Comparison between the experimental ECD spectra of compounds **3** (black) and **4** (red), in methanol



**Figure S7.** Comparison of 3D models of **1** and moandaensine

### S8. Computational methods

Conformations of compound **1**, **3** and **5** were fully optimized *in vacuo* and without constrain using DFT<sup>41,42</sup> with the hybrid Becke3LYP<sup>43,44</sup> functional and the 6-31G\* basis,<sup>45</sup> as implemented in the Gaussian 16 software package.<sup>46</sup> Upon geometrical optimization convergence, a frequency calculation within the harmonic approximation was conducted at the same level of theory and local minima were characterized by the absence of imaginary





frequency. TDDFT at the same level of theory was then employed to predict energies as well as rotational strengths of the first 60 electronic transitions of the lowest energy conformer. The UCSF Chimera v1.11<sup>47</sup> software package was used for the depiction of the most stable conformer of compounds **1**, **3** and **5**. ECD spectrum envelope was then calculated using SpecDis v1.71<sup>48</sup> (with different sigma/gamma values) and rendered using Gnuplot v5.2.<sup>49</sup>

### **Experimental Method S9.** Biological Assays

**Antiplasmodial Evaluation.** The chloroquine-resistant strain FcB1/Colombia of *Plasmodium falciparum* was obtained from the National Museum Natural History collection, Paris, France (n°MNHN-CEU-224-PfFCB1). Parasites were maintained in vitro in human erythrocytes in RPMI 1640 medium supplemented by 8% (v/v) heat-inactivated human serum at 37 °C under an atmosphere of 3% CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub>, and 91% N<sub>2</sub>. Human red blood cells and serum were provided by the Etablissement Français du Sang Ile de France under the C-CPSL-UNT approval n°13/EFS/126. In vitro drug susceptibility was measured by [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation as described previously.<sup>50</sup> Stock solutions of drugs were prepared in DMSO. Compounds were serially diluted two-fold with 100 µL culture medium in 96-well plates. Asynchronous parasite cultures (100 µL, 1% parasitemia and 1% final hematocrit) were then added to each well and incubated for 24 h at 37 °C prior to the addition of 0.5 µCi of [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine (GE Healthcare; 1 to 5 Ci.mmol/mL) per well. After a further incubation of 24 h, plates were frozen and thawed. Cell lysates were then collected onto glass-fiber filters and counted in a liquid scintillation spectrometer. The growth inhibition for each drug concentration was determined by comparison of the radioactivity incorporated in the treated culture with that in the control culture maintained on the same plate. The concentration causing 50% growth inhibition (IC<sub>50</sub>) was obtained from the drug concentration-response curve and the results were expressed as mean values ± standard deviations as determined from

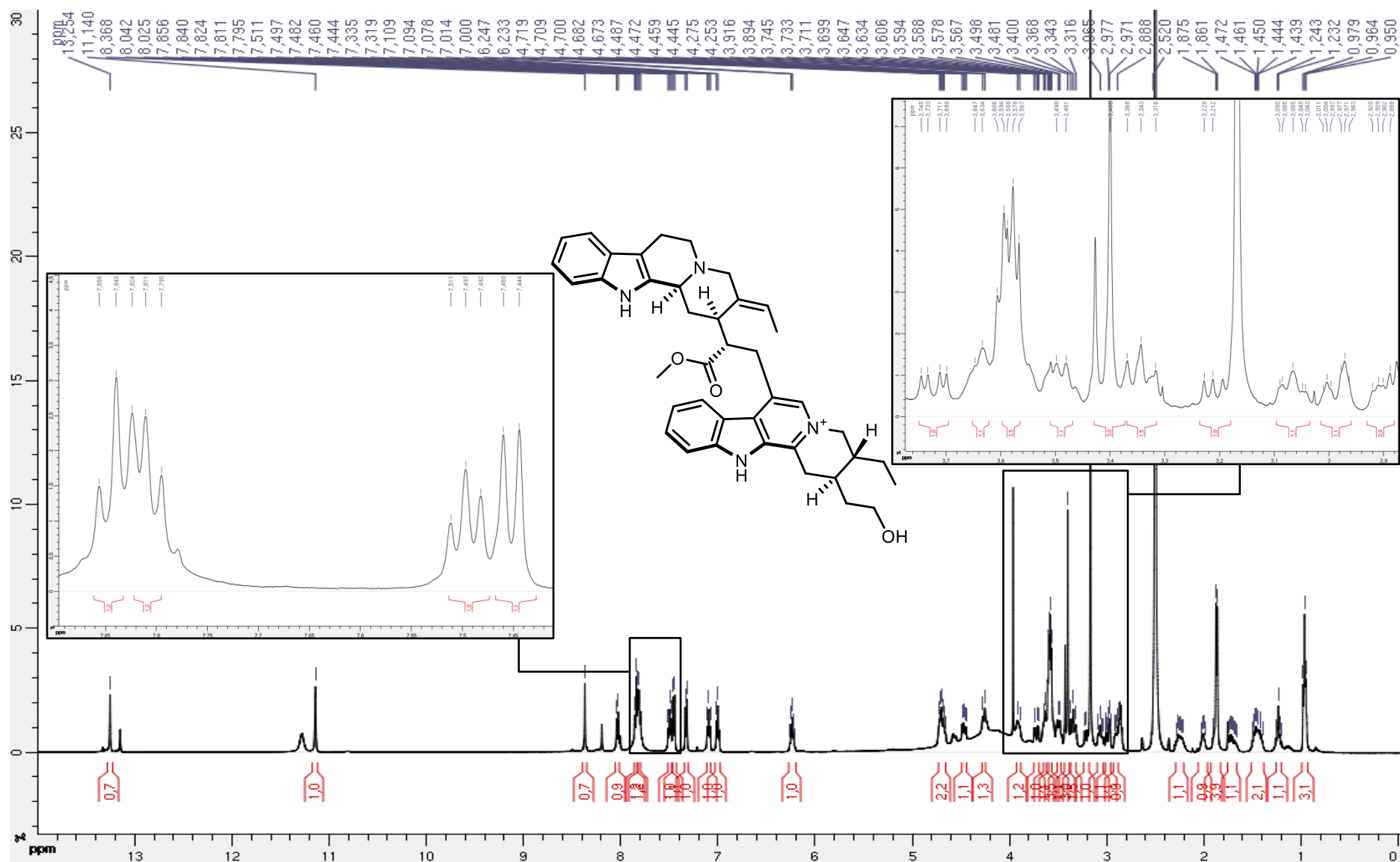


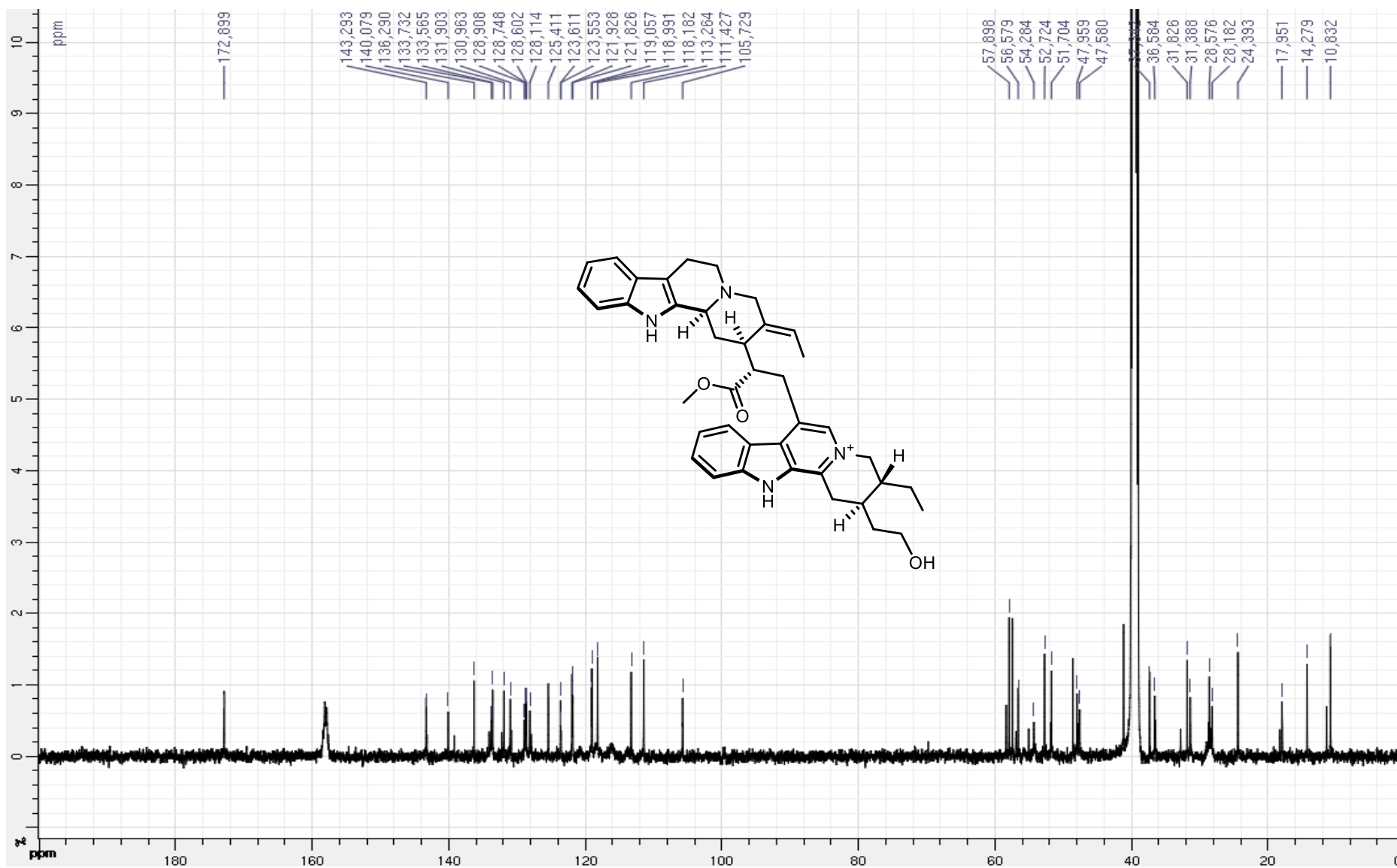
three independent experiments. Chloroquine diphosphate, used as a positive control, was purchased from Sigma (purity>99%).

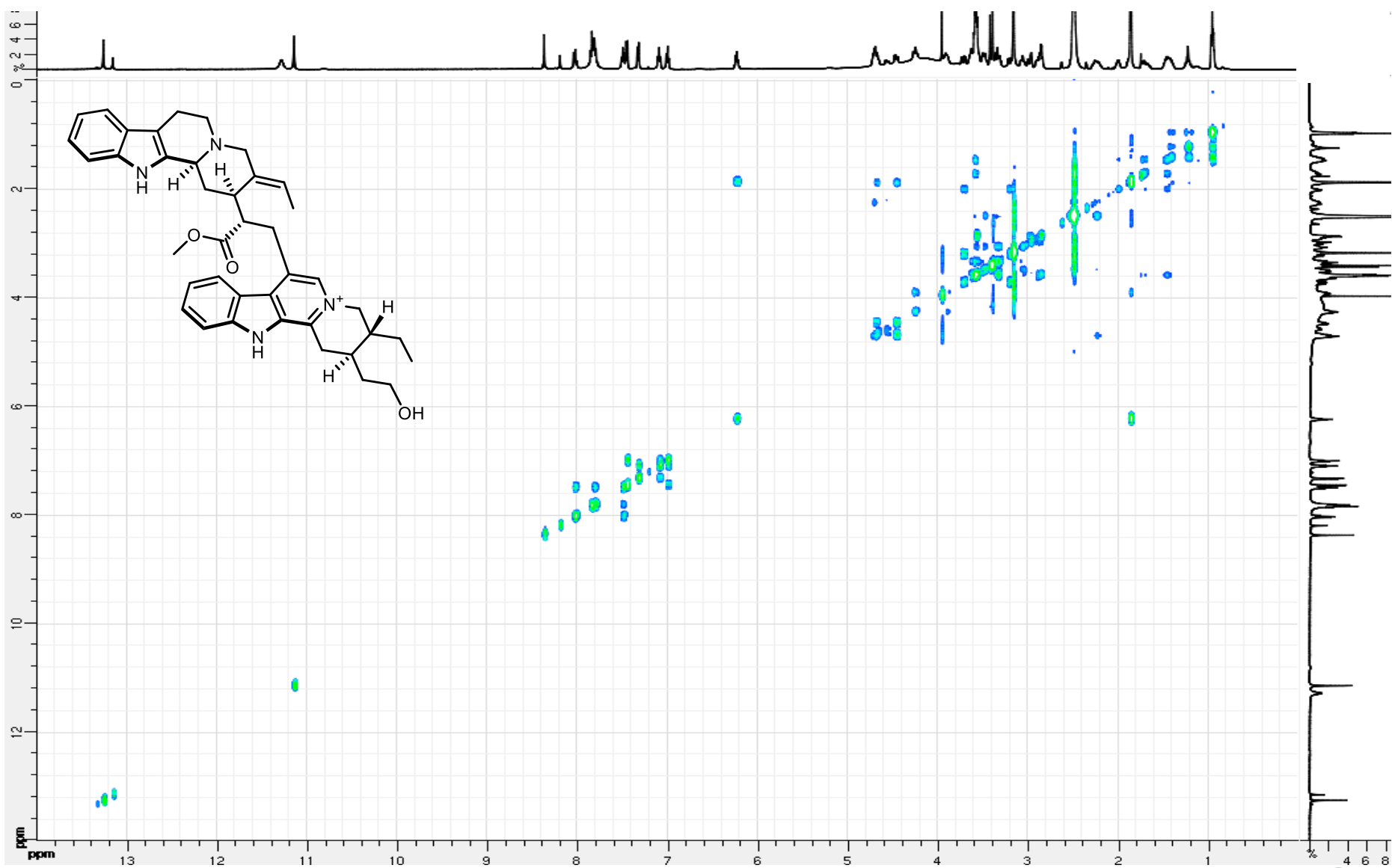
**Cell Culture and Proliferation Assay.** The MRC-5 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and cultured according to the supplier's instructions. Human MRC-5 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% glutamine. The cell line was maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell growth inhibition was determined by an MTS assay according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). Briefly, the cells were seeded in 96-well plates ( $2.5 \times 10^3$  cells/well) containing 200 µL of growth medium. After 24 h of culture, the cells were treated with the test compounds at different final concentrations. After 72 h of incubation, 40 µL of resazurin was added for 2 h before recording absorbance at 490 nm with a spectrophotometric plate reader. The IC<sub>50</sub> value corresponded to the concentration of compound inducing a decrease of 50% in absorbance of drug-treated cells compared with untreated cells. Experiments were performed in triplicate. Paclitaxel was used as the reference compound.

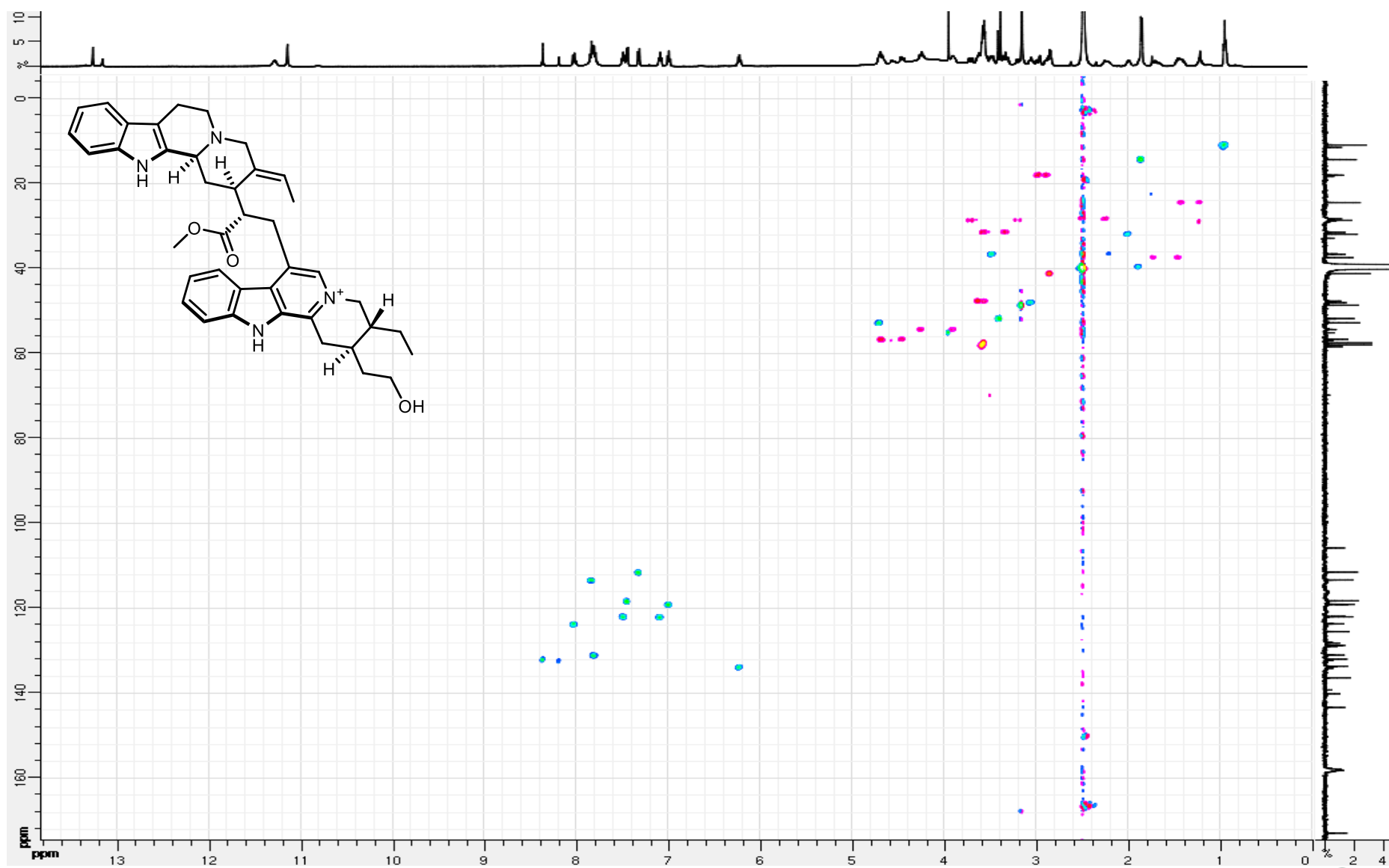


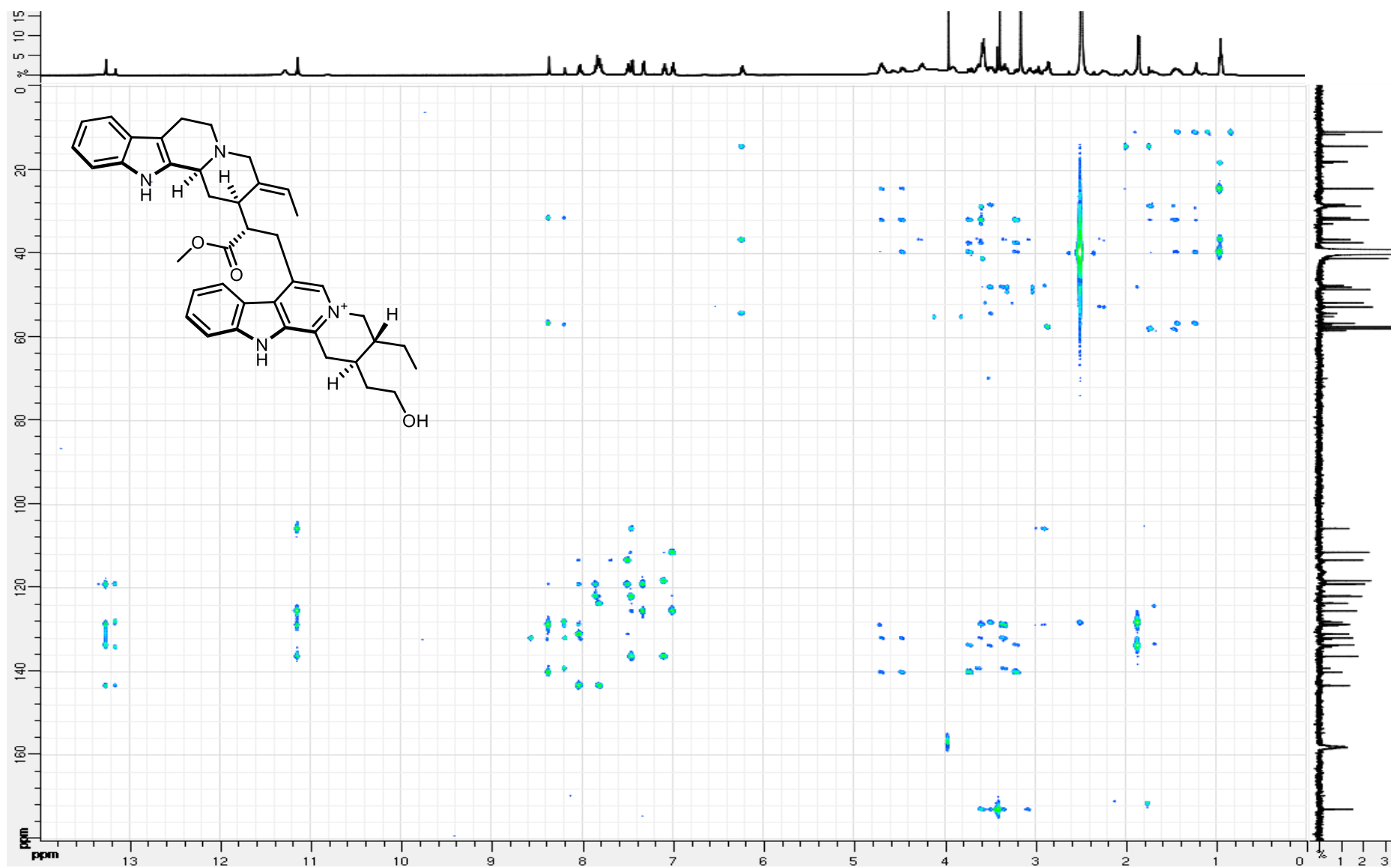
**Figure S10.**  $^1\text{H}$  NMR Spectrum (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) of moandaensine B (**1**)



**Figure S11.**  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) of moandaensine B (**1**)

**Figure S12.** COSY spectrum (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of moandaensine B (**1**)

**Figure S13.** HSQC spectrum (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of moandaensine B (**1**)

**Figure S14.** HMBC spectrum (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of moandaensine B (**1**)

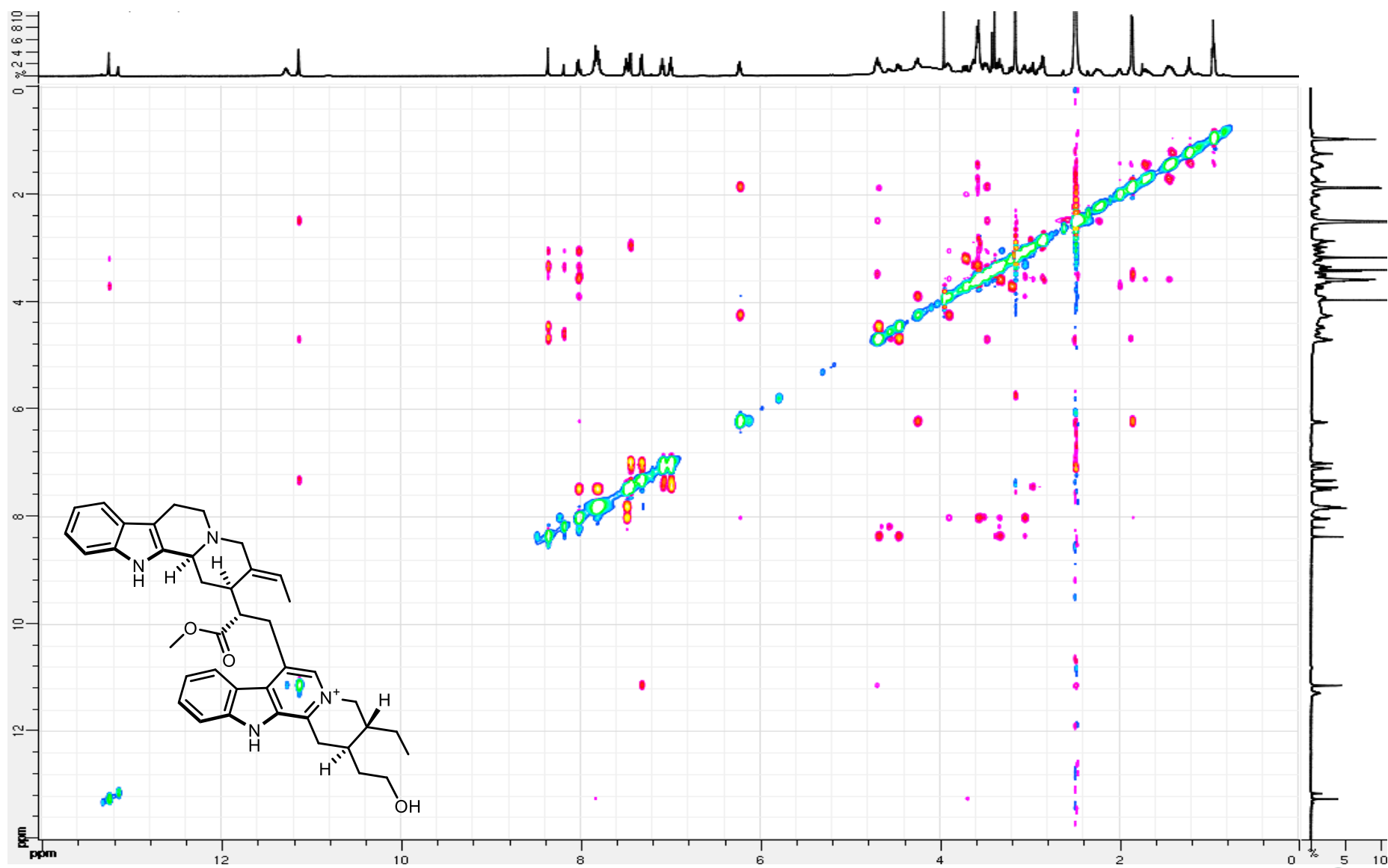
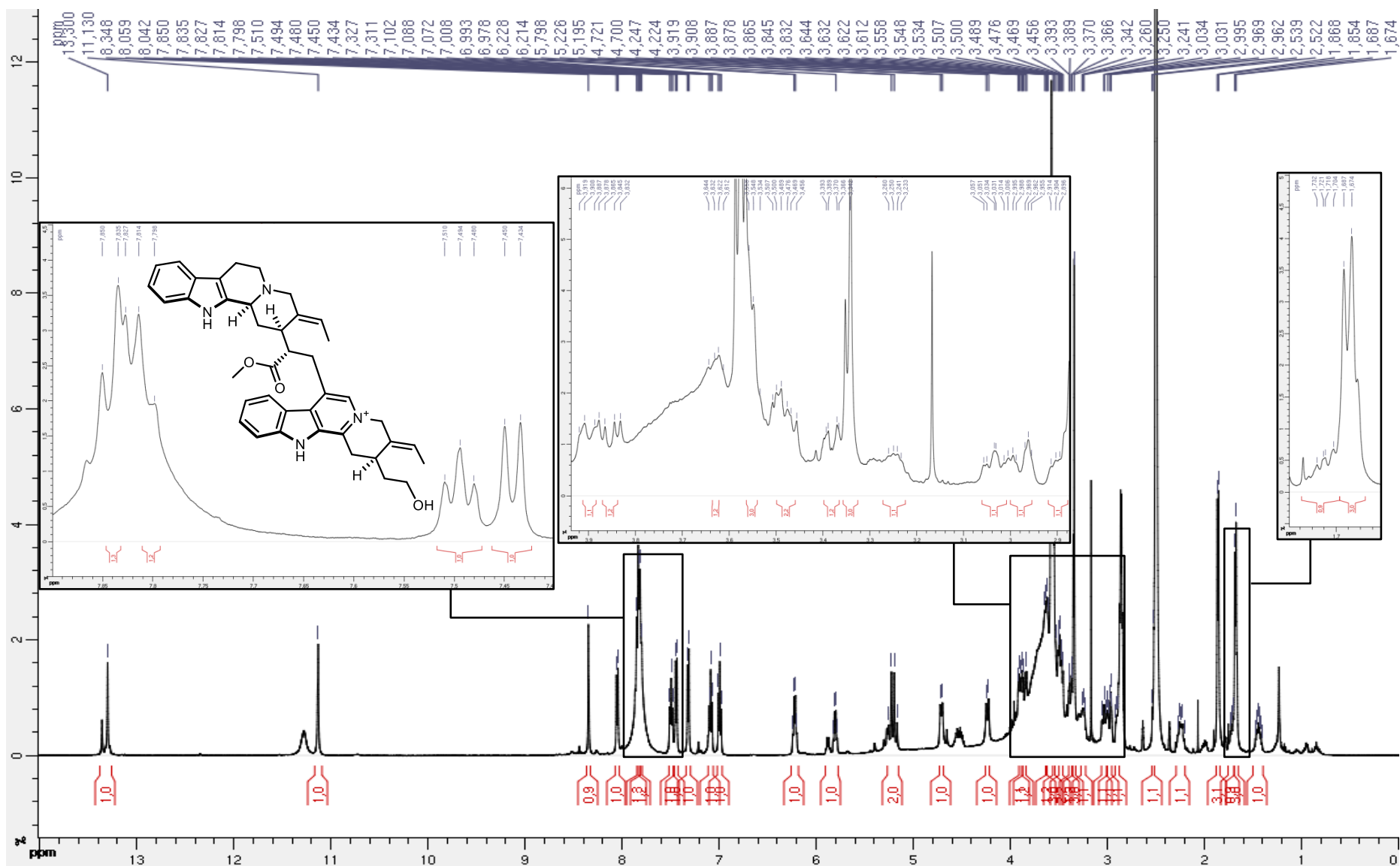
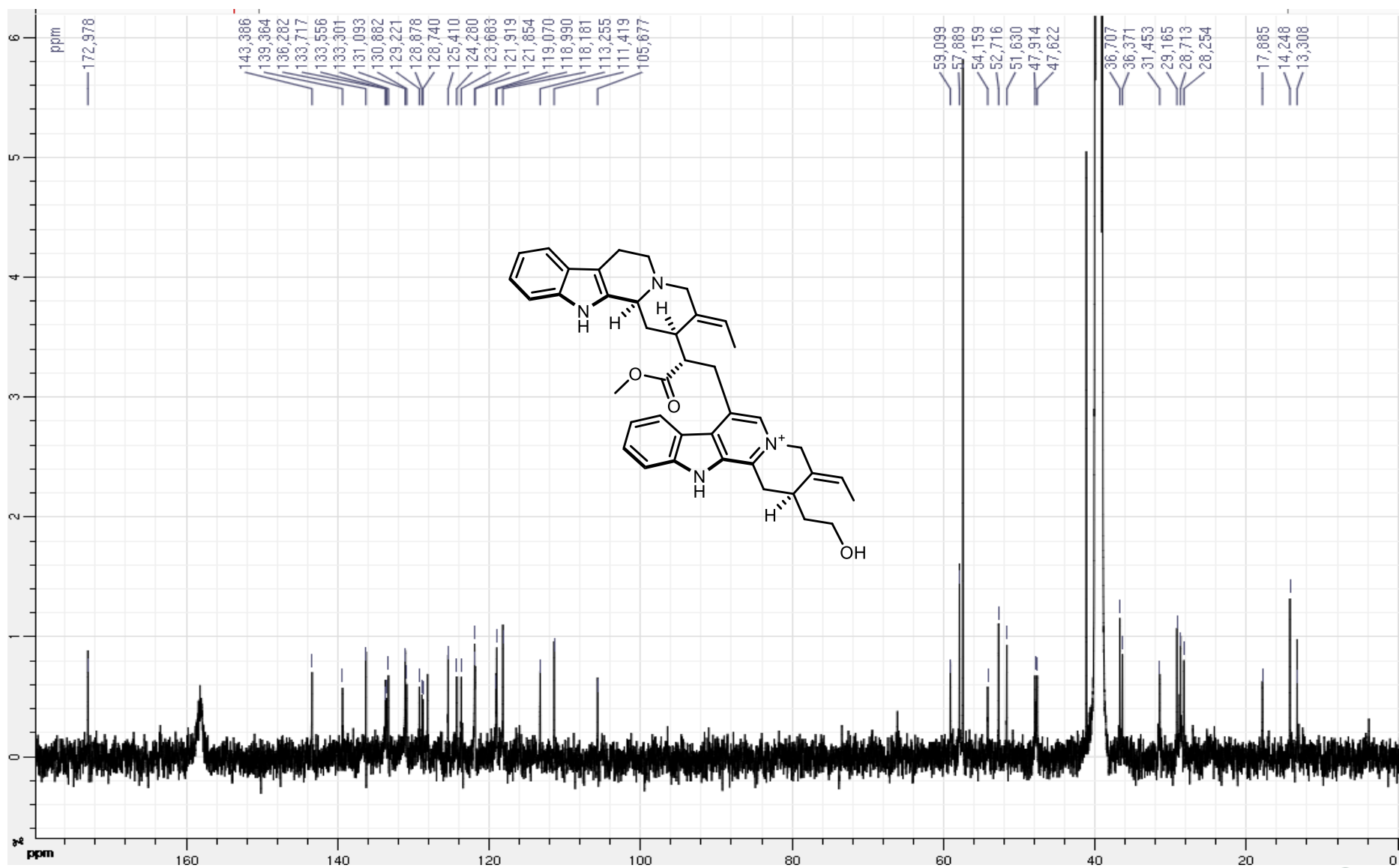
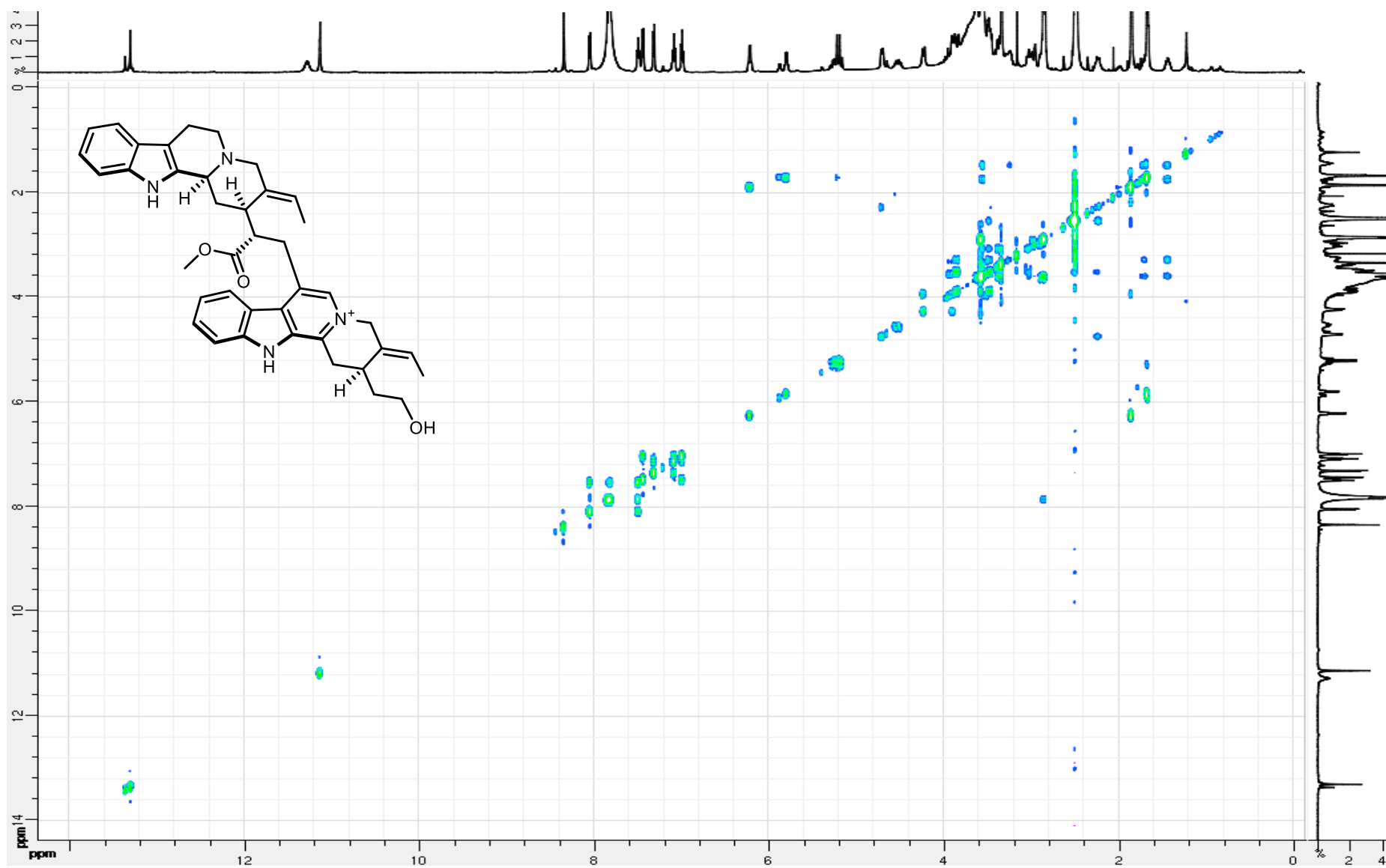
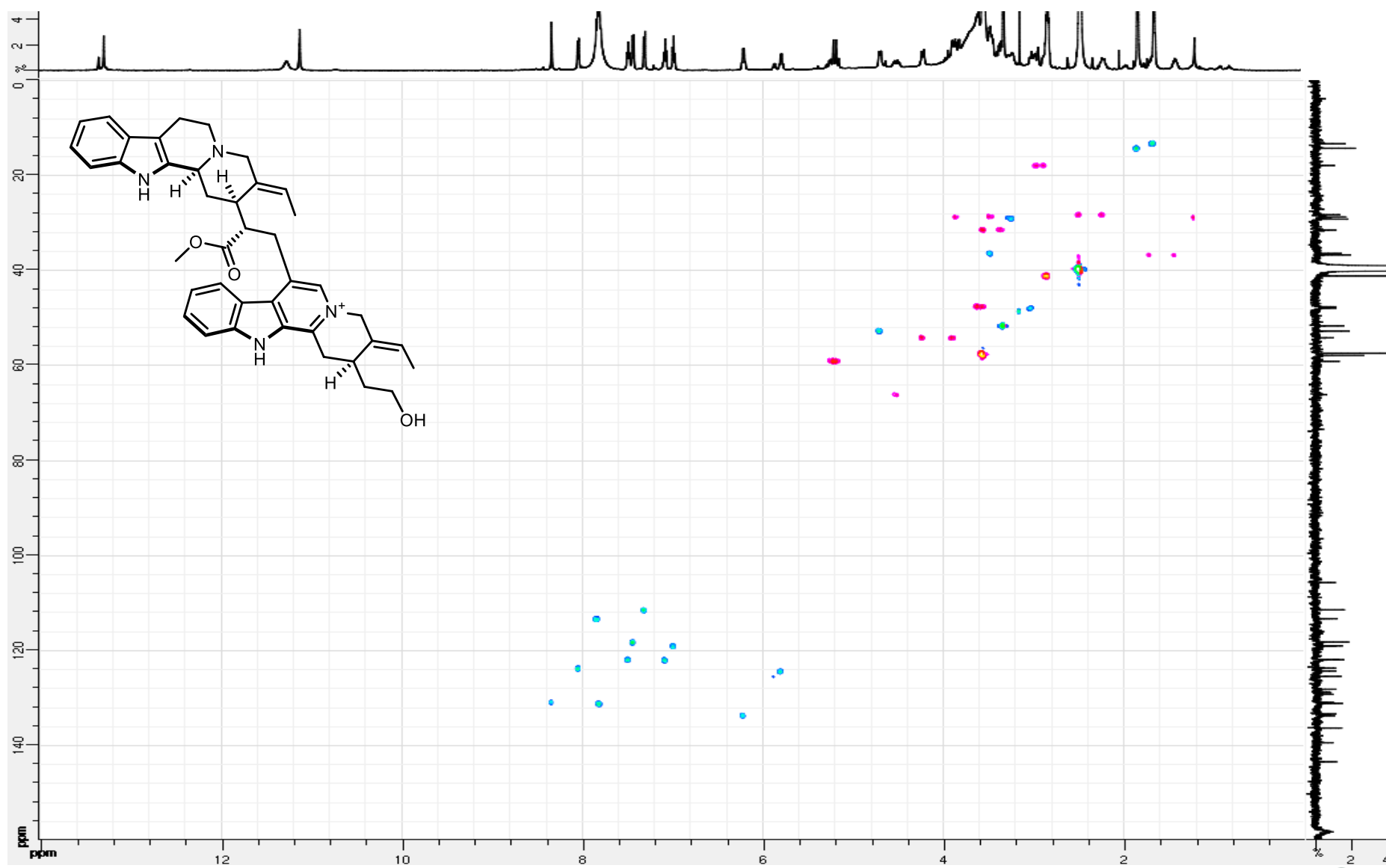
**Figure S15.** ROESY spectrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) of moandaensine B (**1**)

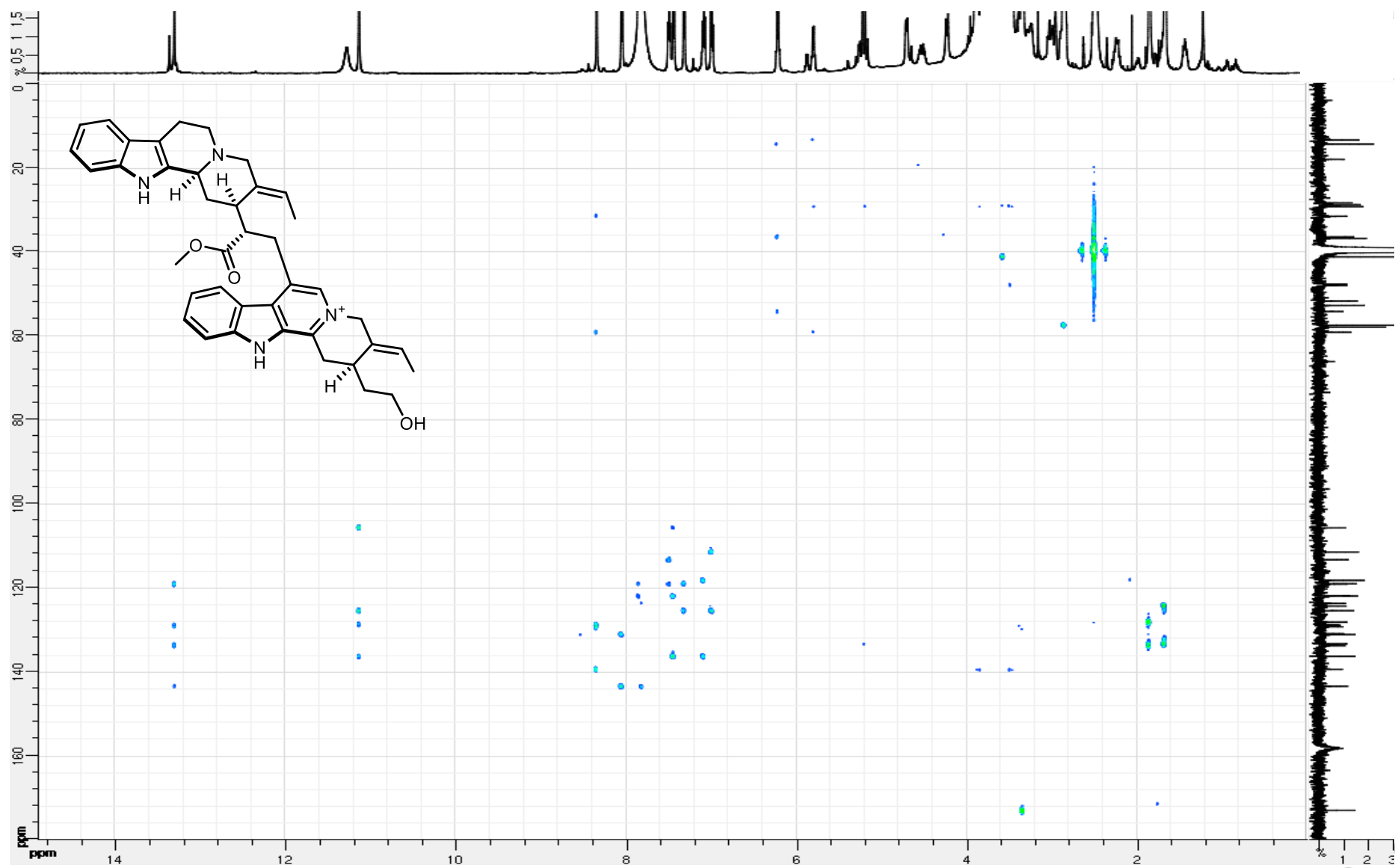


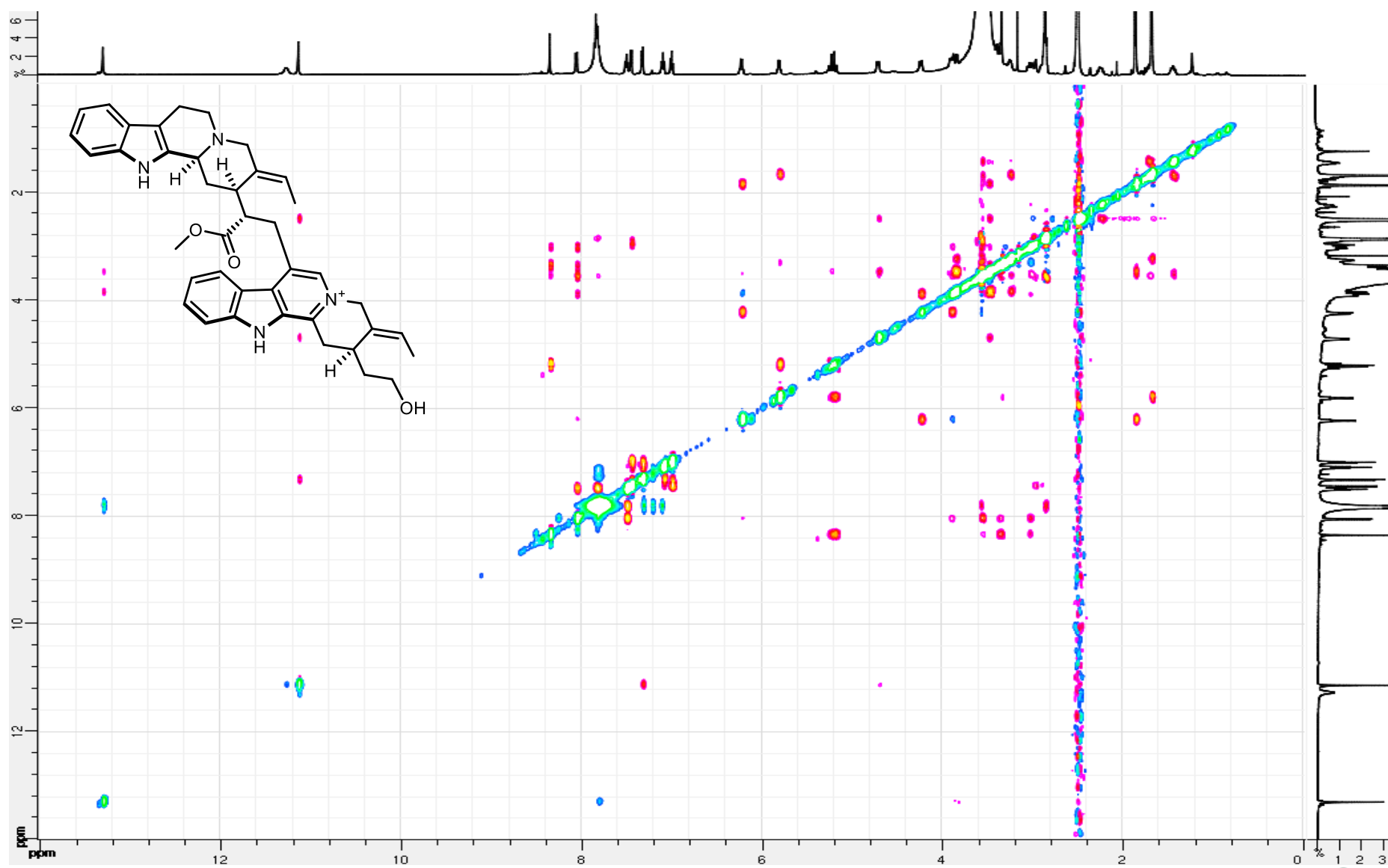
Figure S16.  $^1\text{H}$  NMR spectrum (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) of moandaensine C (**2**)

