



**HAL**  
open science

# Isolement et identification de nouveaux diterpènes de type daphnane, activateurs de PKC et rôle dans le traitement du cancer colorectal

Elise Crossay

► **To cite this version:**

Elise Crossay. Isolement et identification de nouveaux diterpènes de type daphnane, activateurs de PKC et rôle dans le traitement du cancer colorectal. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30076 . tel-04298692

**HAL Id: tel-04298692**

**<https://theses.hal.science/tel-04298692v1>**

Submitted on 21 Nov 2023

**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.



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Elise CROSSAY**

Le 24 mars 2023

### **Isolement et identification de nouveaux diterpènes de type daphnane, activateurs de PKC et rôle dans le traitement du cancer colorectal**

---

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

**PHARMA-DEV -Laboratoire Pharmacochimie et Pharmacologie  
pour le Développement**

Thèse dirigée par

**Nicolas FABRE et Valérie JULLIAN**

Jury

**Pr. Catherine Vonthron-Senecheau**, Université de Strasbourg, Rapporteur  
**Pr. Jean-Hugues Renault**, Université de Reims Champagne-Ardenne, Rapporteur  
**Pr. Olivier Grovel**, Université de Nantes, Examinateur  
**Pr. Vania Bernardes-Genisson**, Université de Toulouse, Examinatrice  
**Pr. Nicolas Fabre**, Université de Toulouse, Directeur de thèse  
**Dr. Valérie Jullian**, Chargée de recherche à l'IRD, Co-directrice de thèse  
**Dr. Claire Racaud-Sultan**, Chargée de recherche au CNRS, Membre invitée



## Résumé

---

Ce travail a consisté à étudier le latex de *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae), collecté en forêt Amazonienne, et en particulier les diterpènes qu'il contient, de type daphnanes. Ces métabolites spécialisés sont connus pour être des activateurs de sérine-thréonine kinases PKCs, des médiateurs enzymatiques particulièrement sous exprimés dans le cancer colorectal. Cette recherche décrit l'isolement, par différentes méthodes séparatives (colonnes chromatographiques, CLMP, CLHP semi préparative), de sept daphnanes, incluant trois molécules connues (huratoxine, 6'-oxo-huratoxin et 4',5'-époxyhuratoxine) et quatre dérivés originaux (6'-hydroxy-huratoxine, 4',5'-dihydroxy-huratoxine, 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine et huratoxigénine-20-(11'-méthylodécadéc-12'-énoate), ainsi que de six daphnanes présents en mélange. Les structures de ces molécules ont pu être élucidées grâce à différentes techniques spectroscopiques (UV, HRMS, RMN 1D et 2D, dichroïsme circulaire) et de la modélisation moléculaire. Les effets de 11 daphnanes isolés ont été évalués sur des cellules humaines de cancer colorectal Caco-2 afin de déterminer des relations structure activité. La huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine ont présenté la meilleure activité cytostatique sélective des cellules cancéreuses avec respectivement 20% et 30% d'inhibition de croissance à la concentration de 1 µg/mL. Cette activité est accompagnée d'un réarrangement cellulaire mimant l'architecture de la crypte intestinale. Des travaux pharmacologiques plus poussés ont permis de montrer l'influence de l'isoenzyme PKCζ sur les activités cytostatiques et morphologiques des deux daphnanes les plus actifs, ainsi que le rôle de voies de signalisation de cancérogénèse (MAPK, Akt, GSK3β). Enfin, l'activité antiproliférative de ces composés a été confirmée sur des cellules primaires cancéreuses humaines cultivées sous forme d'organoïdes. La huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine inhibent de manière sélective la prolifération des organoïdes cancéreux (40% d'inhibition de croissance) à 0,1 µg/mL. Ces résultats permettent donc d'envisager d'évaluer ses composés sur des modèles murins de cancer colorectal.

## Abstract

---

The present study examined the latex of *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae) collected in the Amazonian Forest, with a specific focus on the daphnane-type diterpenes it contains. These specialized metabolites are known to be activators of serine-threonine kinases PKCs, enzymatic mediators particularly under-expressed in colorectal cancer. This research describes the isolation through different separative methods (column chromatographies, MPLC, semi-preparative HPLC) of seven daphnanes, including three known molecules (huratoxin, 6'-oxo-huratoxin and 4', 5'-epoxyhuratoxin) and four original derivatives (6'-hydroxy-huratoxin, 4',5'-dihydroxy-huratoxin, 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxin and huratoxigenin-20-(11'-methyloctadec-12'-enoate), as well as six daphnanes obtained as mixtures. The structures of these compounds were elucidated using various spectroscopic (UV, HRMS, 1D and 2D NMR, circular dichroism) and molecular modeling. The effects of 11 isolated daphnanes were tested on human Caco-2 colorectal cancer cells to determine structure-activity relationships. Huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin exhibited the highest selective cytostatic activity in cancer cells, of 20% and 30% growth inhibition respectively at the concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Along with this activity, cellular rearrangement mimicking the architecture of the intestinal crypt was observed. Further pharmacological work has shown the influence of the PKC $\zeta$  isoenzyme on the cytostatic and morphological activities of the two most active daphnanes, as well as the role of carcinogenesis signaling pathways (MAPK, Akt, GSK3 $\beta$ ). Finally, the antiproliferative activity of these compounds was confirmed on primary cancer cells cultured as organoids. Huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin selectively inhibited the proliferation of cancerous organoids (40% growth inhibition) at 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . These results therefore allow to consider evaluating these compounds in mouse models of colorectal cancer.

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Catherine Vonthron, professeure de pharmacognosie à l'Université de Strasbourg, ainsi que Mr Jean-Hugues Renault, professeur de pharmacognosie à l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je souhaite remercier Mme Vania Bernades-Génisson, professeure à l'Université de Toulouse, pour avoir accepté d'être examinatrice dans mon jury de thèse. Je tiens aussi à remercier Mr Olivier Grovel, professeur de pharmacognosie à l'Université de Nantes, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour m'avoir accueilli pour mon tout premier stage de recherche, ce qui m'a permis de développer mon intérêt dans ce domaine.

Je remercie aussi sincèrement Mme Claire Racaud-Sultan, chargée de recherche CNRS au sein de l'Institut de Recherche en Santé Digestive, pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail et aussi pour m'avoir encadré durant 1 an et m'avoir transmis son savoir et son attrait pour la biologie. Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont épaulé dans l'apprentissage des techniques de biologie lors de mon passage à l'IRSD : Julie, Corinne, Mélissa, Mireille, Simon, Alexia, Elodie, Marion, Laura et Anissa. Je tiens particulièrement à remercier David Sagnat et Dimitri Hamel pour leur soutien dans la réalisation des travaux sur organoïdes. Et enfin, je remercie Mme Nathalie Vergnolle et Mme Céline Deraison pour m'avoir accueillie au sein de cette équipe.

Je tiens également à remercier mon directeur et ma co-directrice de thèse, le professeur Nicolas Fabre et la docteure Valérie Jullian, pour m'avoir encadrée durant ces années. Je les remercie pour toutes les connaissances que j'ai pu acquérir et pour les différentes opportunités que j'ai pu avoir durant ma thèse.

Je remercie également tous les personnels de PHARMA-DEV avec qui j'ai pu travailler durant ses années. Et particulièrement, Pierre Pério qui a toujours été disponible et à l'écoute pour mon apprentissage de la spectrométrie de masse.

Je remercie aussi Anne-Cécile Le Lamer pour son aide et son soutien qu'il soit d'un point de vue scientifique et personnel. Je remercie aussi Valérie Cristofolie pour sa bienveillance et sa bonne humeur durant ses trois ans. Je remercie Alice Gadéa pour ses conseils, son écoute et sa présence dans les moments difficiles. Enfin, je remercie Karine Rebier pour les pauses clopes, les pool party et la bonne ambiance.

Je remercie aussi mes collègues doctorants et post doctorants avec qui j'ai fait un grand nombre de mots fléchés, d'apéros toujours dans la bonne ambiance : Julia, Romina, Monivan, Théo, Quentin, Jade. Spéciale dédicace au bureau 5, Emie, Maroussia, Adrien et Clara, pour le coup de main à chaque fois que j'avais une question conne et pour les brainstormings foireux sur des chansons douteuses. Je remercie aussi Simon et Guillaume pour les discussions intéressantes et les pauses clopes fructueuses. Grâce à vous mon intégration au labo a été plus facile.

Evidemment je souhaite remercier mes amis, mes collocs et en particulier Loïc, sans qui l'aventure aurait été beaucoup plus difficile. Merci de m'avoir changé les idées quand il le fallait !

Enfin, je souhaite remercier ma famille et mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Merci d'avoir fait en sorte que je puisse poursuivre dans cette voie qui me correspond.

## Table des matières

---

Résumé .....	3
Abstract.....	4
Remerciements.....	5
Table des matières .....	7
Abréviations .....	12
Table des figures.....	16
Table des tableaux.....	23
INTRODUCTION .....	24
ETAT DE L'ART.....	27
I. Les Euphorbiaceae .....	28
A. Classification.....	28
B. Aspects morphologiques .....	28
C. Distribution géographique.....	29
D. Utilisations traditionnelles.....	30
E. Autres utilisations .....	31
F. Toxicité des Euphorbiaceae.....	31
G. Composition chimique .....	32
1. Généralités.....	32
2. Focus sur les diterpènes d'Euphorbiaceae .....	33
II. <i>Hura crepitans</i> L. ....	39
A. Généralités .....	39
B. Caractères morphologiques .....	40
C. Usage en médecine traditionnelle et autres utilisations .....	40



D.	Composition chimique .....	41
1.	Généralités.....	41
2.	Focus sur le latex .....	44
III.	Les PKCs .....	62
A.	Généralités : Structure et régulation par les chaînes d'acides gras .....	62
B.	Rôles biologiques : focus sur les PKCs atypiques .....	64
C.	PKCs et cancer : impact de la sous-expression des PKCs .....	65
D.	PKCs et infections virales .....	67
E.	Outils pharmacologiques ciblant les PKCs .....	67
1.	Molécules activatrices des PKCs .....	68
2.	Molécules inhibitrices des PKCs .....	68
IV.	Le cancer colorectal .....	70
A.	Epidémiologie du cancer colorectal.....	70
B.	Voies de carcinogénèse colorectale et interaction avec les PKCs .....	72
1.	Généralités.....	72
2.	Voies de signalisation du CCR et PKCs.....	73
V.	Le latex de <i>Hura crepitans</i> L. et le cancer colorectal.....	79
A.	Une activité cytostatique portée par les daphnanes monoestérifiés .....	79
B.	Une activité cytostatique couplée à des effets morphologiques pro-différenciants.....	81
C.	Une activité cytostatique corrélée à une inhibition des voies GSK3 $\beta$ et Akt mais indépendante des PKC $\alpha$ et PKC $\delta$ .....	83
VI.	Objectifs de l'étude .....	85
	RESULTATS ET DISCUSSION.....	86
I.	Isolement et analyse structurale des daphnanes monoestérifiés du latex de <i>Hura crepitans</i>	
L.	.....	87
A.	Extraction du latex de <i>H. crepitans</i> .....	87

B.	Détection et élimination des acides gras présents dans l'extrait dichlorométhanique n°1	88
1.	Mise au point d'une méthode de détection des acides gras	89
2.	Mise au point d'un protocole d'élimination des acides gras	90
C.	Isolement des daphnanes monoestérifiés	96
1.	Fractionnement de la fraction EC.2.23.B	99
2.	Isolement de la huratoxine et de la molécule M674T11.18	100
3.	Isolement des molécules M544T3.10	103
4.	Isolement des molécules M614T4.92 et M528T5.41	104
5.	Isolement de la 6'-oxo-huratoxine et de la molécule M598T6.37	105
6.	Isolement de la molécule M600T4.77	106
7.	Isolement des molécules M616T3.49 et M616T3.96	107
8.	Isolement de la molécule M618T3.05	108
9.	Isolement de la 4',5'-époxy-huratoxine	109
10.	Isolement des molécules M618T2.82	110
11.	Bilan des purifications	111
D.	Analyse structurale des daphnanes monoestérifiés isolés	112
1.	Analyse structurale des molécules pures	112
2.	Analyse structurale de mélanges	148
E.	Bilan de l'analyse structurale des daphnanes isolés	184
II.	Tests biologiques	186
A.	Activité anticancéreuse	186
1.	Relation structure-activité des daphnanes	186
2.	Effet dose-réponse de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine	189
3.	Activité cytostatique sélective de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine	190
4.	Effets morphologiques de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine	190

5.	Implication de la PKC $\zeta$ dans les effets de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine .....	193
6.	Signalisation adhésive et proliférative sous traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine .....	195
7.	Tests sur cellules primaires humaines.....	201
8.	Conclusion.....	202
B.	Activités antivirales .....	206
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	207
	MATERIELS ET METHODES.....	212
I.	Isolement et analyse structurales des daphnanes monoestérifiés du latex de <i>H. crepitans</i> .....	213
A.	Appareillages .....	213
1.	Isolement des composés d'intérêts .....	213
2.	Suivi des étapes de purification par CCM .....	214
3.	Analyse UHPLC-MS des fractions d'intérêts .....	214
4.	Analyse par RMN des produits purs .....	215
5.	Calculs de modélisation de RMN .....	216
6.	Dichroïsme circulaire.....	216
7.	Spectroscopie ultraviolet (UV).....	217
8.	Spectroscopie infrarouge (IR) .....	217
9.	Pouvoir rotatoire .....	217
B.	Obtention du latex de <i>Hura crepitans</i> L.....	218
C.	Extraction du latex de <i>H. crepitans</i> pour l'isolement.....	219
D.	Précipitation des cérébrosides présents dans l'extrait brut CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> n°1.....	219
E.	Elimination des acides gras présents dans la fraction EC.2.21.B.....	219
F.	Isolement de daphnanes monoestérifiés .....	220

1.	Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP) .....	220
2.	Chromatographie sur colonne ouverte en phase normale .....	221
3.	Chromatographie sur colonne ouverte en phase inverse .....	222
4.	Chromatographie flash.....	222
5.	CLHP semi préparative en phase inverse .....	223
II.	Tests biologiques.....	226
A.	Evaluation de l'activité anticancéreuse des daphnanes monoestérifiés isolés .....	226
1.	Lignées cellulaires.....	226
2.	Organoïdes.....	227
3.	Tests de cytotoxicité.....	228
4.	Analyses microscopiques .....	229
5.	Analyse biochimique .....	231
6.	RT-qPCR.....	233
7.	Analyse statistique .....	233
B.	Tests antiviraux .....	233
1.	Lignées cellulaires et virus utilisés.....	234
2.	Mesure de l'activité antivirale des daphnanes monoestérifiés .....	234
3.	Test d'unités de formation de plaques (UFP) .....	235
	REFERENCES.....	236
	ANNEXES .....	248

## Abréviations

<b>1D</b>	Unidimensionnel	<b>Cdc42</b>	Cell division control protein
<b>2D</b>	Bidimensionnel		42
<b>3D</b>	Tridimensionnel	<b>CID</b>	Collusion-Induced Dissociation
<b>-A-</b>		<b>CLHP</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>AAANE</b>	Acides aminés non essentiels	<b>CLMP</b>	Chromatographie Liquide Moyenne Pression
<b>ACE2</b>	Angiotensin-Convertig Enzyme 2	<b>CMC</b>	Carboxy méthyl-cellulose
<b>AcOEt</b>	Acétate d'éthyle	<b>CMNT</b>	Concentration minimale non toxique
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	<b>COSY</b>	Spectroscopie hétéronucléaire proton- proton
<b>ADNc</b>	AND complémentaire	<b>CPC</b>	Chromatographie de partage centrifuge
<b>Akt</b>	Protéine kinase B	<b>cPKC</b>	Protéine Kinase C conventionnelle
<b>APC</b>	Adenomatous polyposis coli	<b>Covid-19</b>	Corona virus disease 2019
<b>APCI</b>	Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique	<b>CSK</b>	Cytosquelette
<b>aPKC</b>	Protéine Kinase C atypique		
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique		
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate		
<b>-B-</b>			
<b>β-cat</b>	β-caténine		
<b>BSA</b>	Bovine Albumin Serum		
<b>-C-</b>			
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince	<b>d</b>	Doublet
<b>CCR</b>	Cancer colorectal	<b>D1</b>	Daphnane monoestérifié
		<b>D2</b>	Daphnane diestérifié
		<b>DAG</b>	Diacylglycérol
		<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2- phénylindole
		<b>dd</b>	Doublet dédoublé

<b>ddd</b>	Doublet de doublet dédoublé		<b>-H-</b>
<b>DMEM</b>	Dulbecco modified Eagle medium	<b>HBSS</b>	Hanks' Buffer Saline Solution
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde	<b>HMBC</b>	Corrélation hétéronucléaire à travers plusieurs liaisons
<b>DNTP</b>	Désoxyribonucléotide	<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectrometry
	<b>-E-</b>	<b>HSQC</b>	Spectroscopie hétéronucléaire simple quantum
<b>ECL</b>	Enhanced ChemiLuminescence	<b>HRP</b>	HorseRadish Peroxydase
<b>EDTA</b>	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique	<b>HT</b>	Huratoxine
<b>EET</b>	Acide époxyeicosatriénoïque		<b>-I-</b>
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor	<b>IIAP</b>	Institut de Recherche de l'Amazonie Péruvienne
<b>EGFR</b>	Récepteur à l'EGF	<b>IMRCP</b>	Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivités Chimiques et Photochimiques
<b>EHT</b>	époxy-huratoxine		
<b>EMEM</b>	Essential Minimal Eagle Medium	<b>IR</b>	Infrarouge
<b>ERK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase ERK	<b>IRSD</b>	Institut de Recherche en Santé Digestive
<b>ESI</b>	Ionisation par electrospray		
	<b>-F-</b>		<b>-J-</b>
<b>FBS</b>	Fœtal Bovine Serum	<b>J</b>	Constante de coulage en Hz
<b>FUdR</b>	Floxuridine	<b>Jak2</b>	Janus kinase 2
	<b>-G-</b>		<b>-L-</b>
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogène Synthase Kinase 3	<b>LCC</b>	Laboratoire de Chimie de Coordination

	<b>-M-</b>		
<b>m</b>	Multiplet	<b>PDK1</b>	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase	<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>MEK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase MEK	<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3'-kinase
<b>MITO</b>	Mitochondrie	<b>PIMIT</b>	Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical
<b>MOI</b>	Multiplicité d'infection	<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphoinositides phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
<b>MS</b>	Mass spectrometry	<b>PIP<sub>3</sub></b>	phosphoinositides phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
<b>mTORC2</b>	mTOR complex 2	<b>PKC</b>	Protéine Kinase C
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium	<b>PKD</b>	Protéine Kinase D
<b>m/z</b>	Rapport masse/charge d'un ion	<b>PM</b>	Membrane plasmique
	<b>-N-</b>	<b>POS</b>	Mode d'ionisation positif
<b>NEG</b>	Mode d'ionisation négatif	<b>P/S</b>	Pénicilline/Streptomycine
<b>NOESY</b>	Spectroscopie nucléaire d'effet Overhauser	<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>nPKC</b>	Protéine Kinase C nouvelle		<b>-Q-</b>
	<b>-P-</b>	<b>q</b>	Quadruplet
<b>Par3</b>	Partitioning defective protein 3		<b>-R-</b>
<b>Par6</b>	Partitioning defective protein 6	<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline	<b>Rf</b>	Rapport frontal
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
		<b>rpm</b>	Rotation par minute

<b>RT-qPCR</b>	Reverse Transcriptase-Quantitative Polymerase Chain Reaction	<b>uma</b>	Unité de masse atomique
		<b>UMR</b>	Unité Mixte de Recherche
		<b>UPR</b>	Unité propre de recherche
		<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>-S-</b>			
<b>s</b>	Singulet		<b>-V-</b>
<b>SARS-CoV-2</b>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate		
<b>se</b>	Singulet élargi		<b>-W-</b>
<b>SEM</b>	Erreur Standard de la Moyenne	<b>WGA</b>	Wheat Germ Agglutinin
<b>SPCMIB</b>	Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique		<b>-Z-</b>
		<b>ZIKV<sup>GFP</sup></b>	Virus Zika recombinant exprimant le gène rapporteur GFP
<b>SPE</b>	Extraction en Phase Solide		
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Foetal		
<b>-T-</b>			
<b>t</b>	Triplet		
<b>TEA</b>	Triéthylamine		
<b>TMPRSS2</b>	Transmembrane Protease Serine 2		
<b>Tr</b>	Temps de rétention		
<b>-U-</b>			
<b>UFP</b>	Unité de Formation de Plaque		
<b>UHPLC</b>	Ultra High-Performance Liquid Chromatography		