**Figure S17.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) of moandaensine C (2)

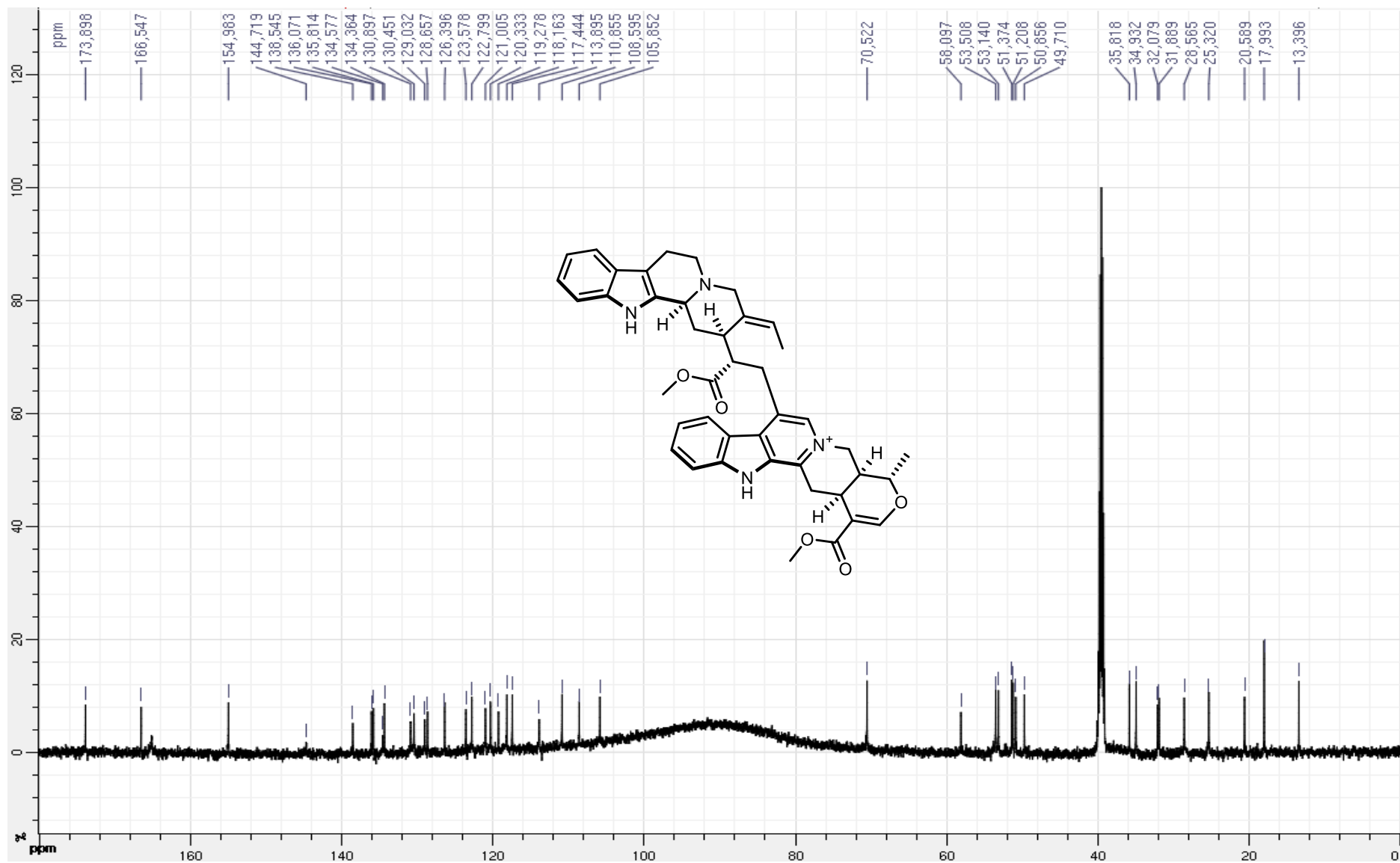
**Figure S18.** COSY spectrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) of moandaensine C (2)

**Figure S19.** HSQC spectrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) of moandaensine C (2)

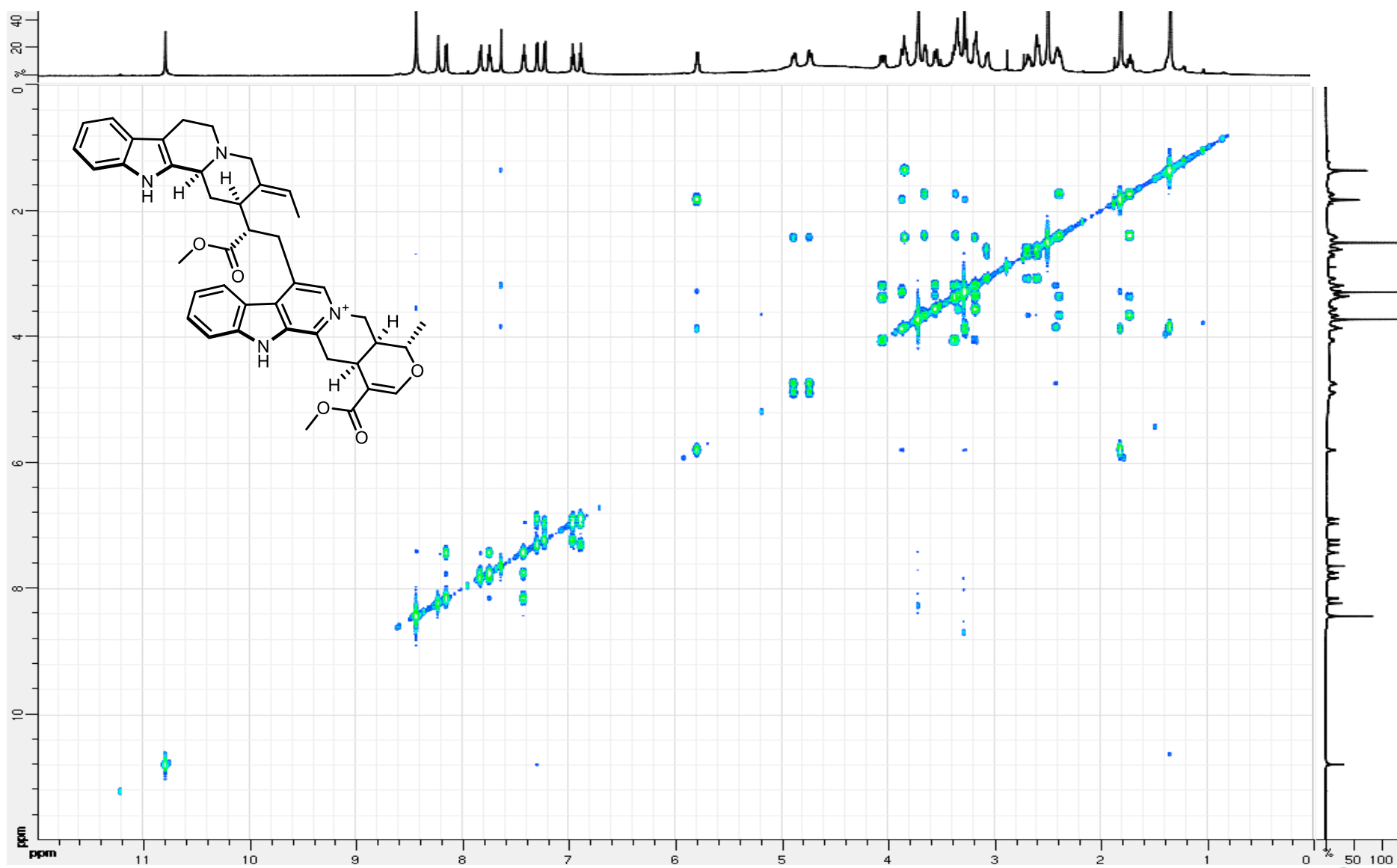
**Figure S20.** HMBC spectrum (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of moandaensine C (2)

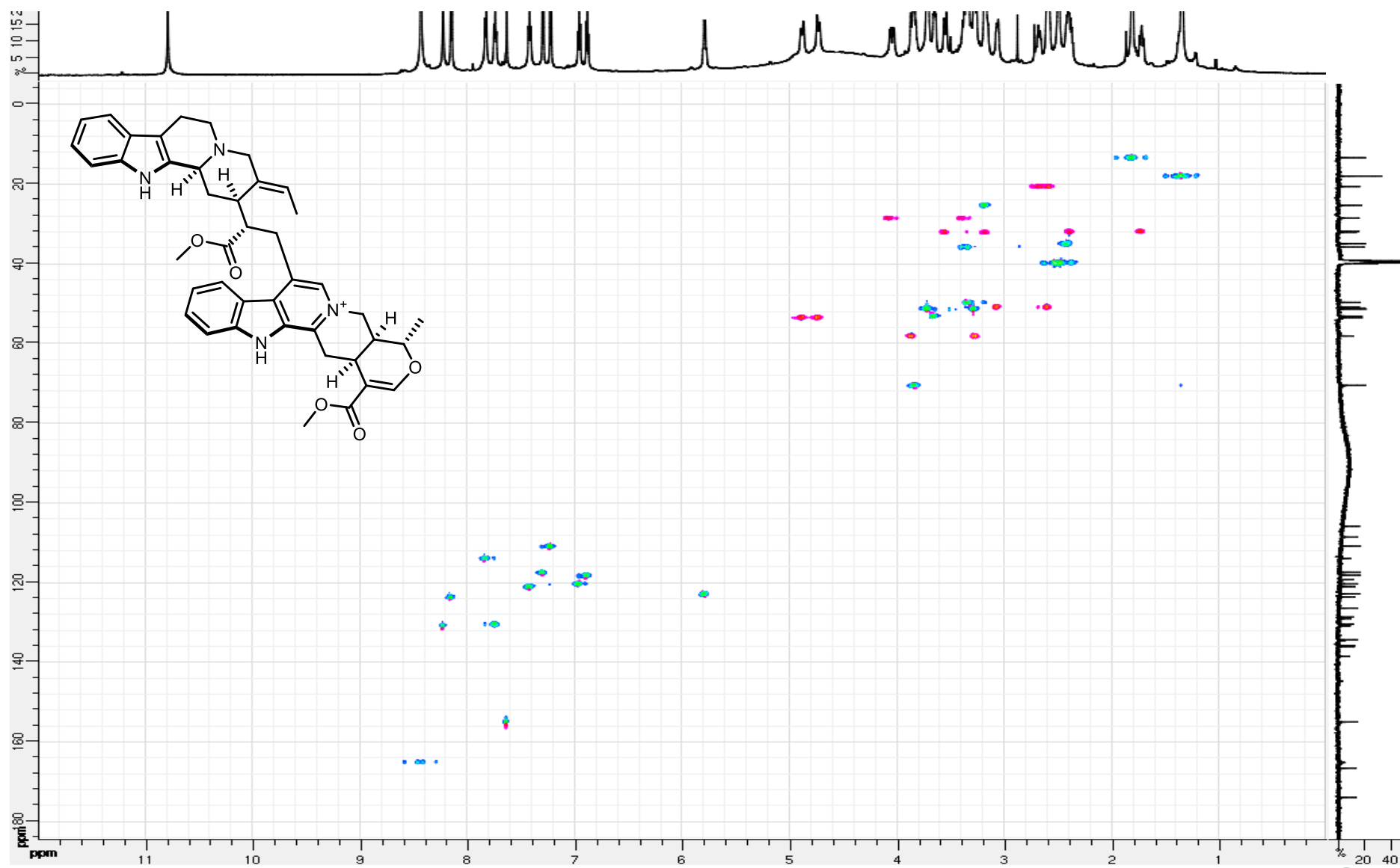
**Figure S21.** ROESY spectrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) of moandaensine C (**2**)

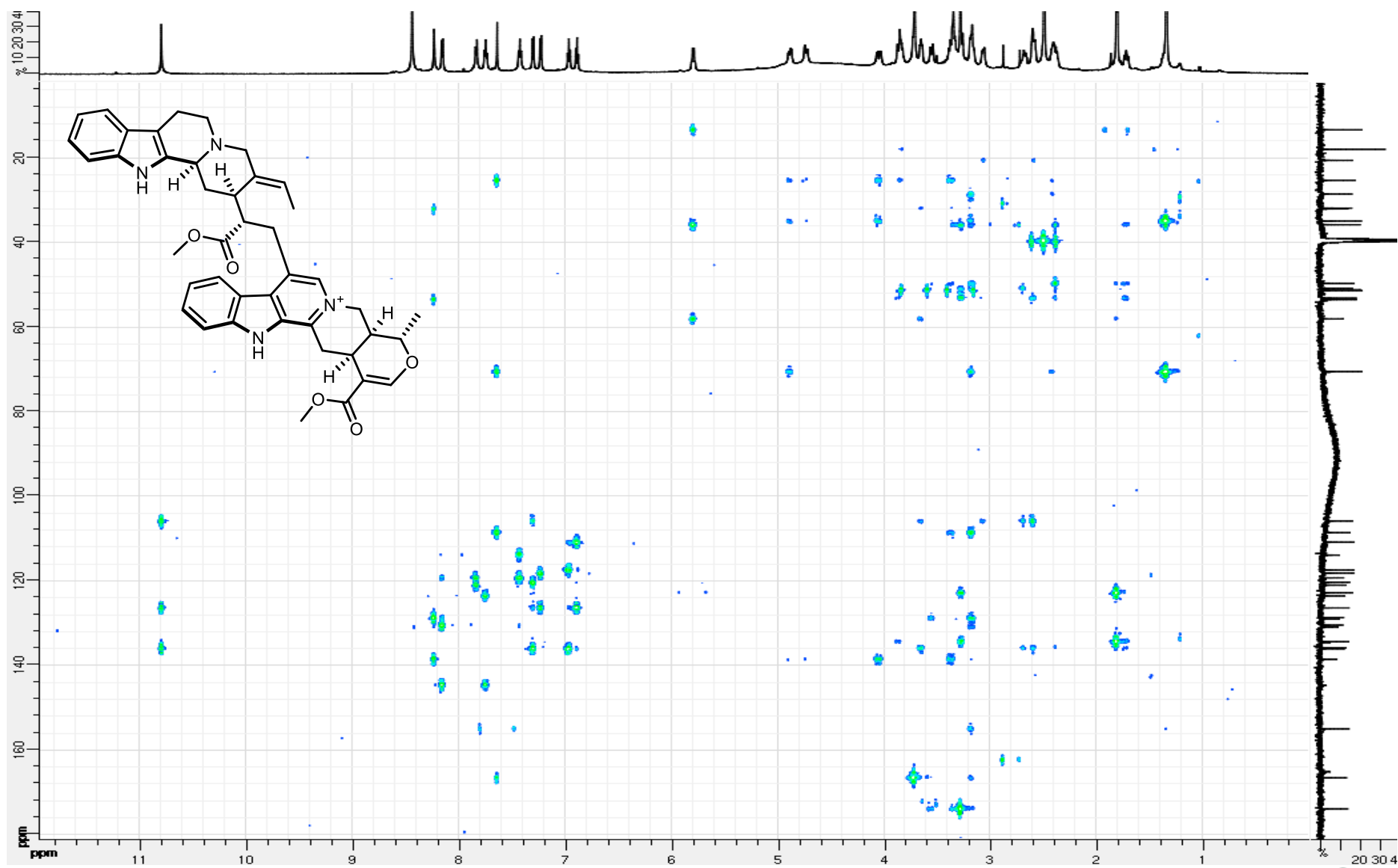


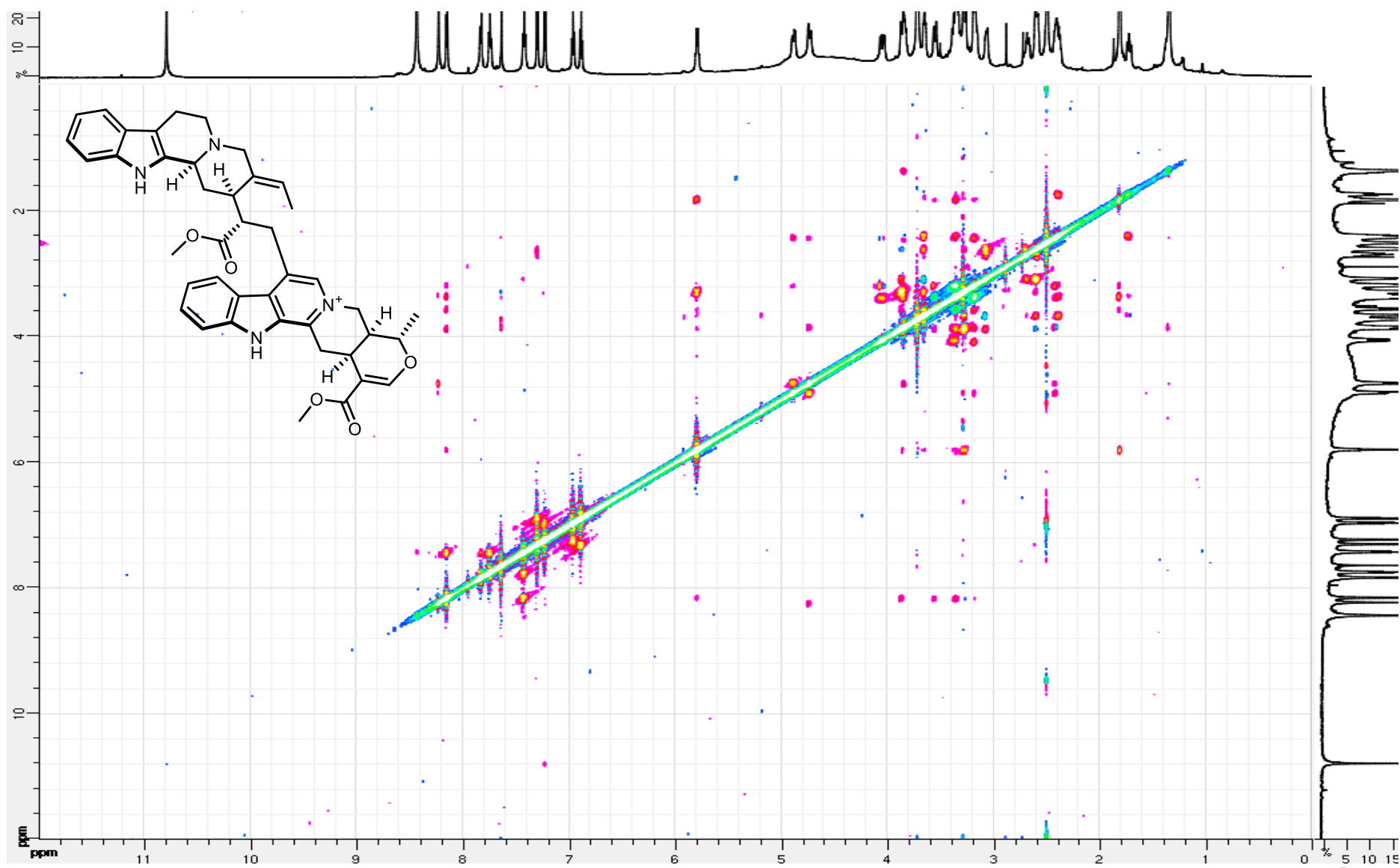
**Figure S23.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) of 20'-*epi*-serpentinine (**3**)



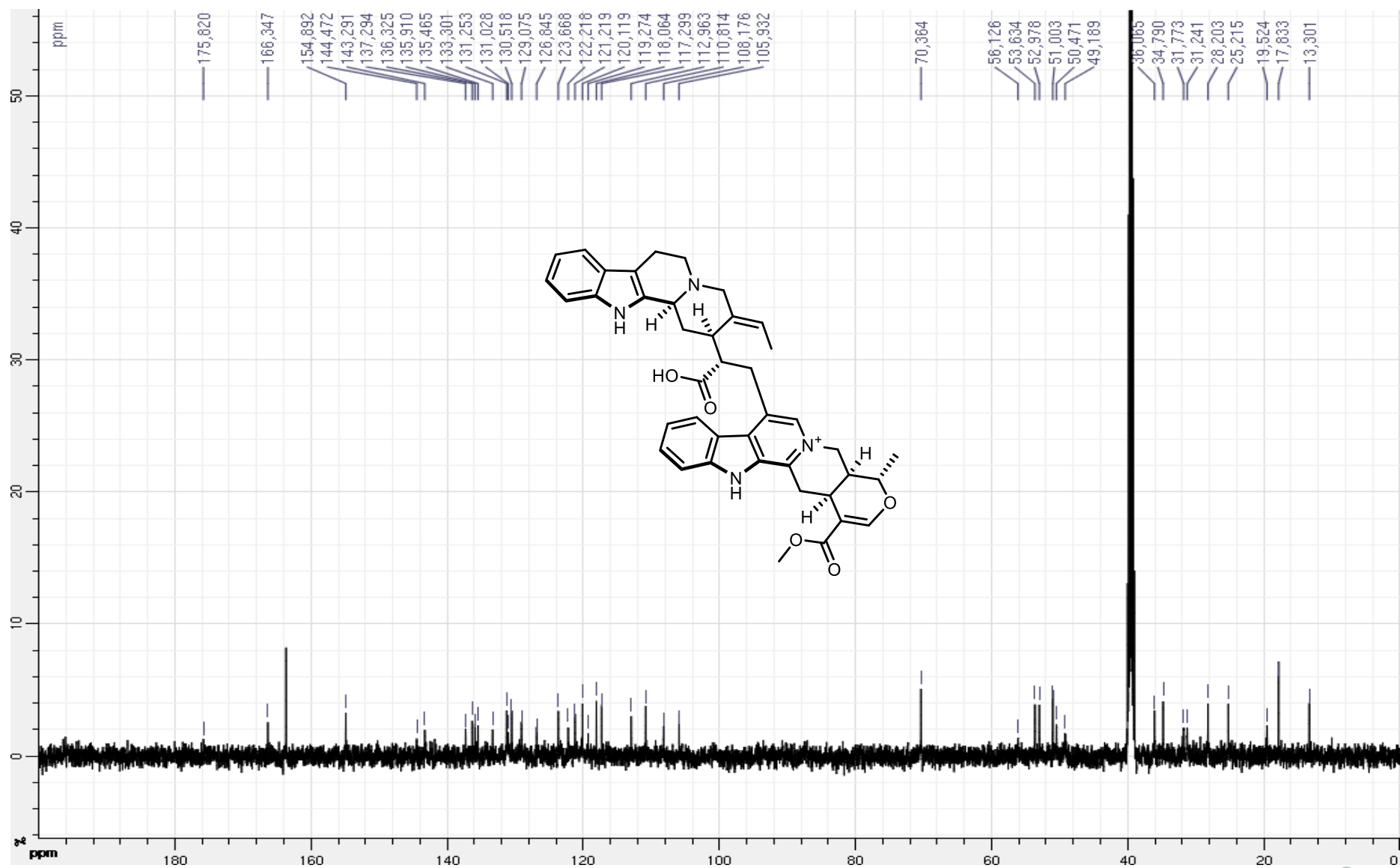
**Figure S24.** COSY spectrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 20'-*epi*-serpentinine (**3**)

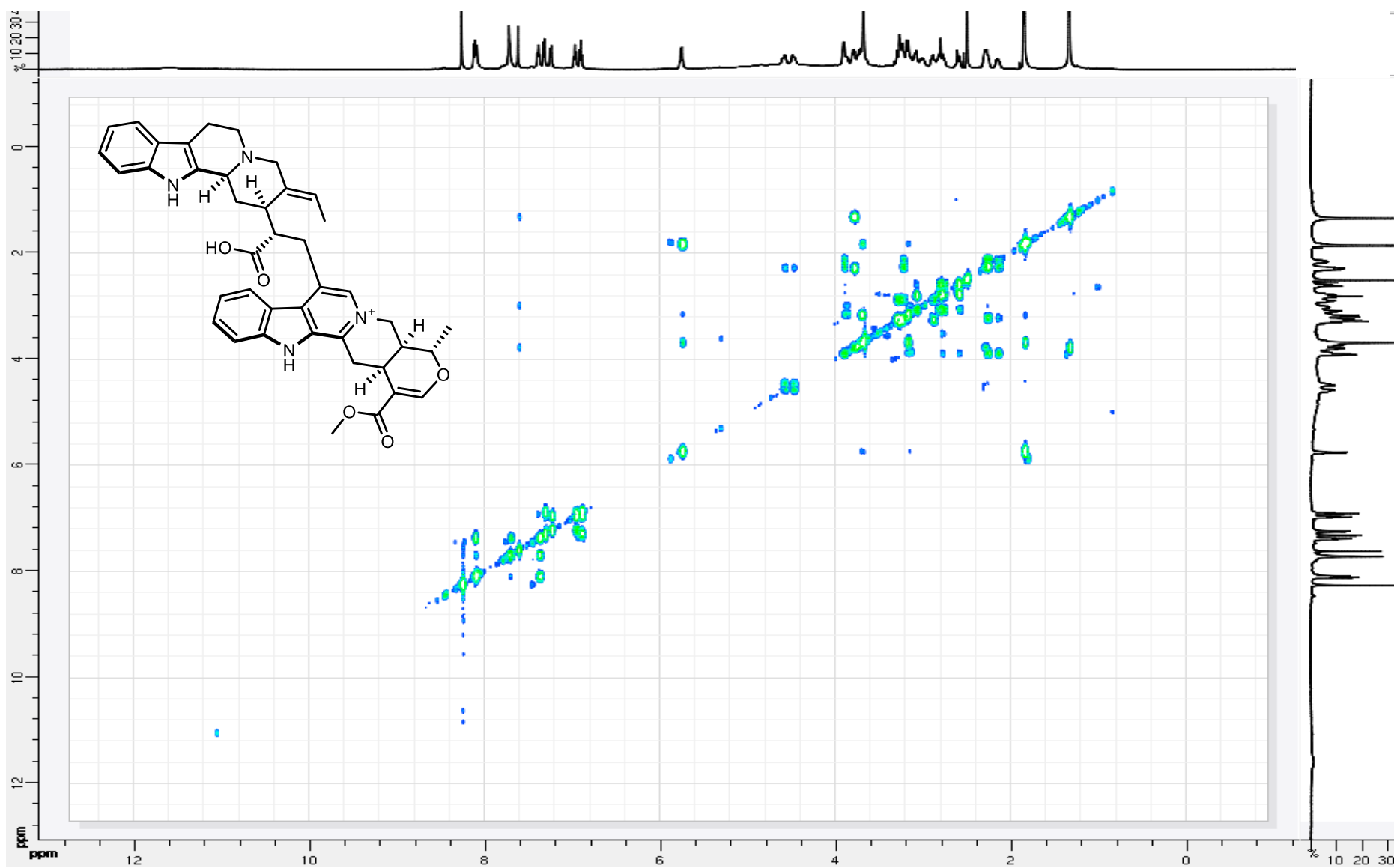
**Figure S25.** HSQC spectrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 20'-*epi*-serpentinine (**3**)

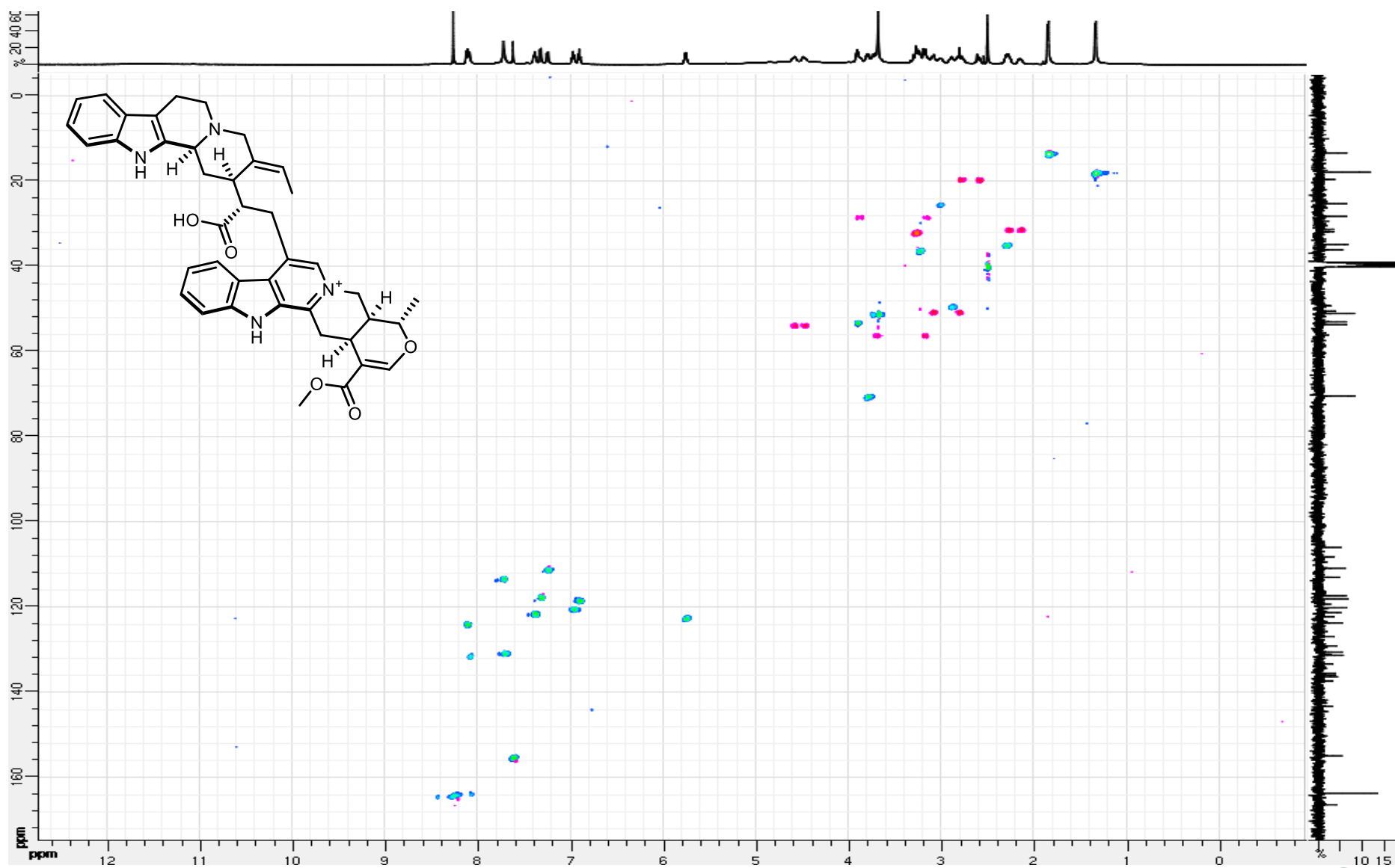
**Figure S26.** HMBC spectrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 20'-*epi*-serpentinine (**3**)

**Figure S27.** ROESY spectrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 20'-*epi*-serpentinine (**3**)

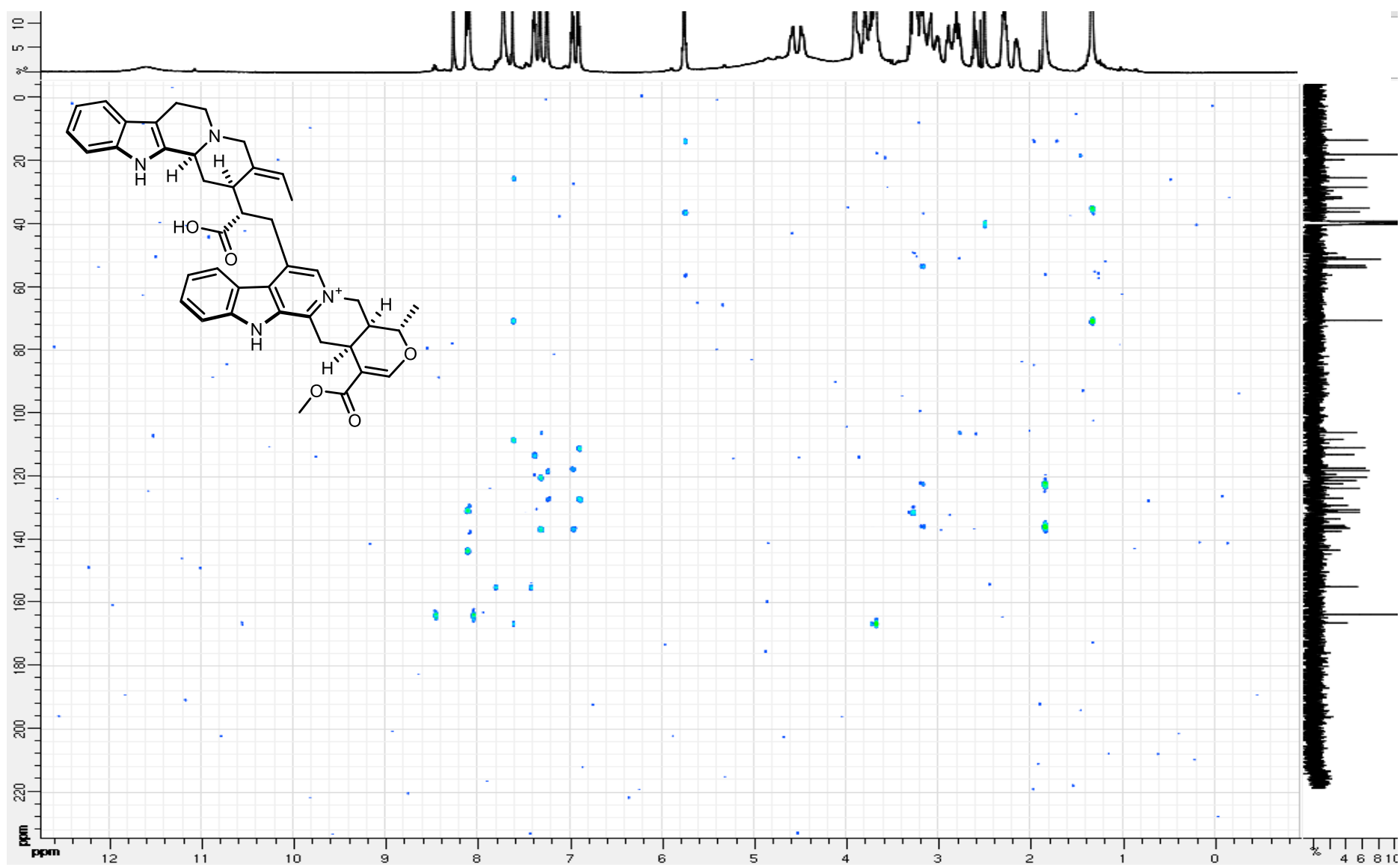


**Figure S29.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) of 16-demethoxy-20'-*epi*-serpentinine (**4**)

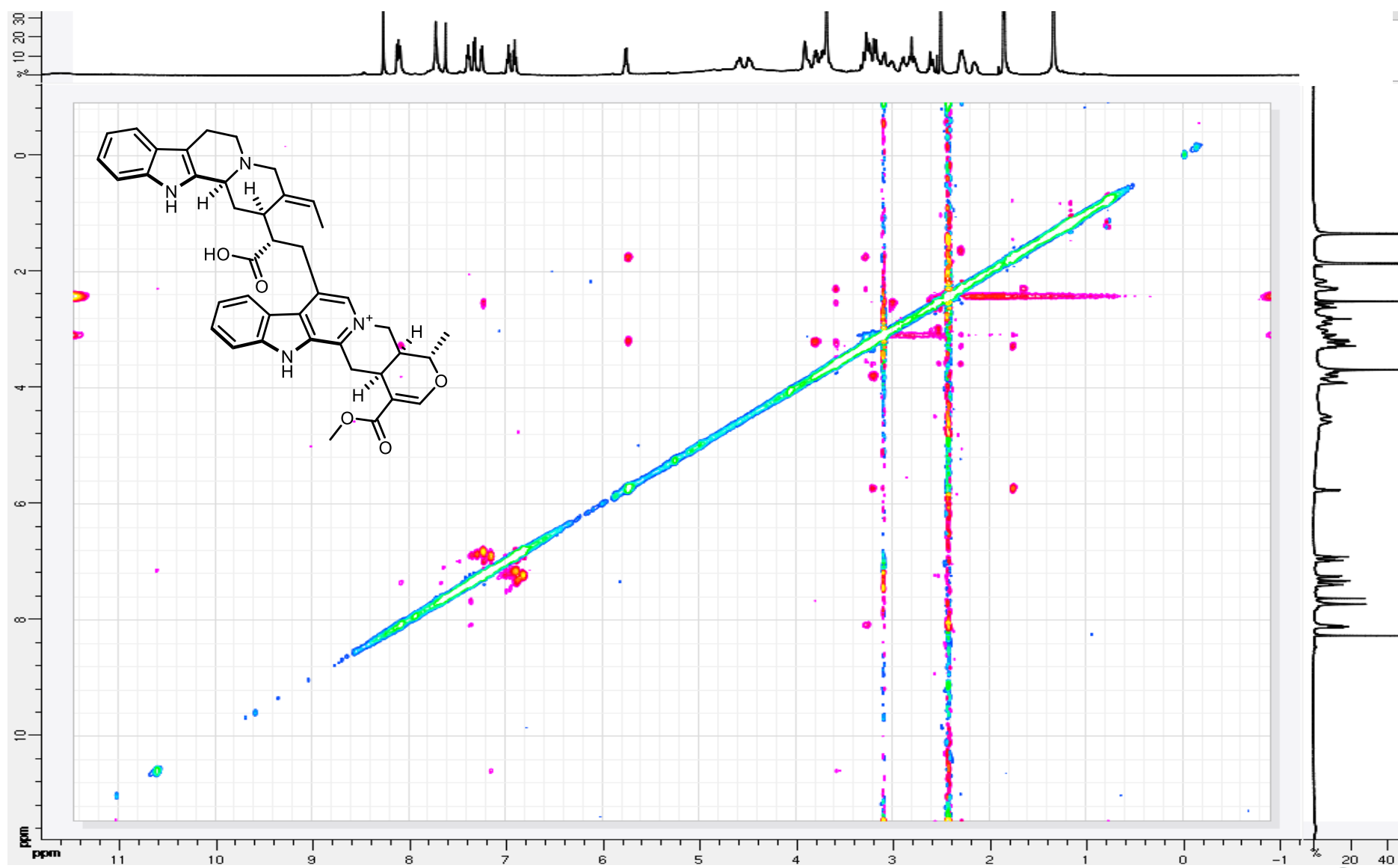
**Figure S30.** COSY spectrum (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of 16-demethoxy-20'-*epi*-serpentinine (**4**)

**Figure S31.** HSQC spectrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 16-demethoxy-20'-*epi*-serpentinine (**4**)

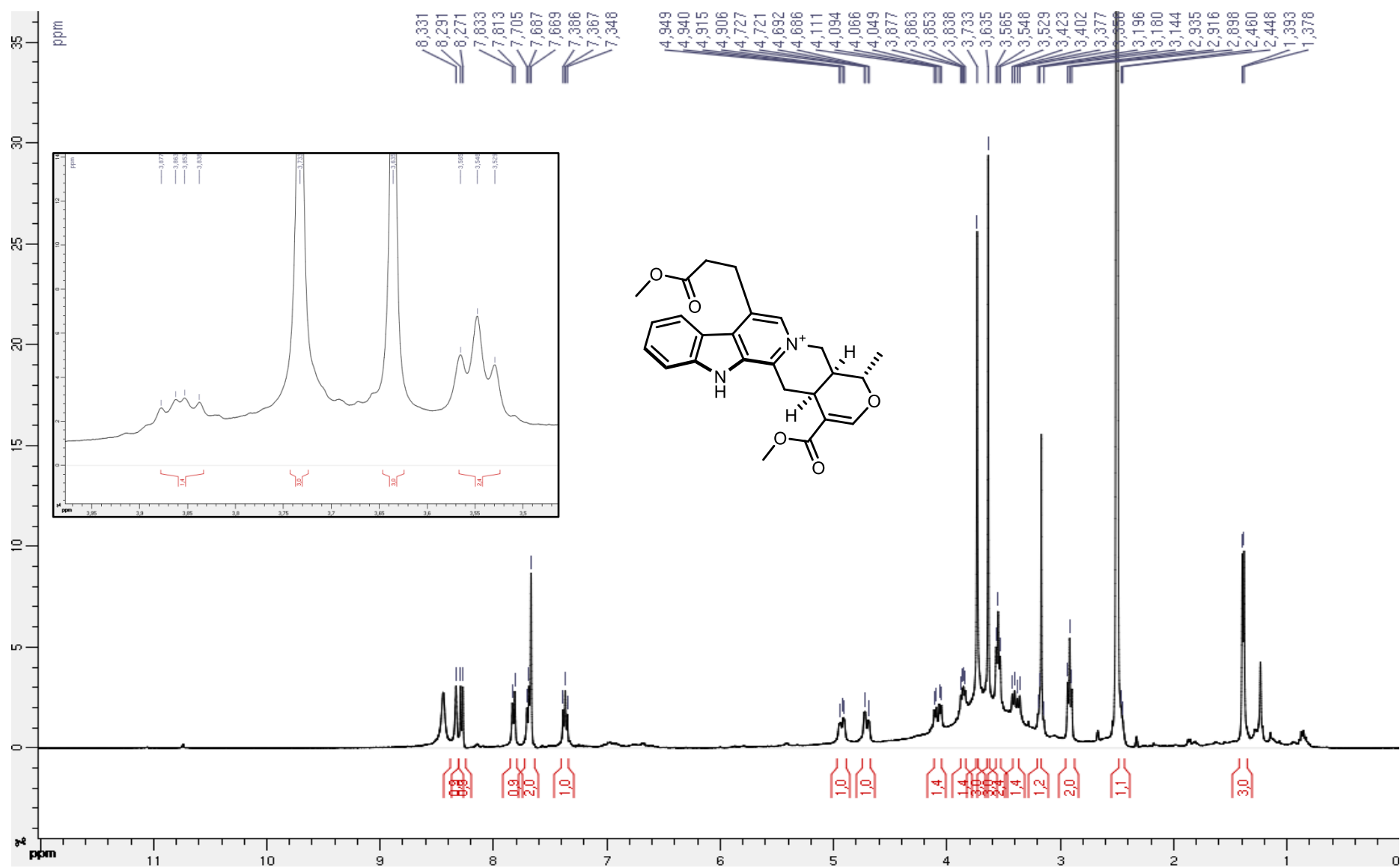


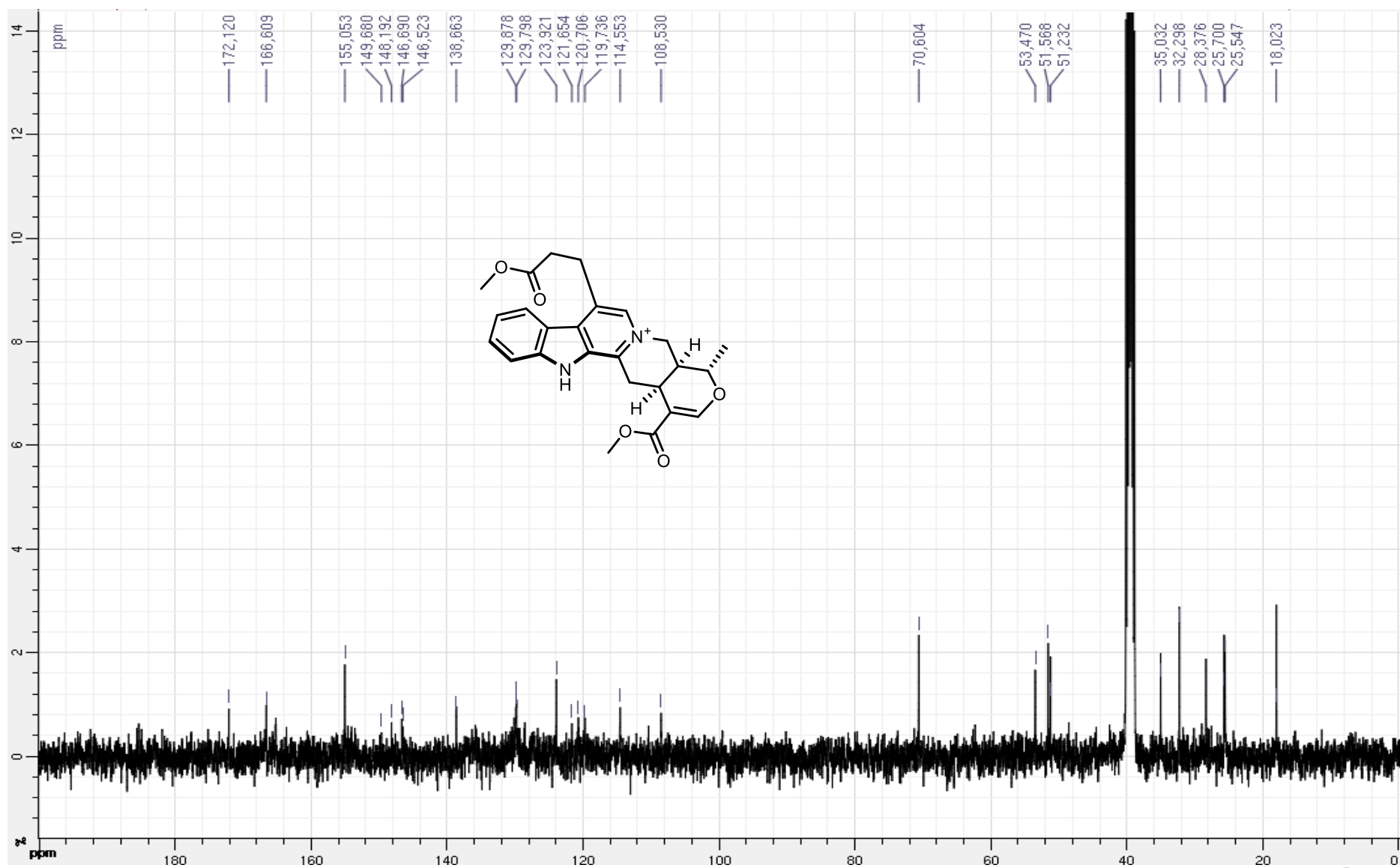
**Figure S32.** HMBC spectrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 16-demethoxy-20'-*epi*-serpentine (4)

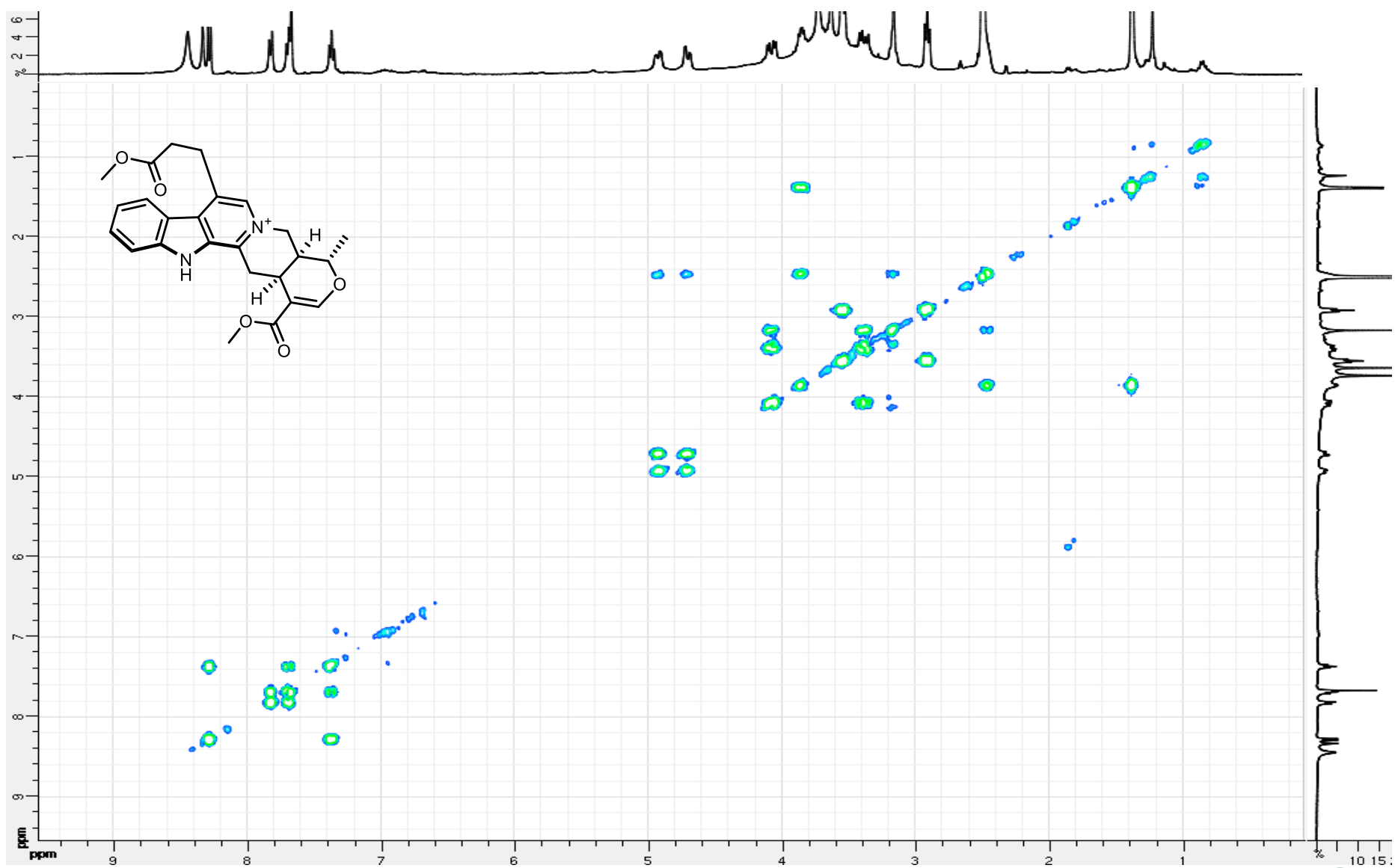
**Figure S33.** ROESY spectrum (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of 16-demethoxy-20'-*epi*-serpentinine (**4**)

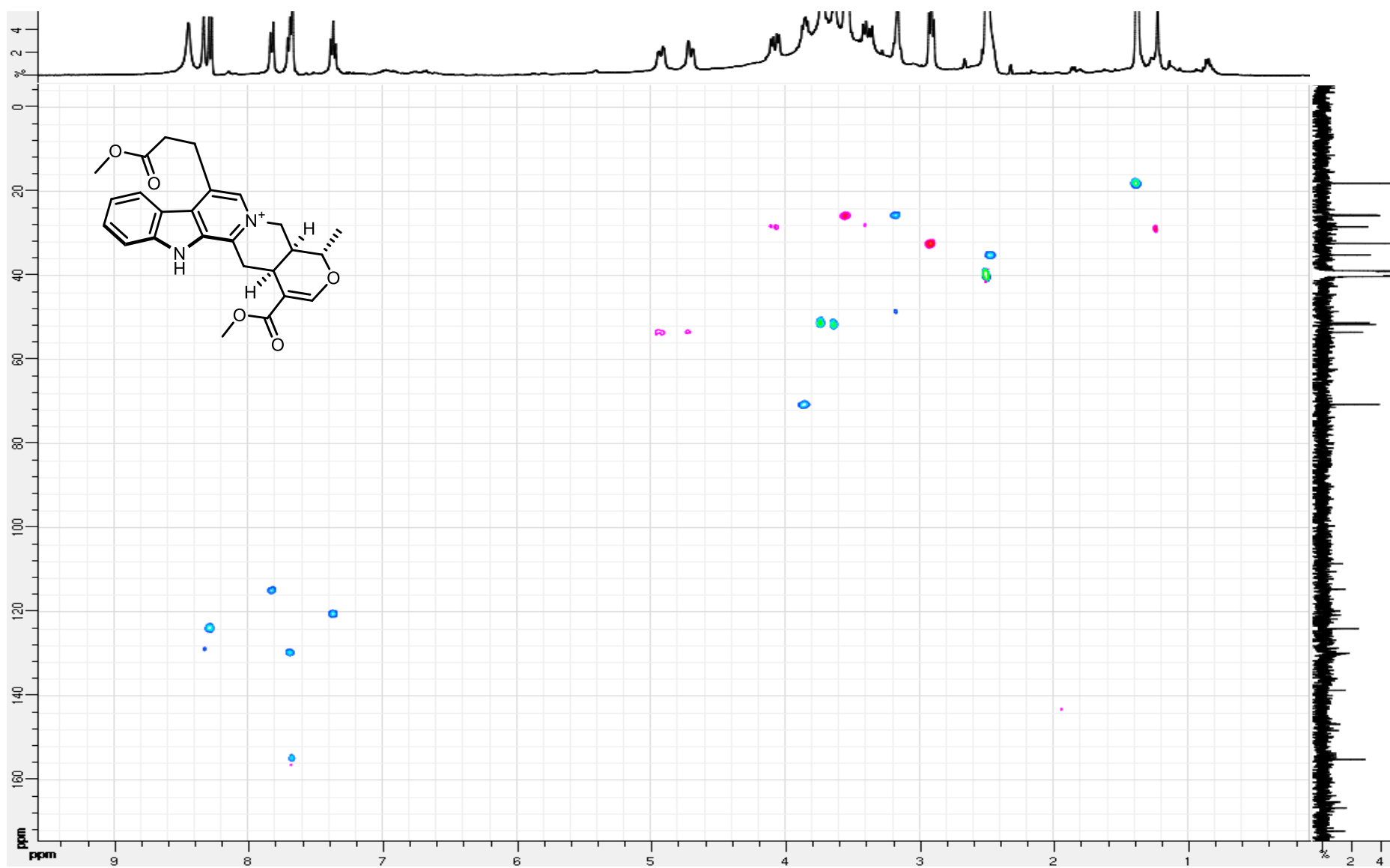


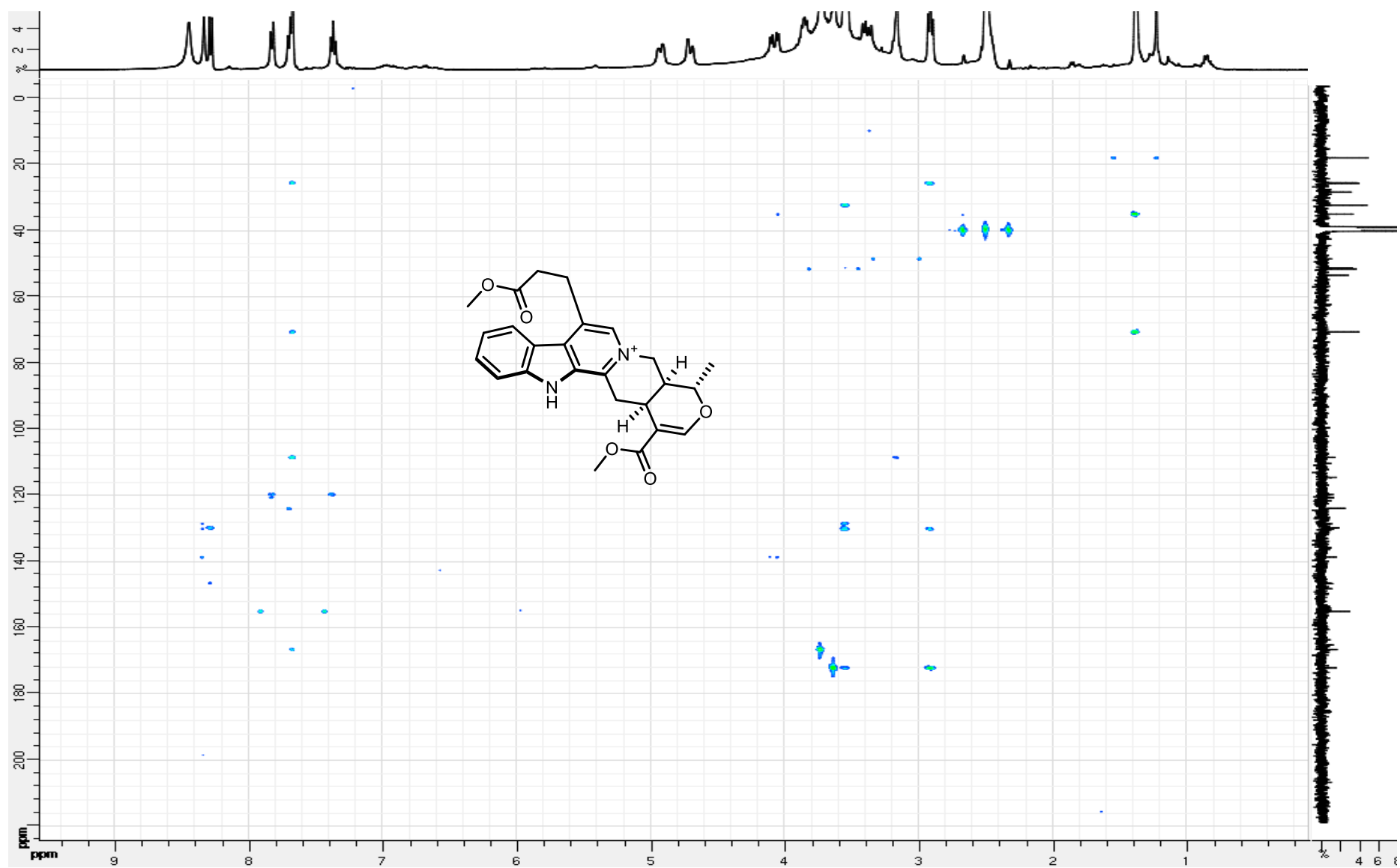
**Figure S34.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) of 6-methyl propionate alstonine (**5**)



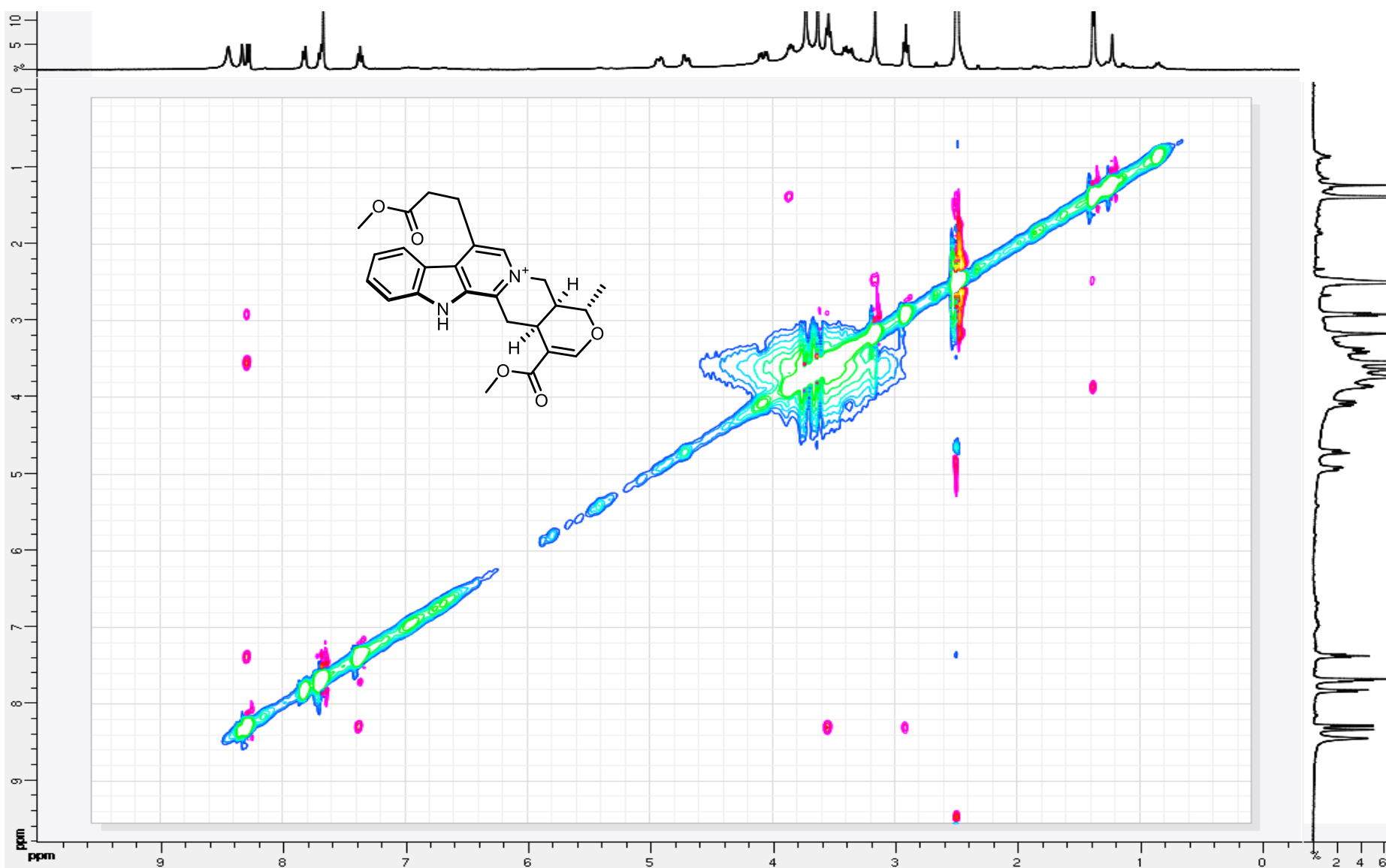
**Figure S35.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) of 6-methyl propionate alstonine (**5**)

**Figure S36.** COSY spectrum (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 6-methyl propionate alstonine (**5**)

**Figure S37.** HSQC spectrum (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) of 6-methyl propionate alstonine (**5**)

**Figure S38.** HMBC spectrum (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of 6-methyl propionate alstonine (**5**)

**Figure S39.** NOESY spectrum (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) of 6-methyl propionate alstonine (**5**)



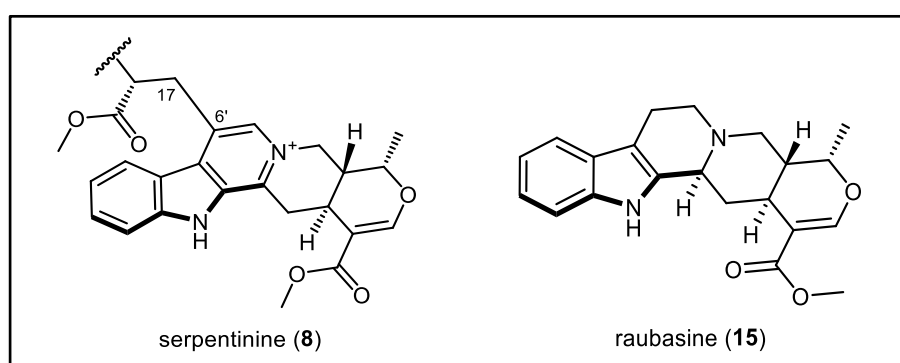


### 3) Vers l'hémisynthèse biomimétique de la serpentinite

#### a. Contexte et hypothèse de biosynthèse

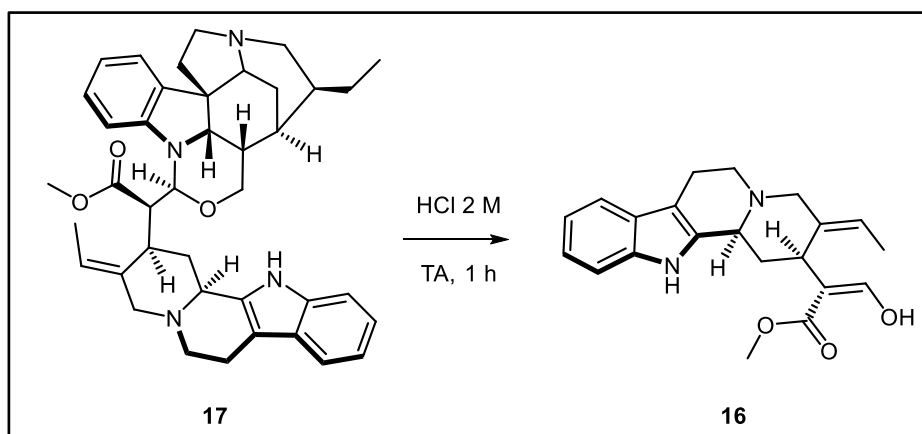
La voie de biosynthèse des alcaloïdes *bis*-indoliques de type serpentinite est à ce jour inconnue, notamment en ce qui concerne la formation de la **liaison C<sub>17</sub>-C<sub>6</sub>**. Ainsi, en complément de nos travaux d'extraction, nous avons souhaité entreprendre une hémisynthèse biomimétique de l'un des membres de cette famille.

Ayant à notre disposition une importante quantité de **raubasine (15, Figure 12)** (source commerciale – Pierre Fabre), composé représentant le monomère « Sud » de la serpentinite elle-même, c'est naturellement sur ce dimère que s'est porté notre choix.



**Figure 12.** Structures du monomère Sud de la serpentinite (8) et de la raubasine (15)

De plus, il se trouve que le monomère « Nord » est commun à tous les composés de cette famille. Celui-ci provient vraisemblablement de la **geissoschizine (16)**, que l'on peut relativement aisément obtenir grâce à l'hydrolyse de la geissospermine (17) (voir **Figure 13**). Ce dimère peut, quant à lui, s'extraire à partir des écorces de *Geissospermum laeve*, une plante emblématique de la famille des Apocynaceae, que nous avons également eues à notre disposition.



**Figure 13.** Hydrolyse de la geissospermine (17) en geissoschizine (16)



### b. Stratégie d'accès à la serpentinine

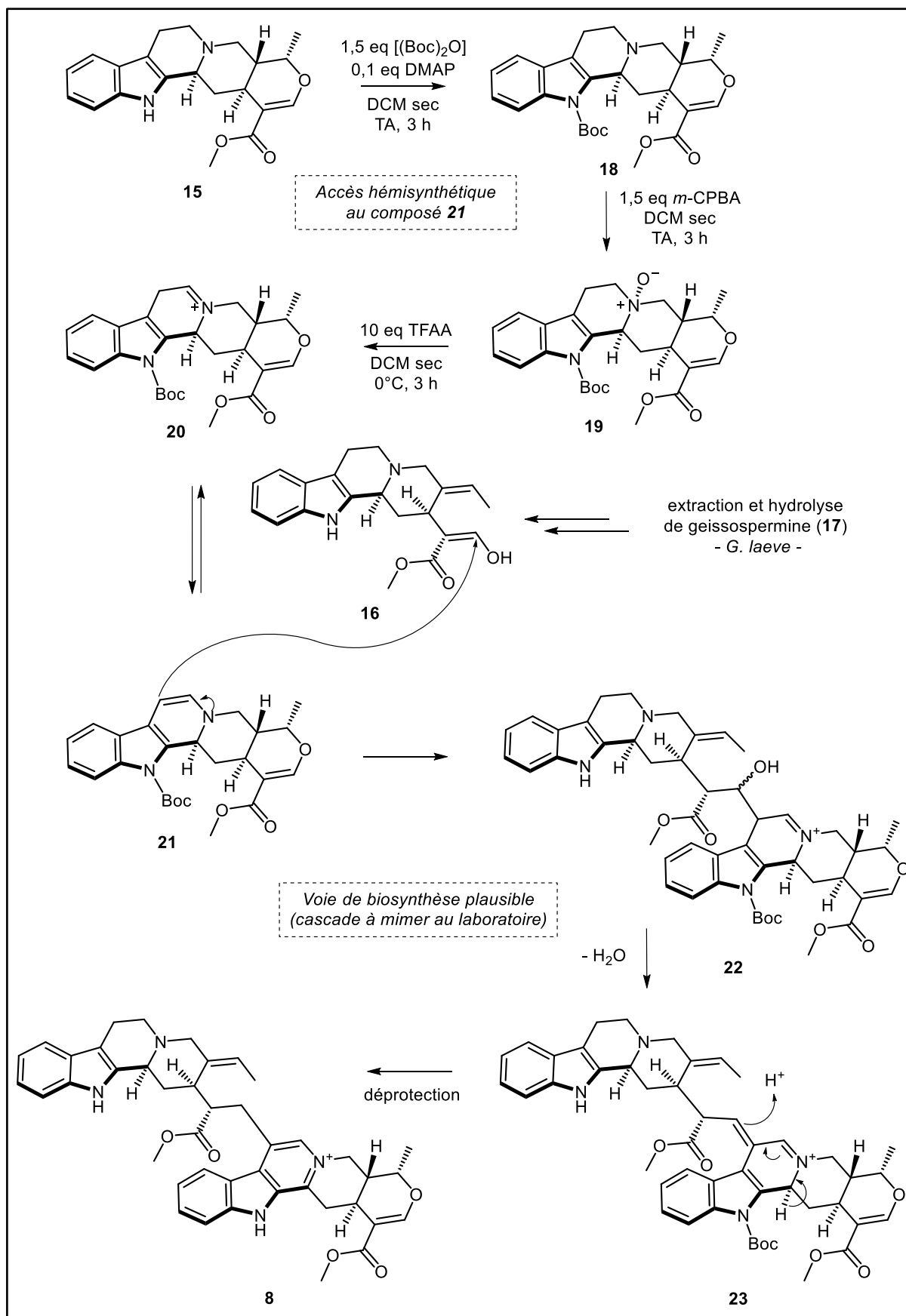


Figure 14. Stratégie d'accès à la serpentinine (**8**)



Comme indiqué dans la **Figure 14**, nous devons avant tout protéger l'azote indolique de la raubasine (**15**), puis procéder à une *N*-oxydation en position 4. Par la suite interviendrait une réaction de Polonovski-Potier, générant l'énamine nécessaire à la cascade réactionnelle avec la geissoschizine (**16**).<sup>51</sup> Cette dernière est quant à elle obtenue par hydrolyse de la geissospermine (**17**), isolée des écorces de *Geissospermum laeve* (le protocole étant décrit dans la section expérimentale suivante).

Enfin, une déshydratation ainsi qu'un réarrangement spontanés du dimère précédemment assemblé nous donneraient accès à la serpentinine (**8**), après élimination du groupement protecteur.

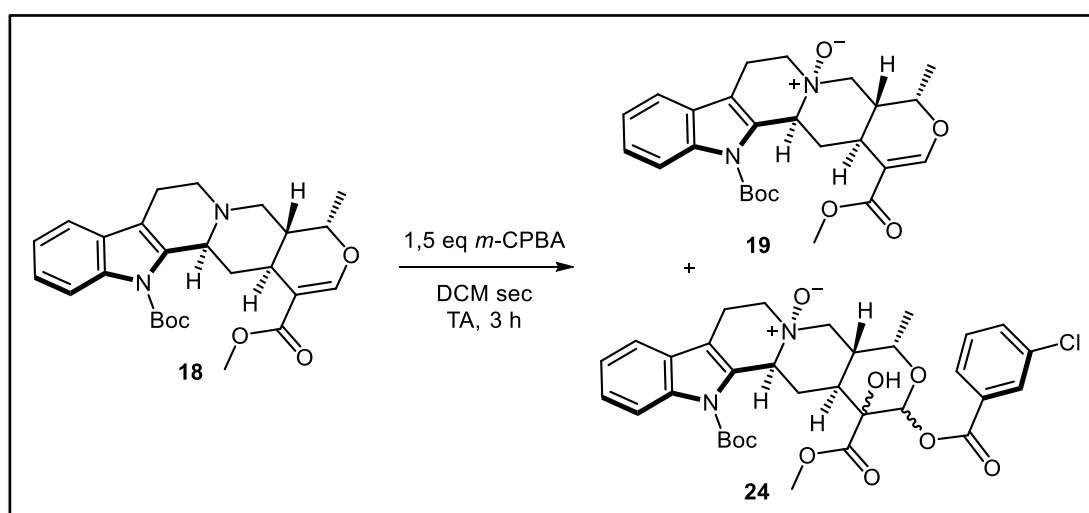
### c. Résultats obtenus

#### i. Obtention de la geissoschizine

Des 1,6 kg d'écorces de *G. laeve* à notre disposition, 18,1 g d'extrait alcaloïdique brut ont été obtenus. Après plusieurs étapes de fractionnement (décrites dans la partie expérimentale suivante), l'hydrolyse d'une fraction riche en geissospermine a fourni 50 mg de geissoschizine (**16**) pure.

#### ii. Vers l'hémisynthèse de la serpentinine

Tout d'abord, la transformation de **15** en **18** nous a permis d'obtenir notre raubasine protégée. Cependant, nous nous sommes ensuite heurtés à deux problèmes majeurs. Premièrement, lors de la *N*-oxydation du composé **18**, nous avons constaté un rendement particulièrement faible par rapport à la publication de référence.<sup>51</sup> De fait, après isolement et caractérisation complète par RMN 1D et 2D, nous avons découvert que l'entité **24** se formait en grande quantité (**Figure 15** et **Figure 16**).



**Figure 15.** Transformation du composé **18** en **19** et **24**

<sup>51</sup> Halonen, M.; Jokela, R.; Lounasmaa, M., Transformation of Na-Boc-tetrahydroalstonine to Na-Boc-5β-cyanotetrahydroalstonine, Na-Boc-21α-cyanotetrahydroalstonine, and Na-Boc-3,14-didehydrotetrahydroalstonine. *Heterocycles* **1995**, *41*, 353-362.



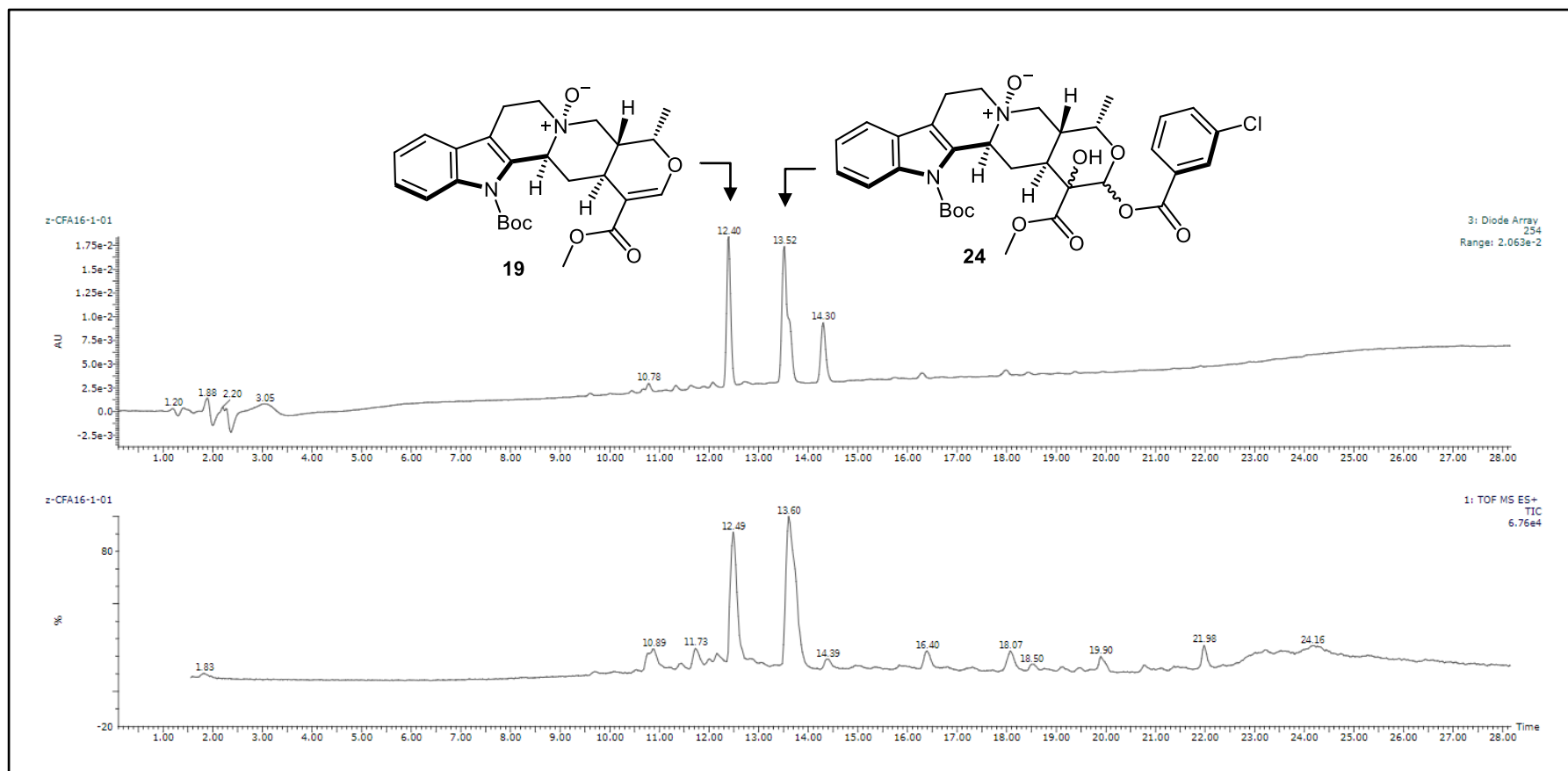


Figure 16. Chromatogrammes CLHP-UV et -MS obtenus

La  $N_1$ -Boc-raubasine (**18**) semble donc avoir été époxydée en  $\alpha$  de l'ester – époxyde ensuite ouvert par le sous-produit de la réaction, l'acide *meta*-chlorobenzoïque (**Figure 17**):

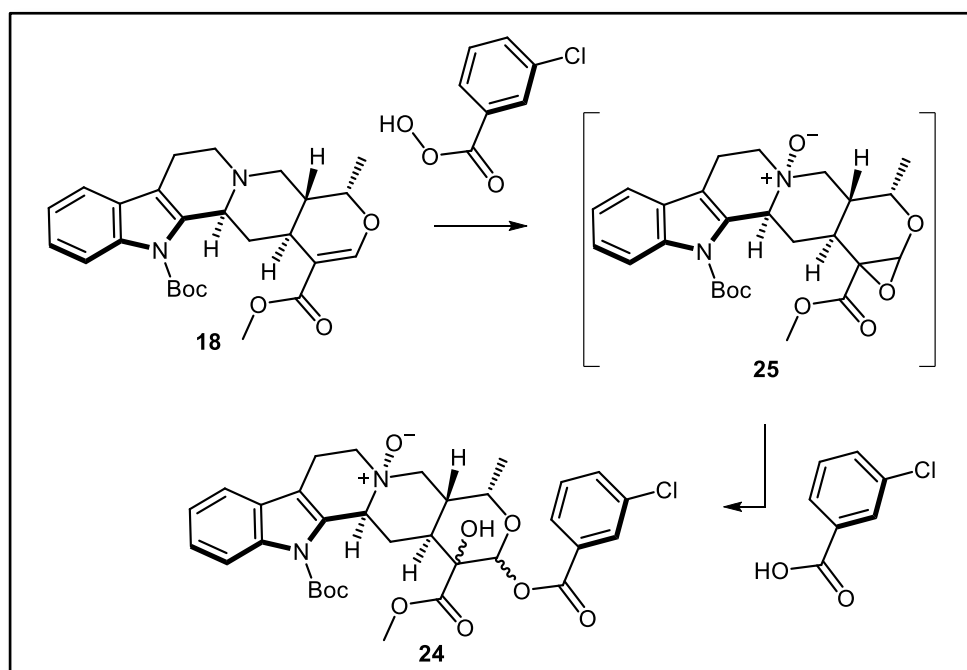


Figure 17. Formation du composé **24**

Le second problème est apparu à l'étape suivante : la  $N_1$ -Boc- $N_4$ -oxyde-raubasine (**19**) ne nous a pas donné accès aux composés **22**, **23** ou **8** dans les conditions décrites dans la partie b.

Cependant, selon le chromatogramme CLHP-UV-SM/SM obtenu (**Figure 18**), au moins un dimère, de  $m/z$  729,4010 et de formule brute  $C_{45}H_{53}N_4O_5$ , est formé. Celui-ci pourrait correspondre à un analogue de la serpentinite (**8**), mais, particulièrement minoritaire dans le mélange obtenu, la réaction devrait être réalisée sur plus grosse échelle afin d'en isoler ce composé et de pouvoir le caractériser.

Enfin, cette dernière étape a été réalisée en réaction « one pot », c'est-à-dire que le composé **19** a été déprotégé directement en présence de geissoschizine (**16**). Nous avons également envisagé la déprotection dans un premier temps, puis l'ajout de geissoschizine, avec ou sans piège au KCN. Ces deux voies restent donc également à explorer dans l'optique d'obtenir la serpentinite (**8**).



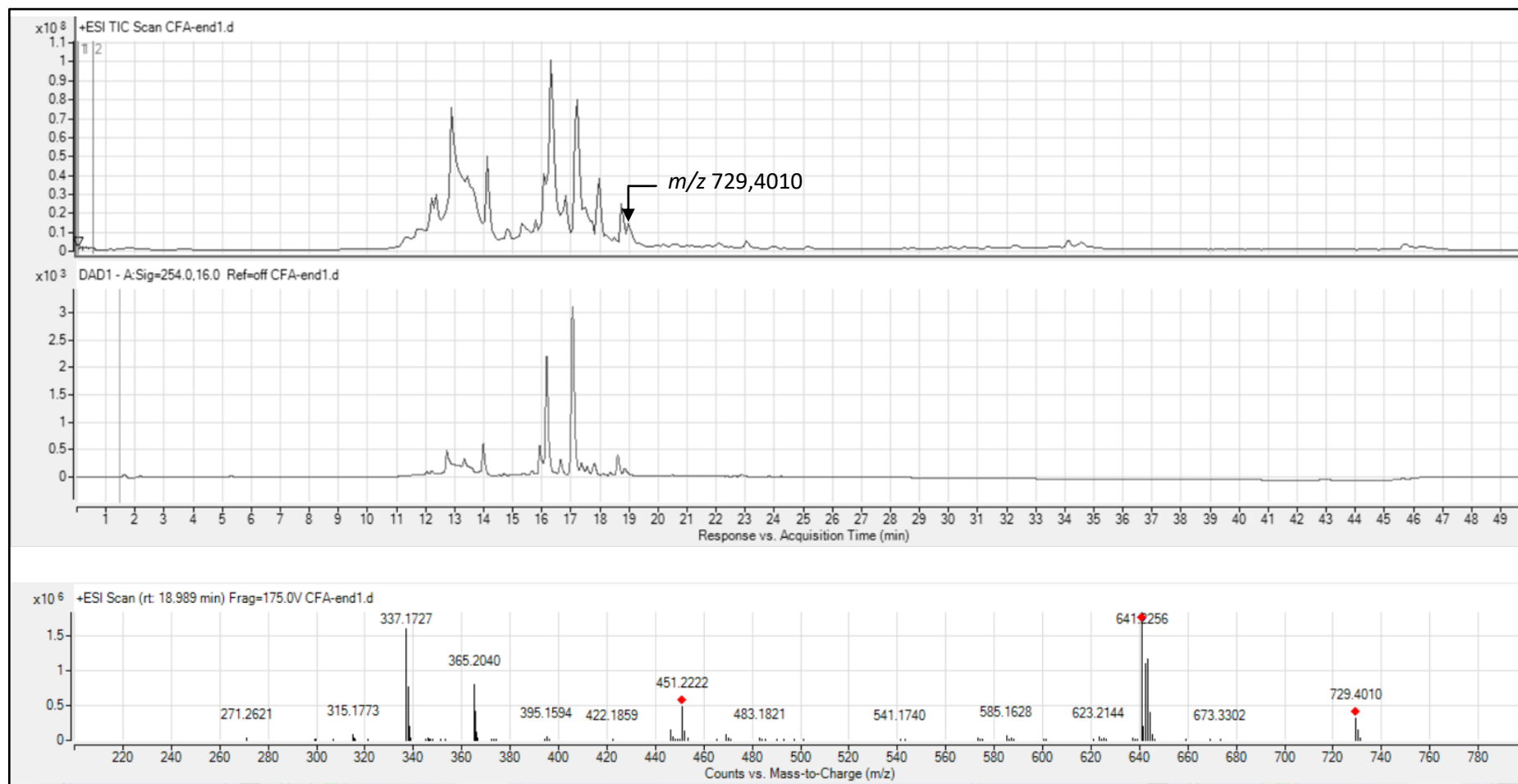


Figure 18. Chromatogrammes CLHP-SM et -UV obtenus, et spectre SM du dimère formé

#### 4) Conclusions du chapitre & critiques

Au cours de ces travaux, **cinq nouveaux alcaloïdes indolo-monoterpéniques**, dont quatre dimères, ont tout d'abord été isolés de *Picralima nitida*, une plante de la famille des **Apocynaceae**. Bien que déjà extrêmement étudiée depuis les années 1920, une approche **déréplicative** fondée sur la technique des **réseaux moléculaires**, et sur une base de données spectrales mise au point au laboratoire, la **MIADB**, s'est révélée particulièrement efficace pour la ré-exploration de la diversité chimique de cette plante.

La grande instabilité, ainsi que la relativement faible quantité de certains des composés isolés sont peut-être autant de raisons pour lesquelles ils n'ont pas été découverts lors des études précédentes de *P. nitida*. Par ailleurs, d'autres molécules *a priori* inconnues avaient également été ciblées, sans que l'on parvienne à les purifier, ce qui démontre que la plante recèle encore **d'autres curiosités à élucider**.

De plus, **l'activité biologique** des alcaloïdes isolés – tout comme celle de l'extrait éthanolique, de l'ordre du  $\mu\text{g/mL}$  – est **très modérée**, vis-à-vis de l'efficacité observée des nombreux remèdes traditionnels basés sur *P. nitida*. Une ré-exploration efficace des autres parties de la plante pourrait donc sans doute mener à des molécules plus actives.

La voie de biosynthèse des composés obtenus lors de cette étude n'étant pas décrite à l'heure actuelle, une tentative d'hémisynthèse d'un analogue, la **serpentinine (8)**, a été entreprise. L'extraction puis l'hydrolyse de la geissospermine (**17**) ont donc été réalisées à partir d'écorces de *Geissospermum laeve*, afin de fournir la geissoschizine (**16**) nécessaire à cette hémisynthèse.

Cependant, deux difficultés majeures ont été rencontrées lors de notre tentative : un faible rendement observé à la seconde étape, ainsi qu'une réactivité relativement inattendue entre la geissoschizine (**16**) et l'énamine **21**. Le dimère formé devrait donc être isolé et caractérisé, afin de déterminer sa structure et ainsi de comprendre le mécanisme de sa formation.

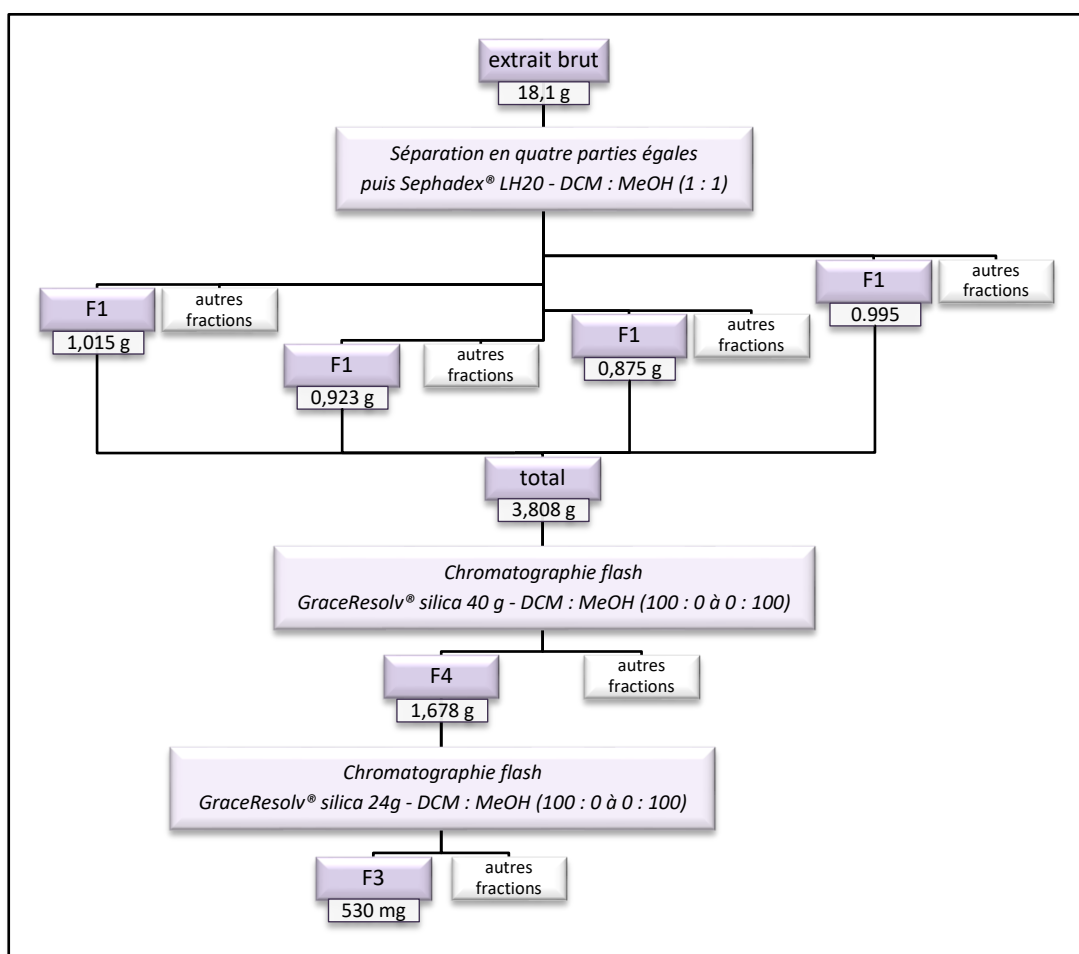


## 5) Partie expérimentale

### a. Extraction et hydrolyse de la geissospermine à partir de *G. laeve*

Les écorces de *G. laeve* (1,6 kg) ont été soumises à une extraction alcaloïdique classique : après avoir humecté la plante avec de l'ammoniaque (25 % – 1 L), nous avons réalisé une extraction solide-liquide par de l'acétate d'éthyle (3 fois 5 L). Par la suite, nous avons réalisé une contre-extraction liquide-liquide par de l'acide chlorhydrique (0,5 M – 1 L), et rapidement récupéré nos alcaloïdes dans l'acétate d'éthyle (après une nouvelle basification à l'ammoniaque (25 % – 50 mL), la geissospermine étant particulièrement fragile en milieu acide. Après évaporation, nous avons alors obtenu notre extrait brut sec (18,1 g).

Cet extrait a été fractionné plusieurs fois : par colonne Sephadex® LH20 (séparation par exclusion stérique), puis par deux chromatographies flash sur silice successives, comme indiqué dans le schéma ci-dessous (**Figure 19**). Nous avons ainsi obtenu une fraction riche en geissospermine (530 mg) que nous pouvons alors hydrolyser.



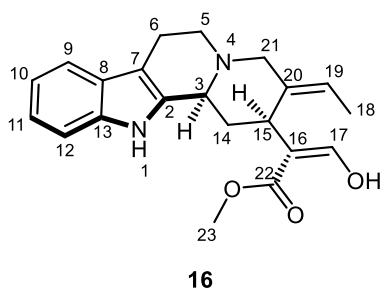
**Figure 19.** Schéma de fractionnement des écorces de *G. laeve*



Cette fraction a donc été imbibée d'HCl (2 M – 5 mL), puis laissée à température ambiante pendant 1 heure. Lorsque la poudre en suspension se dissout, une extraction liquide-liquide après basification à l'ammoniaque (25 % – 10 mL) est réalisée. Une chromatographie sur gel de silice (DCM:MeOH 98:2) permet alors d'obtenir la geissoschizine pure.

**Geissoschizine (16)** : 50,2 mg (0,003%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) -  $\delta$  : 1,77 (H-18, dl, J = 6,9 Hz, 1H) ; 2,06 (H-14 $\alpha$ , ddd, J = 13,7 ; 11,6 ; 1,5 Hz, 1H) ; 2,60 (H-14 $\beta$ , m, 1H) ; 2,70 (H-5 $\alpha$ , m, 1H) ; 2,79 (H-6 $\alpha$ , dd, J = 15,6 ; 4,1 Hz, 1H) ; 3,02 (H-6 $\beta$ , m, 1H) ; 3,18 (H-21 $\alpha$ , m, 1H) ; 3,19 (H-5 $\beta$ , m, 1H) ; 3,69 (H-23, s, 3H) ; 3,82 (H-3, m, 1H) ; 3,93 (H-21 $\beta$ , dt, J = 13,4 ; 2,4 Hz, 1H) ; 4,44 (H-15, dl, J = 11,5 Hz, 1H) ; 5,38 (H-19, q, J = 6,9 Hz, 1H) ; 7,07 (H-10, td, J = 8,0 ; 1,1 Hz, 1H) ; 7,13 (H-11, td, J = 8,0 ; 1,1 Hz, 1H) ; 7,28 (H-12, d, J = 8,0 Hz, 1H) ; 7,44 (H-9, d, J = 8,0 Hz, 1H) ; 7,84 (H-17, s, 1H) ; 8,36 (H-1, sl, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) -  $\delta$  : 13,1 (C-18) ; 20,4 (C-6) ; 27,8 (C-15) ; 33,8 (C-14) ; 50,5 (C-5) ; 51,1 (C-23) ; 53,7 (C-3) ; 59,1 (C-21) ; 107,7 (C-7) ; 108,1 (C-16) ; 111,0 (C-12) ; 118,3 (C-9) ; 119,7 (C-10) ; 122,0 (C-19) ; 122,0 (C-11) ; 126,5 (C-8) ; 133,0 (C-2) ; 133,0 (C-20) ; 136,6 (C-13) ; 161,4 (C-17) ; 206,5 (C-22). MS-ESIHR : 353,1860 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).



**Geissoschizine (16)****C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>****M = 352,4340****Aspect : solide amorphe jaune****MS-ESIHR : 353,1860**

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 1,77 (H-18, dl, J = 6,9 Hz, 1H) ; 2,06 (H-14 $\alpha$ , ddd, J = 13,7 ; 11,6 ; 1,5 Hz, 1H) ; 2,60 (H-14 $\beta$ , m, 1H) ; 2,70 (H-5 $\alpha$ , m, 1H) ; 2,79 (H-6 $\alpha$ , dd, J = 15,6 ; 4,1 Hz, 1H) ; 3,02 (H-6 $\beta$ , m, 1H) ; 3,18 (H-21 $\alpha$ , m, 1H) ; 3,19 (H-5 $\beta$ , m, 1H) ; 3,69 (H-23, s, 3H) ; 3,82 (H-3, m, 1H) ; 3,93 (H-21 $\beta$ , dt, J = 13,4 ; 2,4 Hz, 1H) ; 4,44 (H-15, dl, J = 11,5 Hz, 1H) ; 5,38 (H-19, q, J = 6,9 Hz, 1H) ; 7,07 (H-10, td, J = 8,0 ; 1,1 Hz, 1H) ; 7,13 (H-11, td, J = 8,0 ; 1,1 Hz, 1H) ; 7,28 (H-12, d, J = 8,0 Hz, 1H) ; 7,44 (H-9, d, J = 8,0 Hz, 1H) ; 7,84 (H-17, s, 1H) ; 8,36 (H-1, sl, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 13,1 (C-18) ; 20,4 (C-6) ; 27,8 (C-15) ; 33,8 (C-14) ; 50,5 (C-5) ; 51,1 (C-23) ; 53,7 (C-3) ; 59,1 (C-21) ; 107,7 (C-7) ; 108,1 (C-16) ; 111,0 (C-12) ; 118,3 (C-9) ; 119,7 (C-10) ; 122,0 (C-19) ; 122,0 (C-11) ; 126,5 (C-8) ; 133,0 (C-2) ; 133,0 (C-20) ; 136,6 (C-13) ; 161,4 (C-17) ; 206,5 (C-22).