## Table des figures

<b>Figure 1:</b> Distribution géographique des Euphorbiaceae (9) .....	29
<b>Figure 2:</b> Squelettes des diterpènes d'Euphorbiaceae .....	34
<b>Figure 3:</b> Répartition géographique de <i>Hura crepitans</i> L. ....	39
<b>Figure 4:</b> Photographies de <i>Hura crepitans</i> L. ....	40
<b>Figure 5:</b> <b>A)</b> Structure du 6,7-époxy-5-hydroxyrésiniféronol-14-(2,4-tétradécadiénoate). <b>B)</b> Structure du 5-(hydroxyméthyl) furan-2-carbaldéhyde. <b>C)</b> Structure du 3,5-dihydroxy-6-méthyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one. <b>D)</b> Structure de la nitrocoumarine. <b>E)</b> Structure du méthyl-14-méthylpentadécanoate. <b>F)</b> Structure de l'apocynine. <b>G)</b> structure de l'acide daphnétoxine... 43	43
<b>Figure 6 :</b> Chromatogramme UHPLC-MS de l'extrait brut du latex de <i>H. crepitans</i> .....	44
<b>Figure 7:</b> Structure de la huratoxine .....	44
<b>Figure 8:</b> Structure générale d'un glucocérébroside. ....	45
<b>Figure 9:</b> Exemples de cérébrosides biologiquement actifs.....	47
<b>Figure 10:</b> <b>A)</b> Structure du cérébroside t18:1 <sup>EΔ8</sup> ,h16:0 ; <b>B)</b> Structure du cérébroside d18:1 <sup>Δ8</sup> ,h15:0.....	50
<b>Figure 11:</b> <b>A)</b> Structure du squelette tigliane ; <b>B)</b> Structure du squelette daphnane. ....	51
<b>Figure 12:</b> Squelettes des différents types de daphnane. ....	52
<b>Figure 13:</b> <b>A)</b> Structures de la huratoxine (daphnane monoestérifié) ; <b>B)</b> Structure de la 20-tétracosénoyl-huratoxine (daphnane di-estérifié). ....	53
<b>Figure 14:</b> Spectres UHPLC-MS/MS-APCI-CID de la huratoxine .....	54
<b>Figure 15:</b> Obtention de l'ion m/z 361 par perte de la chaîne latérale de la huratoxine .....	54
<b>Figure 16:</b> Fragmentation de l'ion de m/z 361.....	55
<b>Figure 17:</b> <b>A)</b> Structure du TPA ; <b>B)</b> Structure de la huratoxine.....	59
<b>Figure 18:</b> Structures de la yuanhuacine ( <b>A</b> ), de la gnidimacrine ( <b>B</b> ) et du wikstroélide E ( <b>C</b> )... 60	60
<b>Figure 19:</b> Structure et régulation des isoformes de PKCs .....	62
<b>Figure 20:</b> Lipides activateurs des PKC atypiques. ....	64
<b>Figure 21:</b> Structure de l'inhibiteur des αPKCs CRT0066854.....	69
<b>Figure 22:</b> Nombre de nouveaux cas de cancers et de morts par cancer au niveau mondial en 2020 .....	70

<b>Figure 23:</b> Nombres de morts causées par le cancer colorectal dans les 10 pays montrant la plus haute incidence en 2020 et projections pour 2040 .....	71
<b>Figure 24:</b> Etapes de la tumorigenèse dans le CCR sporadique et organisation de la crypte intestinale. ....	72
<b>Figure 25 :</b> Rôles de GSK3 $\beta$ dans les cellules épithéliales colorectales et interactions avec les PKCs.....	75
<b>Figure 26:</b> Schéma de la voie PI3K/Akt .....	76
<b>Figure 27:</b> Schéma de la voie des MAPK.....	77
<b>Figure 28:</b> Interaction des PKCs avec les voies PI3K/Akt, MEK/ERK et $\beta$ caténine.....	78
<b>Figure 29:</b> Activité cytostatique des extraits du latex de <i>H. crepitans</i> .....	80
<b>Figure 30:</b> Activités biologiques de la huratoxine, de la prohuratoxine et du stelléralide J. ....	81
<b>Figure 31:</b> Impact morphogénétique et différenciant sous l'effet de la huratoxine. ....	82
<b>Figure 32:</b> Impact de la huratoxine sur les kinases GSK3 $\beta$ et Akt dans les cellules cancéreuses Caco-2. ....	83
<b>Figure 33:</b> Implication de la PKC $\alpha$ et de la PKC $\delta$ dans les effets de la huratoxine sur les cellules Caco-2. ....	84
<b>Figure 34 :</b> Chromatogramme UHPLC-MS-APCI-POS des extraits du latex de <i>Hura crepitans</i> L. ....	88
<b>Figure 35:</b> Etat d'ionisation des acides gras en fonction du pH .....	90
<b>Figure 36:</b> A) Structure des cérebrosides ; B) Structure de la huratoxine .....	94
<b>Figure 37:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS du précipité et du surnageant.....	95
<b>Figure 38:</b> CCM du témoin d'acide palmitique AP (à gauche) et des phases supérieure PS (organique) et inférieure PI (aqueuse) du partage liquide-liquide. Révélation avec de l'acide phosphomolybdique .....	96
<b>Figure 39:</b> Obtention d'une fraction enrichie en daphnanes monoestérifiés .....	97
<b>Figure 40:</b> Arbre de purification des daphnanes monoestérifiés.....	98
<b>Figure 41:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fraction EC.2.30.A à EC.2.30.E..	99
<b>Figure 42 :</b> Structure des daphnanes di estérifiés (D2).....	100
<b>Figure 43 :</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.32.A à EC.2.32.D .....	101
<b>Figure 44:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.36.A à EC.2.36.C .....	101

<b>Figure 45:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction EC.2.41.C, EC.2.43. I, de la huratoxine et de la molécule M674T11.18 .....	103
<b>Figure 46:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction EC.2.43.C et de la molécule M544T3.10 .....	104
<b>Figure 47:</b> Chromatogrammes de la fraction EC.2.43.E et des molécules M614T4,92 et M528T5.41.....	105
<b>Figure 48:</b> Chromatogrammes de la fraction EC.2.43.F, de la 6'-oxo-huratoxine et de la molécule M598T6.37.....	106
<b>Figure 49:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.42.B, EC.2.65.E et de la molécule M600T4.77.....	107
<b>Figure 50:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction EC.2.65.D et des molécules M616T3.49 et M616T3.96 .....	108
<b>Figure 51:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.65.C, EC.2.90.J et de la molécule M618T3.05.....	109
<b>Figure 52:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.65.G, EC.2.103.G et EC.2.107.C et de la 4',5'-époxy-huratoxine.....	110
<b>Figure 53:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.34.B, EG.64.A et, EC.2.83.I et des molécules M618T2.82 .....	111
<b>Figure 54 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M600T4.77....	113
<b>Figure 55:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M600T4.77 .....	113
<b>Figure 56:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M600T4.77 .....	116
<b>Figure 57:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H de la molécule M600T4.77 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	117
<b>Figure 58:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C de la molécule M600T4.77 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	117
<b>Figure 59:</b> Principales corrélation NOESY du noyau daphnane de la molécule M600T4.77 ...	120
<b>Figure 60:</b> Spectre de dichroïsme circulaire de la huratoxine (118).....	120
<b>Figure 61:</b> Spectre de dichroïsme circulaire de la molécule M600T4.77 dans le CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	121
<b>Figure 62:</b> Configuration absolue de la molécule M600T4.77 .....	121
<b>Figure 63 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M618T3.05....	123
<b>Figure 64:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M618T3.05 .....	123
<b>Figure 65:</b> Proposition de fragmentation pour la molécule M618T3.05 .....	123

<b>Figure 66:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M618T3,05 .....	124
<b>Figure 67:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ de la molécule M618T3,05 dans un mélange de $\text{CD}_2\text{Cl}_2 / \text{CD}_3\text{OD}$ .....	126
<b>Figure 68:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ de la molécule M618T3,05 dans un mélange de $\text{CD}_2\text{Cl}_2 / \text{CD}_3\text{OD}$ .....	126
<b>Figure 69:</b> Spectre de dichroïsme circulaire de la molécule M618T3.05 dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ .....	128
<b>Figure 70:</b> Modèle 3D de la molécule M618T3.05.....	129
<b>Figure 71:</b> Configuration relative de la molécule M618T3.05.....	129
<b>Figure 72 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M598T5.41....	130
<b>Figure 73:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M598T5.41 .....	131
<b>Figure 74:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M598T6,37 .....	132
<b>Figure 75:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ de la molécule M598T6.37 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	133
<b>Figure 76:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ de la molécule M598T6.37 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	133
<b>Figure 77:</b> Spectre de dichroïsme circulaire de la 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ <b>(A)</b> et de la 6'-oxo-huratoxine <b>(B)</b> .....	135
<b>Figure 78:</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M674T11.18 ...	137
<b>Figure 79:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M674T11.18 .....	137
<b>Figure 80:</b> Corrélation HMBC (flèches) et COSY (gras) du noyau daphnane de la molécule M674T11.18.....	138
<b>Figure 81:</b> Corrélation COSY gras du milieu de la chaîne latérale de la molécule M674T11.18 .....	140
<b>Figure 82:</b> Proposition de structure pour la molécule M674T11.18.....	141
<b>Figure 83:</b> Structure simplifiée de la molécule M674T11.18 utilisée pour la modélisation des déplacements chimiques de RMN.....	142
<b>Figure 84:</b> Différence des déplacements chimiques expérimentaux et calculés avec la structure n°1 .....	142
<b>Figure 85:</b> Différence des déplacements chimiques expérimentaux et calculés avec la structure n°2 .....	143
<b>Figure 86:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ de la molécule M674T11.16 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	144

<b>Figure 87:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ de la molécule M674T11.18 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	144
<b>Figure 88:</b> Structure 3D du noyau daphnane de la molécule M674T11.18 .....	146
<b>Figure 89:</b> Spectre de dichroïsme circulaire de la molécule M674T8,16 dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .....	147
<b>Figure 90:</b> Configuration relative de la molécule M674T11.18.....	147
<b>Figure 91:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS avec le gradient 2 et le gradient 4	149
<b>Figure 92 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M616T3.96....	149
<b>Figure 93:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M616T3.96 .....	150
<b>Figure 94:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la chaîne latérale des diastéréoisomères M616T3.96.....	152
<b>Figure 95:</b> Spectre RMN $^1\text{H}$ de la fraction M616T3.96 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	153
<b>Figure 96:</b> Spectre RMN $^{13}\text{C}$ de la fraction M616T3.96 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	153
<b>Figure 97:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS des molécules M618T2.82 avec le gradient 2 et le gradient optimisé 3 .....	155
<b>Figure 98 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M618T2.82 ....	156
<b>Figure 99 :</b> Spectre de masse APCI-CID-NEG haute résolution de la molécule M618T2.82 ....	156
<b>Figure 100:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M618T2.82 .....	156
<b>Figure 101:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M618T2.82 .....	158
<b>Figure 102:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ de la molécule M618T2.82 dans du $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	159
<b>Figure 103:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ de la molécule M618T2.82 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	159
<b>Figure 104:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction M616T3.49.....	161
<b>Figure 105 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M616T3.49 .	162
<b>Figure 106:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M616T3.49 .....	162
<b>Figure 107:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M616T3.49 .....	164
<b>Figure 108:</b> Spectre RMN $^1\text{H}$ de la fraction M616T3.49 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	165
<b>Figure 109:</b> Spectre RMN $^{13}\text{C}$ de la fraction M616T3.49 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	165
<b>Figure 110:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS des molécules M544T3.10 avec le gradient 2 et le gradient optimisé 3.....	167
<b>Figure 111:</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M544T3.10 ...	168
<b>Figure 112:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M544T3.10 .....	168

<b>Figure 113:</b> Structure de la molécule M544T3,10 avec les corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) .....	169
<b>Figure 114:</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H de la molécule M544T3,10 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	170
<b>Figure 115:</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C de la molécule M544T3,10 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	170
<b>Figure 116:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS de la molécule M614T4.92 avec le gradient 2 et la gradient optimisé 3 .....	172
<b>Figure 117 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M614T4.92 ..	173
<b>Figure 118:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M614T4.92 .....	173
<b>Figure 119:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M614T4.92 .....	175
<b>Figure 120:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H de la molécule M614T4.92 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	176
<b>Figure 121 :</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C de la molécule M614T4.92 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	176
<b>Figure 122:</b> Chromatogrammes UHPLC-MS des molécule M528T3.41 avec le gradient 2 et le gradient optimisé 3 .....	178
<b>Figure 123 :</b> Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M528T5.41 ..	179
<b>Figure 124:</b> Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M528T5.41 .....	179
<b>Figure 125:</b> Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M528T5.41 .....	181
<b>Figure 126:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H de la molécule M528T5.41 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	182
<b>Figure 127:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C de la molécule M528T5,41 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	182
<b>Figure 128:</b> Structure des molécules pures isolées .....	184
<b>Figure 129:</b> Structure des daphnanes monoestérifiés isolés en mélange .....	185
<b>Figure 130 :</b> Activité cytostatique d'une sélection de daphnanes sur les cellules Caco-2.....	186
<b>Figure 131 :</b> Structure du noyau daphnane et des différentes chaînes latérales des daphnanes mono-estérifiés utilisés lors des tests cytotoxiques sur les cellules Caco-2 et classement selon leur activité. ....	187
<b>Figure 132 :</b> Eléments structuraux des daphnanes importants pour leur activité cytostatique sur les cellules Caco-2. ....	188
<b>Figure 133 :</b> Activités cytostatiques sur cellules Caco-2 de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine à différentes concentrations. ....	189
<b>Figure 134:</b> Effets de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine sur la croissance des cellules intestinales saines HIEC-6. ....	190

<b>Figure 135:</b> Activités morphologiques sur les cellules Caco-2 de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine. ....	191
<b>Figure 136:</b> Impact du traitement des cellules Caco-2 avec la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine sur le cytosquelette et les organites. ....	192
<b>Figure 137:</b> Impact de l'inhibition de PKC $\zeta$ sur les activités cytotostatiques et morphologiques de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine. ....	194
<b>Figure 138:</b> Régulation de la PKC $\zeta$ lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine. ....	196
<b>Figure 139:</b> Régulation de la GSK3 $\beta$ lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine et influence de la PKC $\zeta$ . ....	197
<b>Figure 140:</b> Régulation de la kinase Akt lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine et influence de la PKC $\zeta$ . ....	198
<b>Figure 141:</b> Implication de la kinase MEK lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine et influence de la PKC $\zeta$ . ....	200
<b>Figure 142:</b> Activité cytotatique de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine sur des organoïdes coliques humains. ....	202
<b>Figure 143:</b> Schéma bilan du mécanisme d'action proposé pour la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine dans les cellules cancéreuses colorectales. ....	205
<b>Figure 144:</b> Photographies de la récolte du latex de <i>Hura crepitans</i> L. ....	218

## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1:</b> Cérébrosides identifiés dans le latex de <i>H. crepitans</i> (33) .....	49
<b>Tableau 2:</b> Daphnanes dérépliqués dans l'extrait éthanolique du latex de <i>H. crepitans</i> (41)...	57
<b>Tableau 3:</b> Daphnanes monoestérifiés isolés (33). .....	58
<b>Tableau 4:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M600T4.77 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	118
<b>Tableau 5:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M618T3.05 dans un mélange de CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CD <sub>3</sub> OD .....	127
<b>Tableau 6:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la 6'-oxo-huratoxine (gauche) dans le CDCl <sub>3</sub> et de la molécule M598T6.37 (droite) dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	134
<b>Tableau 7:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M674T11.18 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> en comparaison des déplacements chimiques des protons et des carbones de la daphnéodrine F dans le CDCl <sub>3</sub> (120).....	145
<b>Tableau 8:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M616T3,96 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	154
<b>Tableau 9:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M618T2.82 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	160
<b>Tableau 10:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M616T3.49 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	166
<b>Tableau 11:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M544T3,10 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	171
<b>Tableau 12:</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M614T4.92 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	177
<b>Tableau 13 :</b> Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M528T3.41 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	183



---

---

# INTRODUCTION

---

---

La biodiversité végétale représente un réservoir important de molécules originales bioactives. La famille des Euphorbiaceae, en particulier, est connue pour produire un latex contenant de nombreux métabolites secondaires. L'étude de *Hura crepitans* L., un arbre de la famille des Euphorbiaceae très répandu en Amérique du Sud et en Afrique, a été motivée par la présence de diterpènes de type daphnane au sein de son latex. En effet, ces molécules sont connues pour être activatrices des sérine-thréonine kinases PKCs impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires (survie, prolifération, différenciation). Ces kinases sont dérégulées dans de nombreuses maladies et sont particulièrement sous exprimées dans le cancer colorectal (CCR). Malgré la prévention et les thérapies anticancéreuses existantes, le CCR reste le troisième cancer le plus fréquent et le deuxième plus mortel au niveau mondial, avec un taux de survie à 5 ans de seulement 5 à 15% au stade métastatique. Dans ce contexte, la découverte de nouvelles molécules naturelles activatrices des PKCs pourrait être un atout prometteur dans les thérapies anticancéreuses.

La première partie de ce travail est dédiée à la description du contexte de l'étude sous la forme d'une synthèse bibliographique. Nous exposerons tout d'abord les aspects taxonomiques et morphologiques généraux des espèces de la famille des Euphorbiaceae, ainsi que leur distribution géographique, leurs utilisations, leur toxicité et leur composition chimique en nous concentrant particulièrement sur les molécules de type diterpènes. Nous détaillerons ensuite les mêmes informations concernant *Hura crepitans* L. en portant une attention particulière à la composition chimique de son latex, et notamment aux diterpènes de type daphnane. Puis, nous décrirons les structures et fonctions des PKCs, notamment leurs implications en cancérologie et dans les infections virales, ainsi que les outils pharmacologiques actuels permettant de les étudier. Le cancer colorectal sera ensuite présenté avec quelques données épidémiologiques, une description des processus de cancérogénèse et des voies de signalisation impliquées en se focalisant sur l'implication des PKCs avec ces différents mécanismes. Enfin, nous résumerons les résultats déjà obtenus au sein de l'équipe de recherche sur ce projet, avant de présenter les objectifs de ces travaux.

La deuxième partie de ce manuscrit est dédiée à la présentation des résultats. Tout d'abord, nous détaillerons l'isolement et l'analyse structurale de trois daphnanes connus et de quatre daphnanes originaux. Ces démonstrations de structure seront poursuivies par l'analyse de six

daphnanes obtenus sous forme de mélanges, qui sont le plus souvent des mélanges de diastéréoisomères. L'évaluation des activités biologiques des molécules isolées est ensuite présentée en commençant par l'activité sur les cellules cancéreuses colorectales Caco-2 en vue d'établir des relations structure activité. Une étude pharmacologique plus poussée, mettant en évidence le rôle de la PKC $\zeta$  dans les effets morphologiques et cytostatiques observés suite au traitement par certains daphnanes, ainsi qu'une étude de différentes voies de signalisation impliquées, est également présentée. Cette étude sur l'effet antiprolifératif de ces molécules se conclue par leur évaluation sur des cellules primaires prélevées chez des patients atteints de cancer colorectal, et cultivées en 3D sous forme d'organoïdes. Enfin, la potentialité d'activité antivirale de trois daphnanes est succinctement décrite.

Après avoir conclu et exposé les perspectives envisagées, nous terminerons ce manuscrit avec la description des différentes méthodes d'analyse et matériels utilisés.

---

---

## ETAT DE L'ART

---

---

# I. Les Euphorbiaceae

---

## A. Classification

La famille des Euphorbiaceae est l'une des plus grandes et des plus complexes famille de plantes parmi les angiospermes. Elle regroupe 4 sous-familles, 49 tribus, plus de 300 genres et 8000 espèces connues pour être des sources de molécules bioactives et de toxines (1–4).