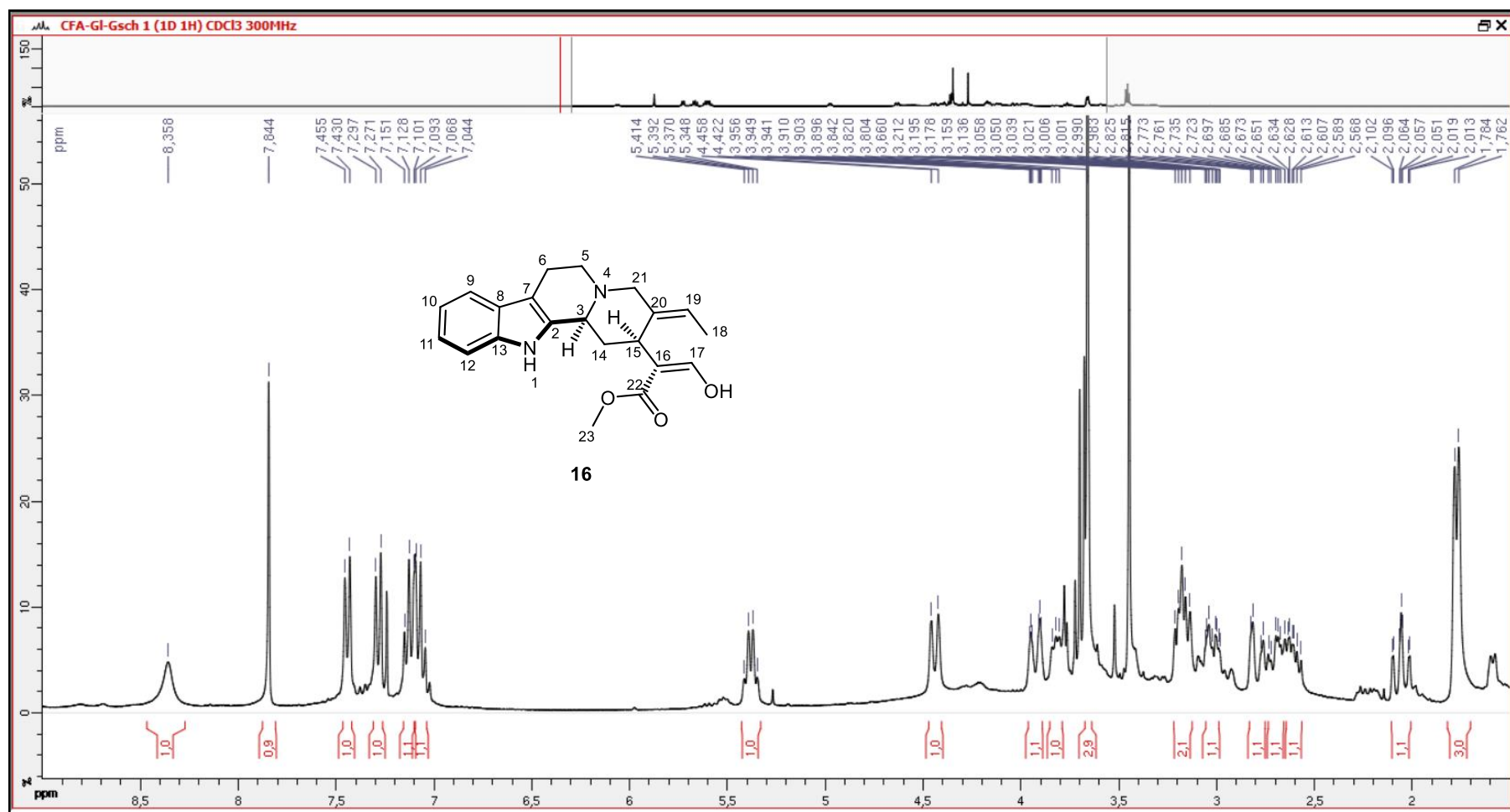


Figure 20. Spectre  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de la geissoschizine (16)

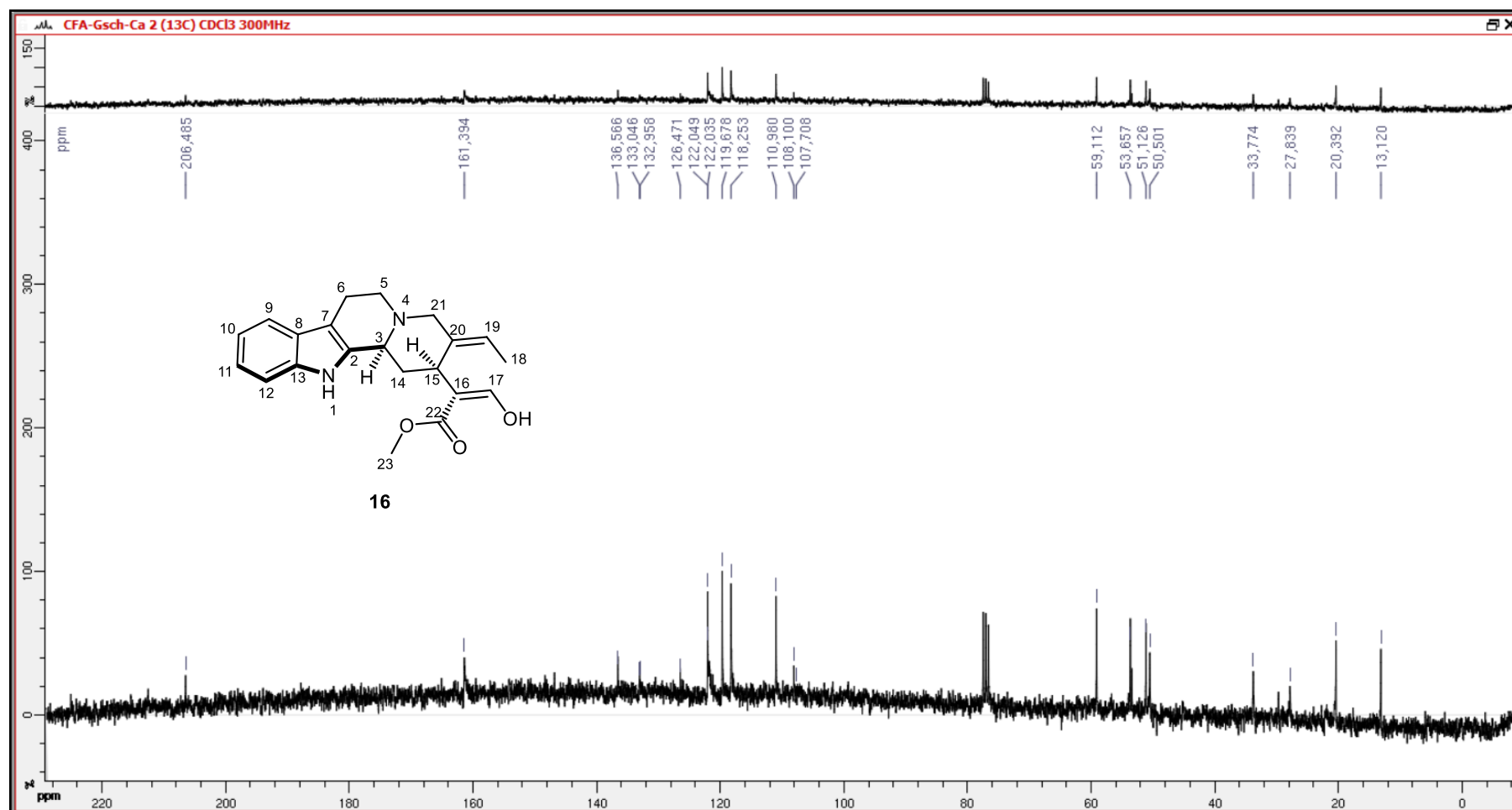
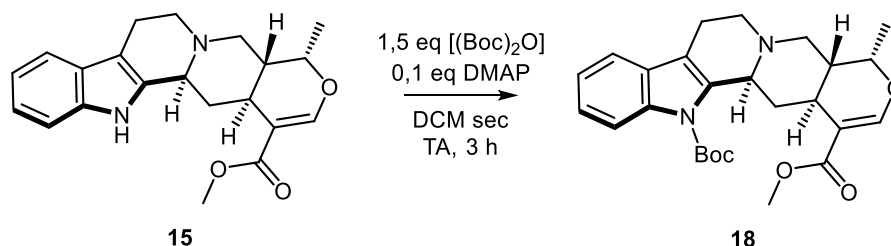


Figure 21. Spectre  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de la geissoschizine (16)

## b. Composés synthétisés

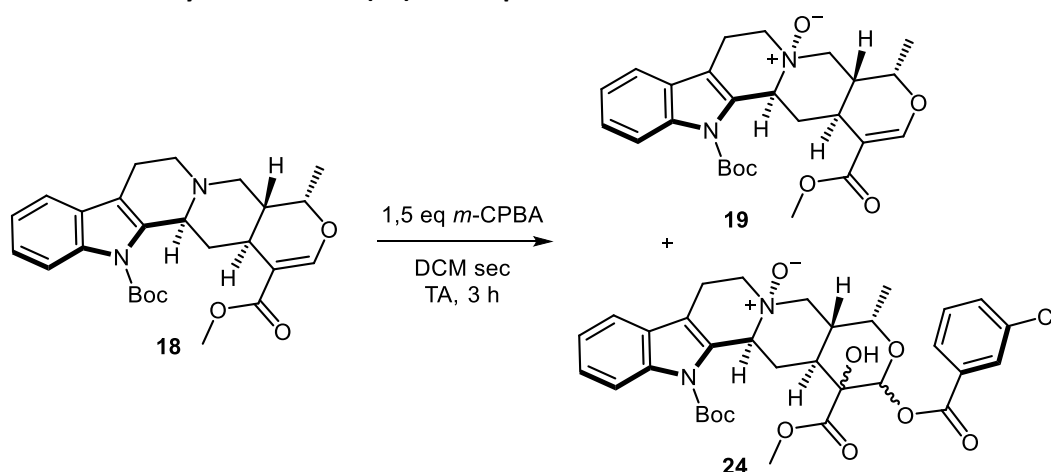
### • $N_1$ -Boc-raubasine (**18**)



La raubasine (**15**) (400 mg, 1,14 mmol, 1 eq), le dicarbonate de di-*tert*-butyle [(Boc)<sub>2</sub>O] (372 mg, 1,70 mmol, 1,5 eq) et la paradiméthylaminopyridine (DMAP) (14 mg, 0,11 mmol, 0,1 eq) sont solubilisés dans du dichlorométhane sec (6 mL), mis sous argon et sous agitation, à température ambiante pendant 3 heures. La solution est ensuite évaporée, puis soumise à une chromatographie flash (GraceResolv® silica 40 g - DCM : MeOH (98,5 : 1,5)) pour donner le composé **18**.

**Composé 18** : 398,7 mg (77,4%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - δ : 1,33 (H-14α, ddd, J = 12,5 ; 12,0 ; 11,0 Hz, 1H) ; 1,38 (H-18, d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,62 (H-20, m, 1H) ; 1,72 (Boc, s, 9H) ; 2,66 (H-6, m, 2H) ; 2,62 (H-14β, ddd, J = 12,5 ; 4,5 ; 2,2 Hz, 1H) ; 2,79 (H-5, m, 2H) ; 2,81 (H-15, m, 1H) ; 2,96 (H-21α, dd, J = 12,5 ; 3,5 Hz, 1H) ; 3,12 (H-21β, dd, J = 12,5 ; 2,0 Hz, 1H) ; 3,70 (H-23, s, 3H) ; 3,78 (H-3, dd, J = 11,0 ; 2,2 Hz, 1H) ; 4,45 (H-20, m, 1H) ; 7,20 (H-10, t, J = 7,0 Hz, 1H) ; 7,25 (H-11, t, J = 7,0 Hz, 1H) ; 7,39 (H-9, d, J = 7,0 Hz, 1H) ; 7,52 (H-17, s, 1H) ; 8,09 (H-12, d, J = 7,0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - δ : 18,4 (C-18) ; 22,7 (C-6) ; 27,8 (Boc) ; 31,7 (C-15) ; 35,0 (C-14) ; 38,3 (C-20) ; 50,9 (C-23) ; 51,1 (C-5) ; 56,2 (C-21) ; 61,1 (C-3) ; 72,4 (C-19) ; 84,0 (Boc) ; 109,8 (C-16) ; 115,3 (C-12) ; 117,1 (C-7) ; 117,8 (C-9) ; 122,6 (C-10) ; 124,0 (C-11) ; 129,1 (C-8) ; 136,4 (C-2) ; 137,4 (C-13) ; 150,5 (Boc) ; 155,4 (C-17) ; 167,8 (C-22). MS-ESIHR : 453,2382 ([M+H]<sup>+</sup>).

### • $N_1$ -Boc- $N_4$ -oxyde-raubasine (**19**) et composé **24**

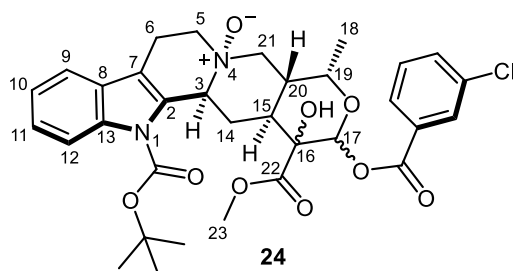


Une solution de  $N_1$ -Boc-raubasine (**18**) (383 mg, 0,85 mmol, 1 eq) et d'acide *meta*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA, 50 %  $H_2O$ , 438 mg, 1,3 mmol, 1,5 eq, séché au  $Na_2SO_4$ ) dans du dichlorométhane sec (7 mL) est agitée à température ambiante pendant 3 h, sous argon. Une extraction liquide-liquide ainsi qu'une chromatographie liquide sur gel d'alumine (DCM : MeOH (100 : 0 à 98,5 : 1,5)) permettent de séparer les composés **19** et **24**.

**Composé 19** : 121,3 mg (29,4%).  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) -  $\delta$  : 1,50 (H-14 $\alpha$ , m, 1H) ; 1,52 (H-18, d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,74 (Boc, s, 9H) ; 2,19 (H-20, m, 1H) ; 2,82 (H-6 $\alpha$ , ddd, J = 15,6 ; 4,5 ; 1,1 Hz, 1H) ; 3,05 (H-15, ddd, J = 12,0 ; 4,6 ; 4,4 Hz, 1H) ; 3,10 (H-14 $\beta$ , m, 1H) ; 3,42 (H-5 $\alpha$ , ddd, J = 11,0 ; 5,6 ; 1,1 Hz, 1H) ; 3,51 (H-6 $\beta$ , ddd, J = 15,5 ; 10,0 Hz ; 5,6 Hz, 1H) ; 3,62 (H-5 $\beta$ , ddd, J = 11,0 ; 10,0 ; 4,4 Hz, 1H) ; 3,71 (H-23, s, 3H) ; 4,10 (H-21, m, 2H) ; 4,22 (H-19, m, 1H) ; 5,05 (H-3, dd, J = 11,0 ; 2,1 Hz, 1H) ; 7,23 (H-10, t, J = 7,0 Hz, 1H) ; 7,29 (H-11, t, J = 7,0 Hz, 1H) ; 7,42 (H-9, d, J = 7,0 Hz, 1H) ; 7,53 (H-17, s, 1H) ; 8,13 (H-12, d, J = 7,0 Hz, 1H).  $^{13}C$  RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ ) -  $\delta$  : 18,1 (C-18) ; 18,3 (C-6) ; 27,8 (Boc) ; 29,4 (C-15) ; 35,3 (C-14) ; 38,4 (C-20) ; 51,1 (C-23) ; 58,1 (C-5) ; 70,3 (C-21) ; 71,3 (C-19) ; 73,2 (C-3) ; 84,8 (Boc) ; 108,1 (C-16) ; 111,7 (C-7) ; 115,8 (C-12) ; 118,1 (C-9) ; 122,8 (C-10) ; 124,5 (C-11) ; 128,1 (C-8) ; 131,4 (C-2) ; 136,4 (C-13) ; 149,5 (Boc) ; 155,2 (C-17) ; 166,8 (C-22). MS-ESIHR : 469,2335 ( $[M+H]^+$ ).

**Composé 24** : 57,6 mg (10,2%).  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) -  $\delta$  : 1,31 (H-18, d, J = 6,9 Hz, 1H) ; 1,66 (Boc, s, 9H) ; 1,76 (H-14 $\alpha$ , m, 1H) ; 2,48 (H-14 $\beta$ , dt, J = 14,6 ; 3,2 Hz, 1H) ; 2,79 (H-6 $\alpha$ , m, 1H) ; 2,81 (H-20, m, 1H) ; 2,88 (H-15, m, 1H) ; 3,24 (H-5 $\alpha$ , m, 1H) ; 3,49 (H-6 $\beta$ , m, 1H) ; 3,56 (H-21, m, 2H) ; 3,63 (H-23, s, 3H) ; 3,95 (H-5 $\beta$ , td, J = 11,0 ; 5,4 Hz, 1H) ; 4,14 (H-19, m, J = 6,3 Hz, 1H) ; 5,08 (H-3, dd, J = 12,3 ; 2,6 Hz, 1H) ; 6,15 (H-17, s, 1H) ; 7,22 (H-10, td, J = 7,3 ; 0,8 Hz, 1H) ; 7,26 (H-11, td, J = 7,3 ; 0,8 Hz, 1H) ; 7,40 (H-9, dd, J = 7,3 ; 0,8 Hz, 1H) ; 7,42 (*m*-CPBA, t, J = 8,2 Hz, 1H) ; 7,58 (*m*-CPBA, ddd, J = 8,2 ; 2,0 ; 1,0 Hz, 1H) ; 7,89 (*m*-CPBA, dt, J = 7,9 ; 1,1 Hz, 1H) ; 7,95 (*m*-CPBA, t, J = 1,6 Hz, 1H) ; 8,01 (H-12, dl, J = 8,2 Hz, 1H).  $^{13}C$  RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ ) -  $\delta$  : 17,9 (C-18) ; 18,4 (C-6) ; 28,3 (Boc) ; 31,4 (C-14) ; 31,7 (C-15) ; 33,2 (C-20) ; 53,2 (C-23) ; 55,6 (C-5) ; 70,3 (C-19) ; 71,9 (C-21) ; 73,3 (C-3) ; 74,1 (C-16) ; 84,8 (Boc) ; 94,8 (C-17) ; 112,1 (C-7) ; 116,2 (C-12) ; 118,7 (C-9) ; 123,3 (C-10) ; 124,9 (C-11) ; 128,0 (*m*-CPBA) ; 128,7 (C-8) ; 129,9 (*m*-CPBA) ; 130,3 (*m*-CPBA) ; 131,4 (*m*-CPBA) ; 132,2 (C-2) ; 134,0 (*m*-CPBA) ; 135,1 (*m*-CPBA) ; 136,3 (C-13) ; 150,0 (Boc) ; 163,7 (*m*-CPBA) ; 172,6 (C-22). MS-ESIHR : 641,2257 ( $[M+H]^+$ )



**Composé 24****C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>Cl****M = 641,1140****Aspect : solide amorphe jaune pâle****MS-ESIHR : 641,2257**

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 1,31 (H-18, d, J = 6,9 Hz, 1H) ; 1,66 (Boc, s, 9H) ; 1,76 (H-14 $\alpha$ , m, 1H) ; 2,48 (H-14 $\beta$ , dt, J = 14,6 ; 3,2 Hz, 1H) ; 2,79 (H-6 $\alpha$ , m, 1H) ; 2,81 (H-20, m, 1H) ; 2,88 (H-15, m, 1H) ; 3,24 (H-5 $\alpha$ , m, 1H) ; 3,49 (H-6 $\beta$ , m, 1H) ; 3,56 (H-21, m, 2H) ; 3,63 (H-23, s, 3H) ; 3,95 (H-5 $\beta$ , td, J = 11,0 ; 5,4 Hz, 1H) ; 4,14 (H-19, m, J = 6,3 Hz, 1H) ; 5,08 (H-3, dd, J = 12,3 ; 2,6 Hz, 1H) ; 6,15 (H-17, s, 1H) ; 7,22 (H-10, td, J = 7,3 ; 0,8 Hz, 1H) ; 7,26 (H-11, td, J = 7,3 ; 0,8 Hz, 1H) ; 7,40 (H-9, dd, J = 7,3 ; 0,8 Hz, 1H) ; 7,42 (*m*-CPBA, t, J = 8,2 Hz, 1H) ; 7,58 (*m*-CPBA, ddd, J = 8,2 ; 2,0 ; 1,0 Hz, 1H) ; 7,89 (*m*-CPBA, dt, J = 7,9 ; 1,1 Hz, 1H) ; 7,95 (*m*-CPBA, t, J = 1,6 Hz, 1H) ; 8,01 (H-12, dl, J = 8,2 Hz, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 17,9 (C-18) ; 18,4 (C-6) ; 28,3 (Boc) ; 31,4 (C-14) ; 31,7 (C-15) ; 33,2 (C-20) ; 53,2 (C-23) ; 55,6 (C-5) ; 70,3 (C-19) ; 71,9 (C-21) ; 73,3 (C-3) ; 74,1 (C-16) ; 84,8 (Boc) ; 94,8 (C-17) ; 112,1 (C-7) ; 116,2 (C-12) ; 118,7 (C-9) ; 123,3 (C-10) ; 124,9 (C-11) ; 128,0 (*m*-CPBA) ; 128,7 (C-8) ; 129,9 (*m*-CPBA) ; 130,3 (*m*-CPBA) ; 131,4 (*m*-CPBA) ; 132,2 (C-2) ; 134,0 (*m*-CPBA) ; 135,1 (*m*-CPBA) ; 136,3 (C-13) ; 150,0 (Boc) ; 163,7 (*m*-CPBA) ; 172,6 (C-22).



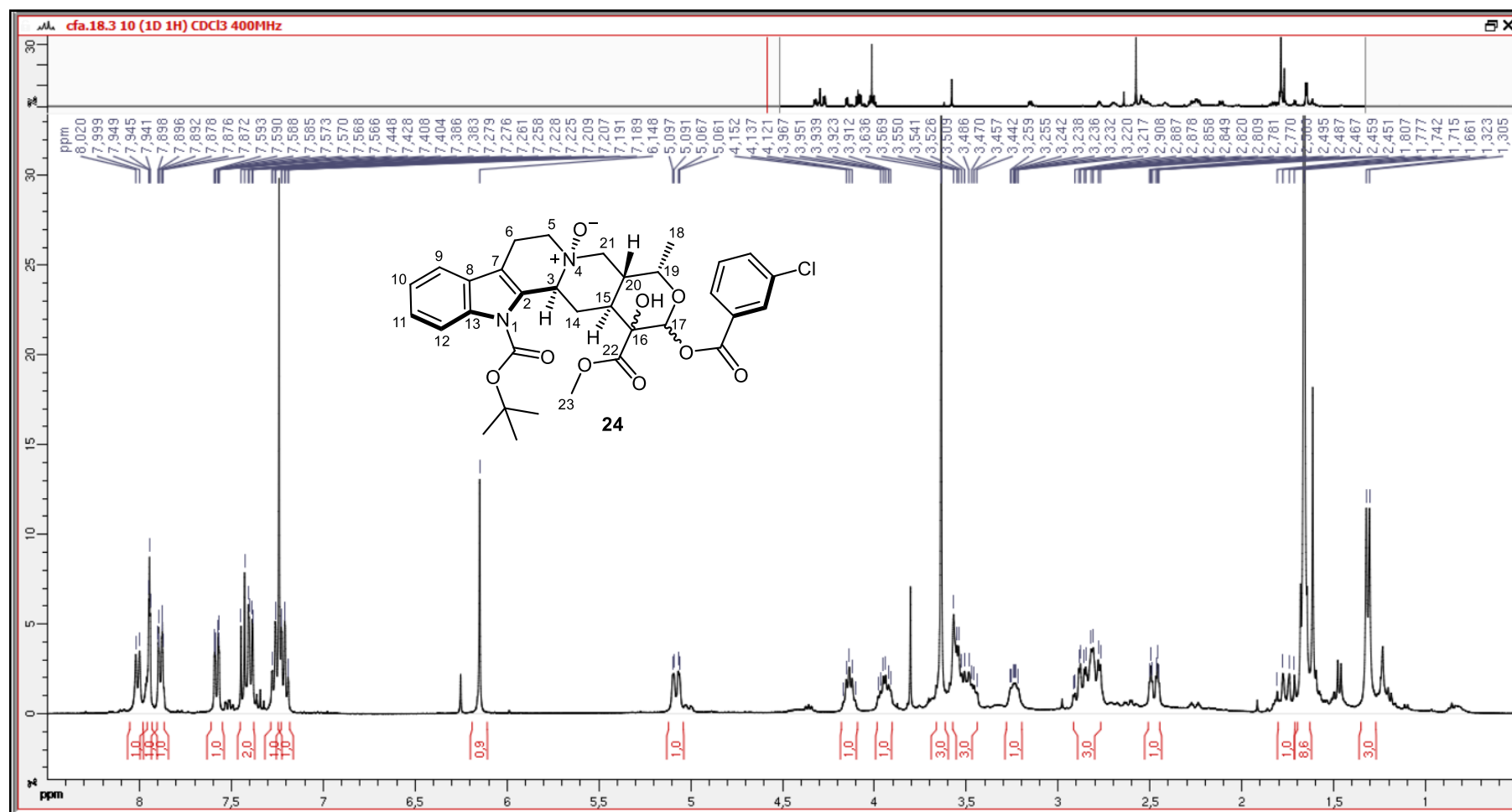
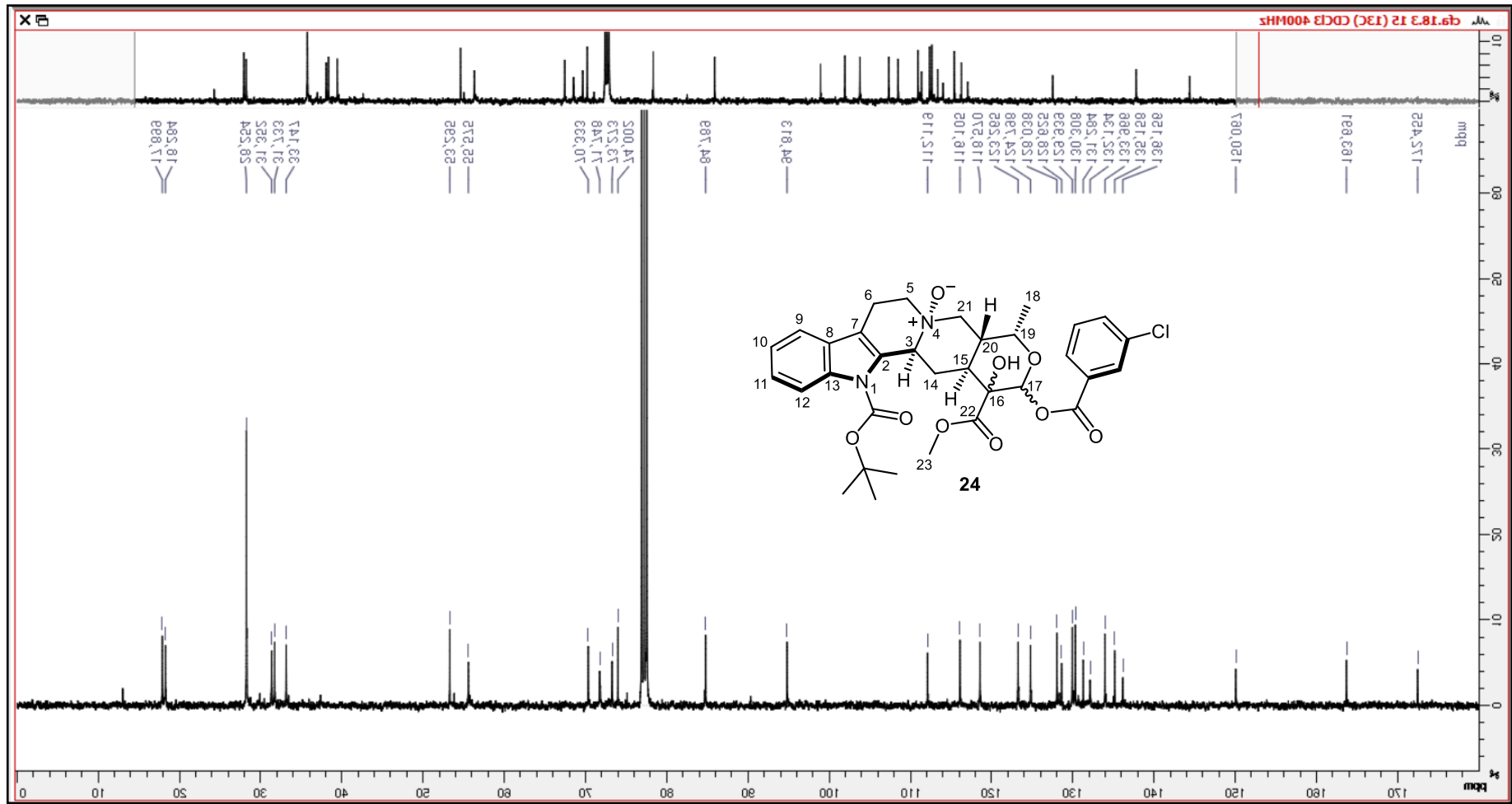


Figure 22. Spectre  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) du composé **24**





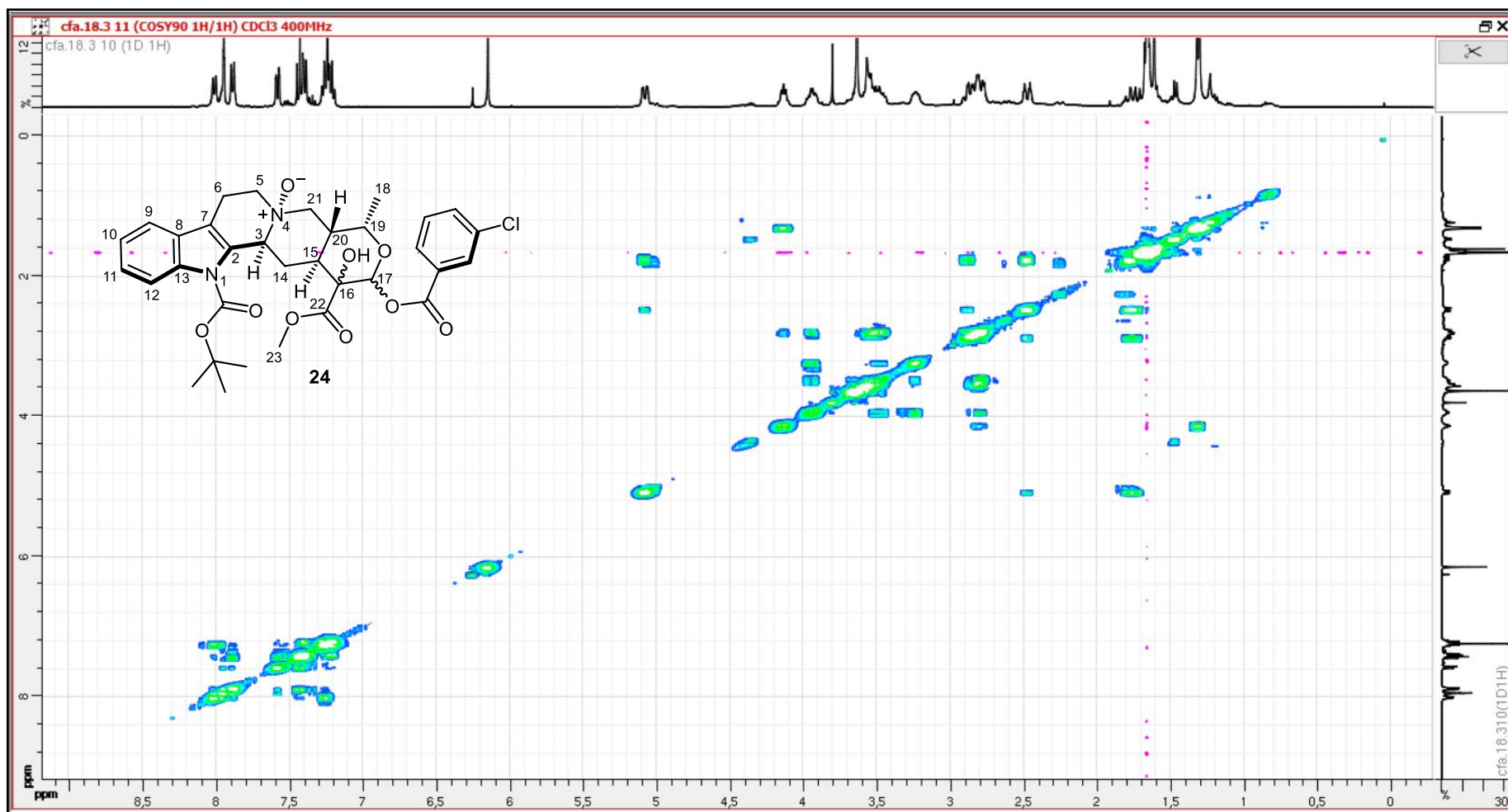


Figure 24. Spectre COSY (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) du composé 24

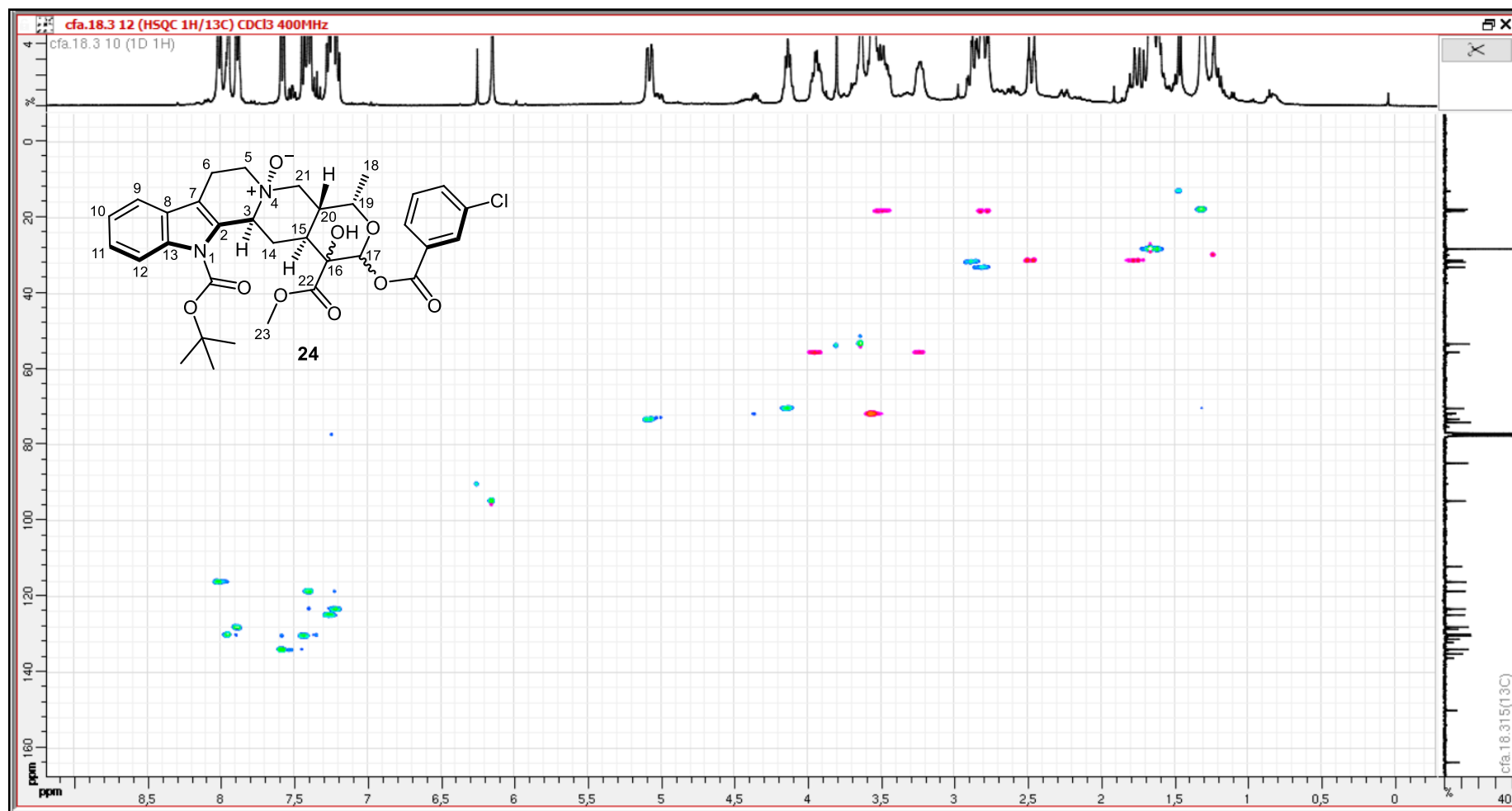


Figure 25. Spectre HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) du composé 24

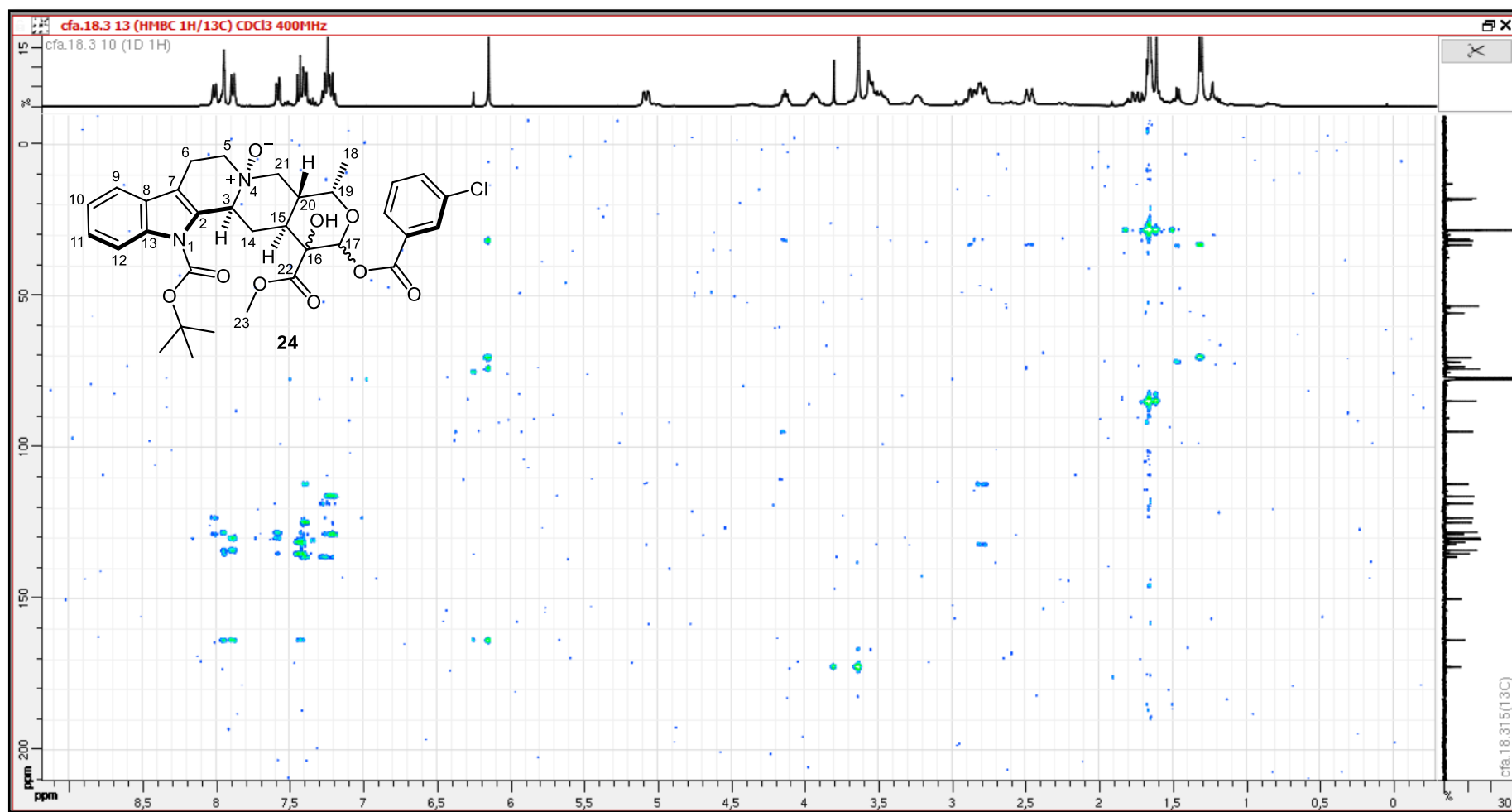


Figure 26. Spectre HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) du composé 24

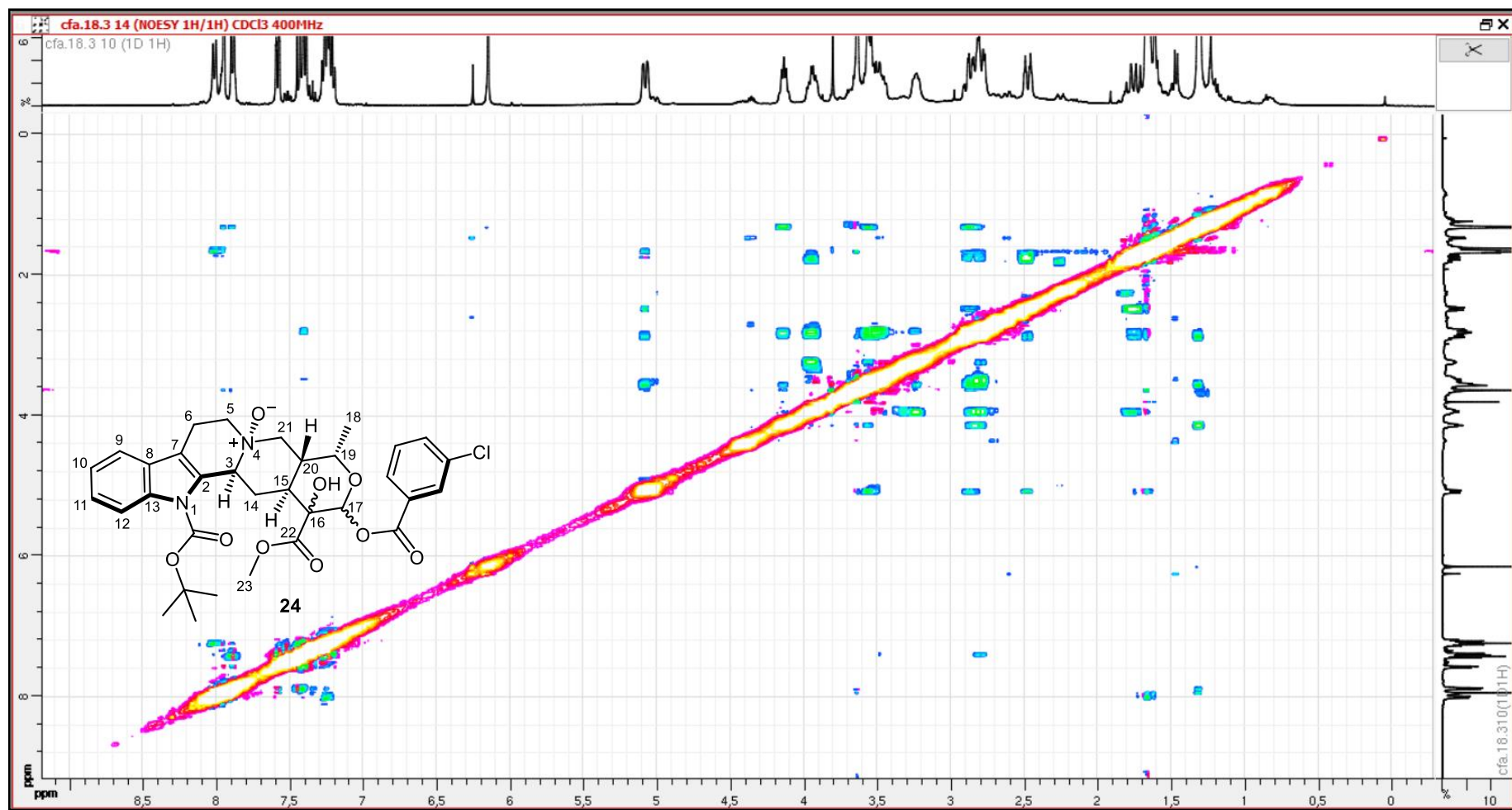


Figure 27. Spectre NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) du composé 24

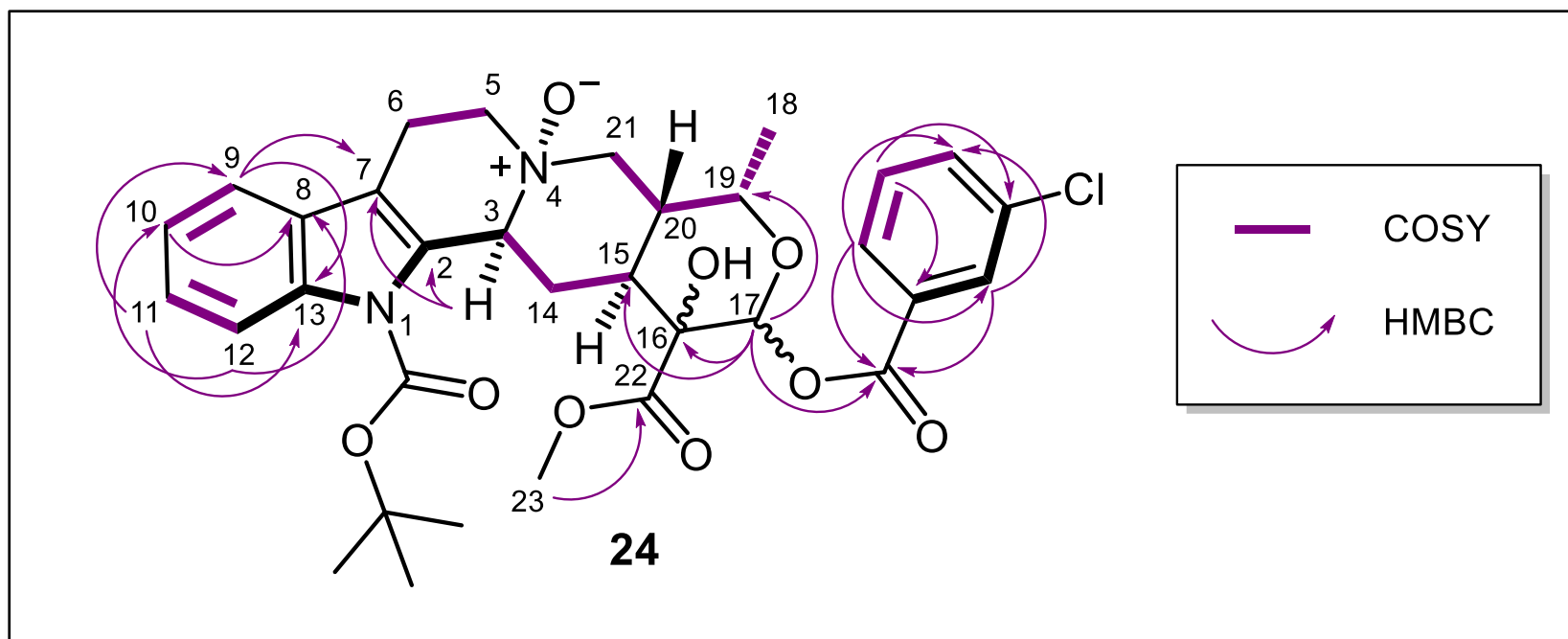
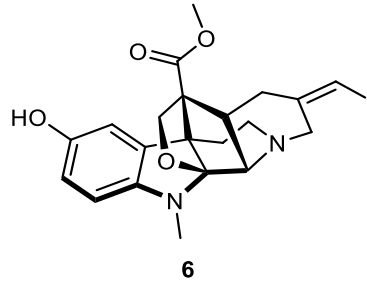
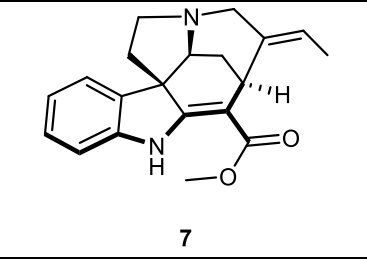
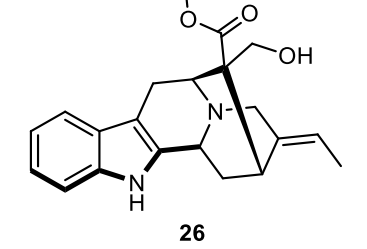
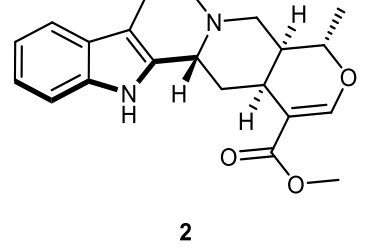
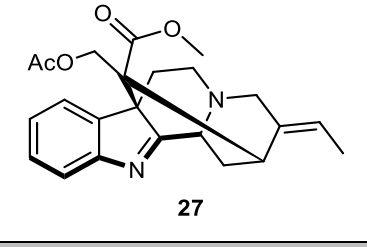
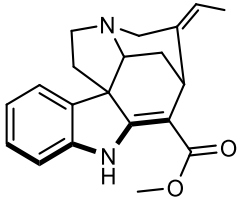
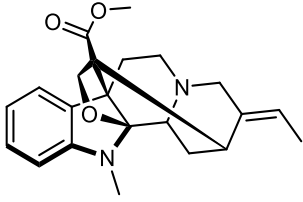
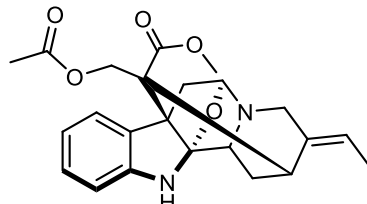
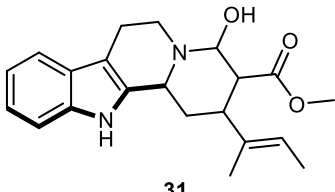
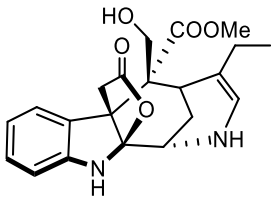
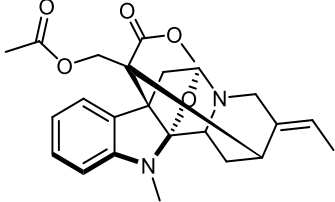
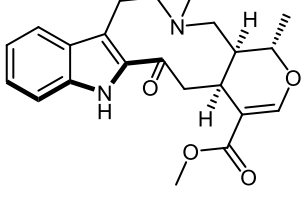