Sa position taxonomique selon l'Angiosperm Phylogeny Group IV est la suivante (5):

**Clade** : *Spermatophyta*

**Clade** : Angiospermes

**Clade** : Dicotylédones vraies

**Clade** : Rosidées

**Clade** : Fabidées

**Ordre** : Malpighiales

**Famille** : Euphorbiaceae

## B. Aspects morphologiques

Les Euphorbiaceae sont une famille de plantes monophylétiques. En effet, la structure de l'enveloppe des graines est caractéristique de la famille. Cette famille de plante est présente sous de nombreuses formes. Les arbres et arbustes prédominent, mais il existe aussi des Euphorbiaceae sous forme d'herbes et de lianes (2,6).

Les principaux caractères morphologiques utiles pour l'identification des Euphorbiaceae sont: la structure du bois, les laticifères, les trichomes et les stomates. De plus, cette famille de plante présente des inflorescences dichasiales, c'est-à-dire qu'elles présentent une double ramification à partir d'un bourgeon terminal (6).

Les genres et sous-familles sont caractérisés notamment grâce au nombre de noyaux polliniques et à la structure de l'exine qui est la couche externe du grain de pollen (6). En effet, leurs caractères floraux et végétatifs sont très modifiés en fonction de leurs habitats et des mécanismes de pollinisation, même si les fleurs sont généralement unisexuées et les fruits souvent schizocarpiques ou capsulaires (4,7,8). La plupart des espèces d'Euphorbiaceae sont pollinisées grâce aux insectes même si certaines espèces peuvent être pollinisées par des chauves-souris comme les *Croton sp.*; *Hura crepitans* L. et *Mabea occidentalis* Benth. (4).

### C. Distribution géographique

Les Euphorbiaceae sont largement répandus dans le monde, dans presque tous les habitats et dans de nombreux climats et sols différents (Figure 1). Cette famille regroupe à la fois des plantes anciennes comme des nouvelles (3).

Ces plantes peuvent être retrouvées à la fois dans des habitats arides ou semi-arides mais aussi dans les forêts primaires tropicales (3,6). La majorité des espèces se trouvent dans les zones tropicales et subtropicales d'Afrique et d'Amérique (1,6). Certaines Euphorbiaceae, notamment du genre *Euphorbia*, peuvent être retrouvées dans des zones non-tropicales comme le bassin Méditerranéen, le Moyen-Orient, l'Afrique du sud et le sud des Etats-Unis (8).

La distribution mondiale des Euphorbiaceae les expose à des habitats très variés ce qui force les plantes à s'adapter en produisant de nombreux métabolites secondaires utiles pour leur survie et leur défense (3).



Figure 1: Distribution géographique des Euphorbiaceae (9)

## D. Utilisations traditionnelles

Les plantes ont toujours joué un rôle clé dans les médecines traditionnelles (1). Les Euphorbiaceae étant une famille très vaste et diversifiée, il existe de nombreuses informations sur leurs utilisations ethno-médicinales. En effet, les membres de la famille des Euphorbiaceae ont été utilisés comme remèdes pour de nombreuses maladies telles que la diarrhée, les infections bactériennes et virales, le cancer, le paludisme, l'infertilité, la syphilis, l'asthme, le diabète, l'inflammation... Différentes parties de la plante peuvent être utilisées : plante entière, racine, feuilles, écorces, graines, sève, latex, fruits...(2).

Par exemple, l'utilisation d'*Euphorbia polycarpa*, *E. hirta* et *Acalypha indica* L. dans la médecine Ayurvédique a été rapportée. *Croton oblongifolius* Roxb. et *C. tiglium* Willd. étaient aussi utilisés par la médecine Ayurvédique pour traiter des maladies du foie, des entorses, des morsures de serpent, des convulsions, de l'asthme, des rhumatismes et même pour des maladies mentales (3).

Également, la médecine chinoise utilise 33 espèces d'Euphorbiaceae. Plusieurs d'entre elles sont utilisées pour traiter les morsures de serpent avec l'idée de combattre des toxines avec d'autres toxines (1,2). Il semblerait même que le genre *Euphorbia* ait été nommé ainsi en hommage à un médecin grec, *Euphorbus*, qui aurait soigné le roi Juba II de Maurétanie avec le latex d'*Euphorbia resinifera* lorsqu'il souffrait de ballonnements (3).

Des Euphorbiaceae, comme *Euphorbia ptercineura*, étaient aussi utilisés au Yucatan pour traiter l'asthme et la toux. *Croton peraeuginosus* a été rapporté pour son utilisation contre les boutons et *Phyllanthus micrandrus* Müll. Arg. pour le traitement de blessures, d'infections et de syndromes inflammatoires (3).

Certains extraits de plantes de la famille des Euphorbiaceae sont disponibles commercialement. *Euphorbia resinifera*, par exemple, est commercialisée sous forme de solution buvable en tant que médicament homéopathique (dilution 8 DH) pour le traitement d'affections cutanées et vésiculaires. Dysentral® est un extrait des racines d'*Euphorbia kansui* commercialisé en tant que purgatif au Mali ou en Allemagne pour un usage vétérinaire (2,3).

Il existe encore bien d'autres exemples d'utilisation traditionnelle des plantes de la famille des Euphorbiaceae. Cependant, dans la plupart des cas, les molécules et les dosages à l'origine de ces effets sont peu connus et nécessitent donc une recherche scientifique pour avoir des données pharmacologiques (3).

## E. Autres utilisations

D'autres Euphorbiaceae sont utilisées comme plantes d'ornement, telles que *E. tirucalli*, *E. milli*, *E. obesa* et *E. pulcherrima*. Certaines de ces plantes ont aussi une importance économique comme l'arbre à caoutchouc (*Hevea brasiliensis* Willd. Ex. A. Juss) ou encore *Jatropha curcas* L. qui est une source de biodiesel (1,3). La plante produisant le manioc *Manihot esculenta*, présente aussi une importance fondamentale pour l'alimentation mondiale. En effet, le manioc fait partie des 13 aliments les plus importants pour l'Homme (1,3,10). *Ricinus communis* L. présente à la fois un intérêt économique majeur par la production d'huile de ricin mais c'est aussi la source de l'une des molécules les plus toxiques : la ricine (1).

Ainsi, les Euphorbiaceae sont considérés comme l'une des 25 familles de plantes les plus importantes économiquement (2).

## F. Toxicité des Euphorbiaceae

De nombreuses espèces d'Euphorbiaceae produisent des molécules toxiques : la ricine notamment, produite par *Ricinus communis* L. Cette protéine est l'une des substances les plus toxiques produite par une plante (1,3). Elle peut être toxique par ingestion, inhalation ou injection et est présente en quantité importante dans la plante (1).

De plus, de nombreux poisons responsables de dermatoses sont produits par les genres *Jatropha* et *Euphorbia*. *J. curcas* L. biosynthétise des esters de phorbols et des curcines toxiques pour les micro-organismes, les animaux et les Hommes (1). Les latex d'*E. tirucalli* et d'*E. royleana* sont connus pour causer des conjonctivites en cas de contact avec les yeux (3).



*E. tirucalli* L., *E. scheffleri* Pax, *E. inaequilatera* Sond sont connus pour être ichtyotoxiques (2,3). *E. ledinii* A Berger, *E. heterophylla* L., *E. cooperi* N.E.Br ex A. Berger, *E. candelabrum* Kotschy, *E. virosa* Willd., *E. poissonii*, *E. unispina* N.E.Br. et *E. venenifica* Tremaux ex Kotschy sont quant à eux des poisons pour l'Homme (2,3).

*E. caput-medusae* L., *E. silenifolia* Sweet et *E. ingens* E. Mey Ex Boiss sont connus pour produire des composés toxiques pour les animaux domestiques et *E. tirucalli*, *E. poissonii*, *E. unispina* et *E. venenifica* produisent des molécules irritantes pour la peau (2,3).

Certaines de ces plantes sont aussi mises en avant pour leurs effets carcinogènes *via* l'induction ou la promotion de la division cellulaire. Ce sont *E. tirucalli*, *E. leuconeura* et *Jatropha curcas* (2,3).

## G. Composition chimique

### 1. Généralités

Comme on l'a vu, les Euphorbiaceae sont l'une des plus grandes familles de plantes avec la plus importante variété d'espèces dans de nombreux habitats. Il y a donc une grande probabilité pour que les espèces de cette famille présentent une importante diversité dans leur composition chimique comparée à celle d'autres familles de plantes (3).

En effet, les Euphorbiaceae sont connues pour la biosynthèse de différents métabolites spécialisés tels que des terpènes, des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des stéroïdes et des peptides (cycliques et linéaires) (1).

La particularité de deux sous-familles d'Euphorbiaceae (*Euphorbioideae* et *Crotonoideae*) est la production d'un latex grâce à leurs canaux laticifères (6,8). A l'opposé, Ramalho *et al* rapportent trois sous-familles d'Euphorbiaceae dépourvues de latex : *Phyllanthoideae*, *Olfieldioideae* et *Acalphoide* (1). Un latex est un mélange complexe de peptides, d'enzymes, de triterpènes, de diterpènes, d'acides aminés entre autres molécules (1). La fonction physiologique de ce latex au niveau de la plante n'est pas tout à fait connue, mais il joue probablement un rôle important pour les réserves d'eau et de nutriments et il paraît être impliqué dans les défenses de la plante

contre les phytopathogènes et pour la cicatrisation de blessures (11,12). Ce latex est la principale source de molécules bioactives avec différentes activités décrites telles qu'une activité cytotoxique, antipaludique, antibactérienne, antifongique, immunosuppressive...(1)

De par leur diversité et leurs habitats variés, les Euphorbiaceae produisent un grand nombre de métabolites spécialisés, souvent originaux et donc intéressant pour la recherche de molécules naturelles bioactives.

## 2. Focus sur les diterpènes d'Euphorbiaceae

### a) *Structure*

Les diterpènes d'Euphorbiaceae (13–15) sont une classe de molécules, possédant un squelette à 20 atomes de carbone, particulièrement intéressante car constituée d'un large groupe de composés possédant des structures très différentes (daphnanes, tiglianes, jatrophanes, ingénanes...). En effet, on peut retrouver plus de 20 types de squelettes diterpéniques dont la plupart sont uniquement présents chez les Euphorbiaceae (Figure 2) (15–17).

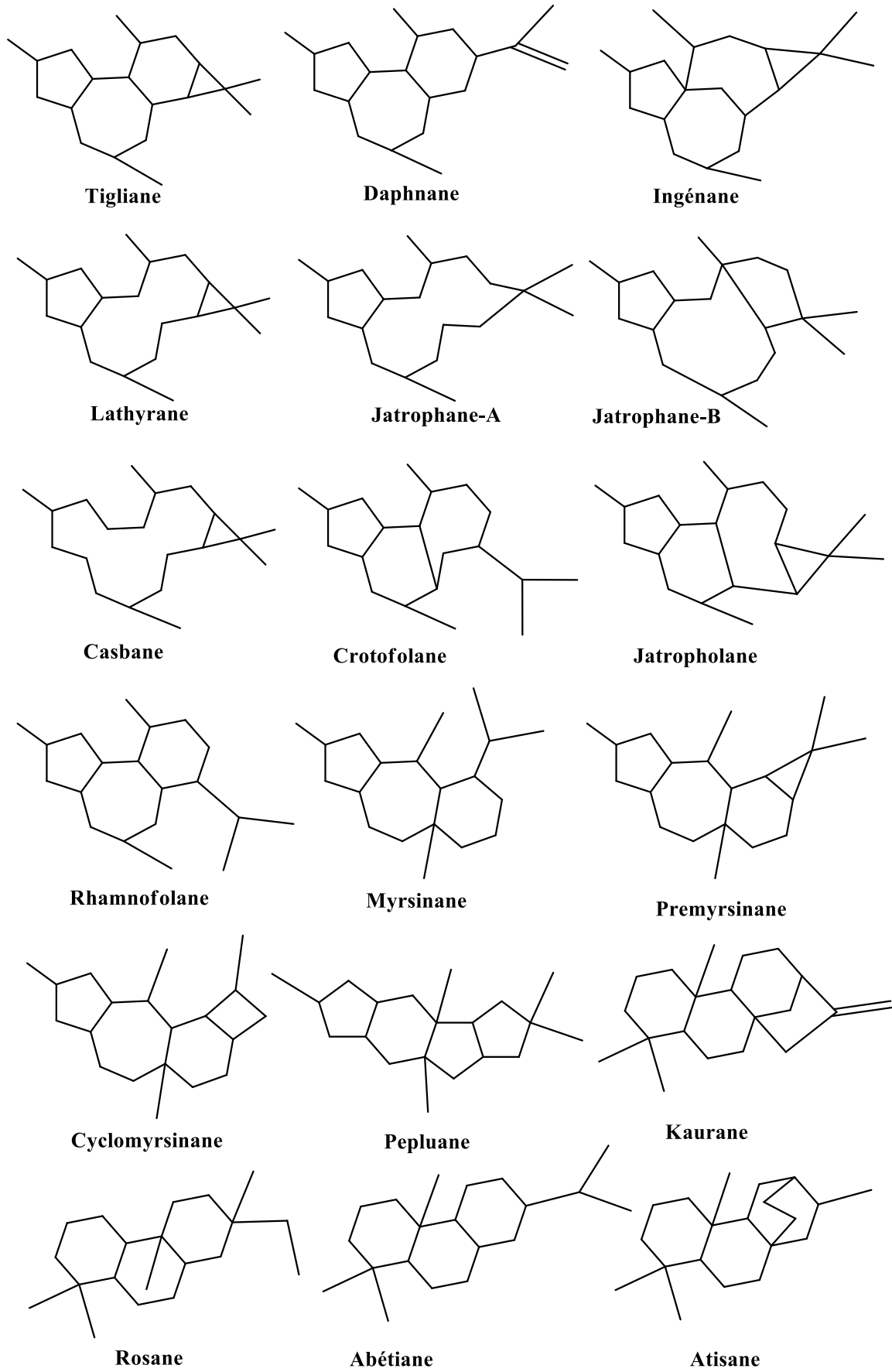


Figure 2: Squelettes des diterpènes d'Euphorbiaceae

## b) *Activités biologiques*

Les diterpènes d'Euphorbiaceae présentent un potentiel bioactif remarquable. Certains sont notamment connus pour interagir avec les protéines kinases C (PKC) au niveau de leur domaine C1 (13,15,18). Celui-ci est riche en cystéine et joue un rôle clef dans la localisation et l'activation des PKCs lors de leur interaction avec les diterpènes (18,19). Le mébutate d'ingénol, isolé à partir d'*Euphorbia peplus* par exemple, a été commercialisé sous le nom de Picato<sup>®</sup> et est un activateur des PKCs (18,20) utilisé dans le traitement des kératoses actiniques. L'activation des PKCs peut être une cible thérapeutique intéressante dans de nombreuses autres pathologies dont certaines sont listées ci-dessous.

### (1) *Activité antivirale*

Différents diterpènes d'Euphorbiaceae ont été étudiés pour leurs activités antivirales, et notamment pour leur activité anti-CHIKV (virus chikungunya) (21,22). Cette maladie cause des épidémies massives et une morbidité sévère, cependant il n'existe à ce jour aucun antiviral spécifique, ni aucun vaccin pour le traitement et/ou la prévention de cette virose (13,15,18,21). Ces dernières années, l'intérêt pour l'étude des *Euphorbiaceae* dans le but de découvrir de nouveaux candidats médicaments anti-CHIKV a donc été grandissant (19,21). De 2009 à 2011, une étude réalisée sur les biodiversités néo-calédonienne, méditerranéenne et de l'océan indien a mis en avant les Euphorbiaceae comme étant la famille de plante la plus prometteuse dans la découverte d'un nouvel agent anti-CHIKV (15). Dans cette étude, 32 tiglanes et 1 ingénane ont été mis en avant comme inhibiteurs de la réplication du CHIKV *in vitro* avec des EC<sub>50</sub> allant de 2 nM à 5 μM (15). L'activité anti-CHIKV la plus importante a été montrée pour le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) et le phorbol-12,13-didécanoate avec des EC<sub>50</sub> de 2,9 et 6,0 nM, respectivement (19,22). Le premier ingénane à montrer une activité anti-CHIKV significative est l'ingénol-3,20-dibenzoate avec une EC<sub>50</sub> de 1,2 μM (15). Des diterpènes de type daphnanes orthoestérifiés (DDO) ont aussi montré une activité anti-CHIKV avec des EC<sub>50</sub> allant de 0,6 à 18 μM (15). Par exemple, les codiapeltines A et B, isolées à partir de l'écorce de *Codiaeum pelatum*, présentent une activité anti-CHIKV comparable à celle de la chloroquine avec des EC<sub>50</sub> de 10 et 4,4 μM respectivement (14). On peut aussi citer la trigocherriérine A et le trigocherriolide E, deux DDOs isolés à partir de l'écorce et du bois de *Trigonostemon cherrieri*,

qui inhibent sélectivement la réplication du CHIKV avec des  $EC_{50}$  de 0,6 et 0,7  $\mu\text{M}$  respectivement (21). Certains jatrophanes présentent aussi une activité anti-CHIKV avec des  $EC_{50}$  allant de 0,76  $\mu\text{M}$  à plus de 200  $\mu\text{M}$  (15). Le jatrophane présentant l'activité anti-CHIKV la plus importante est le 3,5,7,15-tétraacétoxy-2-hydroxy-8-tigloyloxy-9,14-dioxojatropha-6(17),11E-diène. Cette molécule, isolée à partir d'un extrait brut de la plante entière *Euphorbia amygdaloides* spp. *semipefoliata*, présente une  $EC_{50}$  de 0,76  $\mu\text{M}$ , soit une activité plus de 10 fois supérieure à celle de la chloroquine ( $EC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ).

Des activités anti-VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ont aussi été montrées pour les diterpènes d'Euphorbiaceae. Des tiglianes et des ingénanes, par exemple, ont montré une activité anti-VIH1 et anti-VIH2 *in vitro* avec des  $IC_{50}$  de l'ordre du nM (19,23,24). On peut citer également la prostatine ou le 12-déoxyphorbol-13-phénylacétate (DDP) qui présentent une activité anti-VIH *in vitro* puissante et sélective et qui sont donc considérés comme des agents anti-VIH prometteurs (15,22). Pour les diterpènes testés sur VIH-1 et VIH-2, on note que l'activité antivirale est systématiquement plus importante sur VIH-1 (19). De nombreux daphnanes sont aussi des régulateurs puissants du VIH-1 à des concentrations de l'ordre du nM (25). Les stelléralides A, F, G et H, isolés à partir de *Stellera chamaejasme*, présentent une activité anti-VIH impressionnante avec des  $EC_{50}$  comprises entre 0,06 et 1,1 nM (23,24). Les stelléralides I et J ainsi que la huratoxine ont aussi montré une activité anti-VIH significative avec des  $EC_{50}$  allant de 2,6 à 120 nM (24). La gnidamicrine (GM), isolée à partir de *Stellera chamaejasme*, présente une activité anti-VIH1 importante, mesurée sur des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells, contenant donc les lymphocytes et les monocytes) de patients sous antirétroviraux, avec des concentrations de l'ordre du pM. En effet, la GM permet de diminuer la fréquence de cellules latentes infectées (de 4,4 à 5,6 fois), ainsi que les niveaux d'ADN VIH1 dans ces cellules (7,7 fois), à des concentrations n'augmentant pas la prolifération des cellules T, ni la production de cytokines pro-inflammatoires. L'élimination par la GM des cellules latentes infectées serait due à une stimulation importante de la réplication virale et donc à une production élevée d'antigènes viraux permettant l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Cette action serait médiée par l'activation sélective des PKC  $\beta$ I et PKC  $\beta$ II. Cette molécule présente donc un fort intérêt pour le développement de nouveaux traitements anti-VIH1 (23,25).

## (2) Activité anticancéreuse

Sur différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, les diterpènes d'Euphorbiaceae ont montré une activité cytotoxique. Cette activité peut être due à une modulation des PKCs, du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, ou à une inhibition de la Topoisomérase II et de la synthèse d'ADN (16).

Différents ingénols isolés à partir des racines d'*Euphorbia kansi* induisent une inhibition significative de la prolifération des cellules embryonnaires *Xenopus* à de faibles concentrations *via* une inhibition de la topoisomérase II. La jolkinolide B présente une activité cytostatique sur les cellules humaines de leucémie myéloïde chronique avec une IC<sub>50</sub> de 12,1  $\mu$ g/mL. Le mécanisme d'action de cette molécule passe par une activation des caspases 3 et 9 et par une inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt. Une activité antiproliférative a aussi été montrée pour des esters du 12-déoxyphorbol isolés d'*Euphorbia cornigera* avec des IC<sub>50</sub> comprises entre 0,5 et 1  $\mu$ g/mL. Des diterpènes de type jatrophane, isolés d'*Euphorbia helioscopia*, tels que l'euphorine L et l'euphoscopine possèdent une activité cytotoxique sur des cellules HL-60 (promyéloblastes isolés d'une patiente atteinte d'une leucémie) avec des IC<sub>50</sub> de 2,7 et 9,0  $\mu$ M, respectivement. Les euphodendrophanes A et B inhibent la prolifération des cellules de cancer du poumon sans effet sur les cellules saines avec des IC<sub>50</sub> d'environ 50 et 20  $\mu$ M, respectivement. De plus, ces molécules utilisées en combinaison avec le paclitaxel permettent de contrecarrer la chimiorésistance de ce dernier. De façon intéressante, les diterpènes d'Euphorbiaceae peuvent avoir, en plus de leur effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses, une action anti-angiogénique par l'inhibition du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (16).

## (3) Autres activités

Des activités anti-inflammatoires importantes *in vivo* ont été rapportées pour les pépluanones 1 et 2 isolées d'*Euphorbia peplus* (3,16). Une activité antibactérienne a aussi été montrée pour la guyonianine C contre *Bacillus cereus* (16). Des diterpènes de type lathyrane isolés à partir d'*Euphorbia micratina* ont des propriétés vaso-relaxantes. Il a été mis en avant un effet neuroprotecteur *in vitro* pour des diterpènes de type 19-myrsinol isolés d'*Euphorbia*

*prolifera* à des concentrations comprises entre 3 et 30  $\mu\text{M}$  (16). Un effet analgésique chez la souris à des doses de 5 à 20 mg/kg a été rapporté pour la myrsinane isolée d'*Euphorbia decipens*. Cette activité est comparable à celle de l'aspirine ou de l'ibuprofène mais à une dose de 100 mg/kg (26).

Ainsi les diterpènes d'Euphorbiaceae possèdent une grande diversité et originalité structurale avec des activités biologiques variées. Cette famille de plante est donc un réservoir de nouvelles molécules bioactives pour la découverte de nouveaux médicaments.

## II. *Hura crepitans* L.

### A. Généralités

*Hura crepitans* L. ou « Sandbox tree » fait partie de la famille des Euphorbiaceae, de la sous famille des *Euphorbioideae*, et de la tribu des *Hippomaneae* qui comprend 32 genres dont le genre *Hura* L. (4). Cette plante est native d'Amérique du sud et est maintenant répandue en Afrique et en Asie (Figure 3) (27–29).

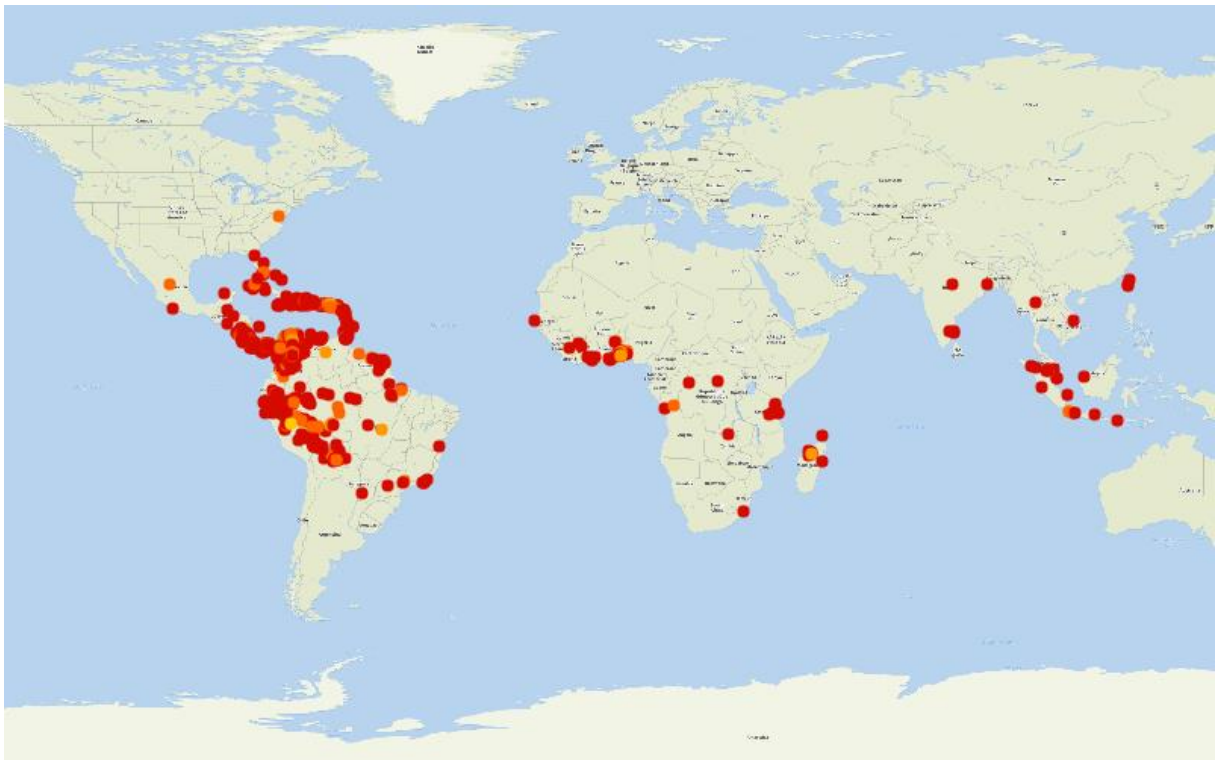


Figure 3: Répartition géographique de *Hura crepitans* L. (source Global Biodiversity Information Facility)(29)

*Hura crepitans* L. peut aussi être appelé *H. brasiliensis* Willd., *H. senegalensis* Baill. et *H. strepens* Willd (28). Dans les pays d'Afrique et d'Amérique du sud, *H. crepitans* porte parfois des noms spécifiques : Aroyin (Nigéria), Okafo odidi (Ghana) (27), Assacou ou sablier du Brésil (30), Catahua (Pérou) (31).



## B. Caractères morphologiques

*H. crepitans* est un arbre monoïque qui possède des épines sur toute l'écorce du tronc. Il peut atteindre une taille entre 35 et 60 m selon son environnement. Ses feuilles peuvent atteindre jusqu'à 30 cm de long. Il est caractérisé par des fleurs rouges sans pétales et des fruits en forme de capsules déhiscentes composés de 11 à 14 carpelles qui abritent des graines dures et aplaties. Les fruits font 3 à 5 cm de long et 5 à 8 cm de large et deviennent brun rougeâtre à maturité. Les graines font 2 cm de large et sont dispersées par un mécanisme explosif lorsqu'elles sont sèches (Figure 4) (4,27,32). *H. crepitans* possède des canaux laticifères sous la forme d'une série de cellules de formes circulaires à polyédriques (28). Lors de la scarification du tronc, il est possible de récupérer un latex blanc très irritant (33).



Figure 4: Photographies de *Hura crepitans* L. : A gauche le tronc, en haut à droite les graines, en bas à droite les fruits (27).

## C. Usage en médecine traditionnelle et autres utilisations

*H. crepitans* a de nombreuses applications en ethnomédecine. Elle est réputée purgative, émétique, hépatoprotectrice, anti-inflammatoire, antimicrobienne et pour le traitement de la lèpre (27,34).

Il a été rapporté que le latex était utilisé pour faire tomber les dents malades (27,35). La sève est utilisée au Pérou pour le traitement de la diarrhée et comme vermifuge chez les chiens et l'Homme. Elle est aussi utilisée pour traiter des maux d'estomac uniquement chez le chien (27). Les feuilles, l'écorce, les racines et les graines d'*H. crepitans* ont aussi des applications thérapeutiques dans les maladies de la peau, les rhumatismes et les parasitoses intestinales (35).

L'huile extraite des graines a aussi été utilisée chez l'Homme pour ses propriétés purgatives (36).

De nos jours, une teinture mère préparée à partir du latex d'*H. crepitans* est commercialisé en France en tant que médicament homéopathique sous le nom de *Hura brasiliensis* pour traiter des symptômes digestifs (troubles du transit, colopathie droite, anorectite, hémorroïdes) et des irritations cutanées (30).

Cet arbre est aussi connu pour sa toxicité. Dans de nombreuses parties du monde, les pêcheurs et les guerriers appliquent le latex sur leurs flèches (27,30,35). L'action toxique serait due à la présence de deux lectines (protéines) ayant une activité hémagglutinante (27,35).

L'huile issue des graines a montré une activité insecticide intéressante qui pourrait permettre le remplacement des insecticides de synthèse dans la protection des denrées alimentaires (37). De plus, son utilisation dans le cadre de la production de savon et de biodiesel a été envisagée (36,38).

Enfin *H. crepitans* est aussi utilisé en Afrique comme arbre d'ombrage et son bois est utilisé en construction car il est très peu cher (27,28). Cette utilisation a contribué à la déforestation (28).

## D. Composition chimique

### 1. Généralités

Très peu de données sont disponibles sur la phytochimie et les propriétés pharmacologiques de *H. crepitans*. Cependant, quelques molécules ont été isolées à partir des

de différents organes de la plante. Ce paragraphe se concentre sur les molécules identifiées dans les autres parties de la plante que le latex qui fera l'objet de la partie suivante.

De la sève, trois molécules ont été isolées et décrites : l'hexahydrohuratoxine, l'hurain (enzyme protéolytique) et la crepitine (toxalbumine) (27,34) .

Des chercheurs ont isolé, à partir de l'écorce, le 6,7-époxy-5-hydroxyrésiniféronol-14-(2,4-tétradécadiénoate) qui est actif dans l'alopecie androgénique (27). D'autres molécules ont pu être identifiées par GC-MS, telles que le 5-(hydroxyméthyl)furan-2-carbaldéhyde, le 3,5-dihydroxy-6-méthyl-2,3-dihydro-4*H*-pyran-4-one, la nitrocoumarine, le méthyl-14-méthylpentadécanoate, l'acide hexadécanoïque, l'acide stéarique, l'acide daphnétoxine, la huratoxine et l'apocynine (Figure 5) (32,34). L'acide syringique et l'acide caféique ont également été isolés à partir d'un extrait aqueux de feuilles de *H. crepitans* (35).

L'étude de la composition d'une huile essentielle de feuilles de *H. crepitans* a montré la présence de sept molécules majoritaires : éthyl-butyrate, éthyl-propionate, isopentyl acétate, isopentyl alcool, isopentyl butyrate, léthyl-butyrate et n-octène (27).

Les graines, quant à elles, peuvent donner une huile riche en acides gras insaturés tels que l'acide linoléique et l'acide oléique et en acide gras saturés tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique. Les proportions de ces différents acides gras varient selon les publications mais il semblerait que les acides gras insaturés soient majoritaires (36,38,39).

La toxicité de la plante est due notamment à deux toxalbumines : hurine et crepitina qui sont largement répandues dans toutes les parties de la plante (27). Cependant, l'extrait hydro-éthanolique d'écorce et de feuilles semble non toxique après administration orale chez l'animal, avec une dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) estimée à 5000 mg/kg (40).

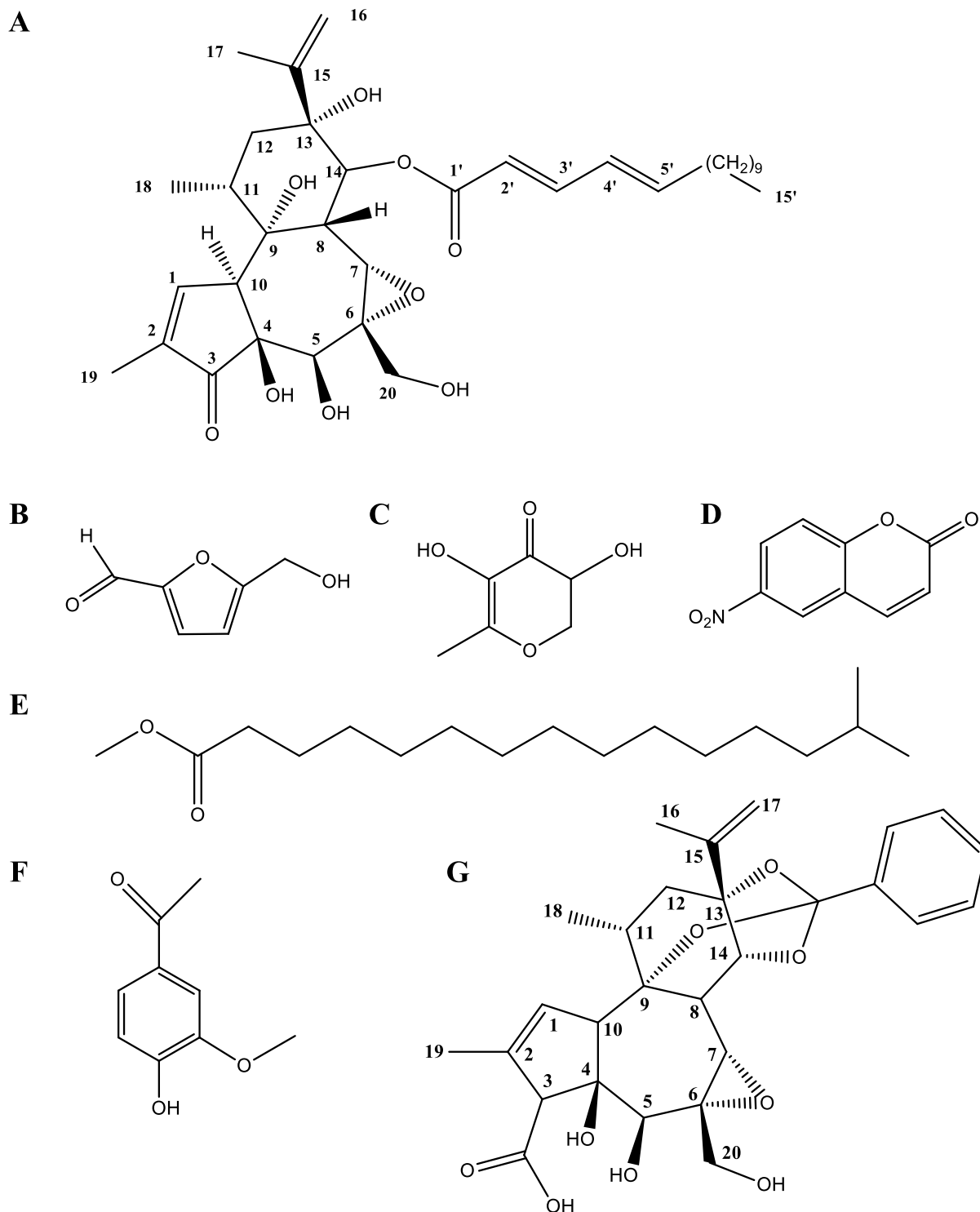


Figure 5: A) Structure du 6,7-époxy-5-hydroxyrésiniférol-14-(2,4-tétradécadiénoate). B) Structure du 5-(hydroxyméthyl) furan-2-carbaldéhyde. C) Structure du 3,5-dihydroxy-6-méthyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one. D) Structure de la nitrocoumarine. E) Structure du méthyl-14-méthylpentadécanoate. F) Structure de l'apocynine. G) structure de l'acide daphnétoxine

## 2. Focus sur le latex

### a) Généralités

Nous avons vu plus haut que les latex d'Euphorbiaceae sont une source importante de molécules bioactives. C'est pourquoi notre laboratoire s'est intéressé à l'étude de la composition du latex de *H. crepitans* (41). Le latex lyophilisé a été extrait avec de l'éthanol à 95% et un travail de déréplication a été réalisé. L'étude du chromatogramme UHPLC-MS/MS a révélé la présence de trois classes de molécules majoritaires dans l'extrait brut du latex de *H. crepitans*: des daphnanes monoestérifiés, des cérébrosides et des daphnanes di-estérifiés (Figure 6).

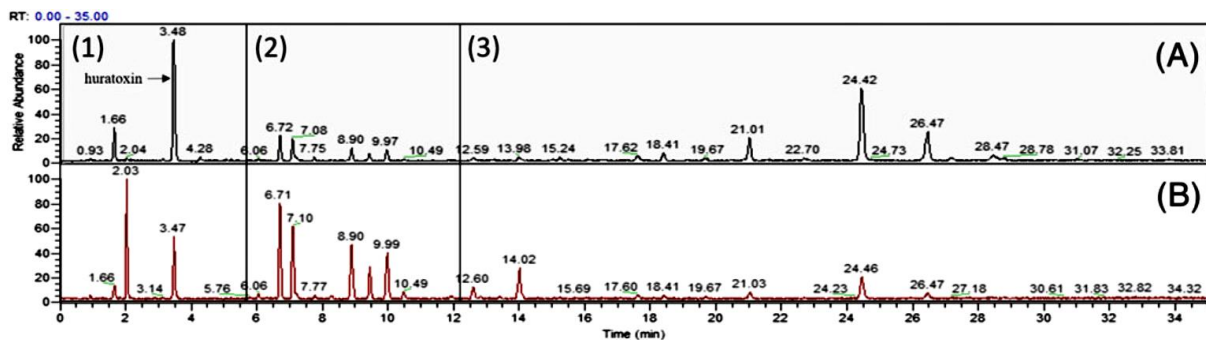


Figure 6: Chromatogramme UHPLC-MS de l'extrait brut du latex de *H. crepitans*. Sources d'ionisation APCI en mode négatif (A) et en mode positif (B)(41). (1) Daphnanes monoestérifiés ; (2) Cérébrosides ; (3) Daphnanes di-estérifiés. Le pic représentant l'huratoxine est indiqué.

Le composé majoritaire a été identifié comme étant la huratoxine (41). La huratoxine, un daphnane orthoestérifié (Figure 7) possédant des propriétés piscicides, avait déjà été décrite dans la composition du latex de *H. crepitans* par Buchanan et ses collègues en 1983 (17).

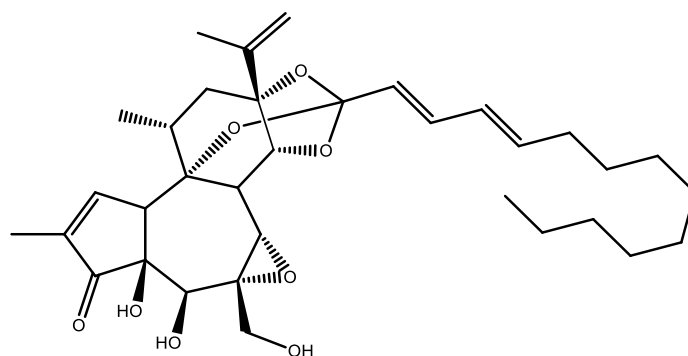


Figure 7: Structure de la huratoxine

D'autres molécules ont été décrites dans la composition du latex de *H. crepitans* : deux lectines possédant des propriétés hemagglutinantes avec une capacité à inhiber la synthèse de protéines (27,34,42) et trois triterpènes majoritaires (méthylène-24-cycloartanol, cycloarténol et butyspermol) (20,43).

## b) Cérébrosides

### (1) Généralités

Bien que les cérébrosides soient une classe de composés majoritaires dans le latex de *H. crepitans* (41), notre travail de recherche ayant porté sur les daphnanes, nous ne décrivons ici ces composés que succinctement.

Les cérébrosides sont des molécules amphiphiles de la famille des glycosphingolipides. Chimiquement, ils sont constitués d'un monosaccharide, le plus souvent un glucose ou un galactose, lié par une liaison  $\beta$ -osidique à un céramide (Figure 8). Celui-ci est composé d'une longue chaîne aminée liée par une liaison amide à une chaîne d'acide gras (44–47). Différents groupements fonctionnels peuvent être liés à la partie céramide des cérébrosides, notamment des groupements méthyle, hydroxyle, des insaturations ou des cycles cyclopropanes (48). Les modifications structurales entre les différents cérébrosides concernent donc la longueur, le degré d'insaturation et les substituants des chaînes du céramide (20,49,50).