Figure 28. Corrélations COSY et HMBC du composé 24

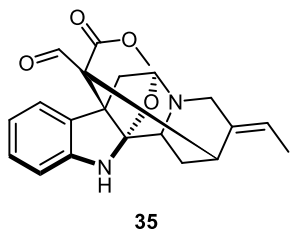
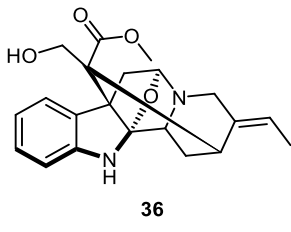
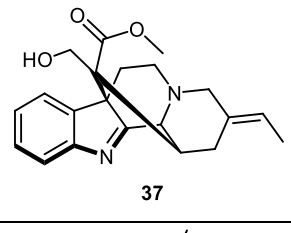
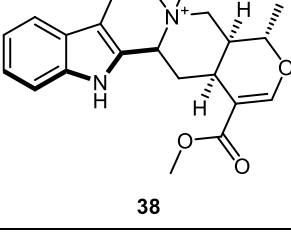
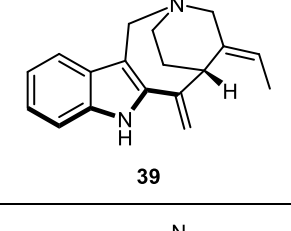
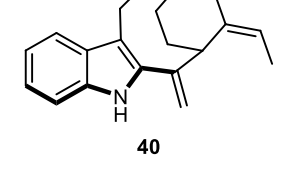
## ANNEXES ASSOCIEES

Tableau 1. Composés isolés de *P. nitida*

Nom	Formule brute	Poids moléculaire	Structure	Provenance
akuammine	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	382.458	 6	Graines, écorces, tiges, feuilles
akuammicine	$C_{20}H_{22}N_2O_2$	322.406	 7	Graines, racines, écorces, fruits
akuammidine	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	352.432	 26	Graines, racines, écorces, tiges, feuilles, fruits
akuammigine	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	352.432	 2	Graines, racines, écorces, feuilles, fruits
akuammiline	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	394.469	 27	Graines
akuamménine	$C_{20}H_{22}N_2O_4$	354.405		Graines

pseudo-akuammicine	$C_{20}H_{22}N_2O_2$	322.406	 28	Graines
pseudo-akuammigine	$C_{22}H_{26}N_2O_3$	366.459	 29	Graines, écorces, fruits
picraline	$C_{23}H_{26}N_2O_5$	410.469	 30	Graines, racines, écorces, fruits
picracine	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	354.450	 31	Racines, écorces
picranitine	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	384.431	 32	
picratidine	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	424.496	 33	Graines
picraphylline	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	382.458	 34	Feuilles



picralinal	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	366.416	 35	
burnamine	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368.432	 36	Graines, racines
rhazimol	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	352.432	 37	
mélinonine A	$C_{22}H_{27}N_2O_3^+$	367.467	 38	Feuilles
péricalline	$C_{18}H_{20}N_2$	264.369	 39	
péricine	$C_{19}H_{22}N_2$	278.396	 40	

## REFERENCES DU CHAPITRE 1

9. The Angiosperm Phylogeny, G., An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2009**, *161*, 105-121.
10. Ledouble, G., Alcaloïdes du *Picralima nitida* STAPF. Faculté de pharmacie de l'Université de Paris, 1964.
11. Hamet, R., Sur une drogue remarquable de l'Afrique tropicale, le "*Picralima nitida*" (Stapf) Th. et H. Durand. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* **1951**, 465-485.
12. Erharuyi, O.; Falodun, A.; Langer, P., Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Picralima nitida* (Apocynaceae) in tropical diseases: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2014**, *7*, 1-8.
13. Henry, T. A.; Sharp, T. M., CCLIV.-The alkaloids of *Picralima klaineana*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1927**, 1950-1959.
14. Henry, T. A., 415. The alkaloids of *Picralima klaineana*, Pierre. Part II. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1932**, 2759-2768.
15. Le Men, J.; Taylor, W. I., A uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia* **1965**, *21*, 508-510.
16. Iwu, M. M.; Klayman, D. L.; Jackson, J. E.; Tally, J. D.; Andersen, S. L., Alkaloids of *Picralima nitida* used for treatment of protozoal diseases. In *US5290553A*, 1994.
17. Irie, H.; Ishizuka, K.; Kawashima, S.; Masaki, N.; Osaki, K.; Shingu, T.; Uyeo, S.; Kaneko, H.; Naruto, S., X-Ray crystallographic determination of the structure of the alkaloid serpentinine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1972**, 871-871.
18. Fox Ramos, A. E.; Le Pogam, P.; Fox Alcover, C.; Otogo N'Nang, E.; Cauchie, G.; Hazni, H.; Awang, K.; Bréard, D.; Echavarren, A. M.; Frédéricich, M.; Gaslonde, T.; Girardot, M.; Grougnet, R.; Kirillova, M. S.; Kritsanida, M.; Lémus, C.; Le Ray, A.-M.; Lewin, G.; Litaudon, M.; Mambu, L.; Michel, S.; Miloserdov, F. M.; Muratore, M. E.; Richomme-Peniguel, P.; Roussi, F.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Collected mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research. *Scientific Data* **2019**, *6*, 15.
19. Verpoorte, R.; Frédéricich, M.; Delaude, C.; Angenot, L.; Dive, G.; Thépenier, P.; Jacquier, M.-J.; Zèches-Hanrot, M.; Lavaud, C.; Nuzillard, J.-M., Moandaensine, a dimeric indole alkaloid from *Strychnos moandaensis* (Loganiaceae). *Phytochemistry Letters* **2010**, *3*, 100-103.
20. O'Connor, S. E.; Maresh, J. J., Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 532-547.
21. Szabó, L., Rigorous Biogenetic Network for a Group of Indole Alkaloids Derived from Strictosidine. *Molecules* **2008**, *13*, 1875-1896.
22. Fox Ramos, A. E.; Pavesi, C.; Litaudon, M.; Dumontet, V.; Poupon, E.; Champy, P.; Genta-Jouve, G.; Beniddir, M. A., CANPA: Computer-Assisted Natural Products Anticipation. *Analytical Chemistry* **2019**, *91*, 11247-11252.
23. Otogo N'Nang, E.; Bernadat, G.; Mouray, E.; Kumulungui, B.; Grellier, P.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Theionbrunonines A and B: Dimeric vobasine alkaloids tethered by a thioether bridge from *Mostuea brunonis*. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6596-6600.
24. Otogo N'Nang Obiang, E.; Genta-Jouve, G.; Gallard, J.-F.; Kumulungui, B.; Mouray, E.; Grellier, P.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Pleiokomenines A and B: Dimeric aspidofractinine alkaloids tethered with a methylene group. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6180-6183.
25. Fox Ramos, A. E.; Alcover, C.; Evanno, L.; Maciuk, A.; Litaudon, M.; Duplais, C.; Bernadat, G.; Gallard, J.-F.; Jullian, J.-C.; Mouray, E.; Grellier, P.; Loiseau, P. M.; Pomel, S.; Poupon, E.;



- Champy, P.; Beniddir, M. A., Revisiting previously investigated plants: A molecular networking-based study of *Geissospermum laeve*. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1007-1014.
26. Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 960-980.
  27. Wachsmuth, O.; Matusch, R., Anhydronium bases from *Rauvolfia serpentina*. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 705-709.
  28. Feng, X. Z.; Kan, C.; Potier, P.; Kan, S. K.; Lounasmaa, M., Monomeric Indole Alkaloids from *Ervatamia hainanensis*. *Planta Med* **1982**, *44*, 212-214.
  29. 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.; Kleigrewe, 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.; Linnington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N., Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* **2016**, *34*, 828.
  30. DNP, accessed: Jan 26, 2019.
  31. Reaxys. <https://www-reaxys-com> (accessed Feb 17, 2017).
  32. Frédéricich, M.; Quetin-Leclercq, J.; Biala, R. G.; Brandt, V.; Penelle, J.; Tits, M.; Angenot, L., 3',4',5',6' Tetradehydrologicaudatine Y, an anhydronium base from *Strychnos usambarensis*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1263-1266.
  33. Lounasmaa, M.; Jokela, R.; Hanhinen, P.; Miettinen, J.; Salo, J., Preparation and conformational study of Z- and E-Isositsirikine epimers and model compounds. Determination of their C-16 configurations. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9207-9222.
  34. Cardoso, C. L.; Siqueira Silva, D. H.; Tomazela, D. M.; Verli, H.; Young, M. C. M.; Furlan, M.; Eberlin, M. N.; da Silva Bolzani, V., Turbinatine, a Potential Key Intermediate in the Biosynthesis of Corynanthean-Type Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1017-1021.
  35. 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., A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology* **2012**, *30*, 918-920.
  36. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M., MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395.



37. Myers, O. D.; Sumner, S. J.; Li, S.; Barnes, S.; Du, X., One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 8696-8703.
38. 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.; Lington, R. G.; Zhang, L.; Debonis, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C., Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1686-1699.
39. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T., Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498-2504.
40. Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J., Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, 2097-2098.
41. Hohenberg, P.; Kohn, W., Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* **1964**, *136*, B864-B871.
42. Kohn, W.; Sham, L. J., Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* **1965**, *140*, A1133-A1138.
43. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648-5652.
44. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **1988**, *37*, 785-789.
45. Wiberg, K. B., Ab Initio Molecular Orbital Theory by W. J. Hehre, L. Radom, P. v. R. Schleyer, and J. A. Pople, John Wiley, New York, 548pp. Price: \$79.95 (1986). *Journal of Computational Chemistry* **1986**, *7*, 379-379.
46. Frisch, M. J. T., H.B.; Schlegel, G.W.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; *et al.* Gaussian 16 Revision B.01; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
47. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605-1612.
48. Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Bringmann, G., SpecDis: Quantifying the Comparison of Calculated and Experimental Electronic Circular Dichroism Spectra. *Chirality* **2013**, *25*, 243-9.
49. Williams, T. K., C., and many others., Gnuplot 4.6: an Interactive Plotting Program. <http://gnuplot.sourceforge.net/>.
50. Guillon, J.; Grellier, P.; Labaied, M.; Sonnet, P.; Léger, J.-M.; Déprez-Poulain, R.; Forfar-Bares, I.; Dallemagne, P.; Lemaître, N.; Péhourcq, F.; Rochette, J.; Sergheraert, C.; Jarry, C., Synthesis, Antimalarial Activity, and Molecular Modeling of New Pyrrolo[1,2-a]quinoxalines, Bispyrrolo[1,2-a]quinoxalines, Bispyrido[3,2-e]pyrrolo[1,2-a]pyrazines, and Bispyrrolo[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrazines. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997-2009.
51. Halonen, M.; Jokela, R.; Lounasmaa, M., Transformation of Na-Boc-tetrahydroalstonine to Na-Boc-5 $\beta$ -cyanotetrahydroalstonine, Na-Boc-21 $\alpha$ -cyanotetrahydroalstonine, and Na-Boc-3,14-didehydrotetrahydroalstonine. *Heterocycles* **1995**, *41*, 353-362.

Photos de *Picralima nitida* : <http://www.tela-botanica.org> (06.02.2016).





---

# CHAPITRE II :

## RESEAUX MOLECULAIRES ET SYNTHESE BIOMIMETIQUE : APPLICATION AUX ALCALOÏDES MARINS DE TYPE « 3-ALKYLPYPERIDINES »

---





## CHAPITRE II : RESEAUX MOLECULAIRES ET SYNTHESE BIOMIMETIQUE : APPLICATION AUX ALCALOÏDES MARINS DE TYPE « 3-ALKYLPÉRIDINES »

### 1) Introduction bibliographique

#### a. Les alcaloïdes de la famille des « 3-alkylpipéridines »

##### i. Présentation des principaux composés

La vaste famille des « 3-alkylpipéridines » (ou « 3-alkylpyridines ») est composée d'une centaine d'alcaloïdes, très hétérogènes d'un point de vue structural. On y trouve à la fois des monomères linéaires (tels que la théonelladine A (41)<sup>52</sup>), des dimères (comme la cyclostellettamine A (42)<sup>53</sup>), ou bien des composés plus complexes tels que la manzamine A (43)<sup>54</sup>, l'halicyclamine A (44)<sup>55</sup>, la saraïne A (45)<sup>56</sup> ou la kéramaphidine B (46)<sup>57</sup> (Figure 29).

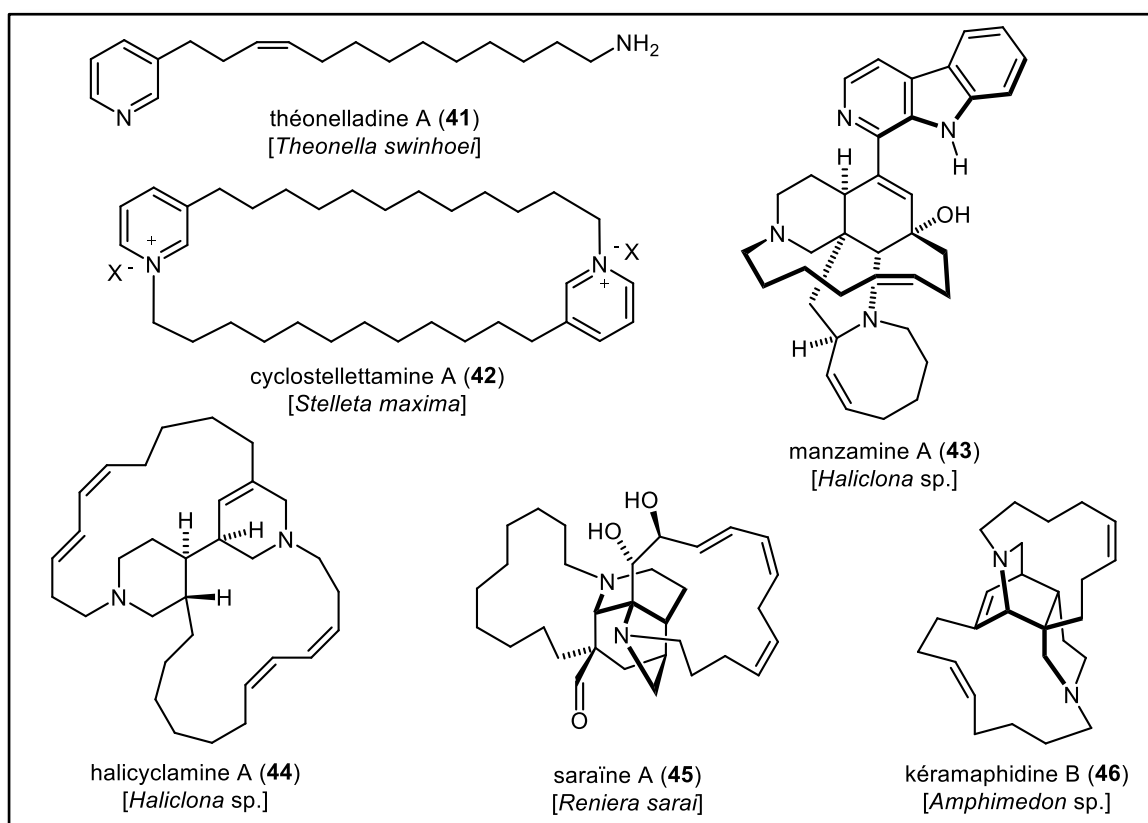


Figure 29. Différents alcaloïdes de la famille des « 3-alkylpipéridines »

<sup>52</sup> Kobayashi, J. i.; Murayama, T.; Ohizumi, Y.; Sasaki, T.; Ohta, T.; Nozoe, S., Theonelladins A ~ D, novel antineoplastic pyridine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 4833-4836.

<sup>53</sup> Fusetani, N.; Asai, N.; Matsunaga, S.; Honda, K.; Yasumuro, K., Cyclostellettamines A-F, pyridine alkaloids which inhibit binding of methyl quinuclidinyl benzilate (QNB) to muscarinic acetylcholine receptors, from the marine sponge, *Stelletta maxima*. *Ibid.* **1994**, *35*, 3967-3970.

<sup>54</sup> Sakai, R.; Higa, T.; Jefford, C. W.; Bernardinelli, G., Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 6404-6405.

<sup>55</sup> Jaspars, M.; Pasupathy, V.; Crews, P., A tetracyclic diamine alkaloid, halicyclamine A, from the marine sponge *Haliclona* sp. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 3253-3255.

<sup>56</sup> Cimino, G.; Mattia, C. A.; Mazzearella, L.; Puliti, R.; Scognamiglio, G.; Spinella, A.; Trivellone, E., Unprecedented alkaloid skeleton from the mediterranean sponge *reniera sarai*: X-ray structure of an acetate derivative of sarain-a. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3863-3872.

<sup>57</sup> Kobayashi, J. i.; Tsuda, M.; Kawasaki, N.; Matsumoto, K.; Adachi, T., Keramaphidin B, a novel pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Amphimedon* sp. : A plausible biogenetic precursor of manzamine alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 4383-4386.





Ce groupe d'alcaloïdes est également retrouvé dans la littérature sous le nom de « **famille des manzamines** », la manzamine A (**43**) étant le premier composé de cette série à avoir été isolé.<sup>54</sup>

### ii. Origines

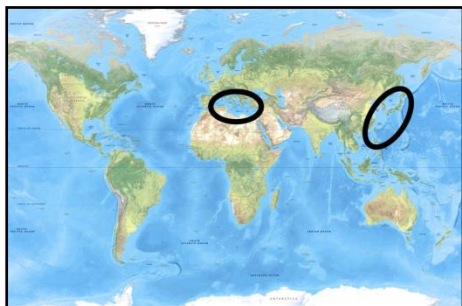


Figure 30. Répartition des éponges citées

La manzamine A fut donc le premier composé découvert, en 1986, à partir d'éponges du genre *Haliclona* collectées à Manzamo, au Japon (Okinawa).<sup>54</sup>

Comme indiqué dans la **Figure 29**, les autres alcaloïdes de cette famille ont été isolés de diverses espèces d'éponges marines, de l'ordre des **Haplosclerida** ou des **Tetractinellida** notamment.<sup>58</sup>

Celles-ci provenaient de baies japonaises (*Theonella swinhoei*, *Stelletta maxima*, ainsi que les éponges des genres *Haliclona* et *Amphimedon*) ou méditerranéennes (*Reniera sarai*) (**Figure 30**).

### iii. Activités biologiques

Les composés de type « 3-alkylpipéridines » présentant une très grande **diversité structurale**, ils arborent également des **activités biologiques très variées**. Ils possèdent, par exemple, des propriétés cytotoxiques, antibactériennes, antipaludiques, anti-inflammatoires et anti-VIH.<sup>59</sup>

De nombreux travaux de recherche ont donc été entrepris autour de cette famille, que ce soit afin d'en élucider les voies de biosynthèse, ou bien dans une optique de synthèse totale. Beaucoup de ces alcaloïdes ont d'ailleurs d'ores et déjà été synthétisés, notamment la manzamine A (**43**)<sup>60</sup> et la saraine A (**45**)<sup>61</sup>.

## b. Hypothèses biogénétiques

### i. Scénario de Baldwin

En 1992, Baldwin et Whitehead proposèrent une première hypothèse de biogenèse pour les alcaloïdes de la famille « des manzamines », basée sur une unité en C<sub>3</sub> – **l'acroléine (47)**, des dialdéhydes à longues chaînes (**48**) et l'ammoniac comme donneur d'azote.<sup>62</sup>

<sup>58</sup> <http://www.marinespecies.org/index.php>.

<sup>59</sup> Cheng, B.; Reyes, J., Recent progress on the total syntheses of macrocyclic diamine alkaloids. *Natural Product Reports* **2019**.

<sup>60</sup> Jakubec, P.; Hawkins, A.; Felzmann, W.; Dixon, D. J., Total Synthesis of Manzamine A and Related Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 17482-17485. (Et références citées pour les synthèses antérieures)

<sup>61</sup> Higo, T.; Ukegawa, T.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T., Formal Synthesis of Sarain A: Intramolecular Cycloaddition of an Eight-Membered Cyclic Nitron to Construct the 2-Azabicyclo[3.3.1]nonane Framework. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 7367-7370. (Et références citées pour les synthèses antérieures)

<sup>62</sup> Kondo, K.; Shigemori, H.; Kikuchi, Y.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Kobayashi, J., Ircinals A and B from the Okinawan marine sponge *Ircinia* sp.: plausible biogenetic precursors of manzamine alkaloids. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 2480-2483.



Le précurseur biosynthétique, formé à partir de ces unités grâce à une réaction de **Diels-Alder**, serait un **sel de bis-3-alkyldihydropyridinium macrocyclique (49)**, pouvant donner accès au **composé pentacyclique 50**. Ce dernier pourrait alors à son tour mener à la **manzamine A (43)**, via un équilibre rédox, une étape d'hydrolyse, plusieurs oxydations et une réaction de Pictet-Spengler, ou à la **kéramaphidine B (46)**, après réduction (**Figure 31**).

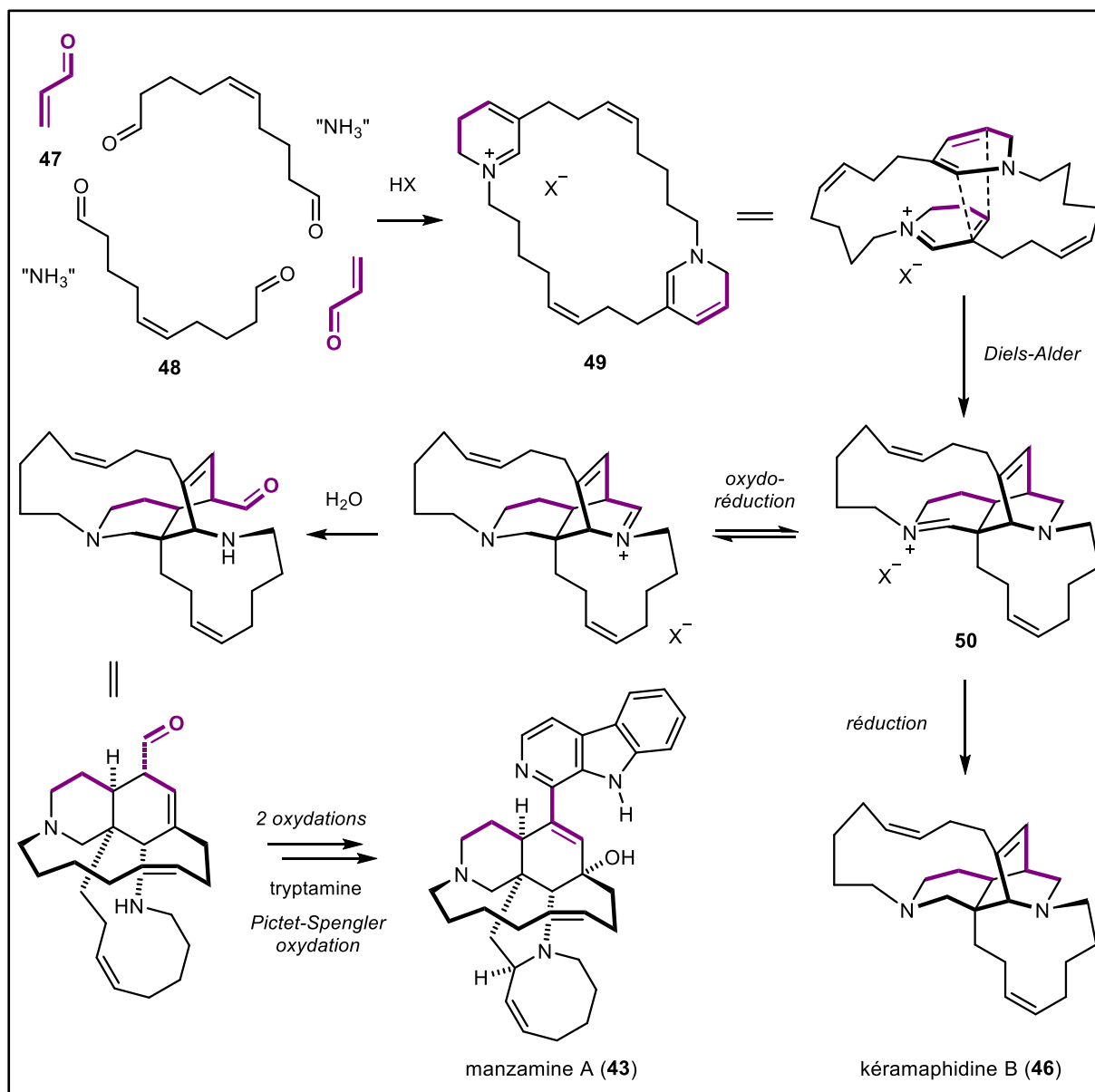


Figure 31. Hypothèse de Baldwin et Whitehead

À partir de ce modèle, l'équipe de Baldwin a effectivement réussi à synthétiser le cœur cyclique puis l'intégralité de la **kéramaphidine B (46)**. Cependant, les rendements globaux observés sont relativement faibles (10 et 0,2% respectivement) ; ce qui s'explique notamment par une



réaction de dismutation spontanée, restreignant le rendement de la réaction-clé de Diels-Alder (Figure 32).<sup>63,64</sup>

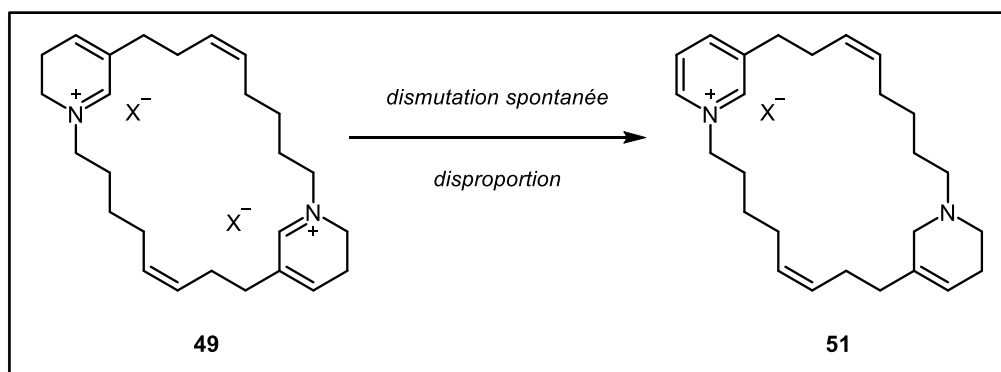


Figure 32. Dismutation du composé 49 en 51

De plus, ce modèle n'a pas permis l'accès au squelette de type **manzamine**.

### ii. Scénario de Marazano

Les difficultés synthétiques rencontrées par Baldwin et Whitehead, citées précédemment, ont fait émerger un second scénario biosynthétique. En 1998, l'équipe de Marazano propose une nouvelle hypothèse, basée sur le **malondialdéhyde (52)**, aussi appelé « **malonaldéhyde** », comme unité en C<sub>3</sub>.

Dans ce scénario, des **sels de pyridiniums** seraient formés, en passant par un intermédiaire de type **glutaconaldéhyde (Figure 33)**, puis **bis-aminopentadiènal (53, Figure 34)**.<sup>65</sup>

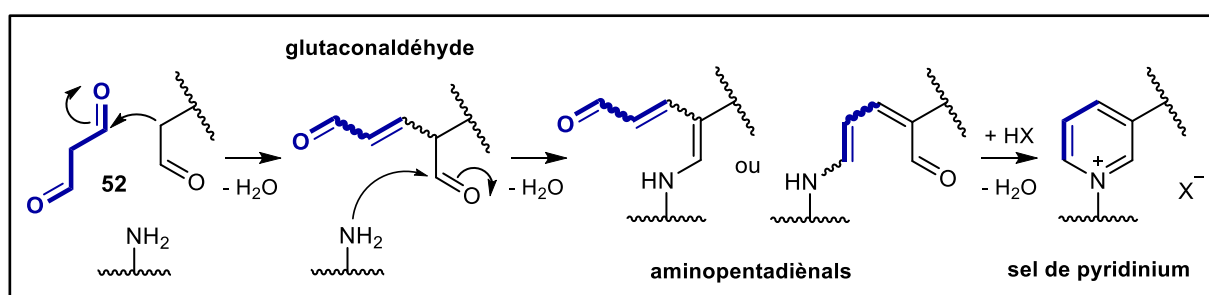


Figure 33. Formation de sels de pyridiniums selon l'hypothèse de Marazano

<sup>63</sup> Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Culshaw, A. J.; Heupel, F. A.; Smrcková, S.; Whitehead, R. C., A biomimetic approach to the manzamine alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6919-6922.

<sup>64</sup> Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Culshaw, A. J.; Heupel, F. A.; Lee, V.; Spring, D. R.; Whitehead, R. C.; Boughtflower, R. J.; Mutton, I. M.; Upton, R. J., Investigations into the Manzamine Alkaloid Biosynthetic Hypothesis. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2661-2663.

<sup>65</sup> Kaiser, A.; Billot, X.; Gateau-Olesker, A.; Marazano, C.; Das, B. C., Selective Entry to the Dimeric or Oligomeric Pyridinium Sponge Macrocycles via Aminopentadienal Derivatives. Possible Biogenetic Relevance with Manzamine Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 8026-8034.

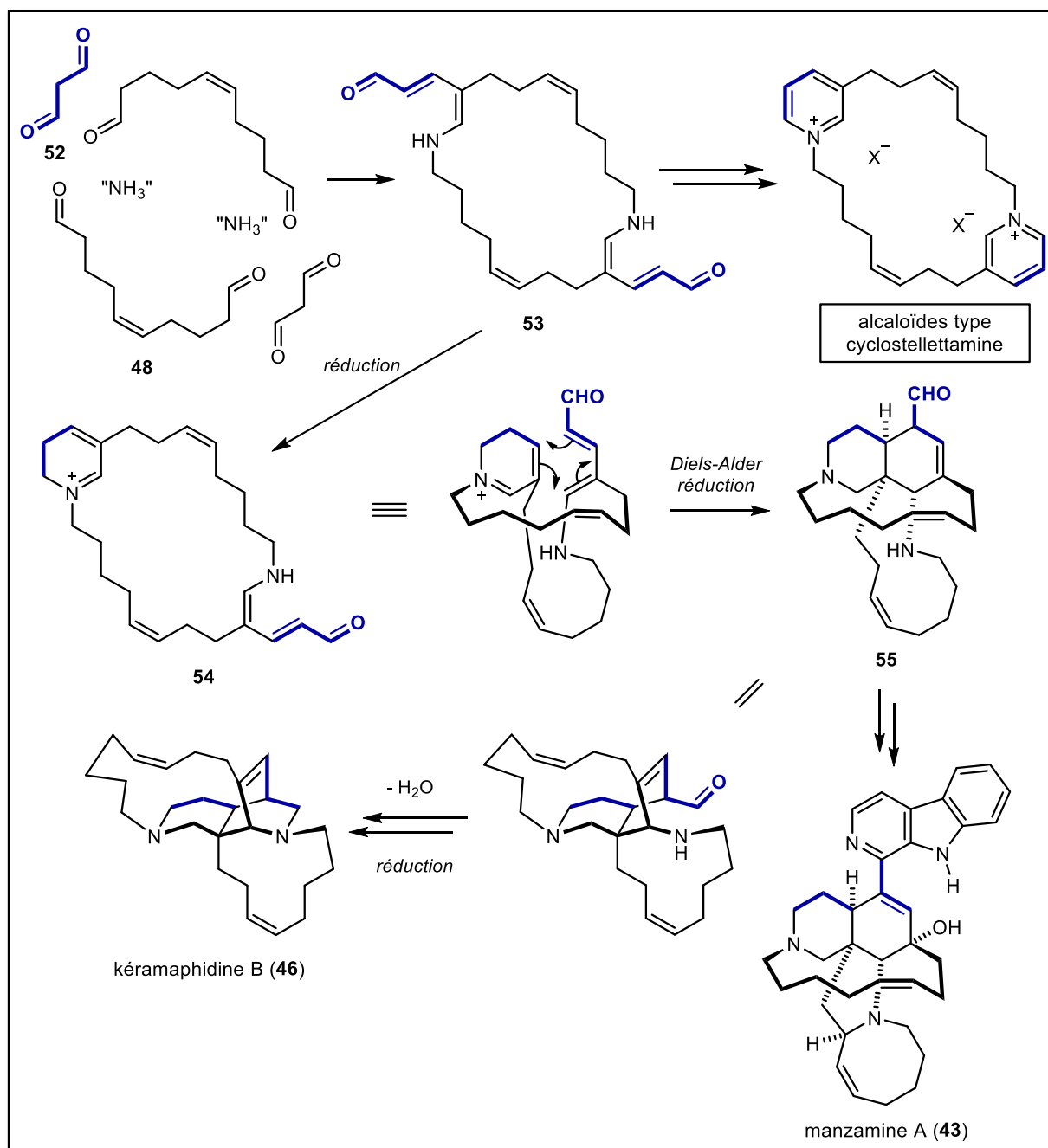


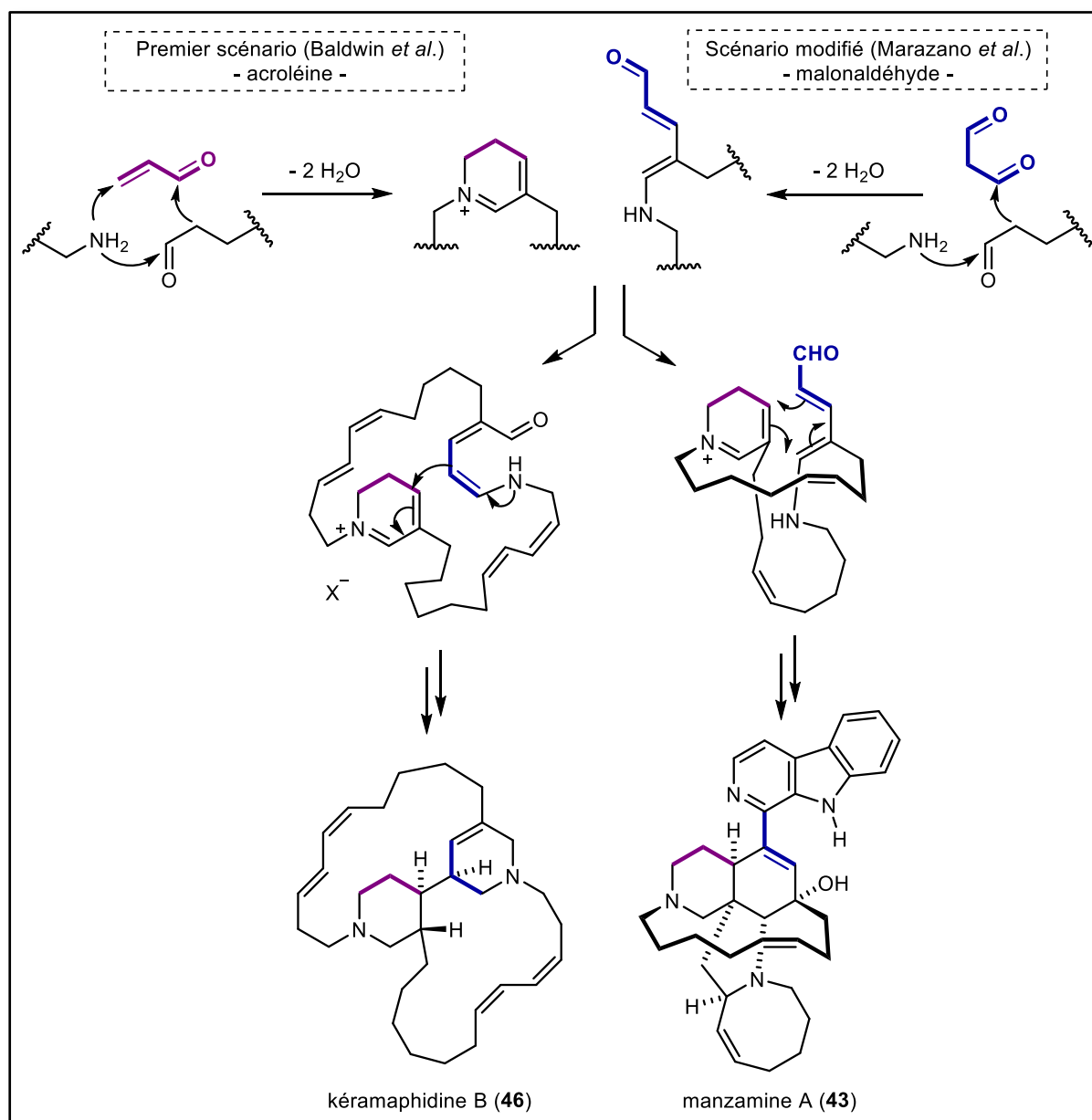
Figure 34. Hypothèse de Marazano

Partiellement réduit, cet intermédiaire mènerait à un composé (**54**) comportant un **dihydropyridinium** et un **aminopentadiène**. Une cyclisation par réaction de **Diels-Alder** suivie d'une étape de réduction donneraient alors accès à un dernier intermédiaire (**55**), susceptible de mener à la fois au squelette de type **manzamine** et à celui de la **kéramaphidine B (46)**.



iii. Scénario « unifié »

En 2008, l'hypothèse d'un scénario « unifié » est alors émise par l'équipe de Marazano : à partir d'un macrocycle comportant à la fois un **aminopentadiène** et un **sel de dihydropyridinium** (**Figure 35**), il serait possible d'aboutir à tous les squelettes de la famille des « 3-alkylpipéridines ». <sup>66</sup>



**Figure 35.** Scénario « unifié »

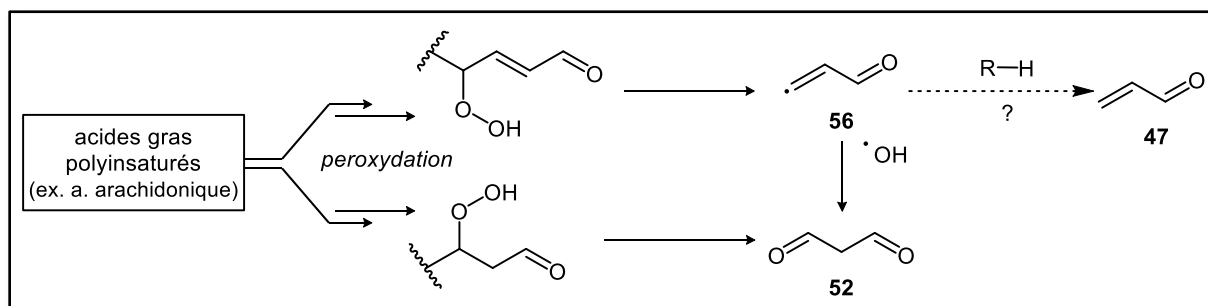
<sup>66</sup> Wypych, J.-C.; Nguyen, T. M.; Nuhant, P.; Bénéchie, M.; Marazano, C., Further Insight from Model Experiments into a Possible Scenario Concerning the Origin of Manzamine Alkaloids. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 5418-5421.



iv. Hypothèses sur l'origine des unités de départ (47, 48 et 52)

*In vivo*, toutes ces unités pourraient provenir du métabolisme des acides gras. Plus particulièrement, l'**acroléine (47)** et le **malonaldéhyde (52)** seraient issus du catabolisme et de la peroxydation d'acides gras polyinsaturés (tels que l'acide arachidonique, voir **Figure 36**).

Parmi les différents mécanismes proposés pour leur formation, certains impliquent des processus radicalaires avec des espèces réactives de l'oxygène.<sup>67</sup> Dans ces hypothèses, un radical de l'acroléine (**56**) réagirait avec un radical hydroxyle pour donner le **malonaldéhyde (52)**, tandis qu'une simple réduction donnerait accès à l'**acroléine (47)**.



**Figure 36.** Formation de l'acroléine (**47**) et du malonaldéhyde (**52**) à partir d'acides gras insaturés

v. Études de biosynthèse

Une seule véritable expérience de biosynthèse sur les composés de la famille des « 3-alkylpipéridines », plus précisément sur l'haminol-2 (**57**, **Figure 37**), a été publiée par l'équipe de Fontana.<sup>68</sup> Ainsi, l'**origine polyacétique** de ses chaînes alkyles a été mise en évidence par des études *in vivo* : des expériences de « *feeding* » ont été menées sur le mollusque producteur, *Haminoea orbignyana*. Nourri par de l'acide acétique [<sup>2-14</sup>C] ou par de l'acide nicotinique [<sup>14</sup>C], d'importants taux d'haminol-2 radiomarqué ont alors été observés.

L'équipe de Fontana a ensuite démontré plus précisément le rôle de l'**acide nicotinique (58)** comme unité de base, et celui de six molécules d'acétate comme unités d'extension, dans la biogenèse de ce composé.<sup>69</sup>

Cependant, cette étude a été réalisée sur des mollusques, et non sur des éponges. La parenté entre l'haminol-2 et les « manzamines » n'est peut-être que structurale.

<sup>67</sup> Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **1991**, *11*, 81-128.

<sup>68</sup> Cutignano, A.; Tramice, A.; De Caro, S.; Villani, G.; Cimino, G.; Fontana, A., Biogenesis of 3-Alkylpyridine Alkaloids in the Marine Mollusc *Haminoea Orbignyana*. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 2633-2636.

<sup>69</sup> Cutignano, A.; Cimino, G.; Giordano, A.; d'Ippolito, G.; Fontana, A., Polyketide origin of 3-alkylpyridines in the marine mollusc *Haminoea orbignyana*. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 2627-2629.



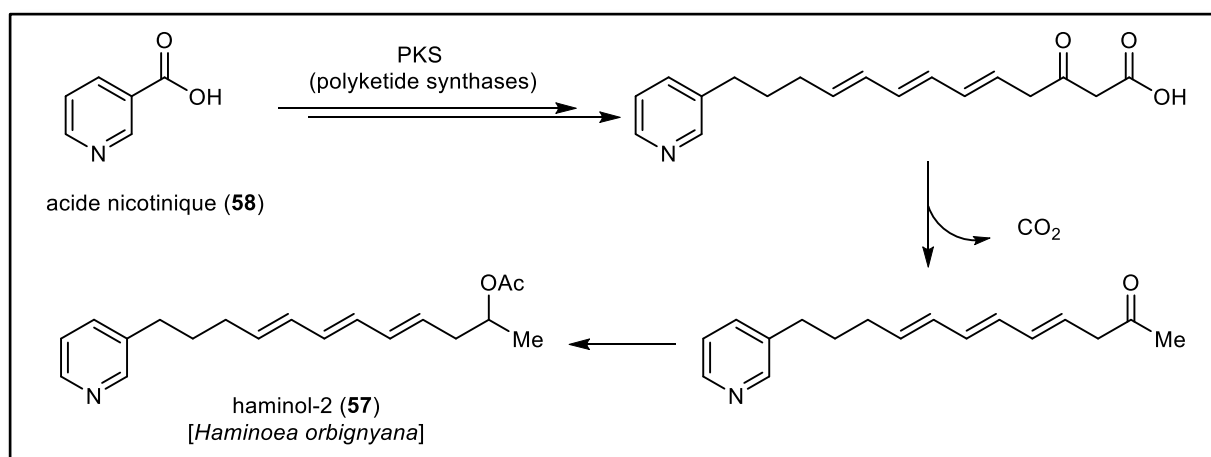


Figure 37. Biosynthèse de l'haminol-2 (57)

vi. Origine réelle des « manzamines »

Si plusieurs hypothèses ont été émises concernant la voie de biosynthèse de ces alcaloïdes, assez peu d'études se sont penchées sur la question de leur véritable **organisme producteur**. En effet, de nombreux micro-organismes vivent en association avec les éponges marines, et cette symbiose est parfois nécessaire à la production de divers métabolites spécialisés.

Néanmoins, il a été démontré en 2004 que des **Actinomycètes** isolées d'éponges des genres *Acanthostrongylophora* et *Micromonospora* étaient capables de synthétiser la manzamine A ainsi que la 8-hydroxymanzamine. Des expériences ont alors été menées afin d'identifier les gènes impliqués, notamment une amplification par *PCR* du gène codant pour la tryptophane décarboxylase (nécessaire à la formation de la tryptamine). Cependant, l'enzyme n'a pas pu être détectée dans ces bactéries lors de cette tentative.<sup>70</sup>

Plus récemment, une souche de *Micromonospora* sp. a été soumise à deux nouvelles expériences de « *feeding* ». Dans la première, de la tryptamine (59) et de l'ircinal A (60), un précurseur de la manzamine A (voir **Figure 38**), sont donnés à la bactérie, qui augmente considérablement sa production de l'alcaloïde ciblé. Dans la seconde, la tryptamine est remplacée par du tryptophane (61) : cette fois, la production de manzamine A n'augmente pas ; cela corroborant l'absence de tryptophane décarboxylase précédemment supposée.<sup>71</sup>

<sup>70</sup> Peraud, O., Isolation and characterization of a sponge-associated actinomycete that produces manzamines. Thèse, University of Maryland, College Park, 2006.

<sup>71</sup> Waters, A. L.; Peraud, O.; Kasanah, N.; Sims, J. W.; Kothalawala, N.; Anderson, M. A.; Abbas, S. H.; Rao, K. V.; Jupally, V. R.; Kelly, M.; Dass, A.; Hill, R. T.; Hamann, M. T., An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora* igens' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Frontiers in Marine Science* **2014**, *1*.

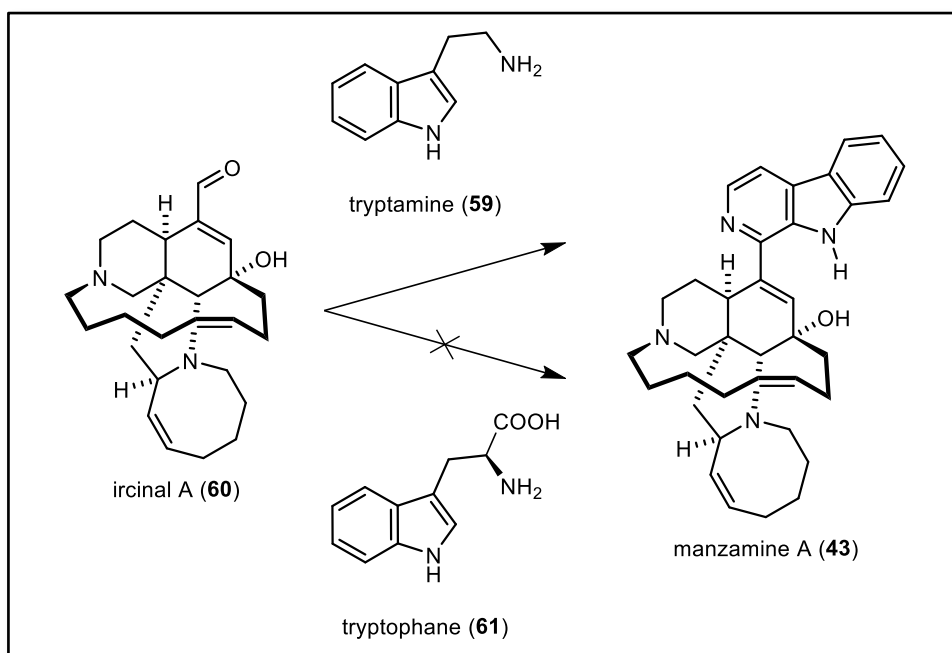


Figure 38. Expériences de « *feeding* » avec de la tryptamine (59) ou du tryptophane (61)

### c. « Défis » à relever

Outre les interrogations autour de sa réelle origine, la famille des « 3-alkylpiperidines » regroupe des composés d'une **diversité** et d'une **complexité structurales impressionnantes**, dont les voies de biosynthèse ont été particulièrement bien décrites « sur le papier ».

Cependant, **évaluer chimiquement ces scénarios**, à partir des « briques » élémentaires qui y sont décrites (acroléine (47) et malonaldéhyde (52) notamment), demeure un véritable défi au vu de leur **très forte réactivité**. De plus, le grand nombre de possibilités de combinaisons entre ces unités implique l'obtention d'un **mélange hautement complexe**, nécessitant le recours à des **outils analytiques performants** pour une exploration et une exploitation efficaces.

L'équipe s'est penchée sur ce sujet, et un programme d'évaluation des réactivités chimiques des trois hypothèses biosynthétiques (« Baldwin », « Marazano » et « Fontana ») a donc été engagé. Amorçant cette thématique au laboratoire, nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux scénarios de Baldwin et Marazano, impliquant respectivement l'acroléine (47) et le malonaldéhyde (52).





## 2) Travaux personnels

### a. Objectifs des travaux

Outre l'évaluation de la **faisabilité chimique** des différents scénarios biosynthétiques autour des alcaloïdes de type « 3-alkylpipéridines », ces travaux donc ont eu pour but de démontrer l'**employabilité des réseaux moléculaires** en synthèse organique, et notamment en « **chimie des mélanges complexes** ».

Bien connue au laboratoire, cette approche part du postulat qu'*in vivo*, les enzymes ne catalysent que des réactions qui soient thermodynamiquement faisables. De fait, elle repose sur de **petites unités de départ**, très **réactives**, pouvant **spontanément former des structures complexes** dans des conditions simples. Bien souvent, ces unités sont inspirées de celles qui sont décrites ou supposées dans les hypothèses de biosynthèse des molécules ciblées.

Cependant, tel que son nom l'indique, cette stratégie génère une **impressionnante diversité** de composés. La qualité de l'exploration et de l'exploitation de l'espace chimique ainsi créé dépend donc de l'utilisation d'**outils analytiques performants**. Dans cette optique, le recours à la technique des **réseaux moléculaires** apparaît alors comme tout à fait pertinent et novateur, d'autant plus que ces mélanges reproduisent, par bien des aspects, des métabolomes naturels ciblés.

### b. Stratégie d'application à la famille des « 3-alkylpipéridines »

#### i. Composés ciblés

Dans le cadre de ces travaux, les réseaux moléculaires ont été employés afin d'explorer des **mélanges « biosynthétiquement pertinents »**, basés sur les hypothèses émises par les équipes de Baldwin et Marazano.

Ainsi, à partir d'unités en C<sub>3</sub> (**acroléine (47)** et **malonaldéhyde (52)**), d'une amine (**butylamine (62)**) et d'un aldéhyde (**hexanal (63)**) (**Figure 39**), simplement mis en mélange, nous avons cherché à atteindre les **squelettes polycycliques** (en bleu) des composés **42 à 46**.



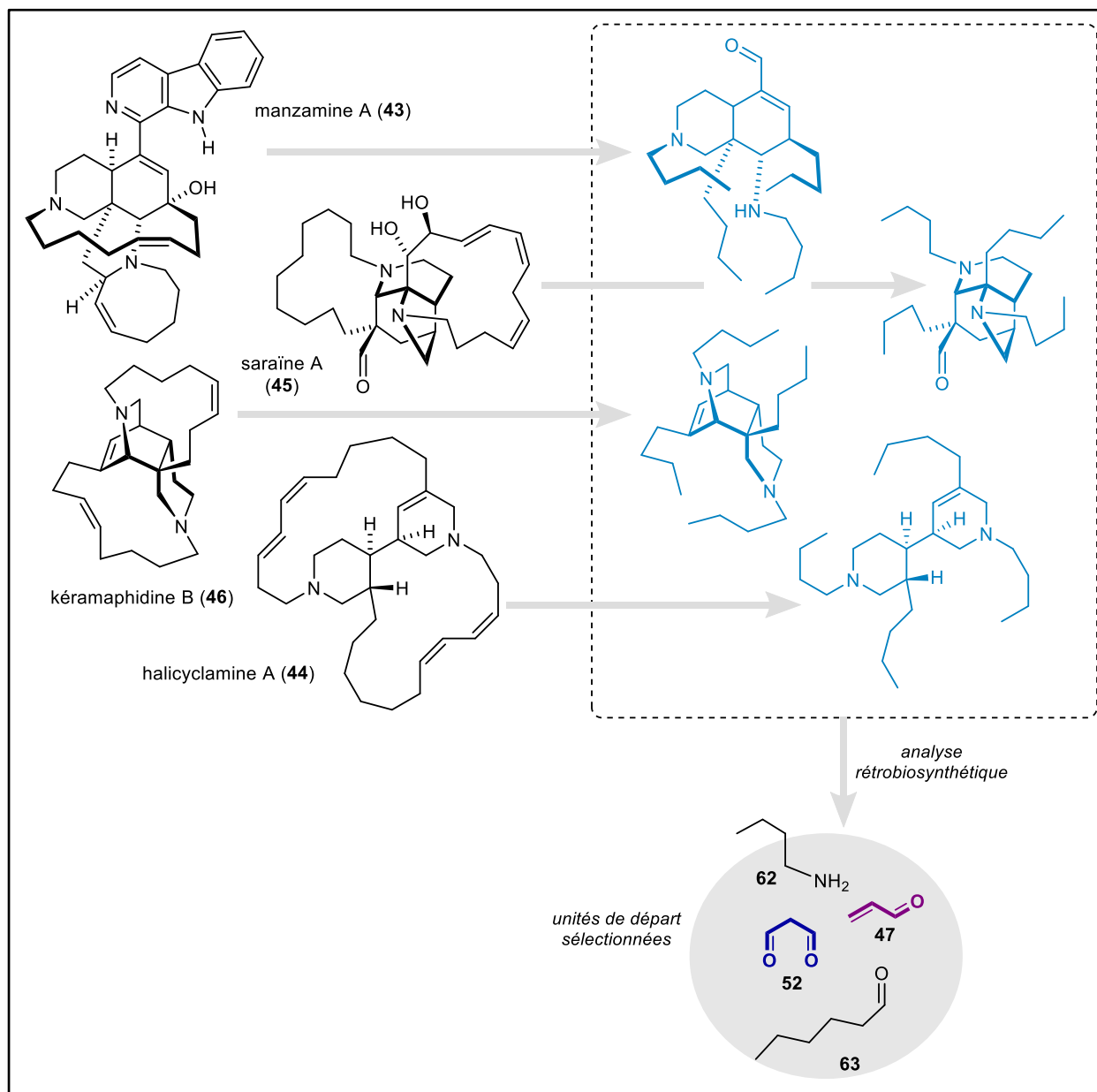


Figure 39. Unités sélectionnées et squelettes ciblés

## ii. Stratégie d'annotation

Ne possédant pas au laboratoire, comme pour l'étude de *P. nitida*, de témoins expérimentaux nous permettant l'annotation de ces réseaux, nous nous sommes appuyés sur un algorithme de **fragmentation *in silico***, le **CFM-ID**.<sup>72</sup>

Cet algorithme permet en effet de simuler le spectre ESI-SM/SM de n'importe quel composé, uniquement à partir de sa structure plane. Une fois copiée en format SMILES, celle-ci est déposée sur

<sup>72</sup> <http://cfmid.wishartlab.com/>.



la plateforme de CFM-ID, qui génère alors un fichier (format .mgf), contenant le spectre de fragmentation du composé sous la forme d'une liste d'ions fils.

Nous avons donc appliqué cette stratégie aux squelettes des alcaloïdes **43** à **46** (Figure 40).

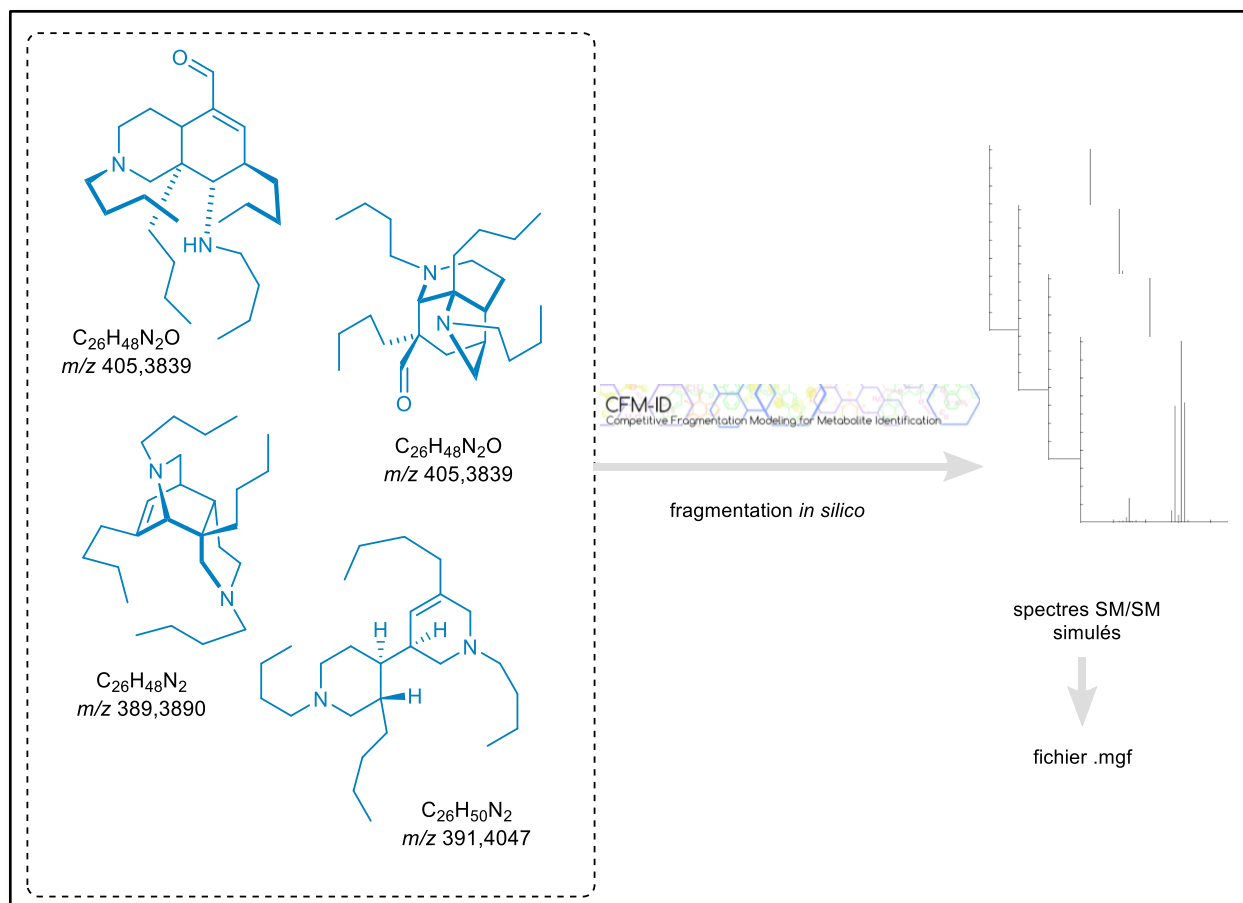


Figure 40. Fragmentation des squelettes ciblés par le CFM-ID

De plus, nous avons également synthétisé le pyridinium **64** ainsi que son analogue partiellement réduit (**65**), complétant ainsi notre panel de témoins (Figure 41). Ces deux composés sont, par ailleurs, également biosynthétiquement pertinents, **64** étant un modèle des pyridiniums de type cyclostelettamines).

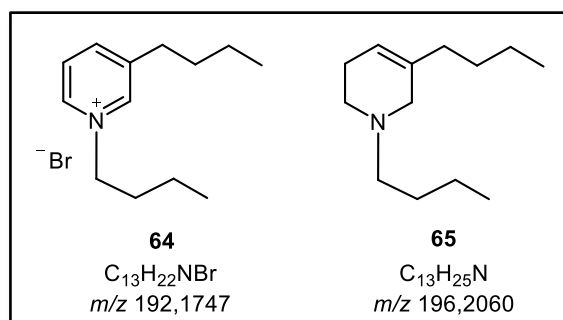


Figure 41. Composés **64** et **65** synthétisés



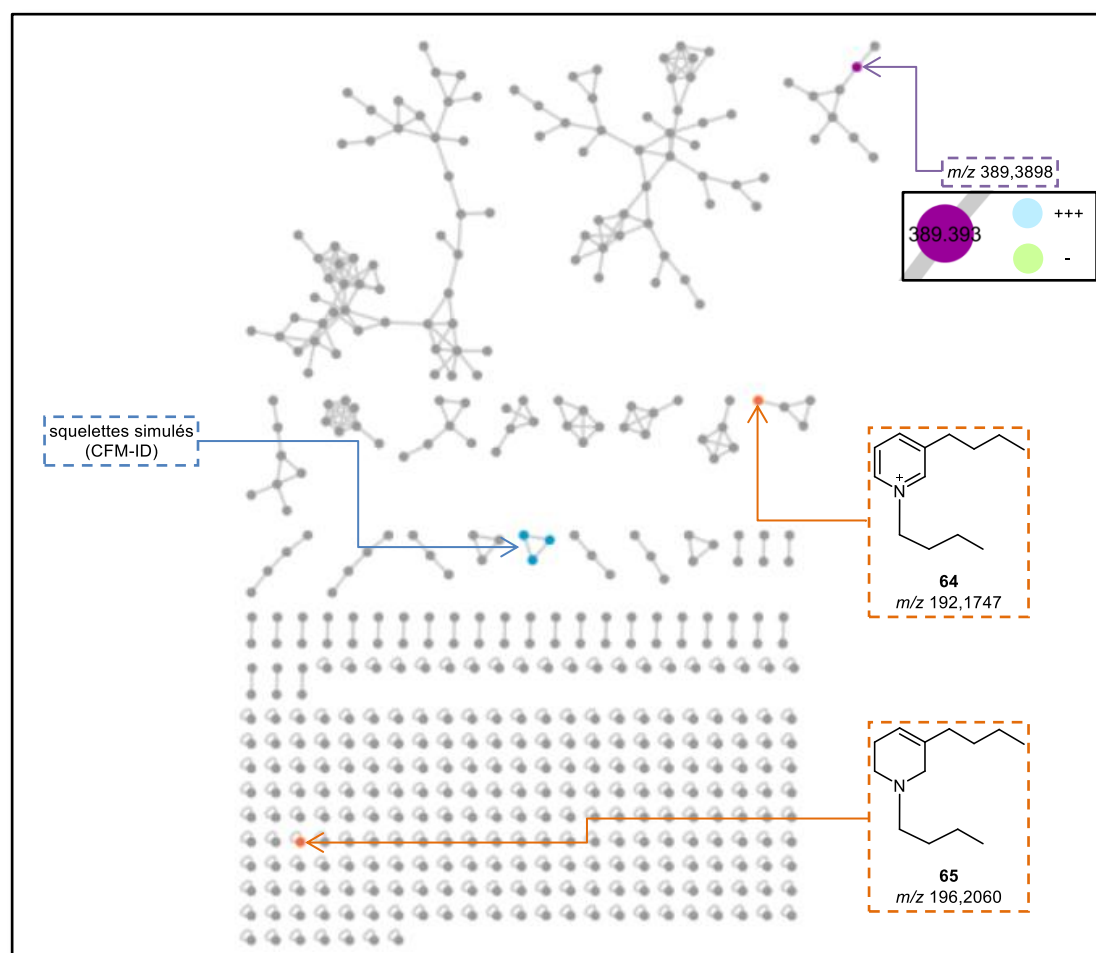
iii. Évaluation des différents scénarios

Guidés par des réseaux moléculaires ainsi annotés, nous avons dans un premier temps « criblé » différentes combinaisons de nos unités de départ afin d'évaluer les différents scénarios biosynthétiques (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Criblage des unités de départ

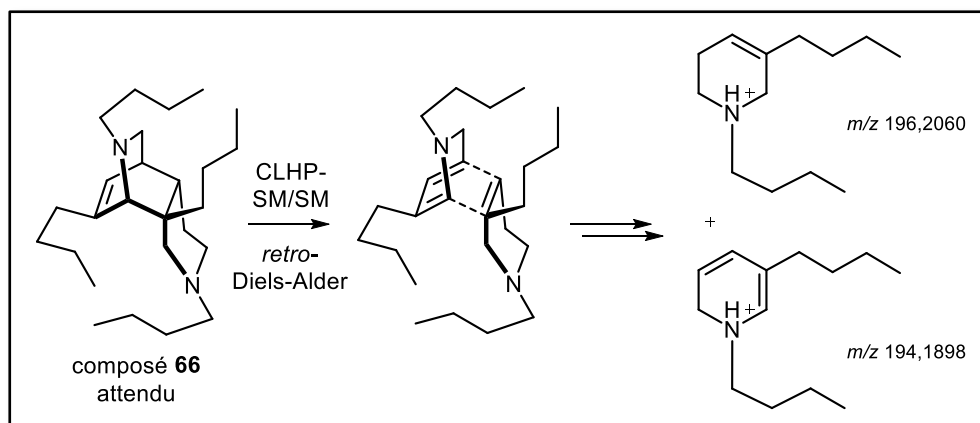
unités de départ			
	(équimolaire, 72 mmol – MeOH, NEt <sub>3</sub> puis 10 éq NaBH <sub>4</sub> )	(équimolaire, 72 mmol – MeOH, NEt <sub>3</sub> puis 10 éq NaBH <sub>4</sub> )	(équimolaire, 72 mmol – MeOH, NEt <sub>3</sub> puis 10 éq NaBH <sub>4</sub> )

Sur le réseau moléculaire obtenu (**Figure 42**, voir également **Figure 64** en annexe), les squelettes simulés (en bleu) ne se sont pas liés ou recouverts avec les composés expérimentaux (en gris). Quelques ions de nos mélanges sont liés au composé **64** synthétisé (en orange), d'après leurs rapports  $m/z$ , ce sont probablement des monomères dérivés de pyridiniums.



**Figure 42.** Réseau moléculaire correspondant au criblage des unités de départ

Cependant, un composé (**66**, en violet dans la figure précédente), de rapport  $m/z$  389,3898, correspondant à celui du **squelette de la kéramaphidine B**, a été détecté. Sa formule brute ( $C_{26}H_{48}N_2$ ) était également identique à celle du châssis désiré ; de plus, son spectre SM comportait un ion di-chargé, très fréquemment retrouvé dans les molécules arborant deux atomes d'azote basiques. Son spectre de fragmentation SM/SM semblait présenter un ion de  $m/z$  194,1898 (formule brute  $C_{13}H_{24}N$ ), explicable par une réaction de *retro*-Diels-Alder (**Figure 43**).



**Figure 43.** Possible réaction de *retro*-Diels-Alder du composé **66** en conditions de spectrométrie de masse tandem

Il a donc été ciblé pour la suite de notre étude, malgré sa distance avec le squelette simulé (en effet, le spectre SM/SM fourni par CFM-ID était assez différent du spectre expérimental, l'algorithme ne semblant pas en mesure de réaliser des réactions de *retro*-Diels-Alder notamment). Principalement présent dans le mélange « bleu » (à acroléine seule), ce sont donc les unités **47**, **62** et **63** qui ont été sélectionnées pour la suite de notre étude.

#### iv. Évaluation approfondie du modèle « acroléine »

Ayant ciblé le **squelette de type « kéramaphidine »**, nous avons ensuite réalisé ce mélange dans différentes conditions réactionnelles, afin de maximiser notre rendement (**Tableau 3**).

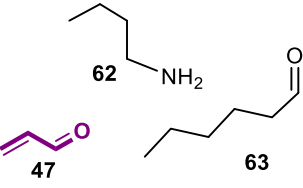
Nous nous sommes donc inspirés de plusieurs publications décrivant la synthèse de ce cœur cyclique à partir de dihydropyridiniums.<sup>73,74</sup>

<sup>73</sup> Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Heupel, F. A.; Whitehead, R. C., A biomimetic approach to the manzamine alkaloids; model studies. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, 7829-7832.

<sup>74</sup> Gil, L.; Baucherel, X.; Martin, M.-T.; Marazano, C.; Das, B. C., Model studies towards a biomimetic synthesis of keramaphidin B and halicyclamine A. *Ibid.* **1995**, 36, 6231-6234.

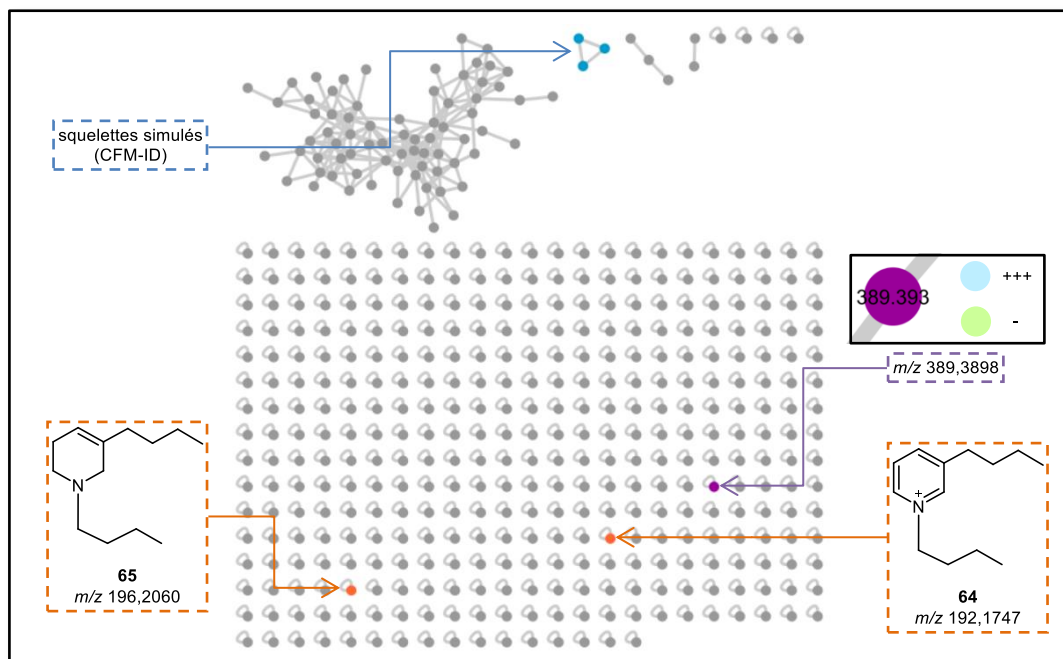


**Tableau 3.** Criblage de conditions réactionnelles

unités de départ	 (équimolaire - 72 mmol)
conditions réactionnelles	MeOH, NEt <sub>3</sub> , ± NaBH <sub>4</sub>
	DCM, NEt <sub>3</sub> , ± NaBH <sub>4</sub>
	tampon citrate (pH 4), ± NaBH <sub>4</sub>
	tampon MOPS* (pH 8), ± NaBH <sub>4</sub>

(\*MOPS : acide 3-morpholino-1-propanesulfonique)

Par un simple clic sur le nœud correspondant à notre composé ciblé, nous avons pu voir que celui-ci se formait principalement dans le mélange réalisé dans du méthanol, ce sont donc les conditions qui ont été choisies lors du passage à grande échelle (décrit dans la partie expérimentale).

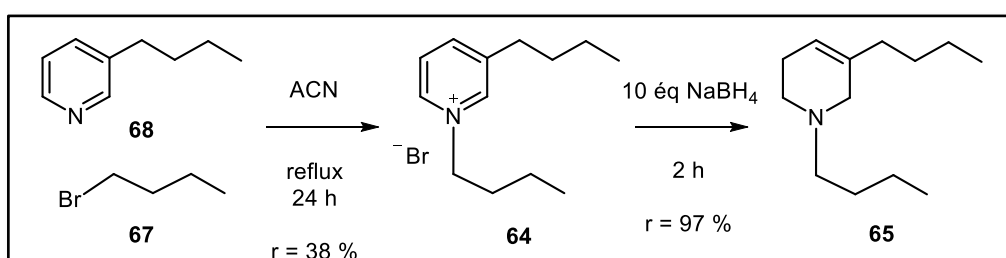
**Figure 44.** Réseau moléculaire correspondant au criblage de conditions réactionnelles

En revanche, les différentes conditions testées ne nous ont pas permis d'obtenir des composés se rapprochant davantage des squelettes simulés (**Figure 44**, voir également **Figure 65** en annexe).

### c. Résultats et composés synthétisés

#### i. « Sondes » moléculaires

Tout d'abord, nous avons synthétisé les composés **64** et **65**, en vue d'enrichir notre annotation. Ceux-ci s'obtiennent aisément (**Figure 45**) : le pyridinium **64** à partir de bromobutane (**67**) et de 3-butylpyridine (**68**), puis le composé **65** par réduction au  $\text{NaBH}_4$  de **64**, ce qui sera détaillé dans la partie expérimentale.



**Figure 45.** Synthèse des composés **64** et **65**

#### ii. Synthèse et isolement du composé 66'

Dans notre mélange aux conditions optimisées, nous avons principalement ciblé le composé **66** (**Figure 46**). Après plusieurs étapes d'isolement (chromatographies flash et préparative, voir partie expérimentale), nous avons pu procéder à l'élucidation complète de sa structure, par RMN 1D et 2D.

Nous avons rapidement remarqué l'absence du signal  $^1\text{H}$  caractéristique de la double liaison du composé attendu (aux alentours de 5 ppm), puisque notre spectre était intégralement compris entre 0 et 3 ppm. De plus, ce faible écart entre les protons de la molécule a considérablement compliqué notre étude, nous avons donc notamment recouru à une HSQC-TOCSY afin d'élucider le cœur cyclique du composé.

Celui-ci s'est alors avéré assez différent du squelette attendu (**Figure 46**).



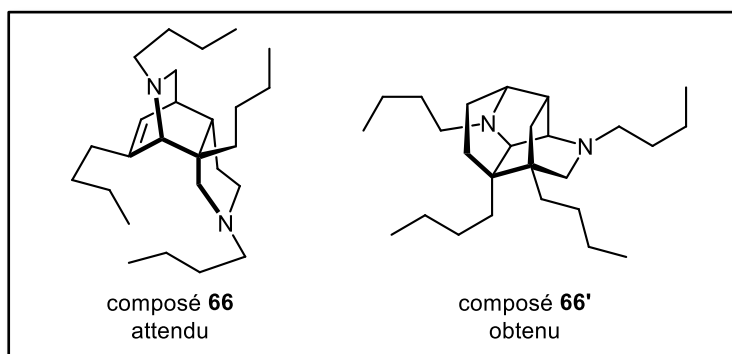


Figure 46. Composé **66** attendu et observé

iii. Mécanisme de formation du composé **66'**

En effet, après analyse du mécanisme de formation probable de notre composé, nous avons constaté que l'acroléine (**47**) ne réagissait pas directement avec la butylamine (**62**) (addition 1,4 de Michael initialement prévue – voir **Figure 47**).

Celle-ci semble réagir dans un second temps, avec l'énamine **69**, elle-même formée par condensation de la butylamine et de l'hexanal (**Figure 48**), puis par une addition 1,2 de Michael.

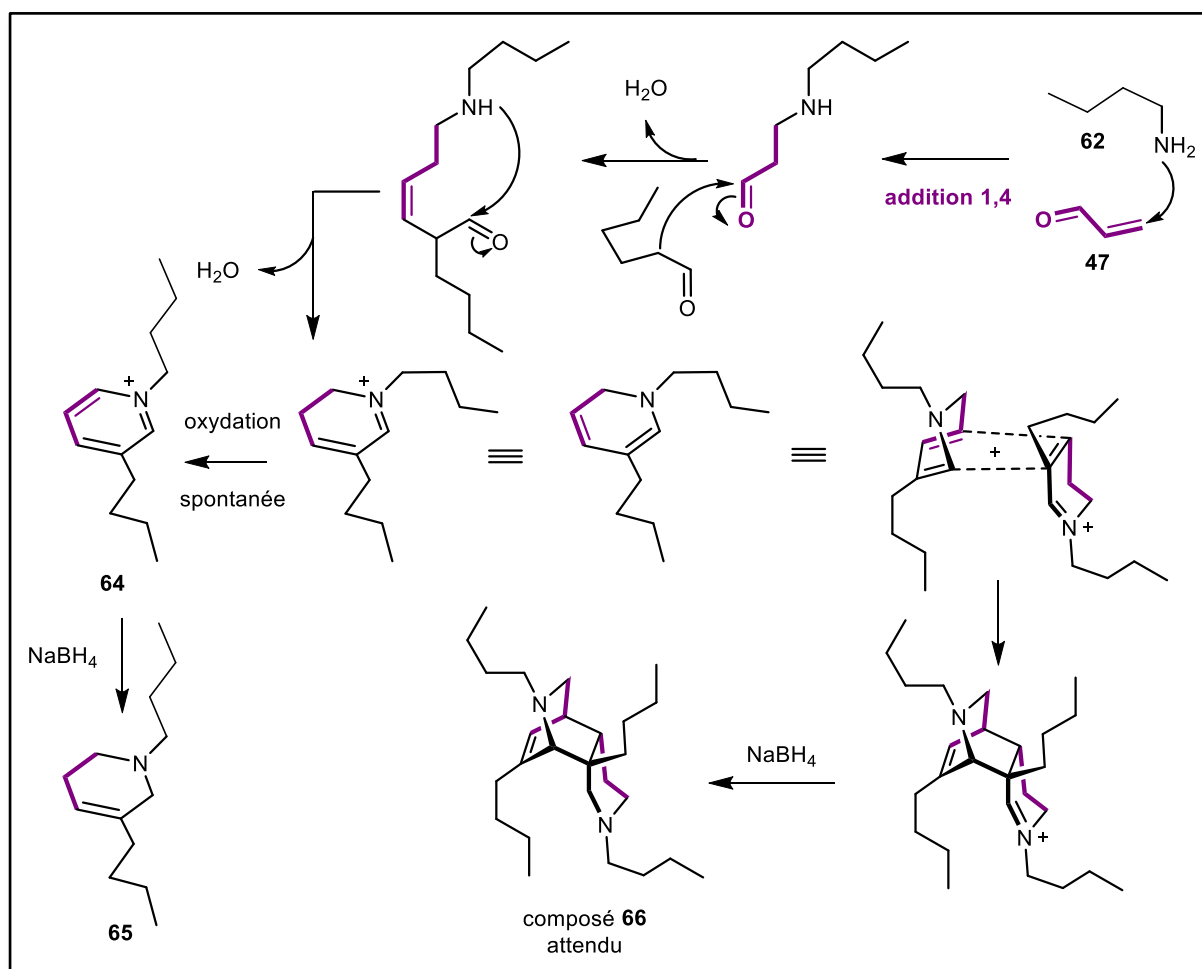


Figure 47. Voie de formation attendue du composé **66**





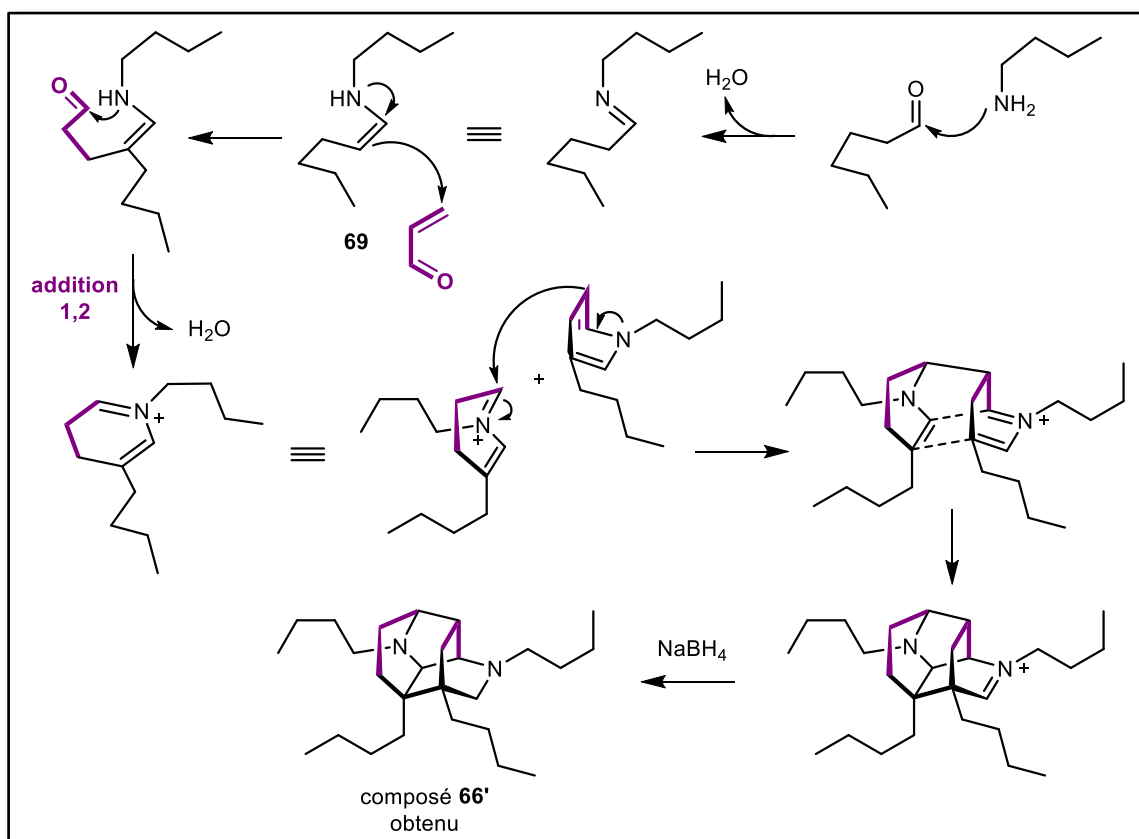


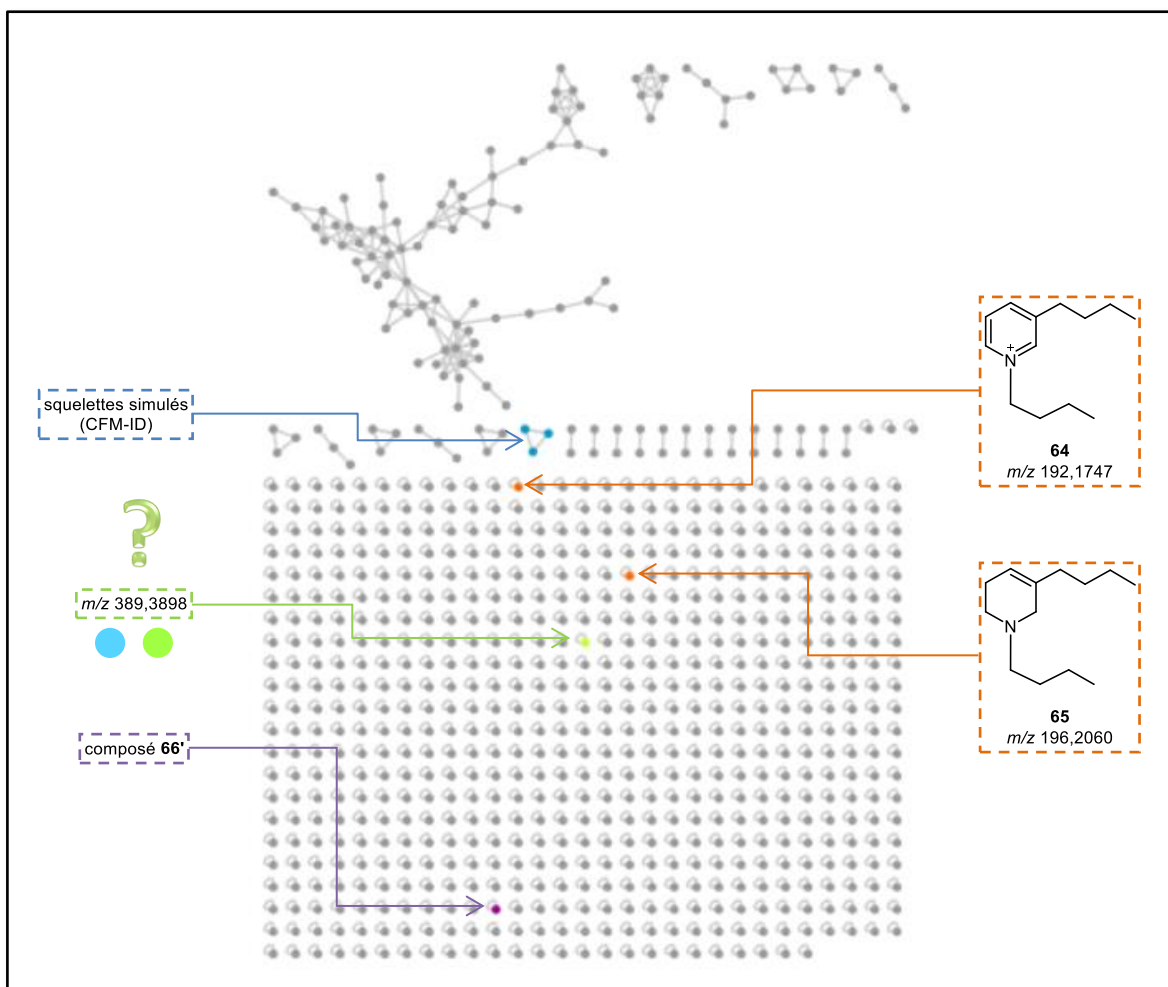
Figure 48. Voie de formation supposée du composé 66' formé

Nous avons donc décidé de réaliser de nouveaux mélanges en fixant l'ordre d'ajout des réactifs, afin que la butylamine et l'acroléine réagissent en premier dans notre milieu (**Tableau 4**).

Tableau 4. Adaptation du mode opératoire

Ajout des unités de départ	47, 62 et 63 simultanément	47, 62 puis 63 après 1 min	47, 62 puis 63 après 10 min
Conditions réactionnelles	MeOH, $NEt_3$ , $\pm NaBH_4$	MeOH, $NEt_3$ , $\pm NaBH_4$	MeOH, $NEt_3$ , $\pm NaBH_4$
	DCM, $NEt_3$ , $\pm NaBH_4$	DCM, $NEt_3$ , $\pm NaBH_4$	DCM, $NEt_3$ , $\pm NaBH_4$
	Sans solvant, $\pm NaBH_4$	Sans solvant, $\pm NaBH_4$	Sans solvant, $\pm NaBH_4$
	Tampon citrate (pH 4), $\pm NaBH_4$	Tampon citrate (pH 4), $\pm NaBH_4$	Tampon citrate (pH 4), $\pm NaBH_4$
	Tampon MOPS (pH 8), $\pm NaBH_4$	Tampon MOPS (pH 8), $\pm NaBH_4$	Tampon MOPS (pH 8), $\pm NaBH_4$





**Figure 49.** Réseau moléculaire correspondant au second criblage de conditions réactionnelles (représentées dans le tableau précédent)

Un nouvel ion de  $m/z$  389,3898, visiblement différent du premier composé synthétisé, est alors formé ; les efforts d'isolement afin de l'obtenir en quantité suffisante pour une élucidation structurale sont en cours (**Figure 49**, voir également **Figure 66** en annexe).

Par ailleurs, d'autres composés dimériques (hautes masses, formule brute à deux azotes et ion di-chargé sur le spectre SM), avaient été ciblés dès notre premier mélange. Néanmoins, ces molécules étant particulièrement difficiles à isoler – notamment en raison de l'absence d'absorption dans l'UV – et à caractériser par RMN – comme mentionné lors de la description du produit **66'** – nous n'avons pas pu élucider d'autre structure lors de cette étude.



### 3) Conclusions, ouvertures et critiques

Lors de ces travaux, les **réseaux moléculaires** ont été mis à l'épreuve de la synthèse organique, et plus particulièrement à la **chimie en mélanges complexes**. Cet outil, enrichi par l'algorithme de **fragmentation *in silico* CFM-ID**, nous ont effectivement permis de cribler quantité de mélanges et de conditions réactionnelles associées. L'annotation *in silico*, du fait de son incapacité à générer des produits de *retro*-Diels-Alder notamment, n'a malheureusement pas pu réellement guider notre démarche. Cependant, l'algorithme pouvant s'enrichir et s'améliorer au fil de son utilisation, ce défaut sera sans doute rapidement corrigé.

De plus, deux molécules témoins ont été synthétisées afin de compléter notre annotation, tout en nous permettant de représenter un autre squelette biosynthétiquement pertinent, celui des cyclostelettamines. Elles nous ont permis d'identifier dans notre premier réseau de probables monomères dérivés de pyridiniums.

Par la suite, un composé (**66'**) sensiblement **analogue aux squelettes désirés** a été formé, puis isolé et caractérisé. L'élucidation structurale ainsi qu'une analyse rétrosynthétique de cette molécule hautement complexe nous a permis de **repenser notre stratégie** et de tester de nouveaux mélanges. Ceux-ci semblent présenter un **nouveau composé**, de même *m/z* que la molécule **66**, mais peut-être plus proche structuralement des squelettes naturels attendus. Pour faciliter l'annotation des réseaux moléculaires correspondants, le composé attendu **66** est d'ailleurs en cours de synthèse par voie conventionnelle.

Néanmoins, il serait intéressant d'utiliser la molécule **66'** synthétisée comme « **sonde** » lors de futures études d'éponges – ou de bactéries – marines, car bien qu'aucun produit naturel n'ait encore été isolé avec ce châssis, il pourrait tout de même exister naturellement. De plus, d'autres composés dimériques analogues ont été formés dans nos mélanges ; les efforts d'isolement dans cette voie pourraient donc également être poursuivis.

Enfin, afin de faciliter la formation des véritables squelettes désirés, nous avons envisagé un mélange impliquant un **aminopentadiène (70)** comme unité de départ ; de fait, ceux-ci sont également postulés dans les travaux de l'équipe de Marazano. Ce composé peut s'obtenir *via* l'intermédiaire **71**, appelé un **sel de Zincke**, lui-même facilement formé à partir de 3-butylpyridine (**68**) et de 1-chloro-3,4-dinitrobenzène (**72**, **Figure 50**).



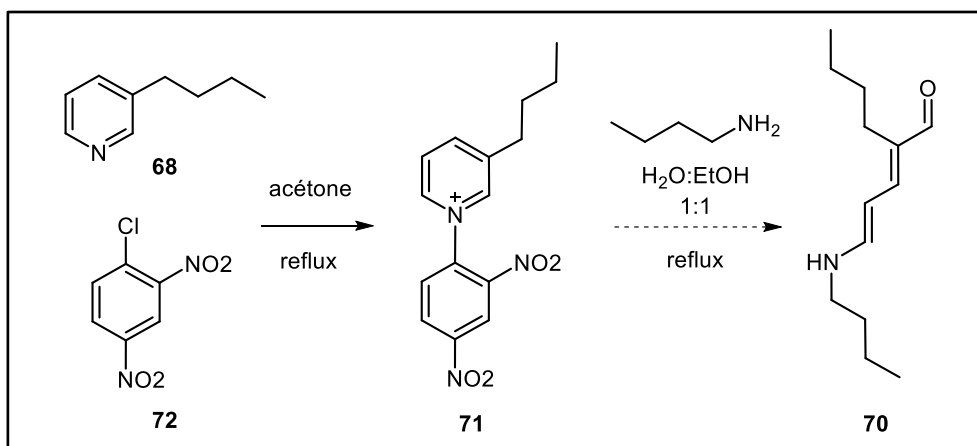


Figure 50. Formation du sel de Zincke (71) et de l'aminopentadiène (70)

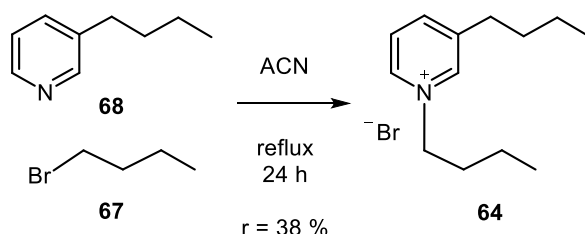
Pouvant théoriquement donner accès aux châssis de tous les alcaloïdes de type « 3-alkylpipéridines », ce composé **70** pourrait permettre l'accès à de nouveaux criblages et de nouveaux réseaux, très probablement riches en composés d'intérêt.



## 4) Partie expérimentale

### a. Synthèse des composés 64 et 65

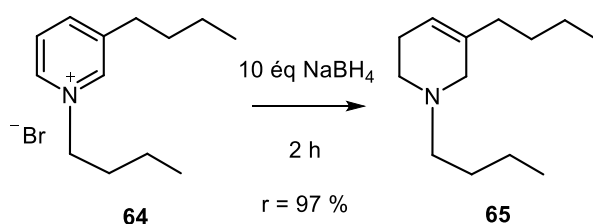
#### i. Synthèse du pyridinium 64



De la 3-butylpyridine (0,55 mL, 3,7 mmol, 1 éq) est mise en réaction avec du 1-bromobutane (0,39 mL, 3,7 mmol, 1 éq), dans de l'acétonitrile (3 mL) porté au reflux. Après 24 heures, le milieu réactionnel est évaporé et le résidu huileux lavé au cyclohexane (3 fois 10 mL). On obtient ainsi le composé **64** (382 mg) sous forme d'une huile jaune claire.