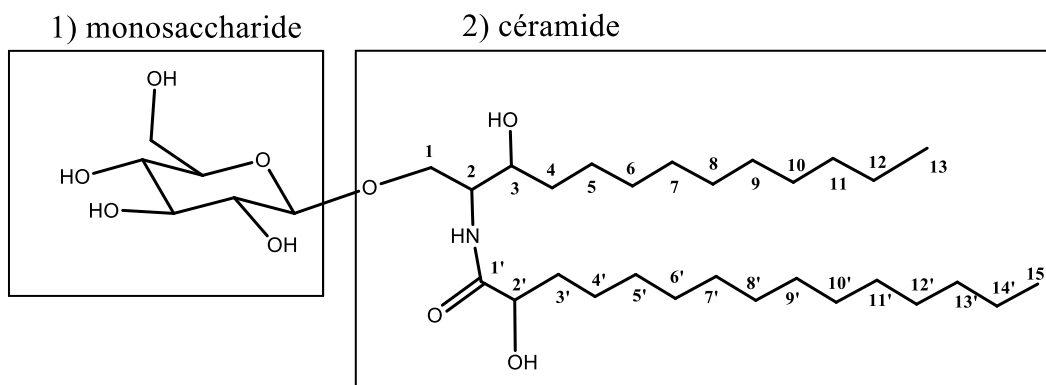


Figure 8: Structure générale d'un glucocérébroside. (1) monosaccharide, (2) céramide.

Les cérébrosides sont présents dans différents organismes vivants, à la fois terrestres et marins : éponges, invertébrés marins, bactéries, champignons, plantes, mammifères (44–47).

Deux familles principales composent les cérébrosides : les glucocérébrosides retrouvés chez les champignons, les plantes et les animaux, et les galactocérébrosides uniquement présents chez les champignons et les animaux (48). De plus, il a été noté que les chaînes aminées des cérébrosides issus d'invertébrés marins sont différentes de celles des cérébrosides de plantes ou de mammifères, ces dernières ne contenant souvent qu'une seule double liaison.

Les cérébrosides sont donc de distribution très large dans le vivant malgré leur diversité structurale restreinte.

## (2) Activités biologiques

Les cérébrosides sont retrouvés dans les membranes de toutes les cellules eucaryotes et chez quelques bactéries procaryotes (48,50). Ils possèdent un rôle très important pour la structure et la texture des membranes cellulaires et sont des médiateurs cellulaires pour différents phénomènes biologiques tels que l'agglutination cellulaire, la communication intracellulaire et intercellulaire, et le développement cellulaire (44,48).

Dans le cas des plantes, les cérébrosides ont un rôle pour l'adaptation de la plante au stress dû à la chaleur ou au froid. Par exemple, un niveau plus important de cérébrosides de type 4-hydroxy-8Z-sphingénine a été détecté chez les vignes les plus résistantes au froid (44).

De plus, les cérébrosides sont importants dans la régulation de la croissance cellulaire, dans l'apoptose et dans la défense contre certains pathogènes. En effet, certaines plantes sont capables de reconnaître les cérébrosides des champignons et d'activer des mécanismes de défense adaptés (20,50).

Hormis leurs rôles physiologiques, les cérébrosides présentent aussi des activités antifongique, antivirale, antibactérienne, anti-inflammatoire, immunosuppressive et anticancéreuse (48). Leur activité antifongique a été décrite vis-à-vis des souches *Candida spp.* et *Mycobacterium tuberculosis* pathogènes pour l'Homme (51,52). Récemment, parmi trente et un cérébrosides isolés d'organismes marins et étudiés pour leur activité antivirale vis-à-vis du SARS-CoV-2, le réniéroside C1 (Figure 9) a montré une activité inhibitrice de la protéine hACE2 (human Angiotensin-Converting Enzyme 2) *in silico*. Cette protéine est reconnue par la protéine S du

virus et est responsable de son entrée dans les cellules hôtes (48). Le chrysogéside B, isolé de *Penicillium chrysogenum*, possède une activité antibactérienne vis-à-vis d'*Enterobacter aerogenes*, souvent associé aux infections nosocomiales (48). Le cordycérébroside B (Figure 9) isolé de l'ascomycète *Cordyceps militaris*, possède une activité inhibitrice de la protéine PTP1B (Protéine Tyrosine Phosphatase 1B), élément clé dans le contrôle négatif de la signalisation cellulaire dépendante de l'insuline, et représente donc une voie prometteuse pour le traitement du diabète de type II.

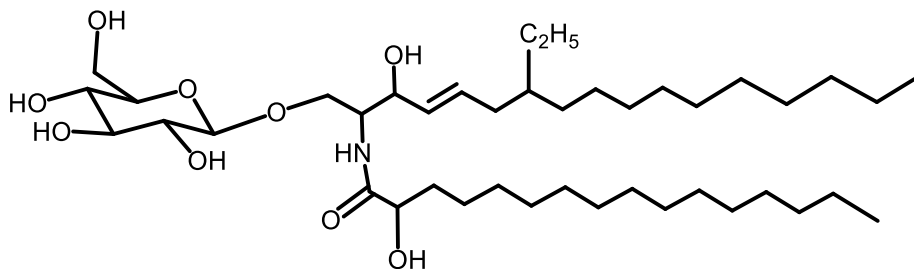
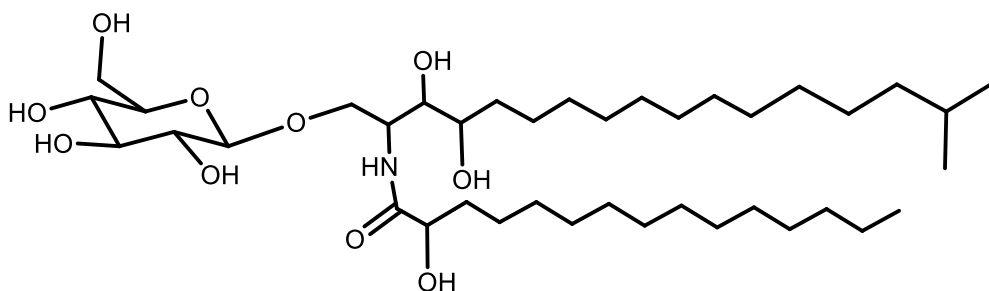
**A****B**

Figure 9: Exemples de cérébroside biologiquement actifs. A) Cordycérébroside B, B) Réniéroside C1.

De plus, les cérébroside peuvent avoir une activité cytotoxique. En effet, deux galactocérébroside, les plakosides A et B, isolés de l'éponge marine *Plakortis simplex*, ont montré une forte activité immunosuppressive sur des lymphocytes T activés (48). Deux cérébroside isolés d'*Euphorbia peplis* ont montré une activité antiproliférative modeste vis-à-vis de cellules tumorales humaines (20,53). Les glucocérébroside et les ophidiacérébroside A à E, isolés de l'étoile de mer *Ophidiaster ophidiamus*, sont efficaces à une concentration de 2 µg/ml pour inhiber plus de 70% de la prolifération de cellules murines leucémiques (48). Une corrélation entre la prise de cérébroside alimentaire (contenus notamment dans le riz, le maïs, le soja...) et la prévention du cancer du côlon a été mise en avant dans différents



travaux. Cela s'expliquerait par l'hydrolyse des cérebrosides dans le corps humain libérant des composés bioactifs (céramide, chaîne aminée...). Les cellules Caco-2 (lignée colorectale cancéreuse humaine) mises en présence, pendant 24 heures, avec des chaînes aminées (20  $\mu$ M) de cérebrosides de concombres de mer deviennent apoptotiques. La présence de doubles liaisons conjuguées sur la chaîne aminée, spécifique des cérebrosides des invertébrés marins, pourrait expliquer cette activité antitumorale (20,54).

### (3) Les cérebrosides du latex de *Hura crepitans* L.

Les cérebrosides sont connus pour être présents dans le latex des Euphorbiaceae (11). Dans le cadre de la thèse de Manon Trinel, une dizaine de cérebrosides ont été dérépliqués dans l'extrait brut du latex de *H. crepitans* grâce à leurs spectres de fragmentation MS-MS particulièrement informatifs et caractéristiques (33).

Tableau 1: Cérébrosides identifiés dans le latex de *H. crepitans* (33)

Nomenclature	Temps de rétention (min)	[M - H] <sup>-</sup>	HCD-NEG-MS/MS	Formule brute
t18:1 <sup>ZΔ8</sup> ,h16:0	6,69	730,5459	568,4945 (12) ; 326,2701 (100) ; 296,2596 (7) ; 271,2281 (11) ; 253,2170 (5) ; 225,2224 (20)	C <sub>40</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> N
t18:1 <sup>EΔ8</sup> ,h16:0	7,08	730,5458	568,4911 (12) ; 326,2701 (100) ; 296,2602 (6) ; 271,2279 (12) ; 253,2174 (6) ; 225,2224 (22)	C <sub>40</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> N
d18:1 <sup>1Δ8</sup> ,h15:0	7,76	700,5339	538,4763 (21) ; 520,4663 (30) ; 280,2606 (5) ; 211,2039 (6)	C <sub>39</sub> H <sub>75</sub> O <sub>9</sub> N
t18:0,h16:0	8,89	732,5610	570,5098 (15) ; 326,2699 (100) ; 296,2588 (6) ; 271,2276 (13) ; 253,2175 (4) ; 225,2225 (19)	C <sub>40</sub> H <sub>79</sub> O <sub>10</sub> N
d18:1 <sup>ZΔ8</sup> ,h16:0	9,43	714,5510	552,5000 (80) ; 534,4886 (100) ; 296,2588 (13) ; 280,2653 (30) ; 225,2223 (31)	C <sub>40</sub> H <sub>77</sub> O <sub>9</sub> N
d18:1 <sup>EΔ8</sup> ,h16:0	9,96	714,5509	552,4998 (92) ; 534,4891 (100) ; 296,2592 (25) ; 280,2637 (32) ; 225,2225 (36)	C <sub>40</sub> H <sub>77</sub> O <sub>9</sub> N
t18:1 <sup>ZΔ8</sup> ,h18:0	9,96	758,5776	596,5279 (14) ; 354,3011 (100) ; 324,2907 (7) ; 299,2593 (13) ; 253,2541 (19)	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> O <sub>10</sub> N
t18:1 <sup>EΔ8</sup> ,h18:0	10,45	758,5764	596,5266 (9) ; 354,3014 (100) ; 324,2915 (7) ; 299,2585 (9) ; 253,2541 (24)	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> O <sub>10</sub> N
d18:0,h16:0	12,59	716,5659	554,5158 (94) ; 536,5042 (100) ; 296,2607 (20) ; 282,2810 (56) ; 225,2220 (37)	C <sub>40</sub> H <sub>79</sub> O <sub>9</sub> N
d18:1 <sup>Δ8</sup> ,h18:0	13,39	742,5851	580,5383 (46) ; 562,5199 (100) ; 253,2541 (43)	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> O <sub>9</sub> N

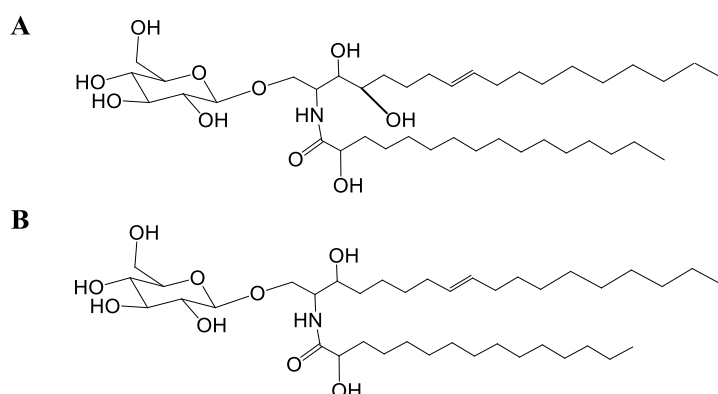


Figure 10: A) Structure du cérébroside t18:1<sup>EΔ8</sup>,h16:0 ; B) Structure du cérébroside d18:1<sup>Δ8</sup>,h15:0. La nomenclature utilisée pour la dénomination des cérébrosides est la suivante : la chaîne aminée est décrite en premier, la première lettre indique le nombre de fonctions hydroxyles (h = hydroxylée ; d = dihydroxylée...), puis le nombre de carbones de la chaîne est indiqué suivi du nombre de doubles liaisons avec leur configuration Z ou E et leur position en exposant. La structure de la chaîne d'acide gras est décrite dans un deuxième temps avec la même codification.

Les cérébrosides identifiés dans le latex de *H. crepitans* possèdent tous une chaîne aminée à 18 atomes de carbone et diffèrent par la longueur et le nombre d'insaturations de leur chaîne d'acide gras ainsi que par leur degré d'hydroxylation (33). Aucun n'est original car ils ont déjà été décrits chez des animaux ou des végétaux.

Les cérébrosides n'étant pas l'objet de l'étude, aucun d'entre eux n'a été isolé dans ce travail. En effet, l'activité biologique de l'extrait du latex est portée par les daphnanes monoestérifiés (cf Partie VI : Le latex de *Hura crepitans* L. et le cancer colorectal).

### c) *Daphnanes*

#### (1) Généralités

Les daphnanes font partie de la famille des diterpènes. Ce sont des molécules tricycliques dérivées du squelette tigliane par ouverture du cycle cyclopropane afin de donner une chaîne isopropényle en C-13 (Figure 11) (17). Ces molécules naturelles sont largement répandues dans la famille des Euphorbiaceae et des Thymelaeaceae. Les daphnanes possèdent un cycle à 5, lié à un cycle à 7 lui-même lié à un cycle à 6 avec plusieurs fonctions hydroxyles généralement situées en C-3, C-4, C-5, C-9, C-13, C-14 ou C-20. Certains daphnanes possèdent un groupement orthoester en C-9, C-13 et C-14 (55).

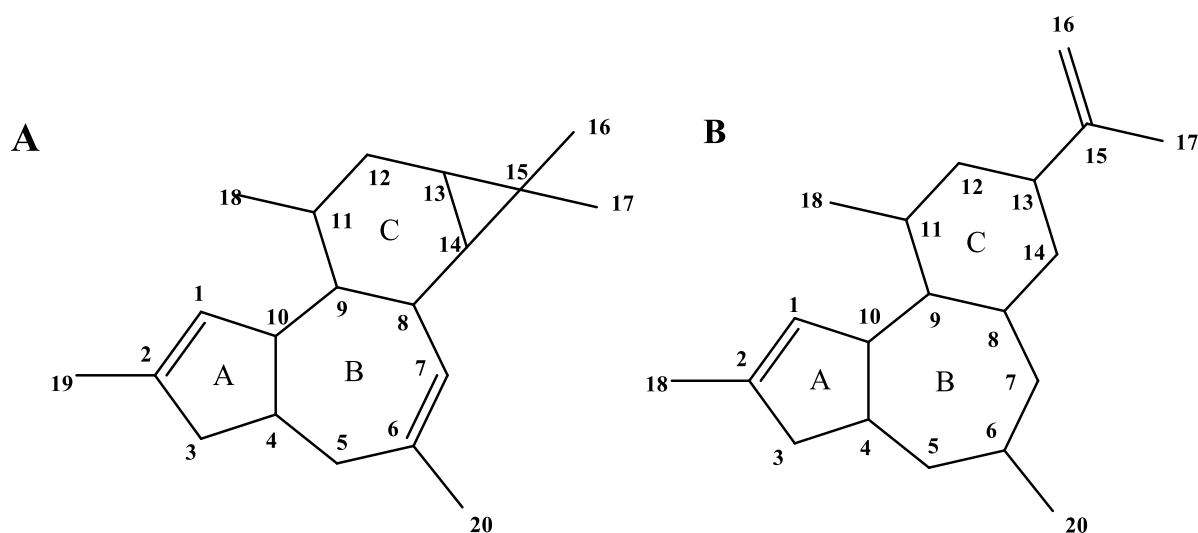


Figure 11: A) Structure du squelette tigliane ; B) Structure du squelette daphnane.

Il existe cinq types de daphnanes dans la nature : les 6,7-époxy-daphnanes, les résiniféroïdes, les genkwanines, les 1-alkyl-daphnanes et les rédiocides (20,41,55). Comme le montre la Figure 12, les 6,7-époxy-daphnanes possèdent un groupement époxyde en C6 $\alpha$ -C7 $\alpha$  sur le cycle B ; les resiniféroïdes possèdent une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée sur le cycle A ; les genkwanines présentent une cétone  $\alpha,\beta$ -saturée sur le cycle A ; les 1-alkyldaphnanes présentent un macrocycle entre le C-1 et le C-1' orthoester ; et enfin les rediocides possèdent une lactone macrocyclique (macrolide) de 12 carbones entre les carbones C-3 et C-16 (55).

Ces molécules possèdent de nombreuses activités biologiques comme décrit dans la partie I.G.2. Focus sur les diterpènes d'*Euphorbiaceae*.