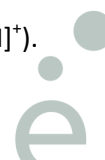
Composé **64** : 382 mg (38,1 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) -  $\delta$  : 1,07 (t,  $J = 7,6$  Hz, 3H) ; 1,12 (t,  $J = 7,6$  Hz, 3H) ; 1,55 (oct,  $J = 7,2$  Hz, 4H) ; 1,90 (quint,  $J = 7,2$  Hz, 2H) ; 2,25 (quint,  $J = 7,2$  Hz, 2H) ; 3,14 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H) ; 4,96 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H) ; 8,35 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H) ; 8,76 (dl,  $J = 7,2$  Hz, 1H) ; 9,14 (d,  $J = 5,9$  Hz, 1H) ; 9,23 (sl, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) -  $\delta$  : 13,6 ; 13,9 ; 19,3 ; 22,0 ; 32,2 ; 32,5 ; 33,4 ; 61,9 ; 128,5 ; 142,4 ; 144,0 ; 144,6 ; 146,0. MS-ESIHR : 192,1685 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

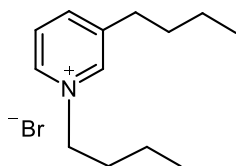
#### ii. Composé 65



Le composé **64** (150 mg, 0,55 mmol, 1 éq) est dissous dans du méthanol (5 mL), puis du tétrahydroborate de sodium est ajouté lentement (208 mg, 5,5 mmol, 10 éq). Après 2 heures, la solution est évaporée, puis une extraction liquide-liquide est réalisée (dichlorométhane : eau, 1 : 1, 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées et évaporées ; on obtient alors le composé **65** (104 mg).

Composé **65** : 104 mg (96,5 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) -  $\delta$  : 0,82 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H) ; 0,85 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H) ; 1,24 (m, 6H) ; 1,45 (m, 2H) ; 1,85 (tl,  $J = 6,7$  Hz, 2H) ; 2,07 (m, 2H) ; 2,31 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H) ; 2,41 (t,  $J = 5,8$  Hz, 2H) ; 2,76 (m, 2H) ; 5,35 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) -  $\delta$  : 14,0 ; 14,2 ; 21,0 ; 22,6 ; 29,4 ; 30,0 ; 35,2 ; 50,3 ; 56,0 ; 58,6 ; 118,7 ; 136,4. MS-ESIHR : 196,1990 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).



**Composé 64****C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sup>+</sup> Br<sup>-</sup>****M = 272,2300****Aspect : huile jaune****MS-ESIHR : 192,1685 ([M+H]<sup>+</sup>)**

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ : 1,07 (t, J = 7,6 Hz, 3H) ; 1,12 (t, J = 7,6 Hz, 3H) ; 1,55 (oct, J = 7,2 Hz, 4H) ; 1,90 (quint, J = 7,2 Hz, 2H) ; 2,25 (quint, J = 7,2 Hz, 2H) ; 3,14 (t, J = 7,6 Hz, 2H) ; 4,96 (t, J = 7,6 Hz, 2H) ; 8,35 (t, J = 7,2 Hz, 1H) ; 8,76 (dl, J = 7,2 Hz, 1H) ; 9,14 (d, J = 5,9 Hz, 1H) ; 9,23 (sl, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :** 13,6 ; 13,9 ; 19,3 ; 22,0 ; 32,2 ; 32,5 ; 33,4 ; 61,9 ; 128,5 ; 142,4 ; 144,0 ; 144,6 ; 146,0.





Figure 51. Spectre  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) du composé 64

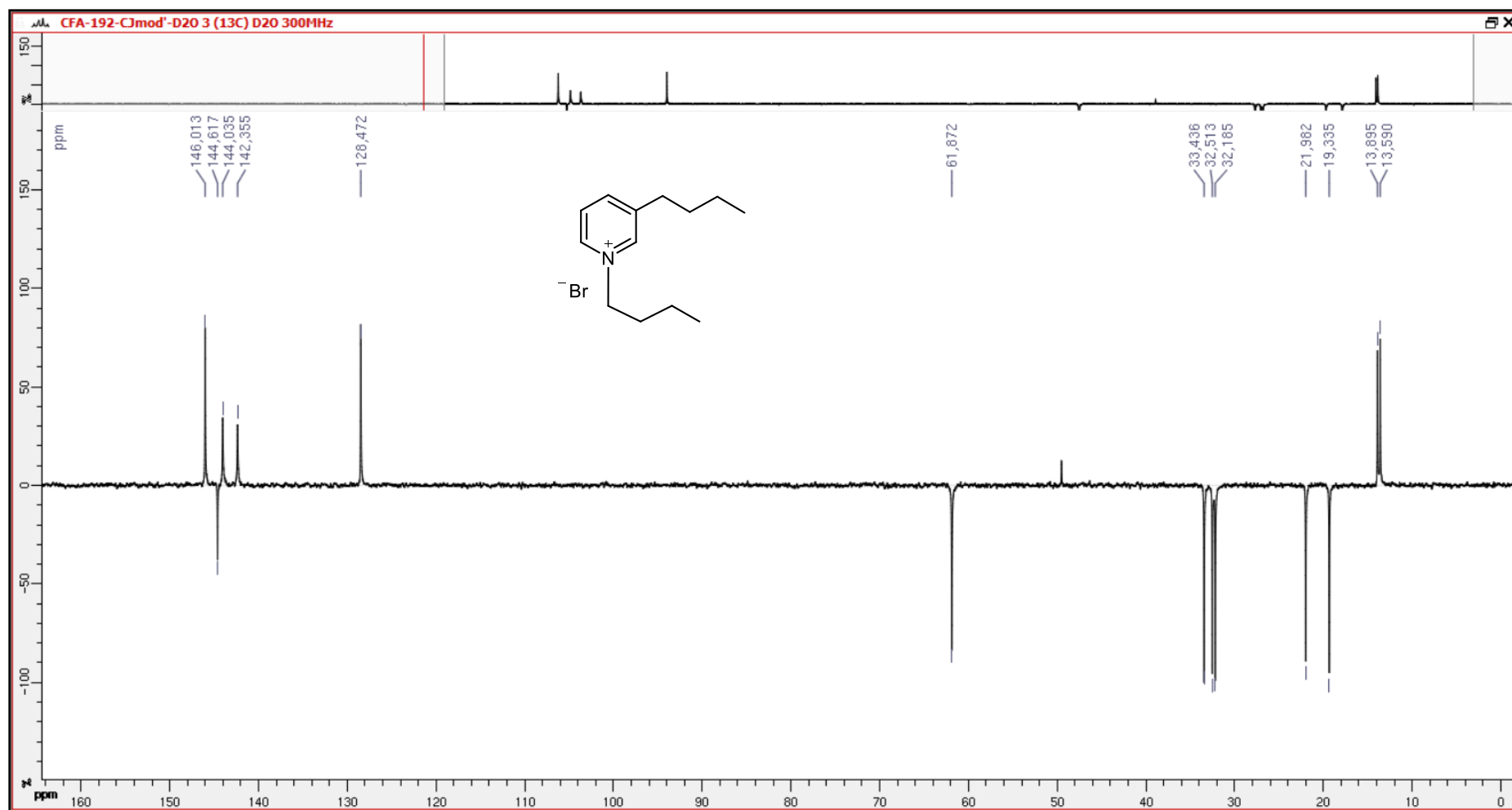
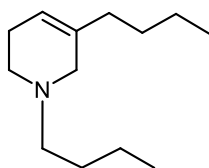


Figure 52. Spectre  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz) du composé 64



**Composé 65****C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N****M = 195,3500****Aspect : huile jaune****MS-ESIHR : 196,1990 ([M+H]<sup>+</sup>)**

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 0,82 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 0,85 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 1,24 (m, 6H) ; 1,45 (m, 2H) ; 1,85 (tl, J = 6,7 Hz, 2H) ; 2,07 (m, 2H) ; 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 2H) ; 2,41 (t, J = 5,8 Hz, 2H) ; 2,76 (m, 2H) ; 5,35 (m, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 14,0 ; 14,2 ; 21,0 ; 22,6 ; 29,4 ; 30,0 ; 35,2 ; 50,3 ; 56,0 ; 58,6 ; 118,7 ; 136,4.



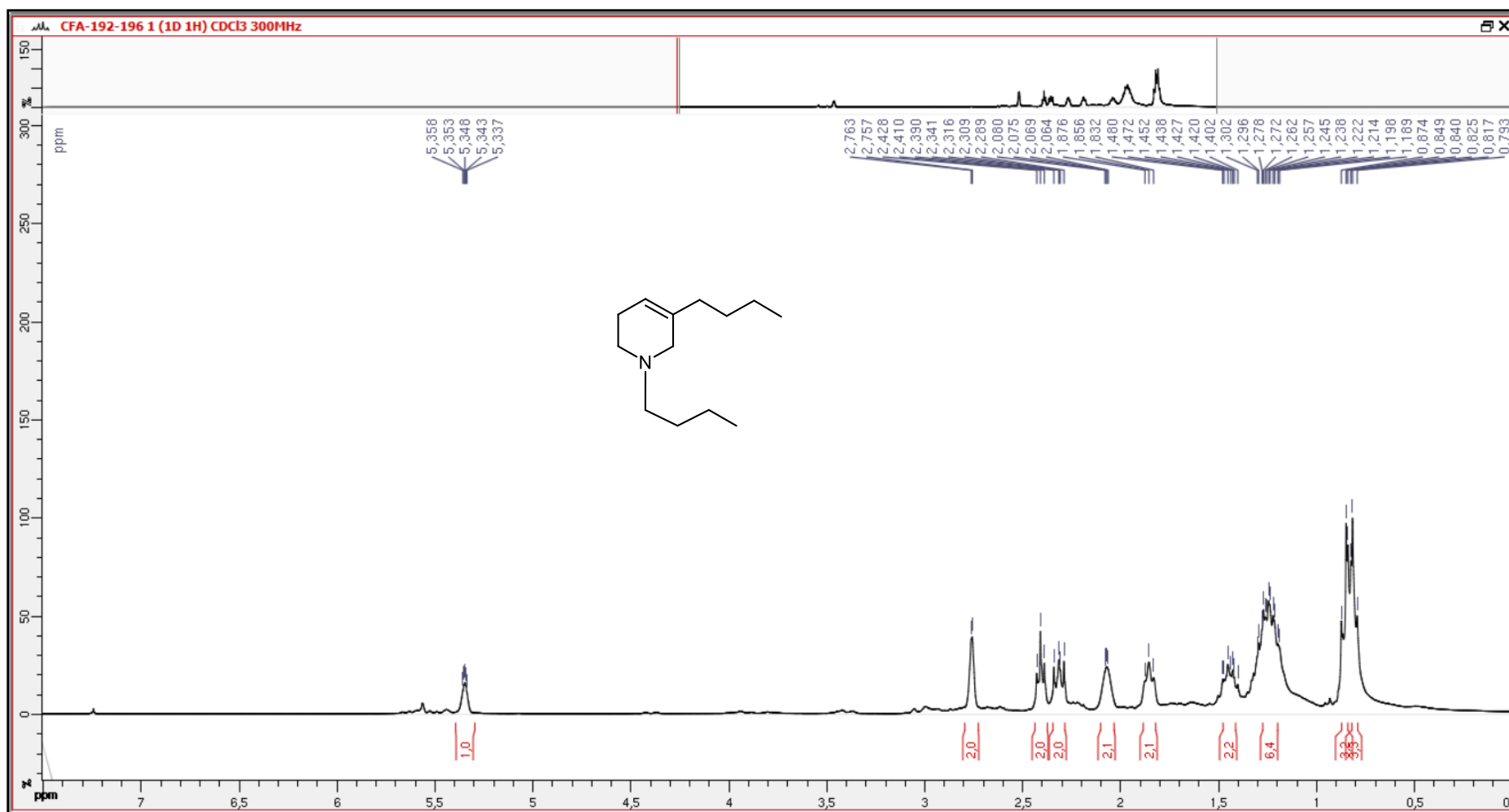


Figure 53. Spectre <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) du composé 65

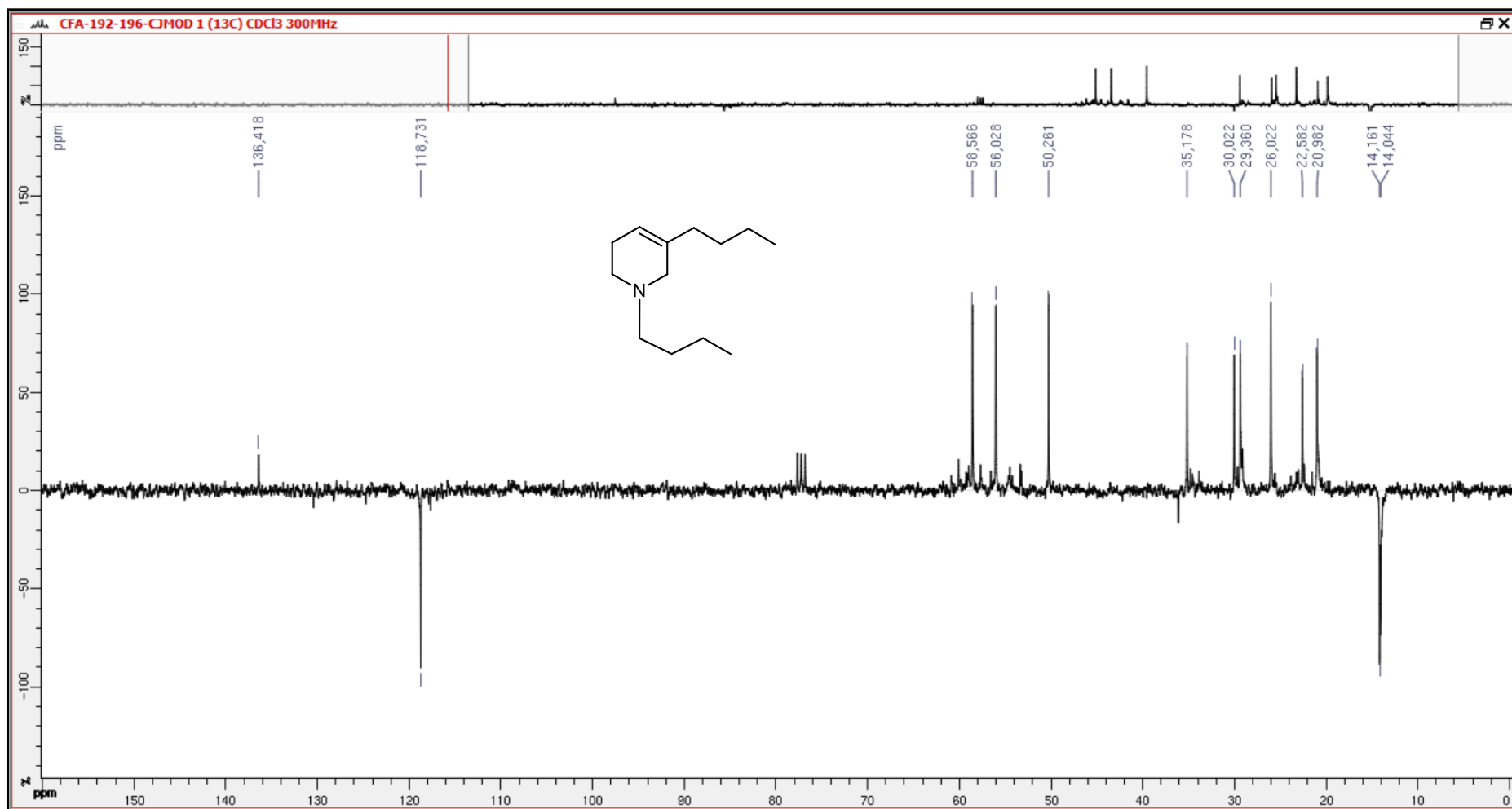
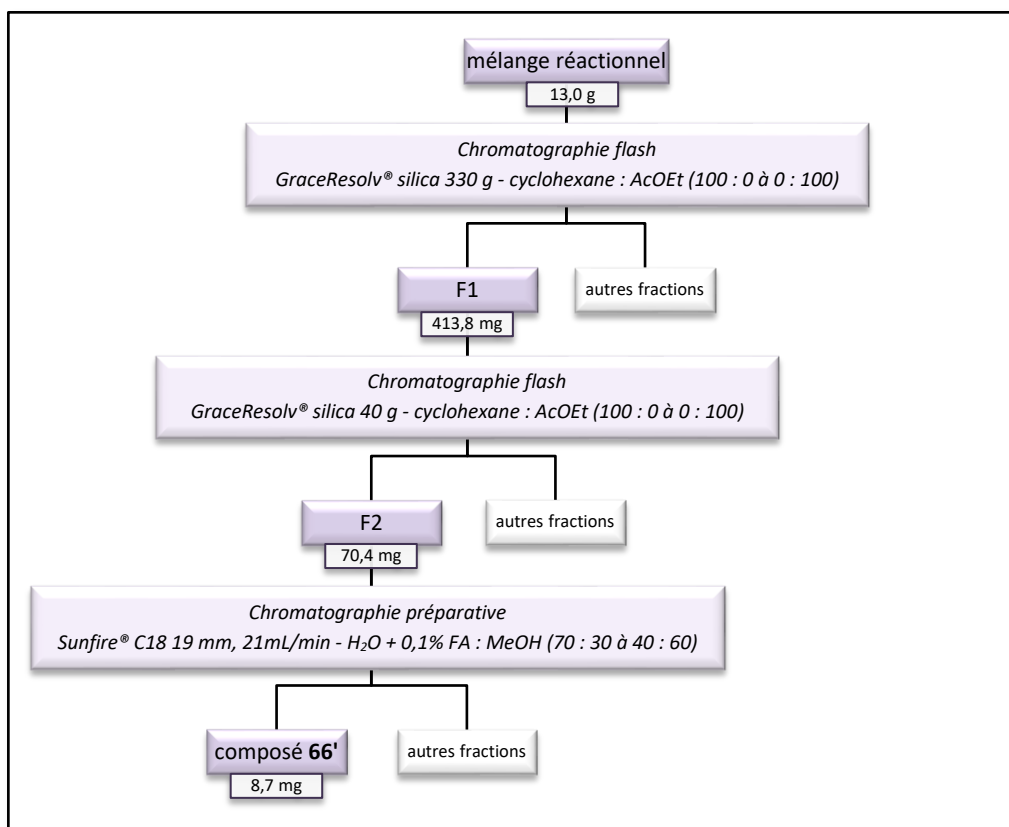


Figure 54. Spectre  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) du composé 65

### b. Isolement du composé 66' et analyses CLHP-SM/SM

Une solution de butylamine (7,1 mL, 72 mmol, 1 éq), d'hexanal (8,8 mL, 72 mmol, 1 éq) et d'acroléine distillée (5,0 mL, 72 mmol, 1 éq) dans du méthanol (2 L) est agitée à température ambiante pendant 2 heures. De la triéthylamine (4,0 mL, 43,2 mmol, 0,6 éq) y est ensuite ajoutée lentement, et l'agitation se poursuit pendant 4 heures. Du tétrahydroborate de sodium (13,7 g, 360 mmol, 5 éq) est enfin ajouté précautionneusement au milieu réactionnel et celui-ci est agité pendant 2 nouvelles heures.

La solution est évaporée, puis le résidu est dissout dans du dichlorométhane (750 mL) afin de réaliser une extraction liquide-liquide avec de l'eau (3 fois 750 mL). La phase organique est alors récupérée, séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Une huile jaune pâle (13,0 g) est ainsi obtenue. Après plusieurs étapes de purification détaillées dans le schéma suivant (**Figure 55**), on obtient le composé **66'** (8,7 mg).



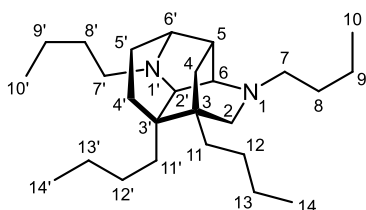
**Figure 55.** Schéma de fractionnement du mélange réactionnel

Composé **66'** : 8,7 mg (0,03%). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - δ : 0,88 (H-10, -10', -14 et -14', t, J = 6,9 Hz, 12H) ; 1,13 (H-12', m, 2H) ; 1,18 (H-12α, m, 1H) ; 1,23 (H-18 et -5'α, m, 2+1H) ; 1,25 (H-4α et -12β, m, 2x1H) ; 1,26 (H-13', m, 2H) ; 1,27 (H-11', m, 2H) ; 1,29 (H-9 et -11, m, 2x2H) ; 1,33 (H-9', m, 2H) ; 1,34 (H-8', m, 2H) ; 1,35 (H-4'α, m, 1H) ; 1,45 (H-8, q, J = 7,3 Hz, 2H) ; 1,53 (H-4β, m, 1H) ; 1,64



(H-4'β, ddd, J = 13,3 ; 9,9 ; 9,3 Hz, 1H) ; 1,82 (H-5'β, ddd, J = 13,3 ; 9,9 ; 4,0 Hz, 1H) ; 2,00 (H-2', sl, 1H) ; 2,30 (H-5, q, J = 5,3 Hz, 1H) ; 2,53 (H-2 et -7'α, m, 2x1H) ; 2,64 (H-6, dl, J = 5,9 Hz, 1H) ; 2,72 (H-7'β, m, 1H) ; 2,76 (H-7, m, 2H) ; 2,80 (H-6', m, 1H) ; 2,97 (H-2β, dd, J = 11,1 ; 1,8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - δ : 14,1 ; 14,2 ; 14,3 ; 14,4 (C10, 10', 14, 14') ; 19,1 (C-5') ; 20,6 (C-9 et -9') ; 23,9 (C-13') ; 24,0 (C-13) ; 26,2 (C-12') ; 26,6 (C-12) ; 27,5 (C-4') ; 30,5 (C-8) ; 31,5 (C-8') ; 33,9 (C-4) ; 35,6 (C-11') ; 37,6 (C-5) ; 38,3 (C-11) ; 40,9 (C-3') ; 42,0 (C-3) ; 52,1 (C-7') ; 53,7 (C-6') ; 56,0 (C-2) ; 57,2 (C-7) ; 59,1 (C-6) ; 62,4 (C-2'). MS-ESIHR : 389,3898 ([M+H]<sup>+</sup>).



**Composé 66'****C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>****M = 388,6840****Aspect : huile jaune****MS-ESIHR : 389,3898 ([M+H]<sup>+</sup>)**

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 0,88 (H-10, -10', -14 et -14', t, J = 6,9 Hz, 12H) ; 1,13 (H-12', m, 2H) ; 1,18 (H-12 $\alpha$ , m, 1H) ; 1,23 (H-18 et -5' $\alpha$ , m, 2+1H) ; 1,25 (H-4 $\alpha$  et -12 $\beta$ , m, 2x1H) ; 1,26 (H-13', m, 2H) ; 1,27 (H-11', m, 2H) ; 1,29 (H-9 et -11, m, 2x2H) ; 1,33 (H-9', m, 2H) ; 1,34 (H-8', m, 2H) ; 1,35 (H-4' $\alpha$ , m, 1H) ; 1,45 (H-8, q, J = 7,3 Hz, 2H) ; 1,53 (H-4 $\beta$ , m, 1H) ; 1,64 (H-4' $\beta$ , ddd, J = 13,3 ; 9,9 ; 9,3 Hz, 1H) ; 1,82 (H-5' $\beta$ , ddd, J = 13,3 ; 9,9 ; 4,0 Hz, 1H) ; 2,00 (H-2', sl, 1H) ; 2,30 (H-5, q, J = 5,3 Hz, 1H) ; 2,53 (H-2 et -7' $\alpha$ , m, 2x1H) ; 2,64 (H-6, dl, J = 5,9 Hz, 1H) ; 2,72 (H-7' $\beta$ , m, 1H) ; 2,76 (H-7, m, 2H) ; 2,80 (H-6', m, 1H) ; 2,97 (H-2 $\beta$ , dd, J = 11,1 ; 1,8 Hz, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 14,1 ; 14,2 ; 14,3 ; 14,4 (C10, 10', 14, 14') ; 19,1 (C-5') ; 20,6 (C-9 et -9') ; 23,9 (C-13') ; 24,0 (C-13) ; 26,2 (C-12') ; 26,6 (C-12) ; 27,5 (C-4') ; 30,5 (C-8) ; 31,5 (C-8') ; 33,9 (C-4) ; 35,6 (C-11') ; 37,6 (C-5) ; 38,3 (C-11) ; 40,9 (C-3') ; 42,0 (C-3) ; 52,1 (C-7') ; 53,7 (C-6') ; 56,0 (C-2) ; 57,2 (C-7) ; 59,1 (C-6) ; 62,4 (C-2').



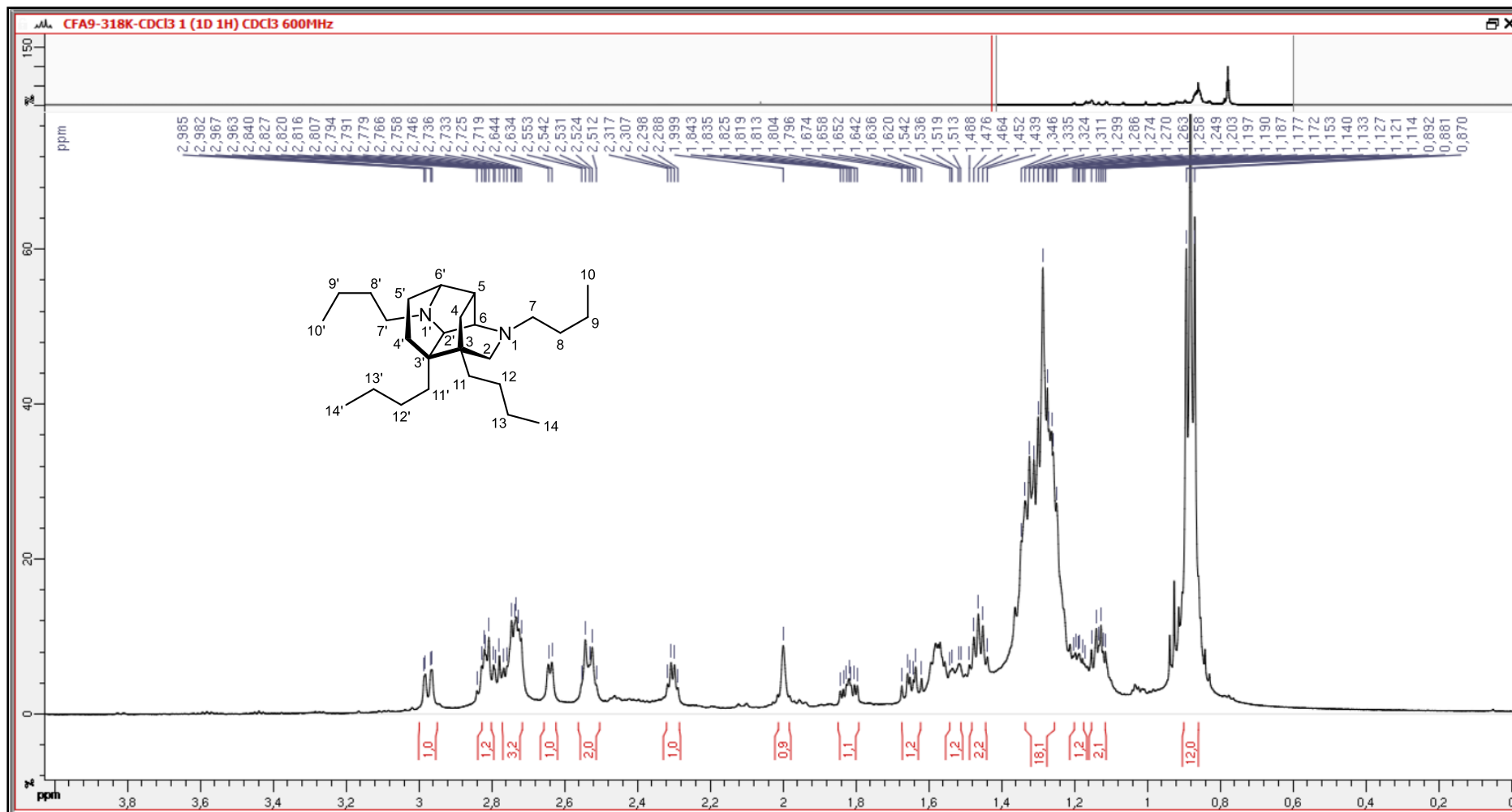


Figure 56. Spectre <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) du composé 66'

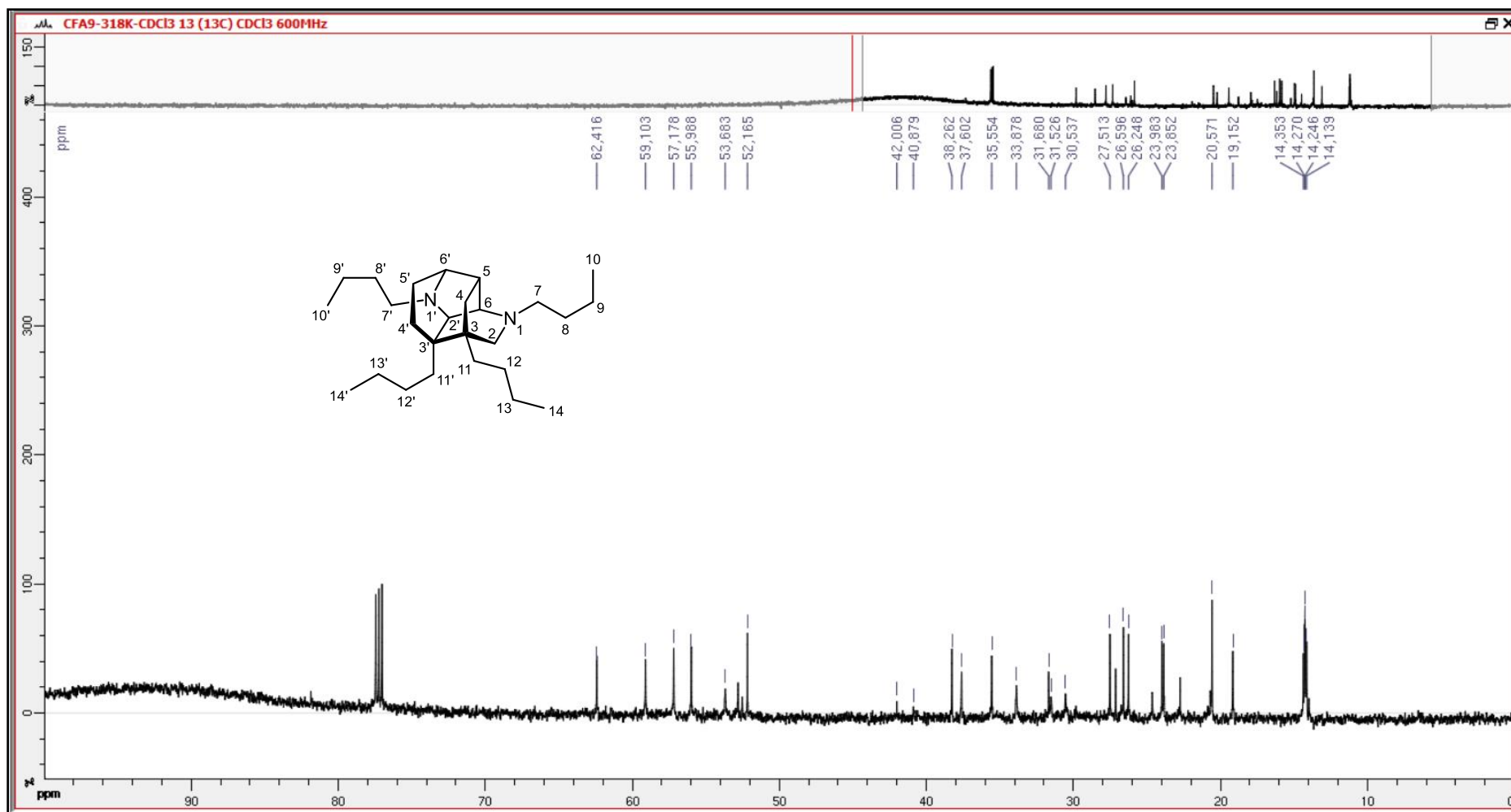


Figure 57. Spectre  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) du composé **66'**



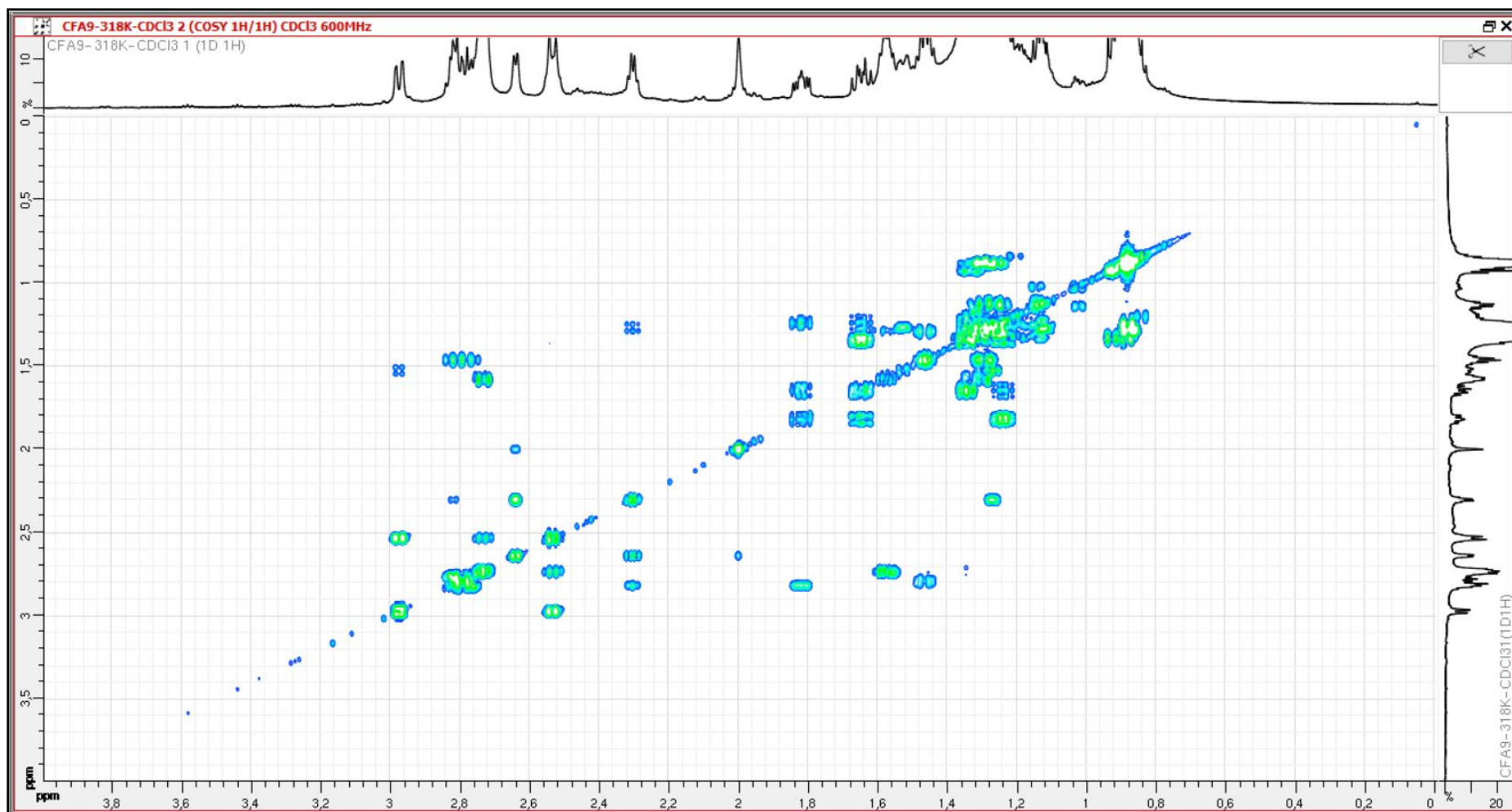


Figure 58. Spectre COSY (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) du composé 66'

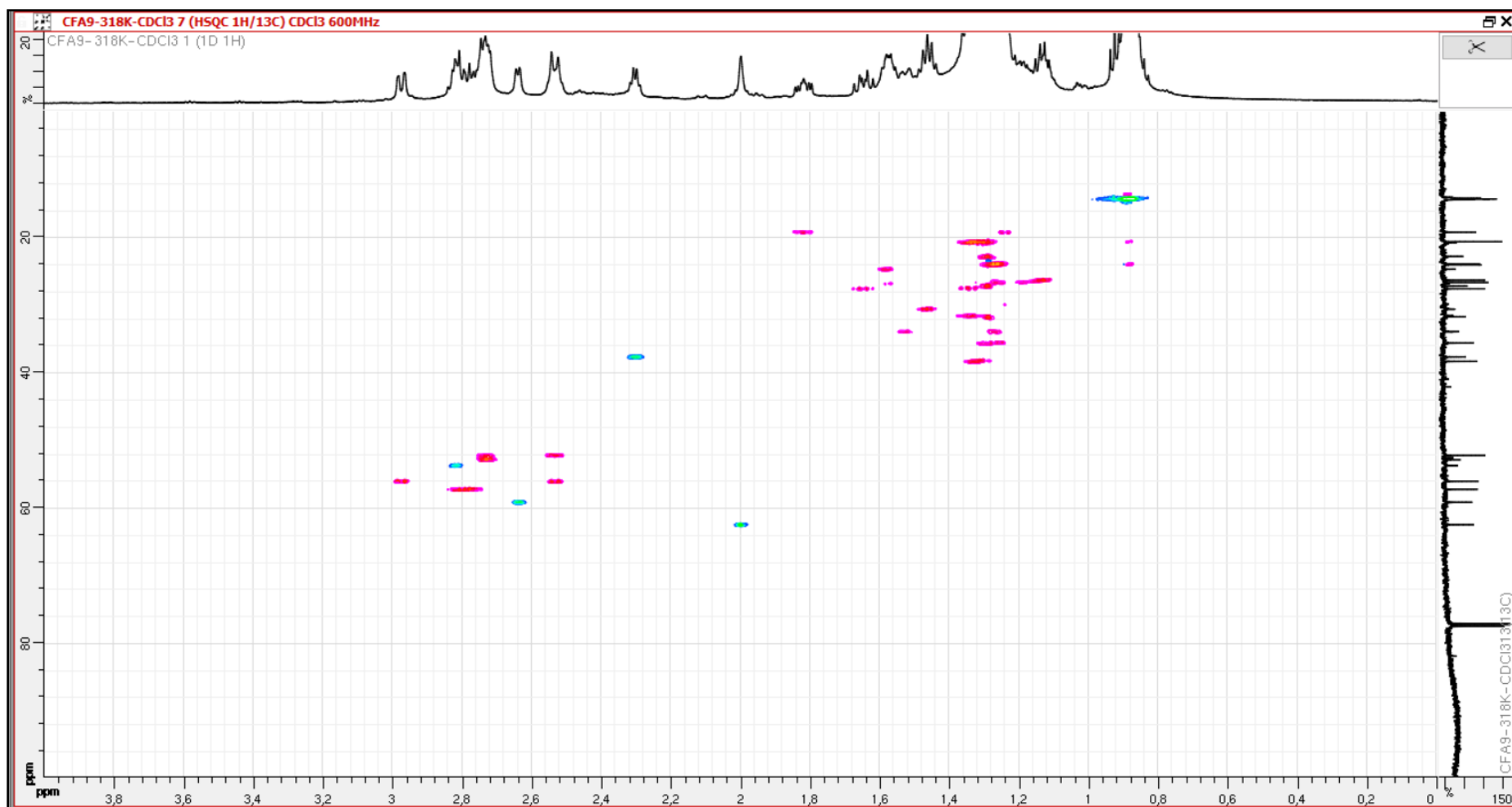


Figure 59. Spectre HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) du composé 66'

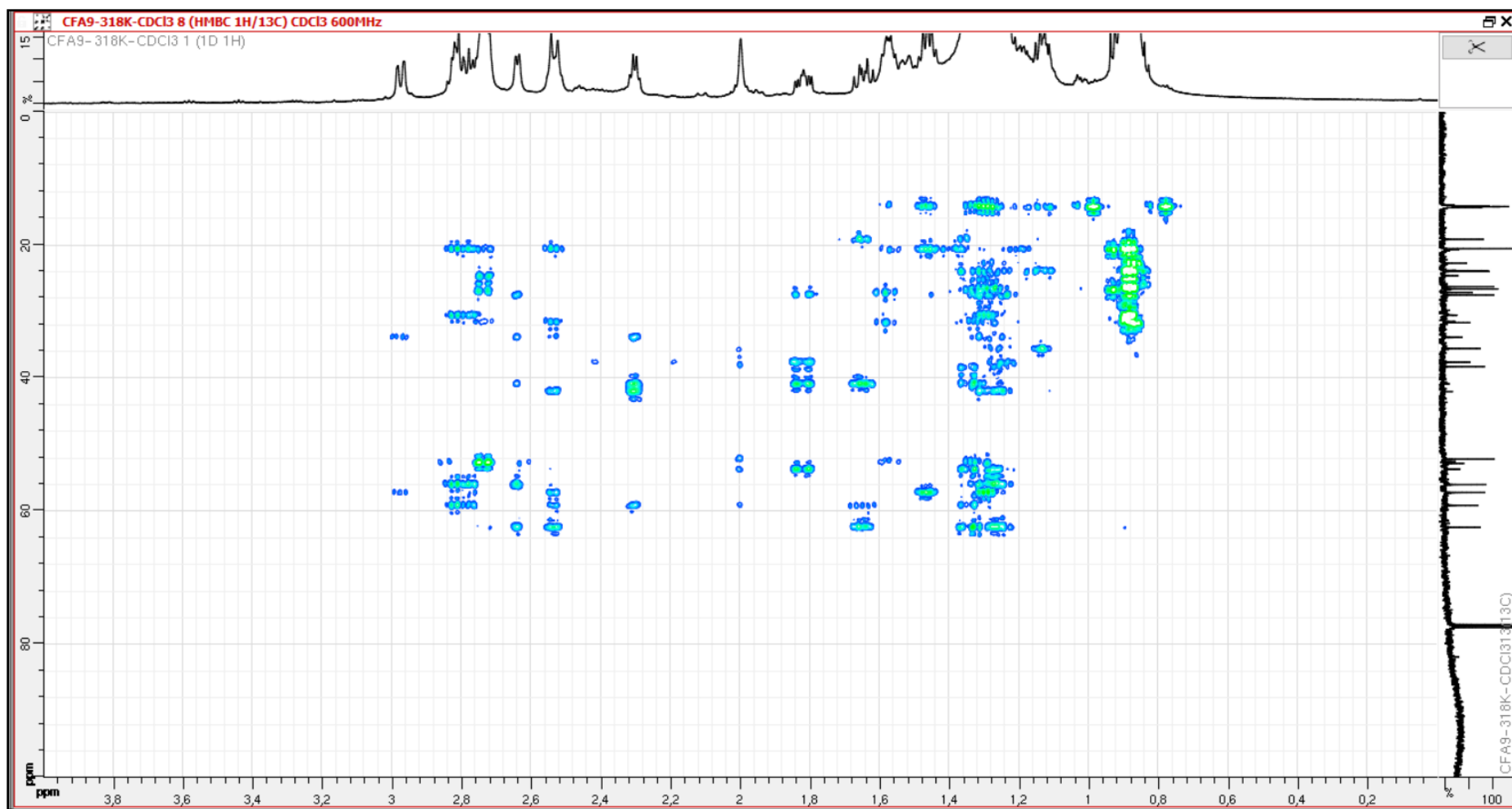


Figure 60. Spectre HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) du composé 66'

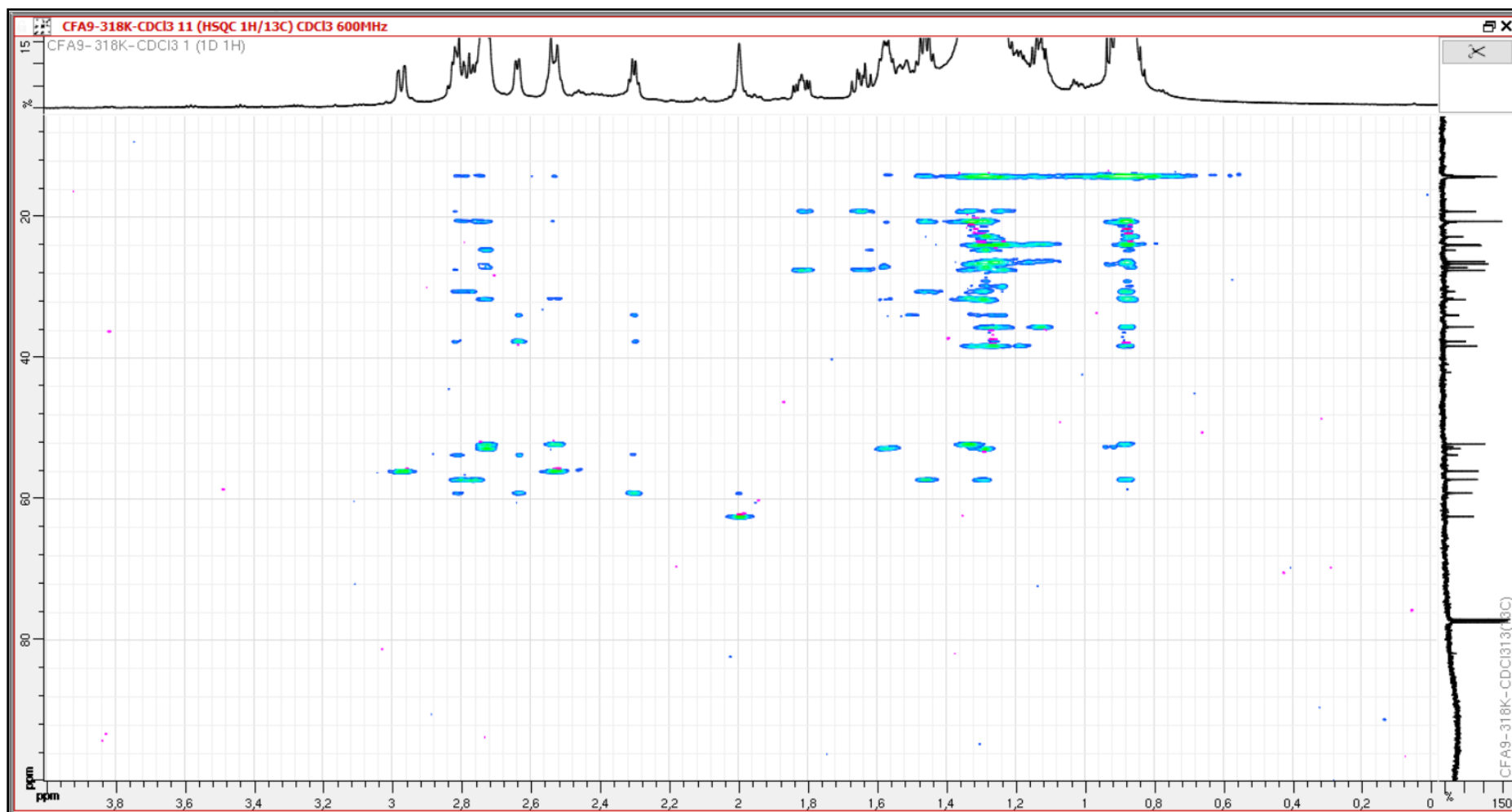


Figure 61. Spectre HSQC-TOCSY (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) du composé 66'

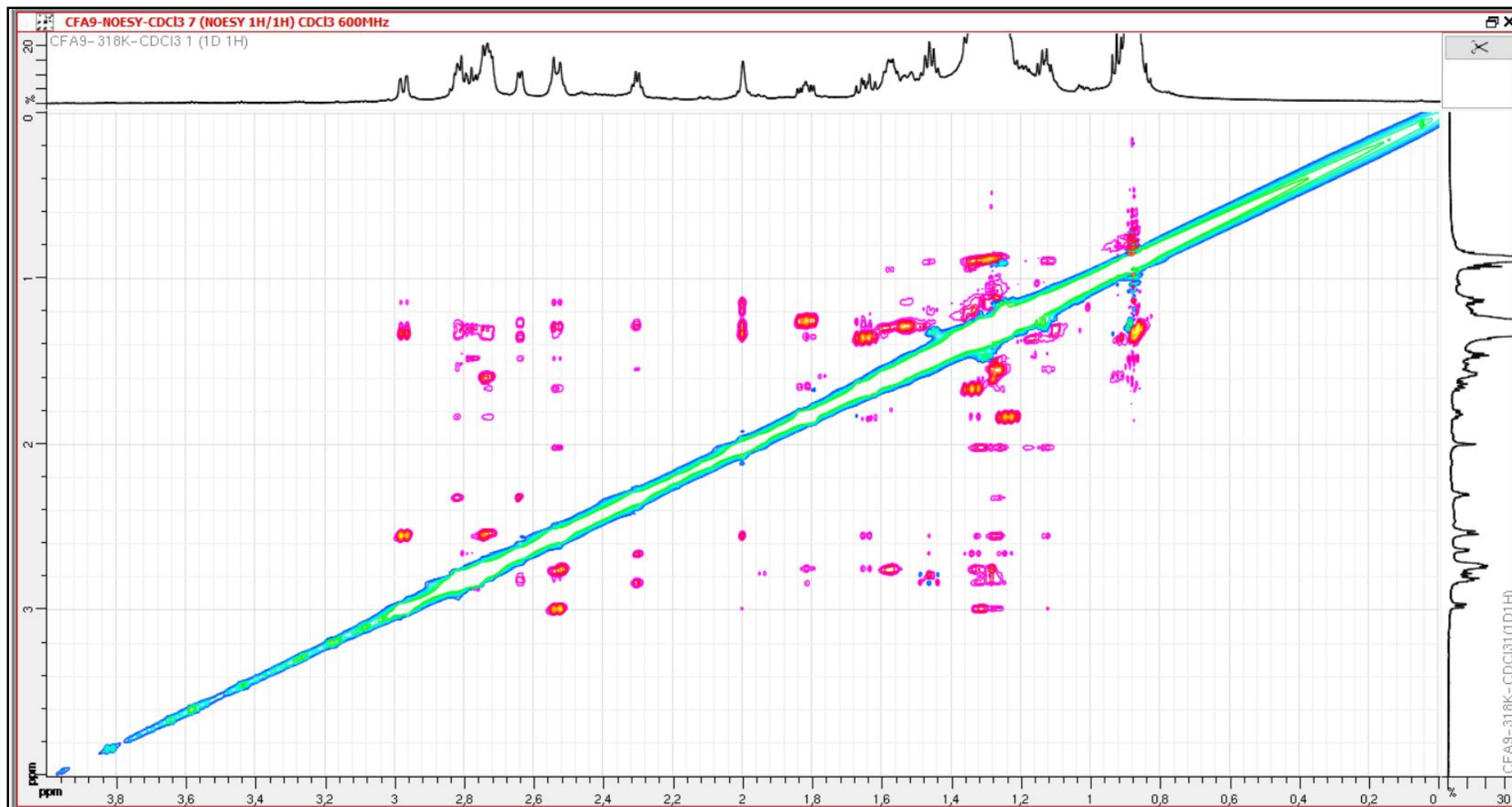


Figure 62. Spectre NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) du composé 66'

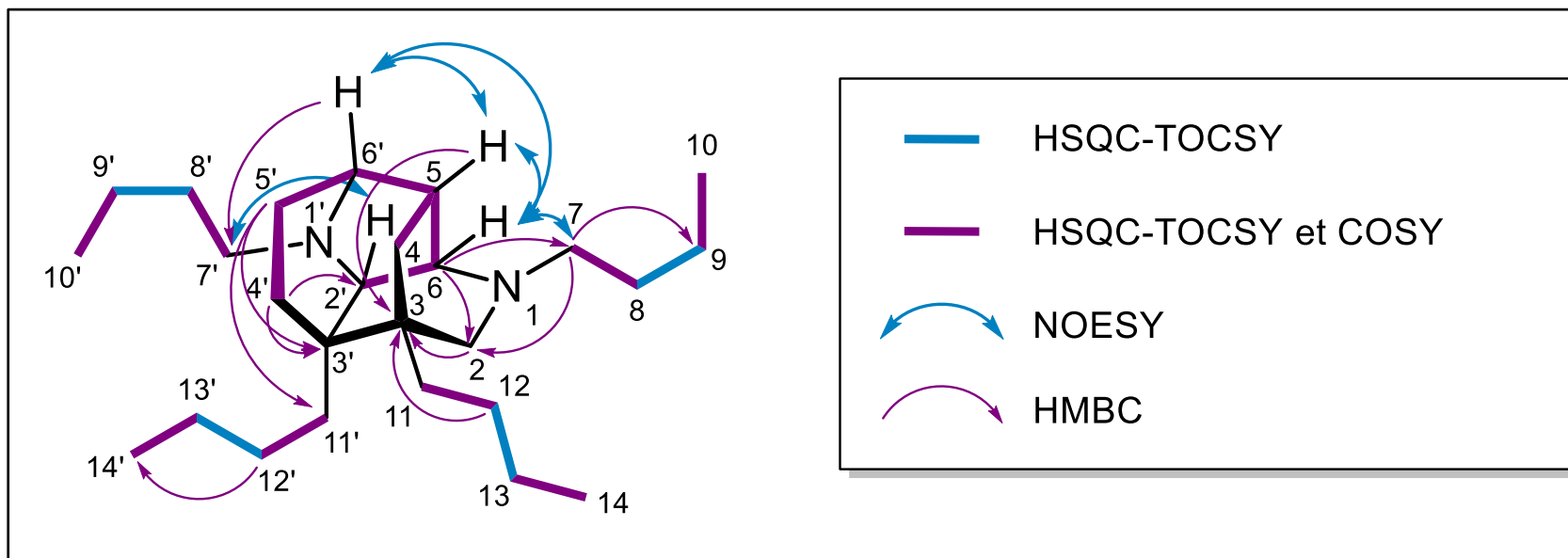


Figure 63. Corrélations HSQC-TOCSY, COSY, NOESY et HMBC du composé 66'

- **Analyses CLHP-SM/SM** : les échantillons ont été analysés avec un système comprenant une CLHP Agilent 1260 infinity couplée à un Q-TOF Agilent 6530, équipé d'une source ESI en mode positif; et une colonne Sunfire C<sub>18</sub> (150 × 2,1 mm; 3,5 μm, Waters), avec un débit de 250 μL/min et un gradient linéaire de 5% de B (A : eau + 0,1% acide formique, B : ACN) à 100% de B en 30 min. Les conditions de la source ESI ont été réglées ainsi : température du capillaire à 320 °C, voltage de la source à 3,5 kV and un débit de gaz à 10 L/min. La fenêtre d'acquisition des « scans » en SM a été réglée entre les *m/z* 100 et 1200, puis les trois ions monochargés les plus intenses de chaque « scan » ont été fragmentés, sans exclusion. Une énergie de collision unique, à 40 eV, a été appliquée. L'intensité minimum a été réglée à 5000 coups, et la largeur d'isolement à 1,2 *m/z*. En mode positif, l'ion purine C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> (*m/z* 121,050873) et l'ion hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>F<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> (*m/z* 922,009798) ont été utilisés comme références.
- Les données ont été converties du format .d (format standard d'Agilent) à .mzXML avec le logiciel MSConvert.
- Ces données ont ensuite été traitées par la méthode des réseaux moléculaires, développée par l'équipe de Dorrestein. Les paramètres suivants ont été utilisés : « *minimum pairs cos* » 0,5 ; « *parent mass tolerance* » 0,05 Da ; « *ion tolerance* » 0.05 ; « *network topK* » 10 ; « *minimum matched peaks* » 6 ; « *minimum cluster size* » 2, « *MScluster* » activé.
- Le réseau moléculaire obtenu a été visualisé grâce au logiciel Cytoscape® (version 3.6.1).



## ANNEXES ASSOCIEES

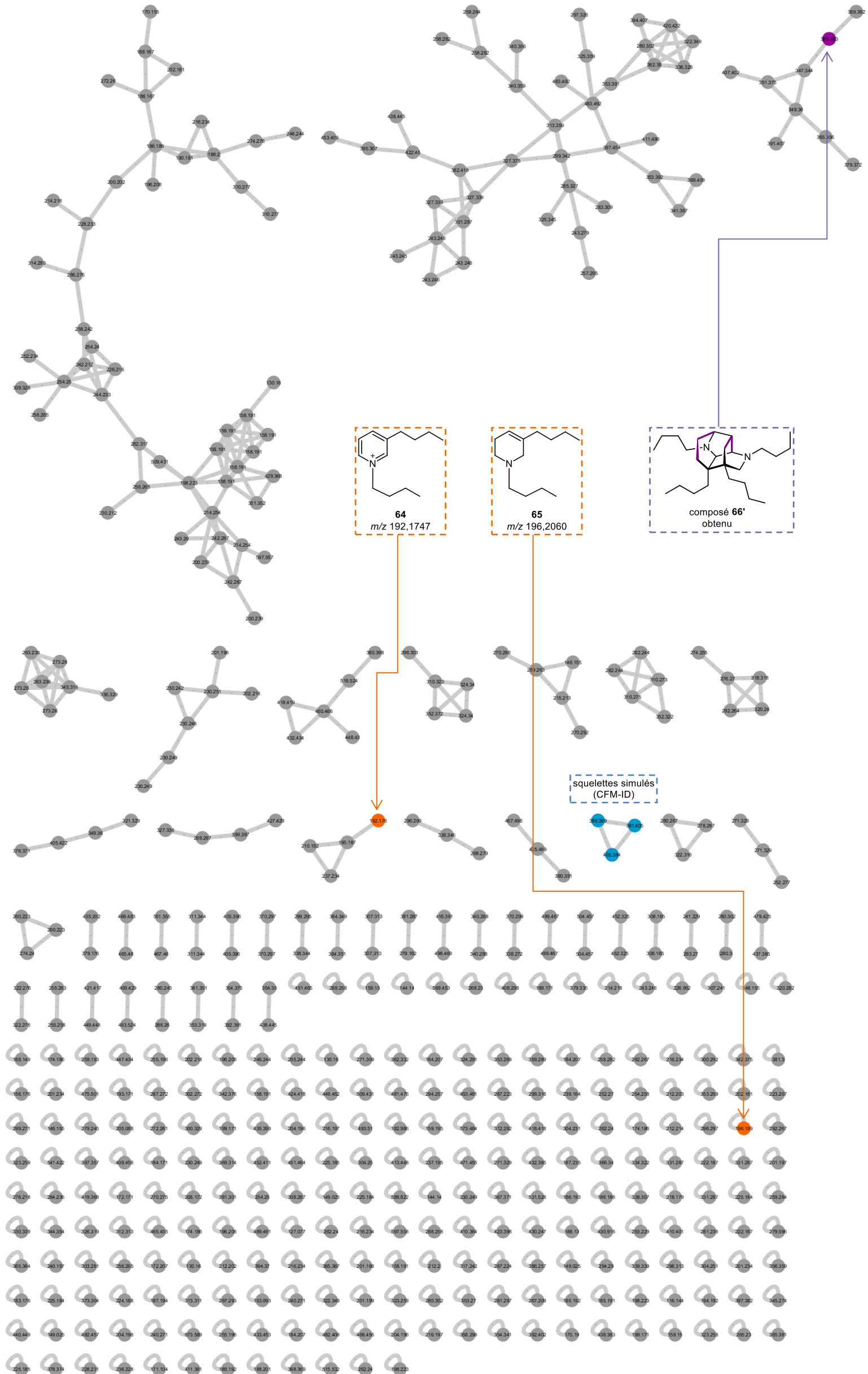


Figure 64. Agrandissement de la Figure 42 (réseau moléculaire correspondant au criblage des unités de départ : acroléine 47, malonaldéhyde 52, butylamine 62 et hexanal 63)



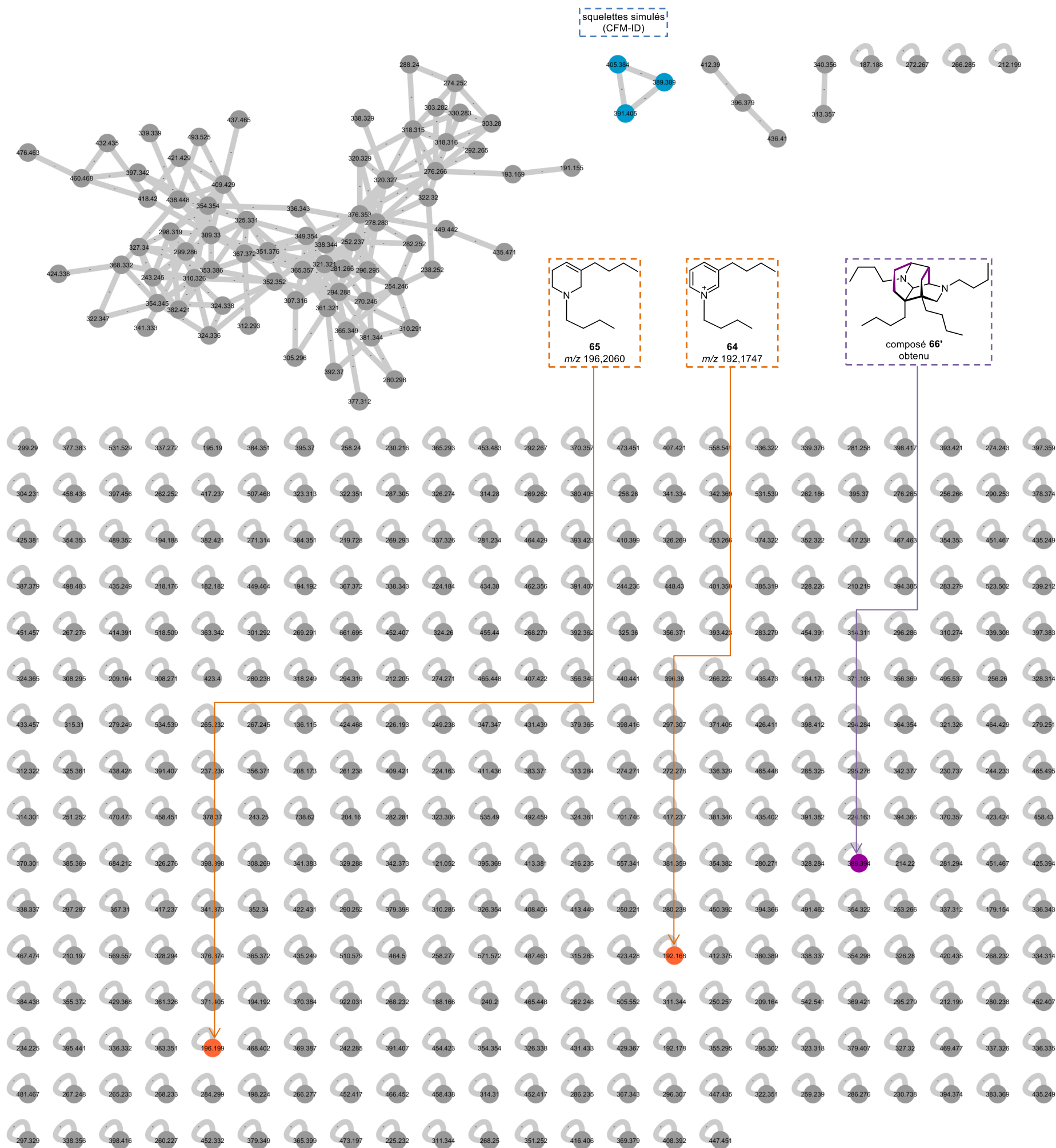


Figure 65. Agrandissement de la Figure 44 (réseau moléculaire correspondant au criblage des conditions réactionnelles, pour le mélange acroléine – butylamine – hexanal)

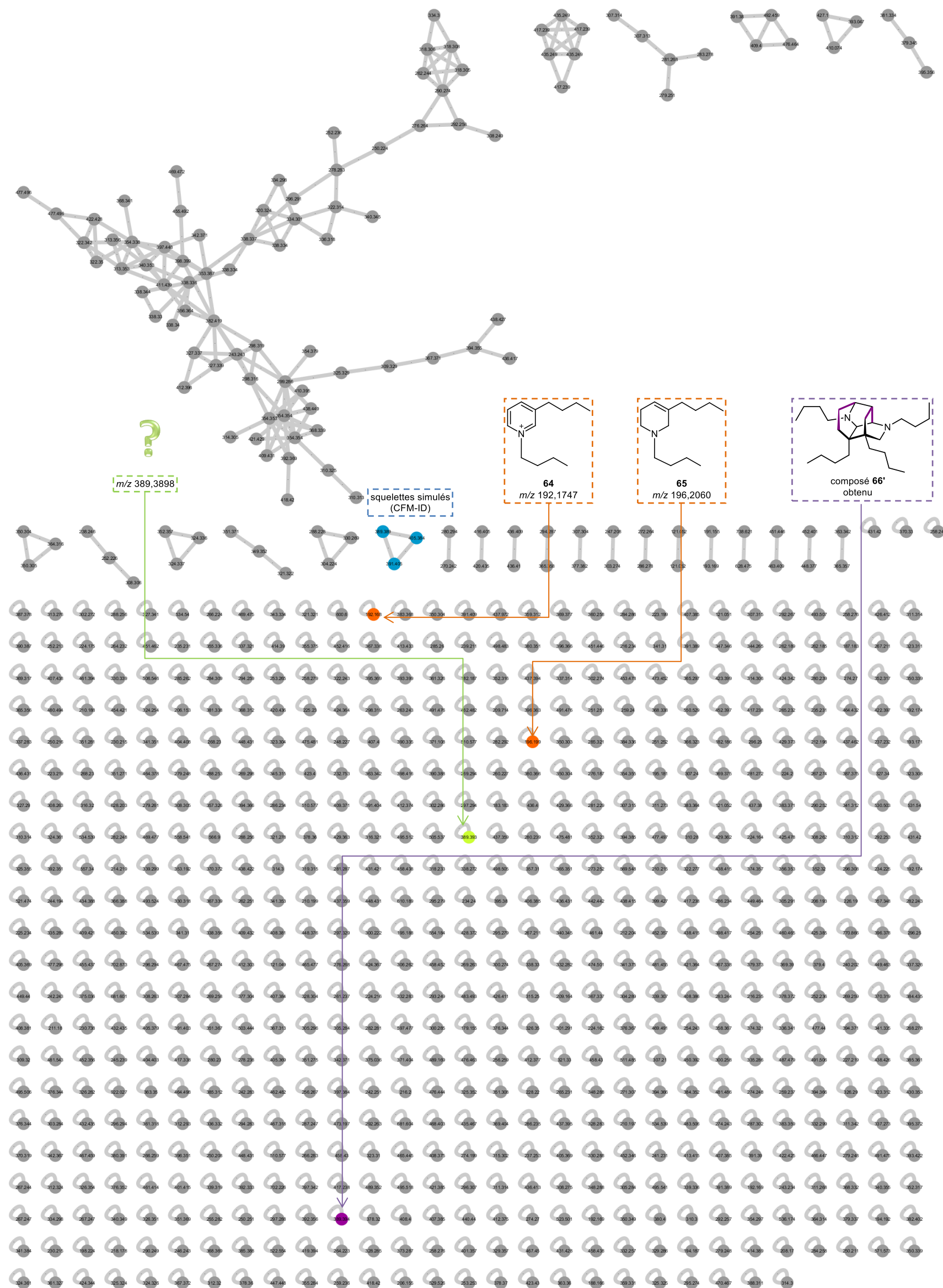


Figure 66. Agrandissement de la Figure 49 (réseau moléculaire correspondant au second criblage de conditions réactionnelles, après modification de l'ordre d'ajout des unités de départ)

## REFERENCES DU CHAPITRE 2

52. Kobayashi, J. i.; Murayama, T.; Ohizumi, Y.; Sasaki, T.; Ohta, T.; Nozoe, S., Theonelladins A ~ D, novel antineoplastic pyridine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 4833-4836.
53. Fusetani, N.; Asai, N.; Matsunaga, S.; Honda, K.; Yasumuro, K., Cyclostellatamines A-F, pyridine alkaloids which inhibit binding of methyl quinuclidinyl benzilate (QNB) to muscarinic acetylcholine receptors, from the marine sponge, *Stelletta maxima*. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 3967-3970.
54. Sakai, R.; Higa, T.; Jefford, C. W.; Bernardinelli, G., Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 6404-6405.
55. Jaspars, M.; Pasupathy, V.; Crews, P., A tetracyclic diamine alkaloid, halicyclamine A, from the marine sponge *Haliclona* sp. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 3253-3255.
56. Cimino, G.; Mattia, C. A.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Scognamiglio, G.; Spinella, A.; Trivellone, E., Unprecedented alkaloid skeleton from the mediterranean sponge *reniera sarai*: X-ray structure of an acetate derivative of sarain-a. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3863-3872.
57. Kobayashi, J. i.; Tsuda, M.; Kawasaki, N.; Matsumoto, K.; Adachi, T., Keramaphidin B, a novel pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Amphimedon* sp. : A plausible biogenetic precursor of manzamine alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 4383-4386.
58. <http://www.marinespecies.org/index.php>.
59. Cheng, B.; Reyes, J., Recent progress on the total syntheses of macrocyclic diamine alkaloids. *Natural Product Reports* **2019**.
60. Jakubec, P.; Hawkins, A.; Felzmann, W.; Dixon, D. J., Total Synthesis of Manzamine A and Related Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 17482-17485.
61. Higo, T.; Ukegawa, T.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T., Formal Synthesis of Sarain A: Intramolecular Cycloaddition of an Eight-Membered Cyclic Nitron to Construct the 2-Azabicyclo[3.3.1]nonane Framework. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 7367-7370.
62. Kondo, K.; Shigemori, H.; Kikuchi, Y.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Kobayashi, J., Ircinals A and B from the Okinawan marine sponge *Ircinia* sp.: plausible biogenetic precursors of manzamine alkaloids. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 2480-2483.
63. Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Culshaw, A. J.; Heupel, F. A.; Smrcková, S.; Whitehead, R. C., A biomimetic approach to the manzamine alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6919-6922.
64. Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Culshaw, A. J.; Heupel, F. A.; Lee, V.; Spring, D. R.; Whitehead, R. C.; Boughtflower, R. J.; Mutton, I. M.; Upton, R. J., Investigations into the Manzamine Alkaloid Biosynthetic Hypothesis. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2661-2663.
65. Kaiser, A.; Billot, X.; Gateau-Olesker, A.; Marazano, C.; Das, B. C., Selective Entry to the Dimeric or Oligomeric Pyridinium Sponge Macrocycles via Aminopentadienal Derivatives. Possible Biogenetic Relevance with Manzamine Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 8026-8034.
66. Wypych, J.-C.; Nguyen, T. M.; Nuhant, P.; Bénèche, M.; Marazano, C., Further Insight from Model Experiments into a Possible Scenario Concerning the Origin of Manzamine Alkaloids. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 5418-5421.
67. Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **1991**, *11*, 81-128.
68. Cutignano, A.; Tramice, A.; De Caro, S.; Villani, G.; Cimino, G.; Fontana, A., Biogenesis of 3-Alkylpyridine Alkaloids in the Marine Mollusc *Haminoea orbignyana*. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 2633-2636.



69. Cutignano, A.; Cimino, G.; Giordano, A.; d'Ippolito, G.; Fontana, A., Polyketide origin of 3-alkylpyridines in the marine mollusc *Haminoea orbignyana*. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 2627-2629.
70. Peraud, O., Isolation and characterization of a sponge-associated actinomycete that produces manzamines. Thèse, University of Maryland, College Park, 2006.
71. Waters, A. L.; Peraud, O.; Kasanah, N.; Sims, J. W.; Kothalawala, N.; Anderson, M. A.; Abbas, S. H.; Rao, K. V.; Jupally, V. R.; Kelly, M.; Dass, A.; Hill, R. T.; Hamann, M. T., An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Frontiers in Marine Science* **2014**, *1*.
72. <http://cfmid.wishartlab.com/>.
73. Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Heupel, F. A.; Whitehead, R. C., A biomimetic approach to the manzamine alkaloids; model studies. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 7829-7832.
74. Gil, L.; Baucherel, X.; Martin, M.-T.; Marazano, C.; Das, B. C., Model studies towards a biomimetic synthesis of keramaphidin B and halicyclamine A. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 6231-6234.



---

# CONCLUSION GENERALE

-

# PERSPECTIVES

---





## CONCLUSION GENERALE

L'**annotation** et la **déréplication** sont à l'heure actuelle des processus quasi indispensables à la découverte de nouvelles substances naturelles. Dans ce but, la technique des **réseaux moléculaires**, fondée sur la spectrométrie de masse tandem, se distingue notamment grâce à sa sensibilité et sa rapidité d'application. De plus, elle est continuellement enrichie d'outils complémentaires (algorithmes ou bases de données principalement) la rendant plus précise. Devenue l'une des thématiques phares du laboratoire, c'est autour de cette stratégie qu'ont gravité nos travaux.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, les réseaux moléculaires ont été appliqués à l'étude d'une plante de la famille des Apocynaceae déjà particulièrement bien étudiée, *Picralima nitida*. Enrichis par une annotation expérimentale pertinente, la **MIADB** (une base de données SM/SM de 172 alcaloïdes indolo-monoterpéniques construite au laboratoire, grâce à plusieurs collaborations nationales et internationales), nous avons pu détecter, puis isoler et caractériser **cinq nouveaux composés** de *P. nitida*, malgré leur instabilité et, pour certains, leur faible quantité dans notre extrait.

Les quatre dimères isolés étant structuralement proches de la **serpentinine (8)**, et la voie de biosynthèse de ce type d'alcaloïde indolo-monoterpénique étant actuellement inconnue, nous avons également décidé d'entreprendre une **hémisynthèse biomimétique** de son représentant phare. Dans ce but, l'extraction puis l'hydrolyse de la geissospermine (**17**) en geissoschizine (**16**) ont été réalisées. Bien que cette hémisynthèse n'ait pas encore pu aboutir à la serpentinine (**8**) désirée, un premier *bis*-indole a pu être détecté par CLHP-SM/SM ; son isolement et l'élucidation de sa structure seront donc déterminants pour la suite de ces travaux.

Dans le second chapitre, les réseaux moléculaires ont été confrontés à un tout autre type de défi : cartographier et guider l'isolement de composés formés en **chimie des mélanges complexes**. Dans ce contexte, les **alcaloïdes de type « 3-alkylpiperidines »** ont été une famille particulièrement intéressante à cibler, notamment afin d'évaluer chimiquement les différents scénarios biosynthétiques émis à leur sujet.



Annotés grâce à quelques molécules synthétisées, mais aussi *via* un **algorithme de fragmentation *in silico*, le CFM-ID**, les réseaux nous ont effectivement permis de cribler de nombreux mélanges réactionnels. Un composé (**66'**) inédit, relativement **analogue aux squelettes désirés**, a ainsi été formé, isolé et caractérisé. Bien que non décrit dans la nature, son origine naturelle n'est pas improbable et pourrait être investiguée. De plus, une analyse rétrosynthétique nous a permis de repenser notre voie de biosynthèse et d'envisager de nouveaux mélanges, visiblement prometteurs.

Les réseaux moléculaires ont ainsi démontré une formidable capacité d'adaptation à nos deux sujets d'étude, pourtant très différents. Leur application dans le domaine de l'extraction de nouvelles substances naturelles est certes répandue, mais les avoir confrontés à de la chimie organique est en revanche inédit. Ces travaux montrent donc bien le potentiel de cette technique, qui reste encore largement à développer et à démocratiser dans le domaine de la synthèse.





## PERSPECTIVES

Comme évoqué dans le premier chapitre, plusieurs composés, probablement nouveaux, pourraient encore être extraits de *Picralima nitida*. En effet, même si leur instabilité rend leur isolement particulièrement complexe, elle est aussi souvent synonyme d'originalité structurale. Les alcaloïdes indolo-monoterpéniques dimériques de type serpentinine ou moandaensine étant à priori très peu répandus, cette étude phytochimique mériterait donc d'être approfondie.

Par ailleurs, les travaux autour de la voie de biosynthèse de ces composés seraient également intéressants à poursuivre. Pour ce faire, l'élucidation structurale du dimère détecté est vraisemblablement une étape-clé, nécessitant néanmoins de réaliser le couplage entre la geissoschizine (**16**) et le composé **19** sur une plus grande échelle. Les deux autres séquences réactionnelles devraient elles aussi être explorées.

Dans le second chapitre de ce manuscrit, un analogue aux alcaloïdes de type « 3-alkylpipéridines » (**66**) a été isolé et décrit. Son origine possiblement naturelle pourrait être investiguée en utilisant ce squelette comme source d'annotation de futurs réseaux moléculaires, réalisés lors d'études de diverses éponges ou bactéries marines. De plus, les composés de la famille des « manzamines » arborant diverses activités biologiques intéressantes, il faudrait rechercher celles que pourraient posséder ce châsis.

Enfin, certains mélanges élaborés après avoir repensé notre voie de synthèse ayant fourni un composé potentiellement plus proche des squelettes naturels désirés, ils demeurent également les sujets privilégiés de futures études. Le recours à un aminopentadiène (**70**) comme unité de départ est aussi une voie envisageable, qui donnera probablement accès à de nombreux autres composés d'intérêt.

Le champ d'application des réseaux moléculaires n'a cessé de s'étendre depuis leur création, et dans ce manuscrit, une confrontation originale à la synthèse en mélanges complexes a été présentée. Cette chimie générant une importante diversité de composés, représentant bien souvent des métabolomes naturels ciblés, il est tout à fait concevable que l'outil bio-informatique s'y adapte.



Cependant, tout type de composé étant aujourd'hui annotable sur ces cartographies (notamment grâce aux algorithmes de fragmentation *in silico*), la technique pourrait parfaitement être employée dans d'autres types de synthèses organiques engendrant une forte diversité structurale, qu'elle soit naturelle ou non.



## RÉFÉRENCES DU MANUSCRIT

Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **2016**, *79*, 629-661.

Rutz, A.; Dounoue-Kubo, M.; Ollivier, S.; Bisson, J.; Bagheri, M.; Saesong, T.; Nejad Ebrahimi, S.; Ingkaninan, K.; Wolfender, J.-L.; Allard, P.-M., Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation. *bioRxiv* **2019**, 702308.

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., Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *Journal of Natural Products* **2013**, *76*, 1686-1699.

Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Natural Product Reports* **2019**, *36*, 960-980.

<https://gnps.ucsd.edu/>.

Allard, P.-M.; Péresse, T.; Bisson, J.; Gindro, K.; Marcourt, L.; Pham, V. C.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L., Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Analytical Chemistry* **2016**, *88*, 3317-3323.

van der Hoof, J. J. J.; Wandy, J.; Barrett, M. P.; Burgess, K. E. V.; Rogers, S., Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 13738-13743.

Beauxis, Y.; Genta-Jouve, G., MetWork: a web server for natural products anticipation. *Bioinformatics* **2018**, *35*, 1795-1796.

The Angiosperm Phylogeny, G., An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2009**, *161*, 105-121.

Ledouble, G., Alcaloïdes du *Picralima nitida* STAPF. Faculté de pharmacie de l'Université de Paris, 1964.

Hamet, R., Sur une drogue remarquable de l'Afrique tropicale, le "*Picralima nitida*" (Stapf) Th. et H. Durand. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* **1951**, 465-485.

Erharuyi, O.; Falodun, A.; Langer, P., Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Picralima nitida* (Apocynaceae) in tropical diseases: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2014**, *7*, 1-8.

Henry, T. A.; Sharp, T. M., CCLIV.-The alkaloids of *Picralima klaineana*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1927**, 1950-1959.

Henry, T. A., 415. The alkaloids of *Picralima klaineana*, Pierre. Part II. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1932**, 2759-2768.

Le Men, J.; Taylor, W. I., A uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia* **1965**, *21*, 508-510.

Iwu, M. M.; Klayman, D. L.; Jackson, J. E.; Tally, J. D.; Andersen, S. L., Alkaloids of *Picralima nitida* used for treatment of protozoal diseases. In *US5290553A*, 1994.

Irie, H.; Ishizuka, K.; Kawashima, S.; Masaki, N.; Osaki, K.; Shingu, T.; Uyeo, S.; Kaneko, H.; Naruto, S., X-Ray crystallographic determination of the structure of the alkaloid serpentinine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1972**, 871-871.

Fox Ramos, A. E.; Le Pogam, P.; Fox Alcover, C.; Otogo N'Nang, E.; Cauchie, G.; Hazni, H.; Awang, K.; Bréard, D.; Echavarren, A. M.; Frédéricich, M.; Gaslonde, T.; Girardot, M.; Grougnet, R.; Kirillova, M. S.; Kritsanida, M.; Lémus, C.; Le Ray, A.-M.; Lewin, G.; Litaudon, M.; Mambu, L.; Michel, S.; Miloserdov, F. M.; Muratore, M. E.; Richomme-Peniguel, P.; Roussi, F.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Collected mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research. *Scientific Data* **2019**, *6*, 15.



Verpoorte, R.; Frédérick, M.; Delaude, C.; Angenot, L.; Dive, G.; Thépenier, P.; Jacquier, M.-J.; Zèches-Hanrot, M.; Lavaud, C.; Nuzillard, J.-M., Moandaensine, a dimeric indole alkaloid from *Strychnos moandaensis* (Loganiaceae). *Phytochemistry Letters* **2010**, *3*, 100-103.

O'Connor, S. E.; Maresh, J. J., Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 532-547.

Szabó, L., Rigorous Biogenetic Network for a Group of Indole Alkaloids Derived from Strictosidine. *Molecules* **2008**, *13*, 1875-1896.

Fox Ramos, A. E.; Pavesi, C.; Litaudon, M.; Dumontet, V.; Poupon, E.; Champy, P.; Genta-Jouve, G.; Beniddir, M. A., CANPA: Computer-Assisted Natural Products Anticipation. *Analytical Chemistry* **2019**, *91*, 11247-11252.

Otogo N'Nang, E.; Bernadat, G.; Mouray, E.; Kumulungui, B.; Grellier, P.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Theionbrunonines A and B: Dimeric vobasine alkaloids tethered by a thioether bridge from *Mostuea brunonis*. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6596-6600.

Otogo N'Nang Obiang, E.; Genta-Jouve, G.; Gallard, J.-F.; Kumulungui, B.; Mouray, E.; Grellier, P.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Pleiokomenines A and B: Dimeric aspidofractinine alkaloids tethered with a methylene group. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6180-6183.

Fox Ramos, A. E.; Alcover, C.; Evanno, L.; Maciuk, A.; Litaudon, M.; Duplais, C.; Bernadat, G.; Gallard, J.-F.; Jullian, J.-C.; Mouray, E.; Grellier, P.; Loiseau, P. M.; Pomel, S.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Revisiting previously investigated plants: A molecular networking-based study of *Geissospermum laeve*. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1007-1014.

Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 960-980.

Wachsmuth, O.; Matusch, R., Anhydronium bases from *Rauvolfia serpentina*. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 705-709.

Feng, X. Z.; Kan, C.; Potier, P.; Kan, S. K.; Lounasmaa, M., Monomeric Indole Alkaloids from *Ervatamia hainanensis*. *Planta Med* **1982**, *44*, 212-214.

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.; Crusemann, 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., Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* **2016**, *34*, 828.

DNP, accessed: Jan 26, 2019.

Reaxys. <https://www-reaxys-com> (accessed Feb 17, 2017).

Frédérick, M.; Quetin-Leclercq, J.; Biala, R. G.; Brandt, V.; Penelle, J.; Tits, M.; Angenot, L., 3',4',5',6' Tetradehydrologicaudatine Y, an anhydronium base from *Strychnos usambarensis*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1263-1266.



Lousnasmaa, M.; Jokela, R.; Hanhinen, P.; Miettinen, J.; Salo, J., Preparation and conformational study of Z- and E-Isositsirikine epimers and model compounds. Determination of their C-16 configurations. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9207-9222.

Cardoso, C. L.; Siqueira Silva, D. H.; Tomazela, D. M.; Verli, H.; Young, M. C. M.; Furlan, M.; Eberlin, M. N.; da Silva Bolzani, V., Turbinatine, a Potential Key Intermediate in the Biosynthesis of Corynanthean-Type Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1017-1021.

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., A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology* **2012**, *30*, 918-920.

Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M., MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395.

Myers, O. D.; Sumner, S. J.; Li, S.; Barnes, S.; Du, X., One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 8696-8703.

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.; Lington, R. G.; Zhang, L.; Debonsi, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C., Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1686-1699.

Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T., Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498-2504.

Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J., Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, 2097-2098.

Hohenberg, P.; Kohn, W., Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* **1964**, *136*, B864-B871.

Kohn, W.; Sham, L. J., Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* **1965**, *140*, A1133-A1138.

Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648-5652.

Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **1988**, *37*, 785-789.

Wiberg, K. B., Ab Initio Molecular Orbital Theory by W. J. Hehre, L. Radom, P. v. R. Schleyer, and J. A. Pople, John Wiley, New York, 548pp. Price: \$79.95 (1986). *Journal of Computational Chemistry* **1986**, *7*, 379-379.

Frisch, M. J. T., H.B.; Schlegel, G.W.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; *et al.* Gaussian 16 Revision B.01; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.

Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605-1612.

Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Bringmann, G., SpecDis: Quantifying the Comparison of Calculated and Experimental Electronic Circular Dichroism Spectra. *Chirality* **2013**, *25*, 243-9.

Williams, T. K., C., and many others., Gnuplot 4.6: an Interactive Plotting Program. <http://gnuplot.sourceforge.net/>.

Guillon, J.; Grellier, P.; Labaied, M.; Sonnet, P.; Léger, J.-M.; Déprez-Poulain, R.; Forfar-Bares, I.; Dallemagne, P.; Lemaître, N.; Péhourcq, F.; Rochette, J.; Sergheraert, C.; Jarry, C., Synthesis, Antimalarial Activity, and Molecular Modeling of New Pyrrolo[1,2-a]quinoxalines, Bispyrrolo[1,2-



a]quinoxalines, Bispyrido[3,2-e]pyrrolo[1,2-a]pyrazines, and Bispyrrolo[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrazines. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997-2009.

Halonen, M.; Jokela, R.; Lounasmaa, M., Transformation of Na-Boc-tetrahydroalstonine to Na-Boc-5 $\beta$ -cyanotetrahydroalstonine, Na-Boc-21 $\alpha$ -cyanotetrahydroalstonine, and Na-Boc-3,14-didehydrotetrahydroalstonine. *Heterocycles* **1995**, *41*, 353-362.

Kobayashi, J. i.; Murayama, T.; Ohizumi, Y.; Sasaki, T.; Ohta, T.; Nozoe, S., Theonelladins A ~ D, novel antineoplastic pyridine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 4833-4836.

Fusetani, N.; Asai, N.; Matsunaga, S.; Honda, K.; Yasumuro, K., Cyclostellatamines A-F, pyridine alkaloids which inhibit binding of methyl quinuclidinyl benzilate (QNB) to muscarinic acetylcholine receptors, from the marine sponge, *Stelletta maxima*. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 3967-3970.

Sakai, R.; Higa, T.; Jefford, C. W.; Bernardinelli, G., Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 6404-6405.

Jaspars, M.; Pasupathy, V.; Crews, P., A tetracyclic diamine alkaloid, halicyclamine A, from the marine sponge *Haliclona* sp. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 3253-3255.

Cimino, G.; Mattia, C. A.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Scognamiglio, G.; Spinella, A.; Trivellone, E., Unprecedented alkaloid skeleton from the mediterranean sponge *reniera sarai*: X-ray structure of an acetate derivative of sarain-a. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3863-3872.

Kobayashi, J. i.; Tsuda, M.; Kawasaki, N.; Matsumoto, K.; Adachi, T., Keramaphidin B, a novel pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Amphimedon* sp. : A plausible biogenetic precursor of manzamine alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 4383-4386.

<http://www.marinespecies.org/index.php>.

Cheng, B.; Reyes, J., Recent progress on the total syntheses of macrocyclic diamine alkaloids. *Natural Product Reports* **2019**.

Jakubec, P.; Hawkins, A.; Felzmann, W.; Dixon, D. J., Total Synthesis of Manzamine A and Related Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 17482-17485.

Higo, T.; Ukegawa, T.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T., Formal Synthesis of Sarain A: Intramolecular Cycloaddition of an Eight-Membered Cyclic Nitron to Construct the 2-Azabicyclo[3.3.1]nonane Framework. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 7367-7370.

Kondo, K.; Shigemori, H.; Kikuchi, Y.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Kobayashi, J., Ircinals A and B from the Okinawan marine sponge *Ircinia* sp.: plausible biogenetic precursors of manzamine alkaloids. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 2480-2483.

Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Culshaw, A. J.; Heupel, F. A.; Smrcková, S.; Whitehead, R. C., A biomimetic approach to the manzamine alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6919-6922.

Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Culshaw, A. J.; Heupel, F. A.; Lee, V.; Spring, D. R.; Whitehead, R. C.; Boughtflower, R. J.; Mutton, I. M.; Upton, R. J., Investigations into the Manzamine Alkaloid Biosynthetic Hypothesis. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2661-2663.

Kaiser, A.; Billot, X.; Gateau-Olesker, A.; Marazano, C.; Das, B. C., Selective Entry to the Dimeric or Oligomeric Pyridinium Sponge Macrocycles via Aminopentadienal Derivatives. Possible Biogenetic Relevance with Manzamine Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 8026-8034.

Wypych, J.-C.; Nguyen, T. M.; Nuhant, P.; Bénéchie, M.; Marazano, C., Further Insight from Model Experiments into a Possible Scenario Concerning the Origin of Manzamine Alkaloids. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 5418-5421.

Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **1991**, *11*, 81-128.

Cutignano, A.; Tramice, A.; De Caro, S.; Villani, G.; Cimino, G.; Fontana, A., Biogenesis of 3-Alkylpyridine Alkaloids in the Marine Mollusc *Haminoea orbignyana*. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 2633-2636.

Cutignano, A.; Cimino, G.; Giordano, A.; d'Ippolito, G.; Fontana, A., Polyketide origin of 3-alkylpyridines in the marine mollusc *Haminoea orbignyana*. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 2627-2629.



Peraud, O., Isolation and characterization of a sponge-associated actinomycete that produces manzamines. Thèse, University of Maryland, College Park, 2006.

Waters, A. L.; Peraud, O.; Kasanah, N.; Sims, J. W.; Kothalawala, N.; Anderson, M. A.; Abbas, S. H.; Rao, K. V.; Jupally, V. R.; Kelly, M.; Dass, A.; Hill, R. T.; Hamann, M. T., An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Frontiers in Marine Science* **2014**, *1*.

<http://cfmid.wishartlab.com/>.

Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Heupel, F. A.; Whitehead, R. C., A biomimetic approach to the manzamine alkaloids; model studies. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 7829-7832.

Gil, L.; Baucherel, X.; Martin, M.-T.; Marazano, C.; Das, B. C., Model studies towards a biomimetic synthesis of keramaphidin B and halicyclamine A. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 6231-6234.







## BILAN DES COMMUNICATIONS

### COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- PUBLICATIONS

**2017**                    **Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*** - Alexander E. FOX RAMOS, Charlotte ALCOVER *et al* - *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*(4), 1007-1014

**2019**                    **Collected mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research** - Alexander E. FOX RAMOS, Pierre LE POGAM, Charlotte FOX ALCOVER *et al* - *Sci. Data.* **2019**, *6*(1), 15

- ACTES DE CONGRÈS

**2017**                    **Out of fashion plants at the "big data" Era: Illuminating the overlooked Apocynaceae alkaloids chemical space by Molecular Networking** - Mehdi A. BENIDDIR, Alexander E. FOX RAMOS, Elvis OTOGO N'NANG, Charlotte ALCOVER *et al* - *Planta Med.* **2016**, *81*(S 01), 46

**2017**                    **Unveiling the secrets of forgotten plants: Molecular networking-based phytochemical study of *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers** - Alexander E. FOX RAMOS, Charlotte ALCOVER *et al* - *Planta Med.* **2016**, *81*(S 01), 31

- POSTERS & COMMUNICATIONS

**2015**                    Poster : **Étude phytochimique de *Geissospermum laeve*** - Alexander E. FOX RAMOS, Charlotte ALCOVER *et al* - Journée de la recherche de l'UFR de Pharmacie, 92290 CHÂTENAY-MALABRY, le 20/11/2015

**2016**                    Poster : **Out of fashion plants at the "big data" Era: Illuminating the overlooked Apocynaceae alkaloids chemical space by Molecular Networking** - Charlotte ALCOVER *et al* - Journée de la recherche de l'UFR de Pharmacie, 92290 CHÂTENAY-MALABRY, le 09/12/2016

**2017**                    Poster : **Molecular Networking and diversity-oriented organic synthesis: exploration of complex mixtures' chemical space** - Charlotte ALCOVER *et al* - Rencontres de Chimie Organique, 94320 THIAIS, le 04/05/2017

**2017 - 2018**                    Poster : **« Réseaux moléculaires », fragmentation in silico et chimie en mélanges complexes : vers la prédiction structurale et la priorisation de composés en synthèse totale biomimétique** - Charlotte ALCOVER *et al* - Symposium Francophone de Synthèse Totale, 91400 ORSAY, les 01 et 02/06/2017 - Journée de l'Ecole Doctorale, 92290 CHÂTENAY-MALABRY, le 23/06/2017 - Symposium de l'ICSN, 91190 GIF SUR YVETTE, les 29 et 30/06/2017 - Symposium Francophone de Synthèse Totale, 33000 BORDEAUX, les 17 et 18/05/2018

**2018**                    Poster : **Enhancing the MS-guided exploration of *Picralima nitida*'s chemical space: highlight of a rare compounds' constellation** - 6<sup>e</sup> Journées internationales de l'AFERP, 35000 RENNES, les 18, 19 et 20/07/2018



**2017** Communication orale : **Deciphering the real chemical diversity of *Picralima nitida*: MS-guided isolation and structure reassignment** - 5<sup>e</sup> Journées internationales de l'AFERP, 49000 ANGERS, les 17, 18 et 19/07/2017

- **ORGANISATION DE CONGRÈS**

**2017** Symposium de l'ICSN, 91190 GIF SUR YVETTE, les 29 et 30/06/2017

**2018** Journée des doctorants de 2<sup>e</sup> année de BioCIS, 92290 CHATENAY-MALABRY, le 14/06/2018

**PRIX & RECOMPENSES**

**Juillet 2017** Prix de la meilleure communication orale - 5<sup>e</sup> Journées internationales de l'AFERP





**Titre :** Réseaux moléculaires et Chimie des Substances Naturelles : de l'isolement de composés inédits à de toutes nouvelles applications en synthèse biomimétique

**Mots clés :** chimie des substances naturelles, chimie des mélanges complexes, réseaux moléculaires, spectrométrie de masse, déréplication

**Résumé :** La découverte de nouvelles entités naturelles est un processus particulièrement long et coûteux ; il faut donc réussir le plus tôt possible à détecter les composés connus dans les matrices étudiées, afin de ne pas les ré-isoler inutilement. C'est tout l'enjeu de l'annotation (c'est-à-dire l'identification partielle mais rapide de composés) et de la déréplication (autrement dit, l'application de l'annotation en vue d'écarter les molécules déjà connues du processus d'isolement).

Grâce à sa sensibilité inégalée et à l'avènement de l'ère du « big data », la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse tandem (CLHP-SM/SM) s'est imposée comme l'un des outils de référence dans cette démarche.

En effet, son utilisation implique bien souvent le recours à des méthodes de traitement informatiques, comme le « molecular networking », de par la quantité considérable de données générées.

La thèse se présente donc en deux parties : la première, portée sur l'extraction de nouveaux composés à partir d'une plante de la famille des Apocynaceae déjà très étudiée, *Picralima nitida*. La seconde propose une application des réseaux moléculaires à de la chimie biomimétique en mélanges, autour des alcaloïdes de type « 3-alkylpiperidines ».

**Title :** Molecular Networking and Natural Products Chemistry : from novel compounds isolation to brand new applications in biomimetic synthesis

**Keywords :** natural products chemistry, complex mixtures' chemistry, molecular networking, mass spectrometry, dereplication

**Abstract :** The discovery of new natural products is a very long and expensive process ; it is therefore important to detect previously known compounds in the studied matrices, to avoid an useless re-isolation. This is the aim of annotation (partial but quick identification of compounds) and of dereplication (application of annotation to avoid re-isolation).

Thanks to its unequaled sensibility and to the "big data" era, high performance liquid chromatography hyphenated to tandem mass spectrometry has become a reference technique in this field.

Indeed, its use is generally implemented by informatic tools, as "molecular networking", because of the large amount of generated data.

This thesis is divided into two parts : the first one deals with extraction of new compounds from a very well-known Apocynaceae plant, *Picralima nitida*. The second one deals with the application of molecular networking to decipher complex mixtures, inspired from the chemistry of "3-alkylpiperidines" alkaloids.