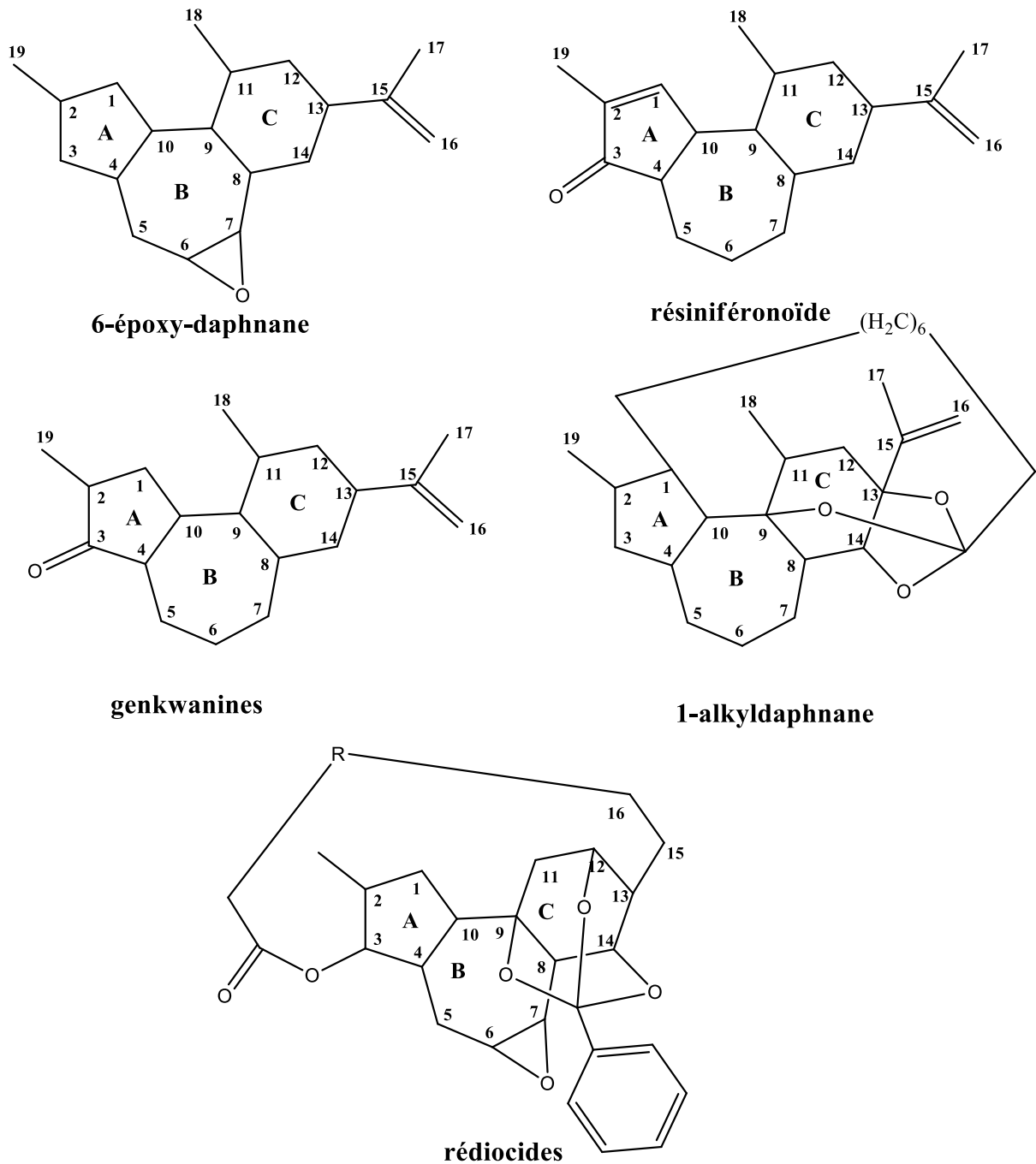
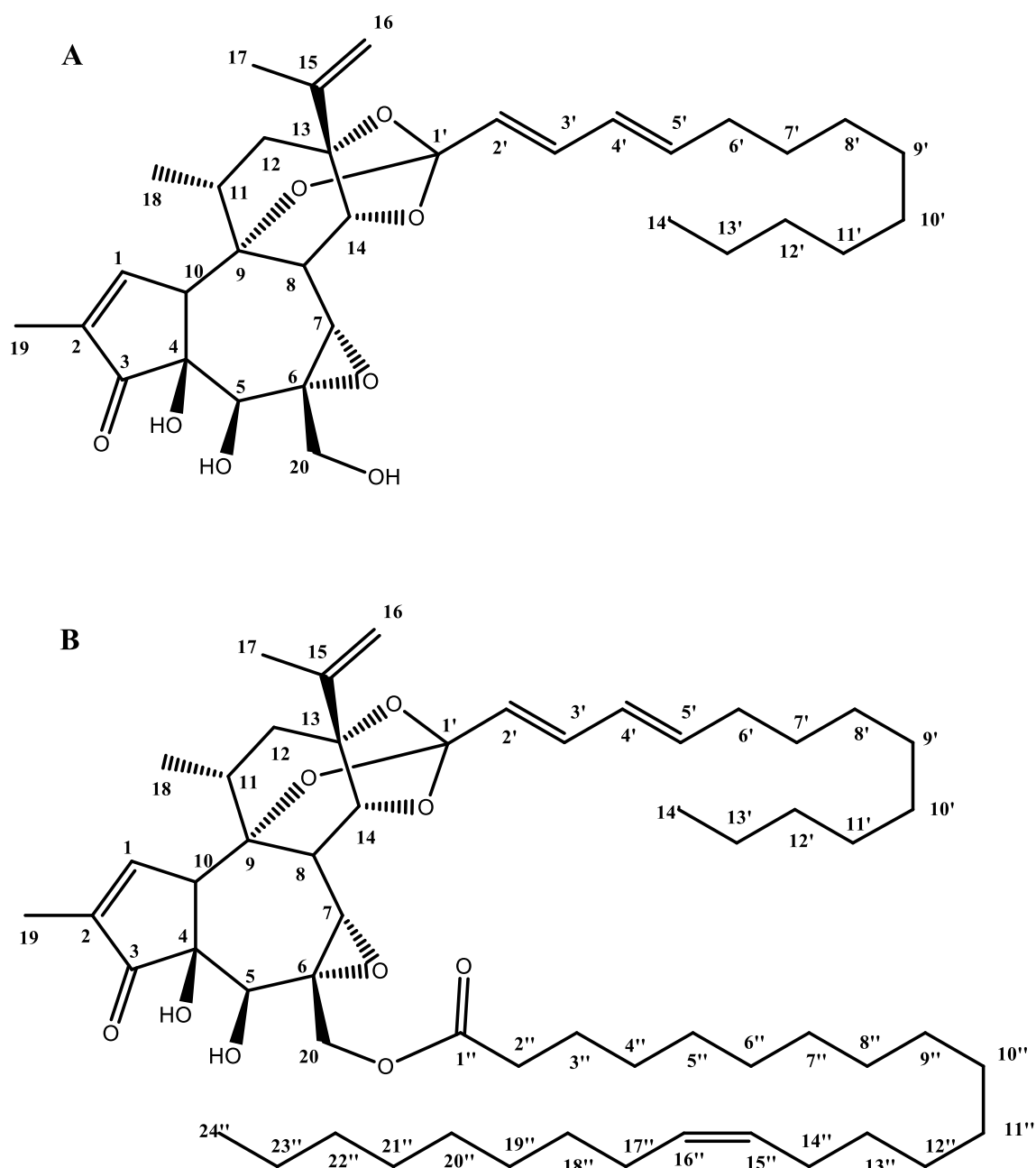


Figure 12: Squelettes des différents types de daphnane.

## (2) Daphnanes du latex de *H. crepitans*

Les travaux antérieurs du laboratoire (41) ont démontré, après déréplication et étude des spectres de fragmentation MS-MS, qu'il existe deux types de daphnanes dans le latex d'*H. crepitans* : les daphnanes monoestérifiés et les daphnanes di-estérifiés. Les deux types de

daphnanes possèdent une chaîne alkyle orthoestérifiée en position C-9, C-13, C-14 et seuls les daphnanes di-estérifiés possèdent, en C-20, une deuxième chaîne latérale (Figure 13).



La huratoxine est prise ici comme exemple pour l'explication des ions fragments obtenus par MS/MS, caractéristiques des daphnanes contenus dans le latex. Les travaux précédents du laboratoire ont déterminé que le mode d'ionisation APCI en mode positif est celui qui fournit le plus d'informations structurales. Le spectre de fragmentation en mode positif de la

huratoxine ( $[M+H]^+$  à  $m/z$  585) montre des déshydratations successives à partir de l'ion parent, dues au noyau daphnane polyhydroxylé et conduisant à des ions fils stabilisés par résonance ( $m/z$  567,  $m/z$  549,  $m/z$  531) (Figure 14). Un autre ion important en mode positif est celui à  $m/z$  361 qui provient de la perte de la chaîne latérale orthoestérifiée (Figure 15). Celui-ci peut ensuite subir différents réarrangements pour donner les ions diagnostiques à  $m/z$  343, 325, 297 et 253 présent comme pic de base (Figure 16) (41). Ces ions seront utiles pour la détection et l'identification des différents daphnanes du latex.

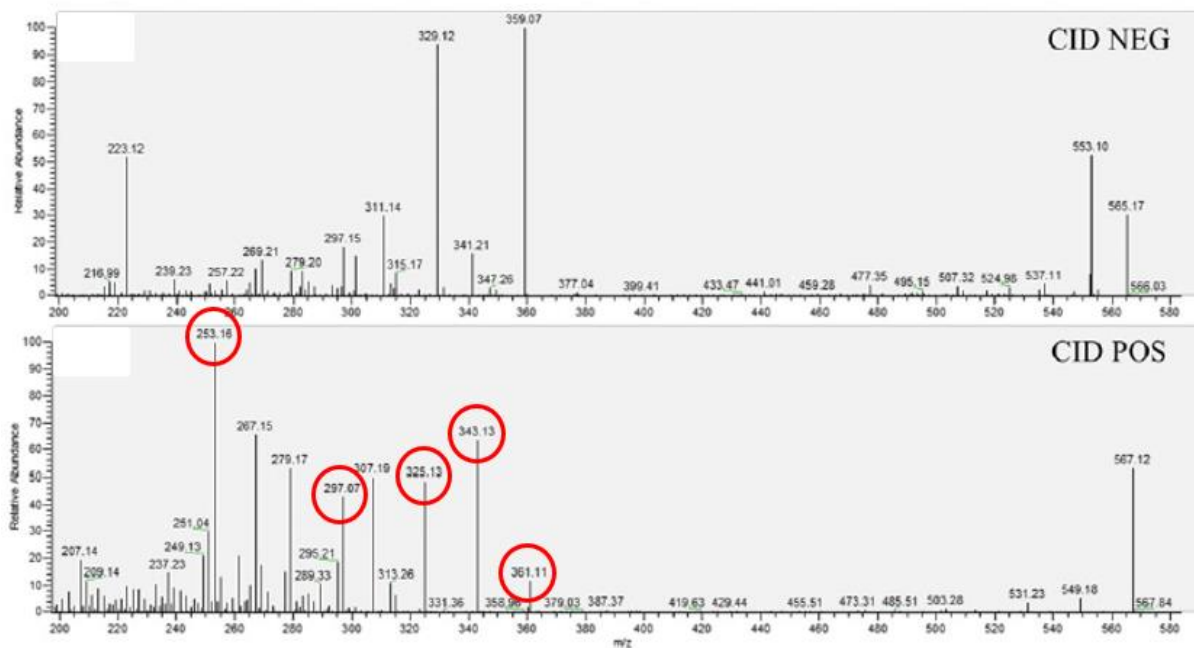


Figure 14: Spectres UHPLC-MS/MS-APCI-CID de la huratoxine

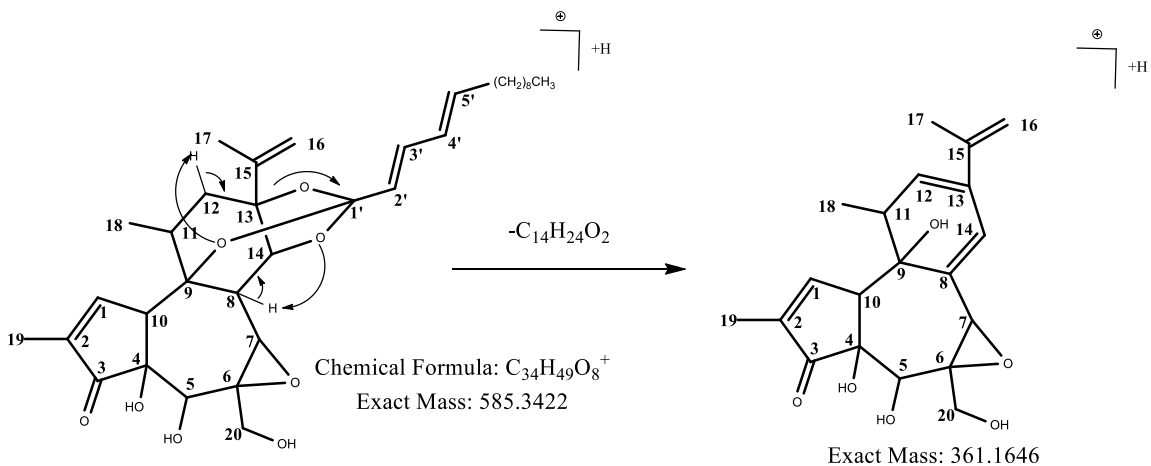
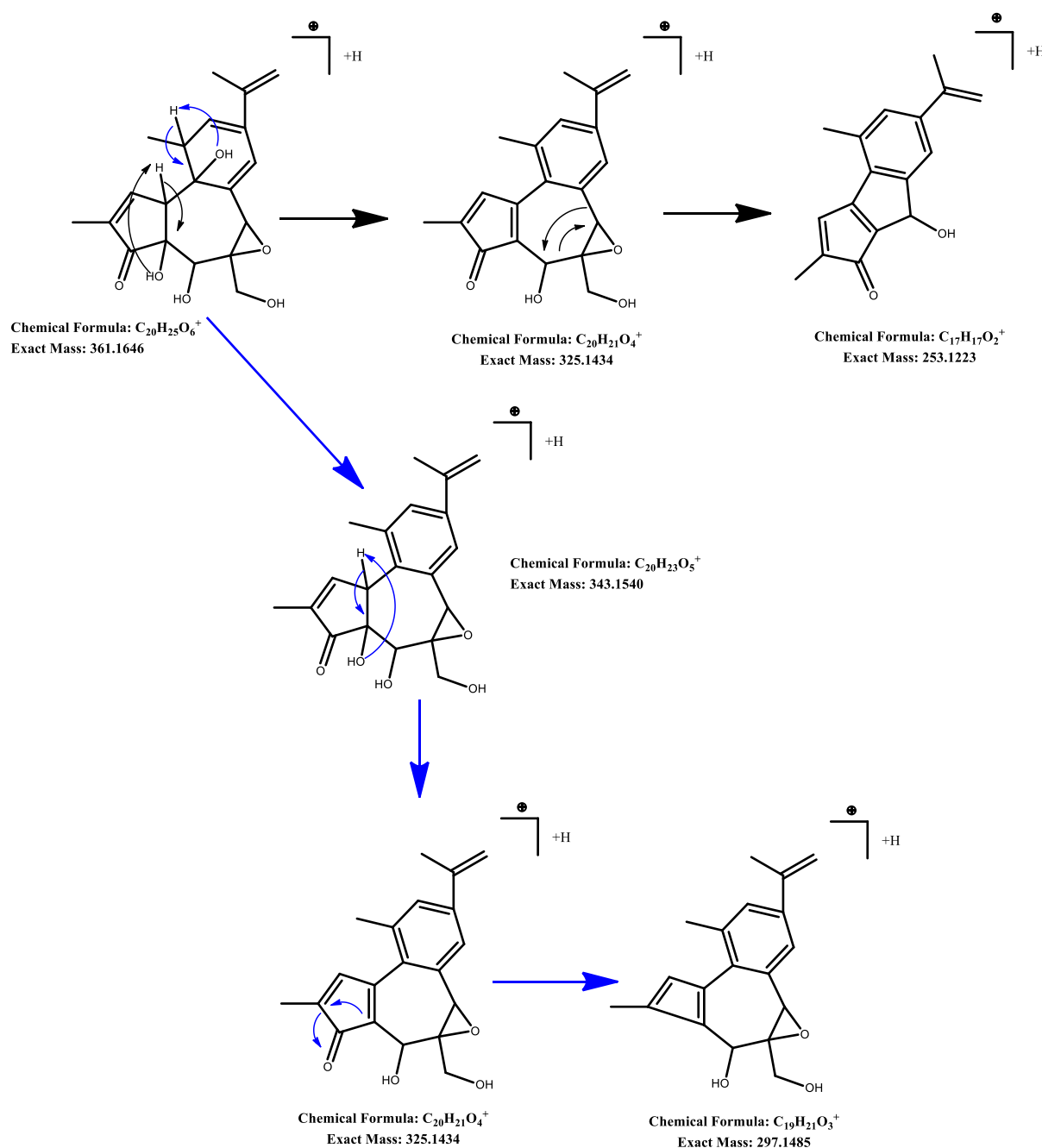


Figure 15: Obtention de l'ion  $m/z$  361 par perte de la chaîne latérale de la huratoxine

Figure 16: Fragmentation de l'ion de  $m/z$  361

La particularité des daphnanes di-estérifiés est la présence d'un ion intermédiaire entre les ions provenant des déshydratations de l'ion parent et l'ion à  $m/z$  361. Cet ion intermédiaire signe la perte de la deuxième chaîne latérale estérifiée en C-20 (33).

Grâce à ces différents ions diagnostiques, il est possible de repérer rapidement les daphnanes dans les chromatogrammes UHPLC-MS. Ainsi, quatre daphnanes monoestérifiés et vingt



daphnanes di-estérifiés ont été dérépliqués dans l'extrait éthanolique du latex de *H. crepitans*. Ces différents daphnanes sont regroupés dans le Tableau 2 (41).

Tableau 2: Daphnanes dérépliqués dans l'extrait éthanolique du latex de *H. crepitans* (41).

Nom	Tr, (min)	[M + H] <sup>+</sup>	CID-POS-MS/MS (intensité relative %)	Formule brute
5-déoxy-6,7-déépoxy-6,7-didéhydro-huratoxine	1.65	553,3508	535 (7); 329 (16); 293 (76); 283 (56); 267 (18); 267 (18); 265 (41); 251 (17); 223 (13); 207 (17)	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>
Isomère de l'uratoxine	1.65	585,3405	567 (27); 549 (>10); 531 (>10); 361 (8); 343 (41); 325 (52); 307 (41); 297 (22); 279 (31); 267 (48); 253 (100)	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>
Prohuratoxine	1.65	603,3513	585 (88); 567 (56); 549 (21); 531 (>10); 379 (8); 361 (40); 343 (80); 325 (66); 307 (100); 297 (62); 279 (63); 251 (54)	C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>
Huratoxine	3.46	585,3405	567 (47); 549 (>10); 531 (>10); 361 (12); 343 (58); 325 (50); 307 (50); 297 (36); 279 (49); 267 (54); 253 (100)	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>
20-hydroxyoctadecanoyl-huratoxine	15.23	867,5955	847 (100); 829 (31); 641 (21); 623 (30); 605 (97); 587 (68); 569 (23); 361 (>10); 343 (54); 325 (41); 307 (36); 297 (19); 279 (38); 261 (16); 253 (15)	C <sub>52</sub> H <sub>82</sub> O <sub>10</sub>
20-octadecanoyl-huratoxine	16.6	849,5852	821 (100); 803 (22); 615 (16); 597 (24); 579 (70); 561 (47); 361 (>10); 343 (52); 325 (53); 307 (50); 297 (23); 279 (45); 261 (23); 253 (12)	C <sub>52</sub> H <sub>80</sub> O <sub>9</sub>
20-hydroxyoctadecanoyl-huratoxine	16.6	867,5945	823 (100); 805 (24); 617 (20); 599 (28); 581 (78); 563 (59); 361 (>10); 343 (61); 325 (56); 307 (52); 297 (31); 279 (51); 261 (30); 253 (15)	C <sub>52</sub> H <sub>82</sub> O <sub>10</sub>
20-hexadecanoyl-5-deoxy-6,7-deepoxydidehydro-huratoxine	17.6	791,5797	849 (100); 831 (31); 625 (15); 607 (32); 589 (18); 567 (29); 343 (36); 325 (64); 307 (46); 297 (46); 279 (20); 261 (14); 253 (>10)	C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> O <sub>7</sub>
20-octadecanoyl-5-deoxy-6,7-deepoxydidehydro-huratoxine	17.6	817,5959	863 (100); 845 (26); 657 (19); 639 (29); 621 (86); 603 (73); 585 (20); 361 (>10); 343 (42); 325 (55); 307 (40); 297 (22); 279 (46); 261 (26)	C <sub>52</sub> H <sub>80</sub> O <sub>7</sub>
20-tetradecanoyl-huratoxine	18.38	793,5219	549 (12); 535 (33); 517 (6); 311 (100); 293 (76); 283 (50); 275 (10); 265 (56)	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>9</sub>
20-nonadecanoyl-5-deoxy-6,7-deepoxydidehydro-huratoxine	19.67	831,6103	799 (>10); 593 (>10); 575 (31); 557 (17); 539 (12); 535 (30); 311 (82); 293 (100); 283 (58); 265 (72); 247 (12)	C <sub>53</sub> H <sub>82</sub> O <sub>7</sub>
20-hexadecanoyl-huratoxine	20.88	821,5538	775 (91); 569 (17); 551 (97); 533 (15); 361 (>10); 343 (34); 325 (100); 307 (100); 297 (64); 279 (79); 261 (21); 253 (75); 251 (29)	C <sub>50</sub> H <sub>76</sub> O <sub>9</sub>
20-octadec-dien-oyl-huratoxine	21.01	847,5696	607 (8); 589 (22); 571 (14); 535 (25); 311 (100); 293 (93); 283 (49); 265 (64); 247 (10)	C <sub>52</sub> H <sub>78</sub> O <sub>9</sub>
20-hexadecanoyl-huratoxine	21.55	821,5533	803 (78); 597 (13); 579 (89); 561 (32); 361 (>10); 343 (30); 325 (100); 307 (99); 297 (57); 279 (73); 253 (49); 251 (22)	C <sub>50</sub> H <sub>76</sub> O <sub>9</sub>
20-pentadecanoyl-huratoxine	22.52	809,5536	829 (100); 623 (20); 605 (88); 587 (56); 569 (18); 361 (>10); 343 (39); 325 (84); 307 (99); 297 (54); 279 (66); 253 (53); 251 (18)	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> O <sub>9</sub>
20-heptadecanoyl-huratoxine	22.71	835,5689	803 (100); 597 (18); 579 (72); 561 (29); 533 (16); 343 (29); 325 (82); 307 (81); 297 (63); 279 (58); 253 (64); 251 (16)	C <sub>51</sub> H <sub>78</sub> O <sub>9</sub>
20-hexadecanoyl-huratoxine	24.41	823,5702	791 (65); 585 (16); 567 (95); 549 (37); 361 (>10); 343 (25); 325 (85); 307 (100); 297 (62); 279 (56); 253 (57); 251 (21)	C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> O <sub>9</sub>
20-octadecanoyl-huratoxine	24.41	849,5858	817 (97); 611 (17); 593 (100); 575 (33); 361 (>10); 343 (26); 325 (91); 307 (88); 297 (39); 279 (83); 253 (55)	C <sub>52</sub> H <sub>80</sub> O <sub>9</sub>
20-nonadecanoyl-huratoxine	26.45	863,6011	845 (100); 639 (22); 621 (98); 603 (34); 585 (14); 361 (>10); 343 (27); 325 (90); 307 (87); 297 (56); 279 (73); 253 (45); 251 (16)	C <sub>53</sub> H <sub>82</sub> O <sub>9</sub>
20-nonadecanoyl-huratoxine	27.15	863,6013	845 (96); 639 (25); 621 (85); 603 (25); 549 (15); 361 (>10); 343 (27); 325 (100); 307 (90); 297 (56); 279 (72); 253 (48); 251 (13)	C <sub>53</sub> H <sub>82</sub> O <sub>9</sub>
20-eicosenoyl-huratoxine	28.41	877,6162	859 (93); 653 (27); 635 (99); 617 (54); 599 (20); 361 (>10); 343 (27); 325 (100); 307 (95); 297 (54); 279 (64); 253 (39)	C <sub>54</sub> H <sub>84</sub> O <sub>9</sub>
20-octadecanoyl-huratoxine	28.76	851,6004	833 (97); 627 (21); 609 (67); 591 (41); 343 (37); 325 (91); 307 (100); 297 (51); 279 (51); 253 (43)	C <sub>52</sub> H <sub>82</sub> O <sub>9</sub>
20-nonadecanoyl-4',5'-dideoxy-6',7'-deepoxydidehydro-huratoxine	31.02	815,6174	591 (>10); 573 (28); 555 (13); 519 (34); 295 (100); 277 (41); 267 (15); 249 (7); 235 (4)	C <sub>53</sub> H <sub>82</sub> O <sub>6</sub>
20-docosenoyl-huratoxine	33.83	905,6478	887 (100); 663 (79); 627 (41); 361 (>10); 343 (31); 325 (93); 307 (74); 297 (40); 279 (44); 253 (10)	C <sub>56</sub> H <sub>88</sub> O <sub>9</sub>

Suite à ce travail d'annotation par LC-MS, l'isolement des daphnanes a été entrepris. Cinq dérivés monoestérifiés ont été identifiés et leur configuration relative a été déterminée : il s'agit de la huratoxine, la prohuratoxine, le stelléralide J, la 2',3'-dihydrohuratoxine et la 6'-oxo-huratoxine. Un isomère de la prohuratoxine a aussi été isolé et nommé isoprohuratoxine. Cependant, la configuration relative de ce dernier n'a pas pu être déterminée. Et enfin, un mélange de deux diastéréoisomères de la 4',5'-époxy-huratoxine a aussi été isolé (Tableau 3) (33).

Tableau 3: Daphnanes monoestérifiés isolés (33).

Nom	[M + H] <sup>+</sup>	Formule brute
Prohuratoxine ou isomère	603,3513	C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>
6'-oxo-huratoxine	599,3204	C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>
Stelléralide J	621,3243	C <sub>34</sub> H <sub>52</sub> O <sub>10</sub>
Huratoxine	585,3405	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>
2',3'-dihydrohuratoxine	587,3629	C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>
4',5'-époxy-huratoxine	601,3356	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>

En ce qui concerne les daphnanes di-estérifiés, deux composés purs ont pu être isolés. Cependant, les analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) n'ont pas permis la détermination précise de la structure de la deuxième chaîne aliphatique estérifiée en C-20. Une hypothèse a été émise grâce aux données de la littérature pour l'un d'entre eux : il s'agirait de la 20-(15''Z)-tétracos-15-enoyl-huratoxine (33).

En conclusion, les daphnanes du latex de *H. crepitans* jusqu'à présent identifiés sont quasiment tous des dérivés de la huratoxine.

### (3) Cibles biologiques des daphnanes

Parmi les cibles biologiques des daphnanes, les PKCs ont été les premières identifiées (56). En effet, les daphnanes orthoestérifiés présentent une similarité structurale avec les esters de phorbol, tel le TPA (12-O-Tétradécanoylphorbol-13-acétate), qui sont connus pour être des activateurs de PKCs (Figure 17) (57).

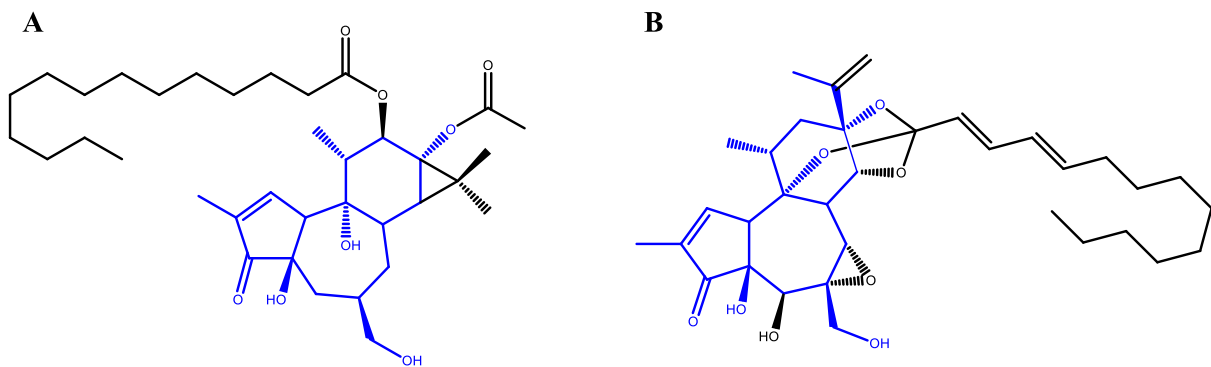


Figure 17: A) Structure du TPA ; B) Structure de la huratoxine.

Comme exemples de l'action des diterpènes de type daphnane vis-à-vis des PKCs, nous examinerons les cas de la yuanhuacine, de la gnidimacrine et du wikstroélide E qui présentent des structures différentes (Figure 18). La yuanhuacine, isolée des racines et des fleurs de *Daphne genkwa* (Thymelaeaceae), aurait pour cible directe une ou des PKCs avec pour conséquences une inhibition de l'expression de la PKC $\alpha$  et une activité antiproliférative sur des cellules cancéreuses (leucémie, cancer colorectal, cancer du sein, mélanome). Sur des cellules de cancer pulmonaire, son IC<sub>50</sub> est de 19  $\mu$ M et son activité *in vivo* sur un modèle murin entraîne une diminution de la croissance tumorale de 63% à une concentration de 0,5 mg/kg (58). La gnidimacrine, isolée des racines de *Stellera chamaejasme* L., se lie directement aux PKCs et montre une activité antiproliférative sur des cellules cancéreuses humaines et murines qui dépend des isoformes PKC $\alpha$  et PKC $\beta$ II (57). Le wikstroélide E, isolé de *Wikstroemia chamaedaphne* (Thymelaeaceae), présente une activité sélective anti-VIH intéressante *in vitro*, à une concentration de 2 nM, dépendante des PKCs (59).

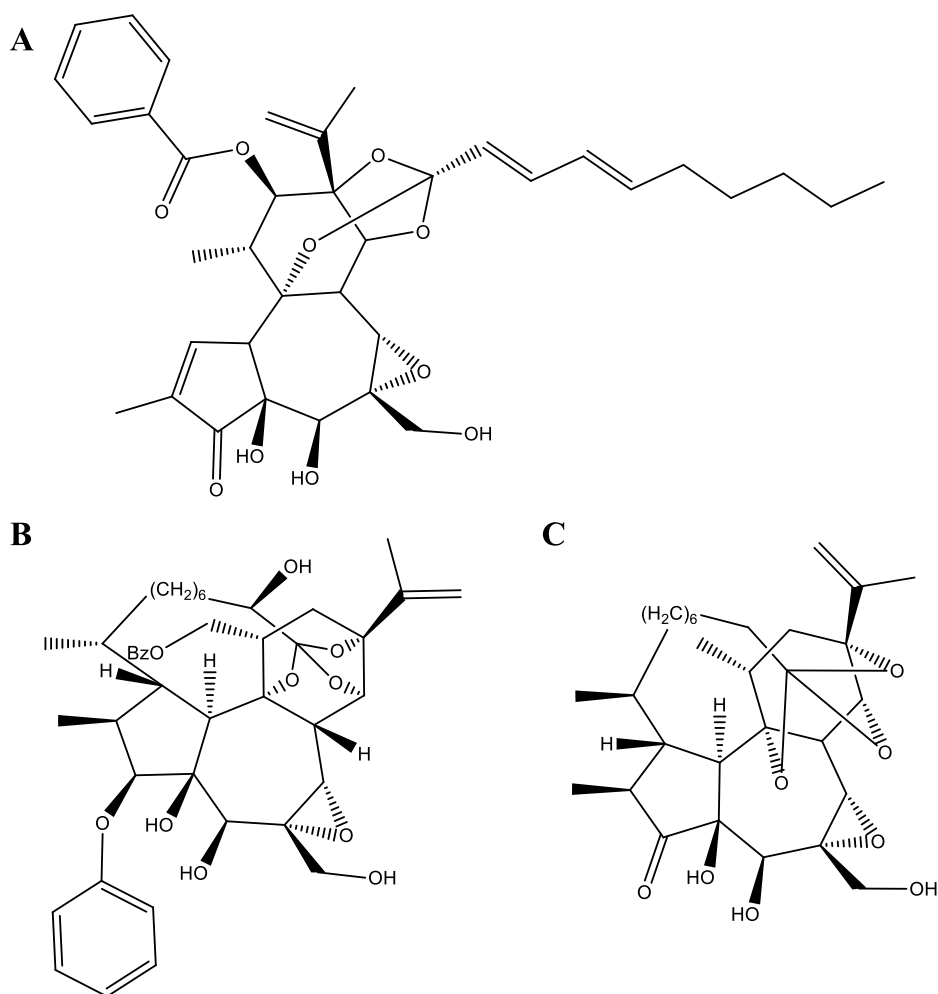


Figure 18: Structures de la yuanhuacine (A), de la gnidimacrine (B) et du wikstroélide (C).

Les PKCs sont donc une cible privilégiée pour les diterpènes de type daphnane. L'action des daphnanes peut entraîner à la fois une activation et une inhibition de certaines isoformes de PKCs. L'action sur cette famille d'enzymes confère aux daphnanes de nombreuses activités biologiques prometteuses, notamment en cancérologie et en virologie.

Les daphnanes orthoestérifiés peuvent aussi jouer leur rôle anti-cancéreux par d'autres mécanismes sur différentes voies de signalisation impliquées dans les phénomènes de cancérogénèse. Ces différentes voies sont décrites dans la partie IV.B.2. *Voies de signalisation du CCR et PKCs*. L'action anti-cancéreuse de la yuanhuacine pourrait passer par l'activation de la *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) p38 et par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. D'un autre côté, il semblerait que les daphnanes orthoestérifiés soient capables d'inhiber l'ADN topoisomérase I et ainsi d'induire un effet anti-prolifératif (60). La daphgenkine A, isolée des

fleurs de *Daphne genkwa*, induit un arrêt du cycle cellulaire dans des cellules colorectales cancéreuses (SW620) par une inhibition de la PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) et de ses effecteurs en aval (Akt et mTOR) (61). Il a été montré que la yuanhuadine, un dérivé de la yuanhuacine, peut avoir la même action sur la voie PI3K/Akt/mTOR et aussi inhiber le récepteur à l'EGF (EGFR) pour expliquer son action antiproliférative (62,63).

### III. Les PKCs

#### A. Généralités : Structure et régulation par les chaînes d'acides gras

Les PKCs sont des enzymes cytosoliques appartenant à la famille des protéines kinases A, G, et C (PKA, PKG, PKC). Ces sérine/thréonine kinases, très conservées au cours de l'évolution, englobent trois sous-familles en fonction de leur mode d'activation (Figure 19), les PKCs conventionnelles (cPKCs :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) qui nécessitent la présence de diacylglycérol (DAG) et de calcium pour être activées ; les PKCs nouvelles (nPKCs :  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\delta$ ) qui ont la particularité, par rapport aux précédentes, d'être indépendantes du calcium et les PKCs atypiques (aPKCs :  $\zeta$  et  $\lambda/\iota$ ) dont l'activité n'est pas dépendante des DAG et du calcium (64–66).

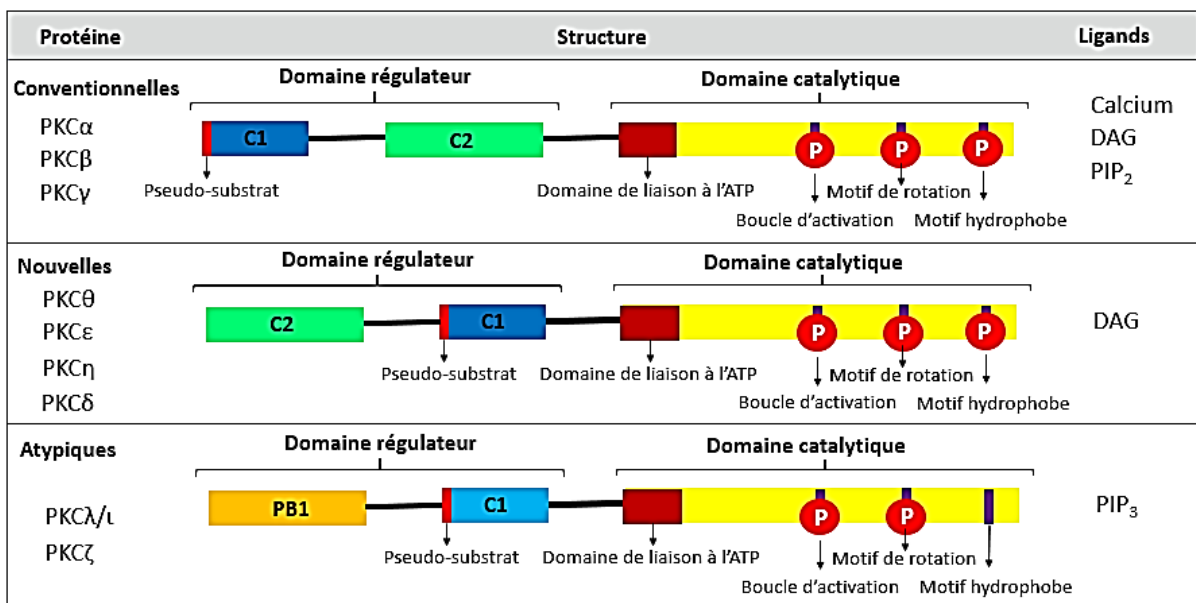


Figure 19: Structure et régulation des isoformes de PKCs (D'après (64)). Le domaine catalytique est commun aux trois classes de PKCs (conventionnelles, nouvelles et atypiques) alors que leurs domaines régulateurs diffèrent par leur sensibilité aux lipides (DAG, diacylglycérol ; PIP, phosphatidylinositol diphosphate ou triphosphate) et au calcium, ainsi que par la présence du domaine d'interaction protéique PB1.

Les PKCs sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique avec un domaine catalytique qui comprend la poche de liaison à l'ATP en position C-terminale, un domaine pseudo-substrat et plusieurs domaines régulateurs en position N-terminale. L'extrémité C-terminale est hautement conservée et le motif pseudo-substrat interagit avec elle au niveau du domaine

catalytique, empêchant la liaison du substrat à l'enzyme. Des phosphorylations initiales préparent les cPKCs et les nPKCs à leur activation, au niveau de la boucle d'activation, du motif de rotation et du domaine hydrophobe. Pour les aPKCs, la phosphorylation du domaine hydrophobe n'est pas possible à cause de la présence d'un résidu acide glutamique phosphomimétique (64,65,67). Ces trois domaines sont le plus souvent phosphorylés de manière constitutive dans la cellule. La phosphorylation de la boucle d'activation est catalysée par PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1) et celle des deux autres domaines par le complexe TORC2 (Target Of Rapamycin Complex 2) contenant la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (64,67,68). Puis, une activation allostérique est nécessaire à l'activité catalytique : le pseudo-substrat doit être libéré du site de liaison au substrat grâce à l'interaction de l'enzyme avec ses ligands d'activation tels que les DAG (64).

Les DAG sont les produits de l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires par des phospholipases C, activées après la liaison des récepteurs membranaires avec leurs ligands. Les DAG sont donc des seconds messagers qui lient les domaines C1 des cPKCs et nPKCs (Figure 19). Comme dans le cas du traitement par des esters de phorbol, cette liaison au domaine C1 provoque l'insertion membranaire de l'enzyme (64,65). Les cPKCs et nPKCs possèdent aussi un domaine C2 qui se lie à des phospholipides acides membranaires tels que les phosphoinositides phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>), de manière dépendante ou indépendante du calcium, respectivement pour les cPKCs et les nPKCs (Figure 19). Le domaine C2 participe à l'ancrage membranaire et au changement conformationnel de l'enzyme (64,65).

Le domaine C1 des aPKCs ne lie pas les DAG ou les esters de phorbol en raison de différences intrinsèques avec les autres domaines C1 (69). Il interagit avec le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>), des acides phosphatidiques, l'acide arachidonique ou des céramides, capables d'induire l'activité enzymatique (Figure 20). De plus, les aPKCs possèdent un domaine PB1 (Phox-Bem1) à leur extrémité N-terminale qui permet des interactions homologues avec d'autres protéines. Ces interactions expliquent la présence des aPKCs au sein de complexes protéiques tels que le complexe de polarité cellulaire dépendant de Par6 (70), et participent à la localisation membranaire de l'enzyme et à son activation (64–67,71).



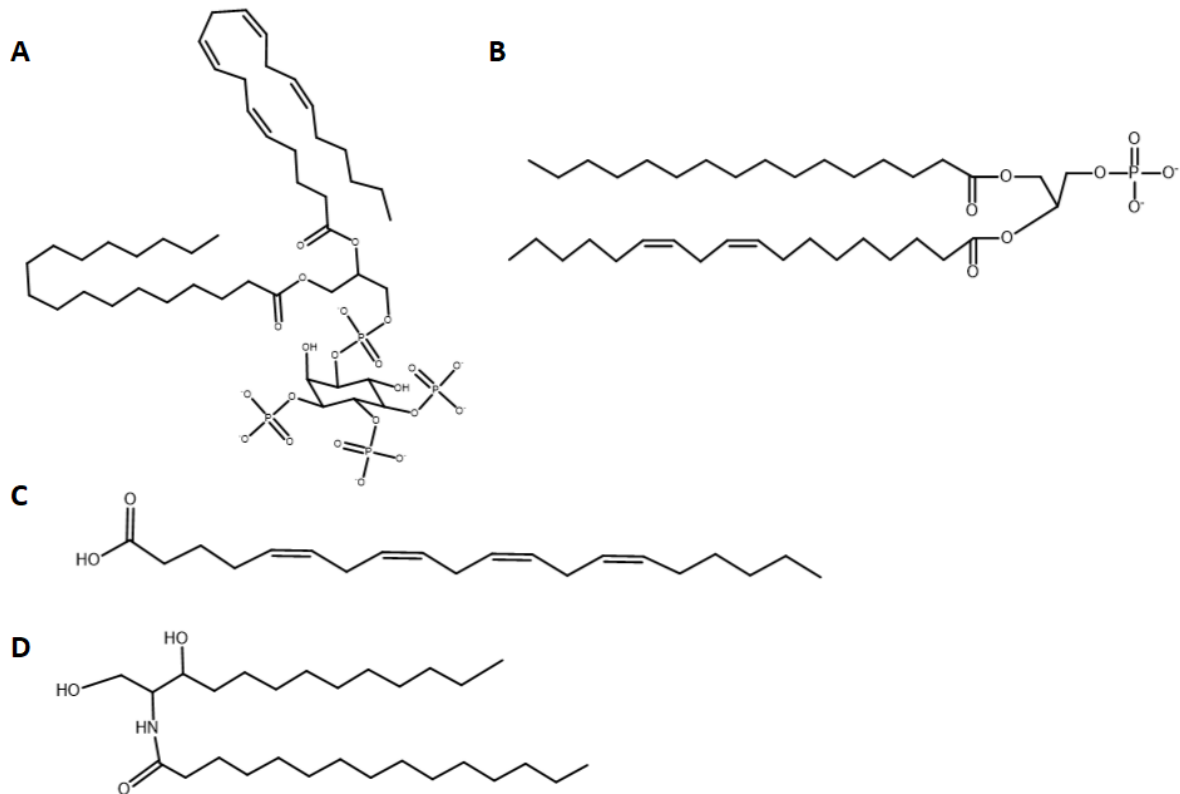


Figure 20: Lipides activateurs des PKC atypiques. A) PIP<sub>3</sub>, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ; B) PA, acide phosphatidique ; C) AA, Acide arachidonique ; D) Céramide.

## B. Rôles biologiques : focus sur les PKCs atypiques

Les PKCs sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation et jouent un rôle central dans la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaires. Les isoformes de PKCs peuvent avoir des rôles très différents du fait de leurs différentes voies de régulation et de leur expression différentielle selon le type cellulaire (64,65,72). Une absence ou une dérégulation des PKCs peut entraîner de nombreuses maladies telles que diabète, pathologies cardiaques, maladies neurodégénératives, allergies, maladies inflammatoires, maladies auto-immunes et cancers (65).

Au niveau de la cellule, les PKCs sont activées de manière séquentielle. L'activation des cPKCs entraîne l'activation des nPKCs induisant une libération de céramides et donc l'activation des aPKCs. La PKC $\zeta$  a en plus une activité kinase constitutive qui lui permet d'activer les autres isoformes de PKCs (73).

Les aPKCs ont un rôle critique dans la polarité cellulaire, une fonction liée à l'adhésion/migration et à la division cellulaires (67,71). Le complexe de polarité aPKC-Par6-Par3-cdc42 (atypical PKCs-Partitioning defective protein 6- Partitioning defective protein 3- Cell division control protein 42) au niveau des jonctions serrées du pôle apical des cellules épithéliales est essentiel à leur survie, au contrôle de la prolifération cellulaire et à leur division asymétrique, basés sur une distribution apico-basolatérale de différents récepteurs et de leurs partenaires de signalisation (64,67,71).

Les aPKCs sont aussi des régulateurs du cytosquelette. En effet, une activation des aPKCs induit une réorganisation du cytosquelette d'actine *via* l'interaction du complexe de polarité avec différents composants du cytosquelette (fibres d'actine, réseau contractile d'actomyosine, microtubules, protéines du cytosquelette) au niveau des jonctions adhérentes (70,74–76). La PKC $\zeta$ , notamment, est connue pour s'associer à la  $\beta$ -tubuline lors de la formation du fuseau mitotique (75).

Les aPKCs sont impliquées dans le maintien de l'identité tissulaire, notamment dans les tissus épithéliaux et dans le système nerveux central, en régulant la balance progéniteurs/cellules différenciées (77). La PKC $\zeta$  est même considérée comme un marqueur de la différenciation épithéliale colique (78). La PKC $\zeta$  a plus largement un rôle protecteur dans différents types cellulaires. Elle est impliquée dans les fonctions des cellules de l'immunité et de l'inflammation en régulant notamment le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (64,66,71).

### C. PKCs et cancer : impact de la sous-expression des PKCs

Les PKCs ont un rôle critique dans les processus de cancérogénèse : elles participent à la transformation cellulaire, à la progression tumorale et à la formation de métastases dans différents types de cancer. Cependant, les PKCs peuvent exercer un rôle protumoral ou antitumoral selon le type cellulaire et le contexte (64,65). Dans le cas du cancer colorectal par exemple, la PKC $\alpha$  est montrée tantôt comme un acteur favorable à la prolifération cellulaire, tantôt comme une enzyme antiproliférative. Des travaux sur une culture 3D de cellules cancéreuses colorectales montrent que la PKC $\alpha$  permet la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine pour sa dégradation et a donc un rôle antiprolifératif (79). Tandis qu'une étude sur une culture 2D d'une autre lignée cellulaire colorectale cancéreuse montre un rôle prolifératif de la PKC $\alpha$  via l'activation de ERK et de NF- $\kappa$ B (80).

Récemment, le rôle antitumoral des PKCs a été mis en avant. L'étude de 48 mutations touchant les gènes PKCs dans différents cancers a montré que toutes ces mutations sont responsables d'une perte de fonction des PKCs. Aucune mutation activatrice n'a été trouvée (65). L'expression altérée des gènes PKCs peut induire l'expression de proto-oncogènes ou une altération de diverses voies de signalisation cellulaire (64,65). Il semble donc que la restauration des activités PKCs représente un enjeu thérapeutique important en cancérologie. Dans les leucémies par exemple, l'activation des PKCs par des esters de phorbol diminue la prolifération et rétablit la différenciation cellulaire (65). Dans un modèle murin de cancer du poumon, cette activation réduit le nombre de métastases (65).

La dérégulation de la polarité cellulaire est souvent associée à un phénotype de tumeur plus invasif et agressif (67,71). A ce stade, les aPKCs sont particulièrement impliquées car elles jouent un rôle clef dans le maintien de la polarité cellulaire et l'immunosurveillance (71). Dans le cas du cancer colorectal par exemple, la sous-expression de la PKC $\zeta$  permet aux cellules cancéreuses une adaptation métabolique dans un environnement pauvre en glucose et promeut la transition épithélio-mésenchymateuse et la formation de métastases tumorales (66,71). Un déficit en PKC $\zeta$  est donc associé à un mauvais pronostic pour les patients atteints d'un cancer colorectal parmi lesquels certains présentent une mutation inactivatrice de la PKC $\zeta$  (S514F : substitution de la sérine en position 514 par une phénylalanine) (65). Le rôle suppresseur de tumeur de la PKC $\zeta$  a aussi été mis en avant dans d'autres types de cancer, tels que le cancer de la prostate (65,66,71).

Une activité PKC $\zeta$  déficiente impacte à la fois les cellules transformées et leur microenvironnement. La voie PI3K/Akt est un acteur majeur de la carcinogenèse et la kinase Akt peut être inhibée par certains céramides activateurs de la PKC $\zeta$ , aboutissant à une inhibition de la croissance cellulaire (81). Une déficience en PKC $\zeta$  entraîne une surproduction d'IL-6 (Interleukine-6), ce qui favorise la croissance tumorale et sa chimiorésistance (66).

L'activation d'une isoforme particulière de PKC, en particulier la PKC $\zeta$ , est donc une voie de recherche extrêmement prometteuse pour la découverte de nouvelles thérapies anticancéreuses. Des molécules activatrices de PKCs seraient un atout majeur en polythérapie, associées avec d'autres thérapies moléculaires et des traitements conventionnels de chimiothérapie (65,81). Dans cette optique, l'étude des diterpènes de type daphnane semble justifiée et tout indiquée.

## D. PKCs et infections virales

Les PKCs sont aussi impliquées dans différentes infections virales où les pathogènes intracellulaires peuvent interférer avec les voies de signalisation des PKCs (73). Des activateurs de PKCs sont donc envisagés comme thérapies antivirales.

Dans le cas de l'infection par le VIH, les activateurs de PKCs seraient des candidats médicaments prometteurs pour éliminer les cellules T latentes infectées en activant la réplication virale. Cette stratégie dite « shock and kill » permet d'augmenter le taux d'antigènes et l'action des lymphocytes T cytotoxiques vis-à-vis des réservoirs viraux (23,25). Ici, il s'agit de cibler spécifiquement certaines isoformes de PKCs (hormis les isoformes  $\alpha$  et  $\theta$ ) dans les lymphocytes T afin de favoriser la réplication virale (25). Les Stelléralides A, F, G et H, isolés à partir de *Stellera chamaejasme*, présentent une activité anti-VIH excellente avec des  $EC_{50}$  comprises entre 0,06 et 1,1 nM (23,24). La gnidamicrine, isolée de la même plante, présente une activité anti-VIH1 *ex vivo* importante, avec des concentrations de l'ordre du picoM. Cette action serait médiée par l'activation sélective de la PKC  $\beta$ I et de la PKC  $\beta$ II (23,25).

De façon intéressante, des activateurs de PKCs montrent une corrélation positive entre leur activité anti-VIH et leur activité anti-CHIKV suggérant des mécanismes communs dans les activités antivirales (15,19).

Les activateurs de PKCs sont donc des candidats médicaments intéressants en cancérologie et en virologie mais plus largement, dans de nombreuses autres pathologies telles que les maladies neurodégénératives (82).

## E. Outils pharmacologiques ciblant les PKCs

Un grand challenge dans le développement de molécules activatrices ou inhibitrices des PKCs est la sélectivité vis-à-vis d'une des isoformes car celles-ci peuvent avoir des rôles très différents (64,71).

## 1. Molécules activatrices des PKCs

Les esters de phorbol et autres diterpènes possédant une structure similaire (Figure 17), sont le premier groupe de molécules capables de cibler le domaine C1 des PKCs et de les activer. Ces composés possèdent de meilleures affinité et stabilité que les DAG. Le TPA notamment, représentant de la famille des esters de phorbol, agit de la même manière que le DAG et est capable d'activer les cPKCs et les nPKCs, mais aussi toutes les protéines contenant un domaine C1 similaire (65).

La Bryostatine 1, une lactone macrocyclique isolée à partir de *Bugula neritina*, est capable d'activer de manière réversible les c- et nPKCs en se liant à leur domaine C1. Cette molécule a été testée dans de nombreux essais cliniques mais sans résultat probant (64,65).

Plus récemment, des analogues du DAG ont été synthétisés (HK434 et HK654) et montrent de meilleures affinité et sélectivité que le DAG. Il a été montré que ces deux composés induisent l'apoptose de lignées cellulaires de cancer de la prostate (65).

Les céramides et l'acide arachidonique sont aussi connus pour activer les aPKCs en interagissant directement avec leur domaine kinase (77,83).

## 2. Molécules inhibitrices des PKCs

L'inhibition de la fixation de l'ATP est un outil classique pour inhiber les kinases. La staurosporine, isolée de *Streptomyces staurosporeus*, a été découverte il y a plus de 40 ans et est capable d'inhiber de cette façon toutes les formes de PKCs ainsi que d'autres kinases (65). Le Gö6976 est un inhibiteur de la PKC $\alpha$  et de la PKC $\beta$  souvent utilisé lors de tests pharmacologiques. Cependant, il a été montré qu'il est capable d'inhiber d'autres kinases *in vitro* telles que la Janus kinase 2 (Jak2) ou la protéine kinase D (PKD)(64,65).

L'enzastaurine est une molécule synthétique qui inhibe plusieurs isoformes de PKCs, ainsi que d'autres sérine/thréonine kinases. Des essais cliniques en phase 1 et 2 ont montré des résultats prometteurs avec ce composé. Cependant, un essai de phase 3 utilisant l'enzastaurine en monothérapie pour la prévention de la rechute des patients atteints de lymphomes n'a montré aucun effet significatif par rapport au placebo (64,65).

Récemment, un inhibiteur puissant et sélectif des aPKCs a été développé : CRT0066854 (Figure 21) (84). Cette molécule inhibe l'activité de la PKC $\iota$  de 87% et celle de la PKC $\zeta$  de 77% *in vitro* à

une concentration de  $1\mu\text{M}$ . Aucune inhibition significative des c- ou nPKCs n'a été montrée. La particularité de cet inhibiteur est qu'en plus de se lier au site de fixation à l'ATP, il se lie à un second site proche de la poche de liaison à l'ATP dans le cas de la PKC  $\zeta$ . Ce deuxième site de fixation permet une meilleure sélectivité (64).

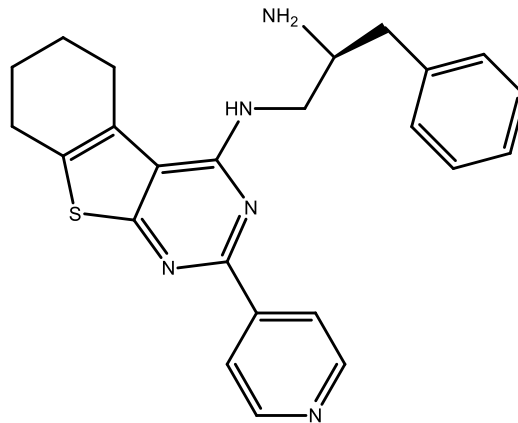


Figure 21: Structure de l'inhibiteur des aPKCs CRT0066854

Globalement, les essais cliniques utilisant des molécules ciblant les PKCs chez des patients ont montré des résultats décevants, notamment à cause de leur manque de sélectivité (65). Il est donc nécessaire de continuer les efforts de recherche dans la découverte de molécules modulatrices des PKCs, sélectives d'une isoforme particulière.

## IV. Le cancer colorectal

### A. Epidémiologie du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est très fréquent et particulièrement mortel. En 2020, au niveau mondial, 1,93 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués et 0,94 millions de morts ont été imputées au CCR. Ces chiffres représentent 10% de l'incidence globale des cancers et 9,4% des morts causées par cancer. Le CCR est donc le 3<sup>ème</sup> cancer le plus diagnostiqué au monde et le deuxième plus mortel juste après le cancer du poumon (Figure 22) (85,86).

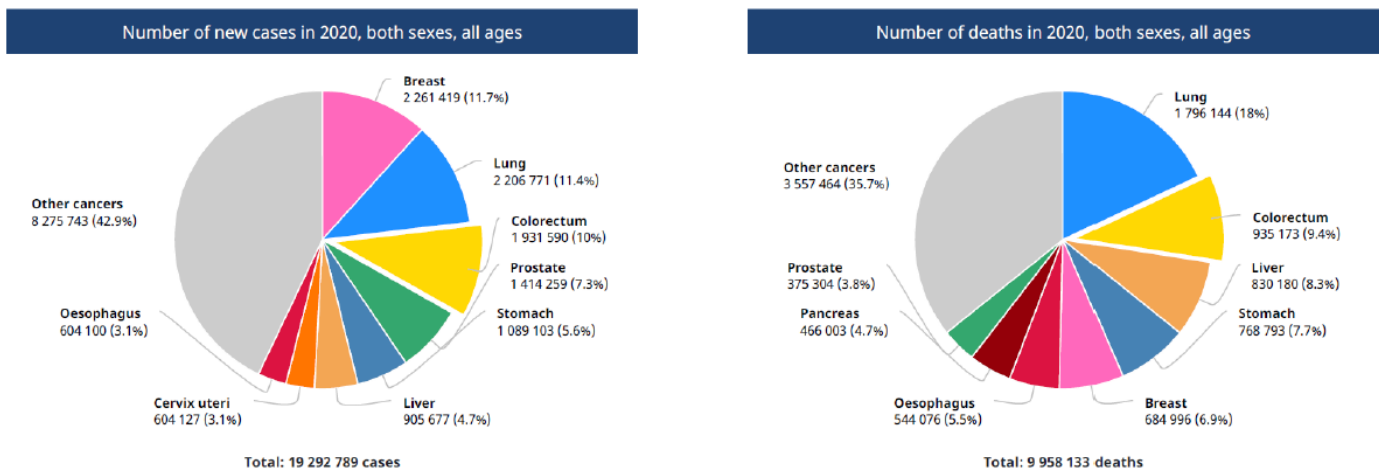


Figure 22: Nombre de nouveaux cas de cancers et de morts par cancer au niveau mondial en 2020 (87)

Ces dernières années, la prévalence du CCR a augmenté de manière alarmante. Si l'incidence et la mortalité du CCR augmentent fortement après l'âge de 50 ans, un nombre de cas non négligeable est désormais retrouvé chez les personnes plus jeunes. Aujourd'hui, 5,25 millions de personnes vivent avec un CCR et une projection estime le nombre de nouveaux cas à 3,2 millions en 2040. L'augmentation de l'incidence du CCR est notamment due à une exposition grandissante vis à vis de facteurs de risque environnementaux, résultant du mode de vie occidental (obésité, consommation de viande rouge et de plats ultra-transformés, tabagisme, consommation excessive d'alcool, sédentarité...) (85,86). Ainsi, la proportion de CCR d'origine sporadique par rapport à celle des CCR familiaux dus à une anomalie génétique est nettement plus grande : 80% vs 20% (88).

Les CCR sont généralement asymptomatiques, et lorsque les symptômes apparaissent (saignements rectaux, anémie, douleurs abdominales), la majorité des patients est déjà à un stade avancé où le cancer est très agressif et métastatique (85). A ce stade, la survie des patients à 5 ans est seulement de 40 à 50%, et si les métastases ont atteint d'autres organes, la survie à 5 ans diminue pour atteindre 5 à 15%. Ce cas de figure représente 20% des diagnostics (89). Les récurrences tumorales et les métastases sont les principales causes de la mortalité du CCR et sont reliées aux capacités prolifératives et invasives des cellules tumorales (90).

Les programmes de dépistage du CCR sont donc cruciaux pour diminuer sa mortalité (85). Les résections endoscopiques, les excisions chirurgicales localisées, les thérapies ciblées et les immunothérapies représentent de grandes avancées à côté de la chimiothérapie classique. Malgré tout, les études de projection pour 2040 montrent une augmentation du nombre de morts par CCR (Figure 23) (85).

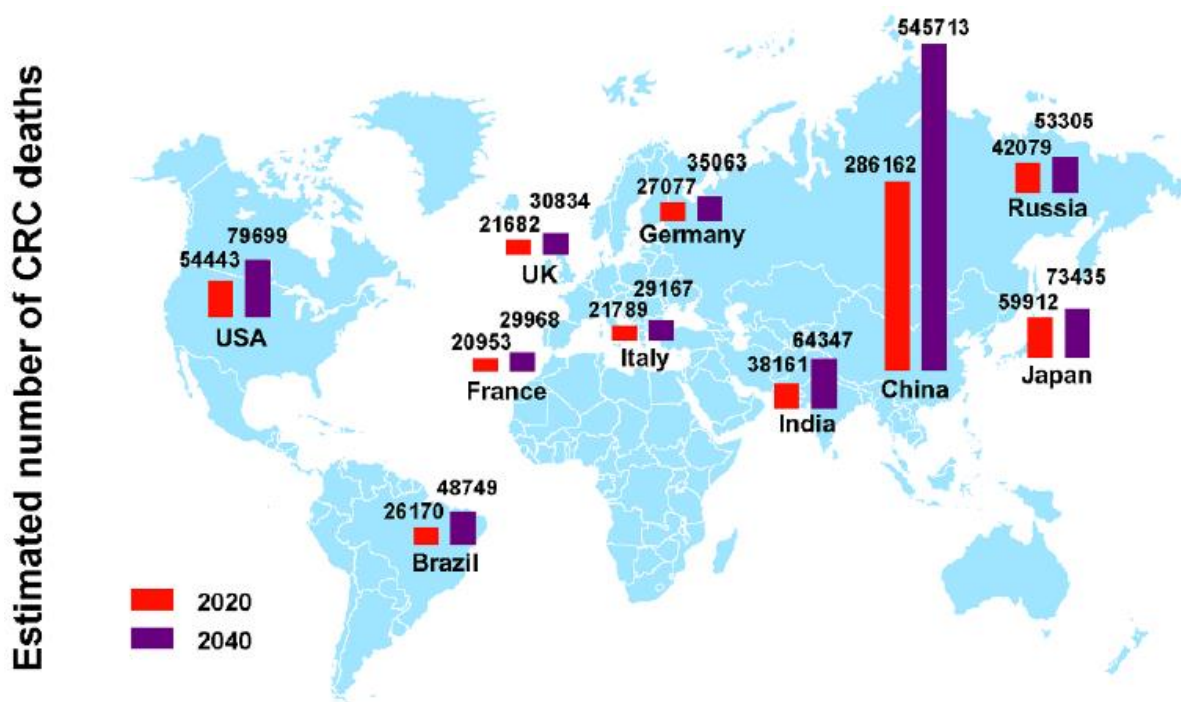


Figure 23: Nombres de morts causées par le cancer colorectal dans les 10 pays montrant la plus haute incidence en 2020 et projections pour 2040 (85)

Le nombre de cas toujours grandissant, ainsi que l'augmentation de l'incidence chez des patients plus jeunes, fait du CCR un gros problème de santé publique et une charge financière importante pour la société (85,86). De nouvelles thérapeutiques ciblées représentent donc un



enjeu important. Parmi les cibles à envisager, les PKCs sont bien placées car restaurer leurs fonctions (déficiences dans le CCR) permettrait un contrôle normal de l'adhésion, de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

## B. Voies de carcinogénèse colorectale et interaction avec les PKCs

### 1. Généralités

La carcinogénèse du CCR sporadique repose sur une dérégulation de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs épithéliaux après une première phase, parfois longue, de survie de cellules souches anormales qui à la suite d'évènements mutagènes donneront naissance aux progéniteurs tumoraux (89,91,92) (Figure 24A).

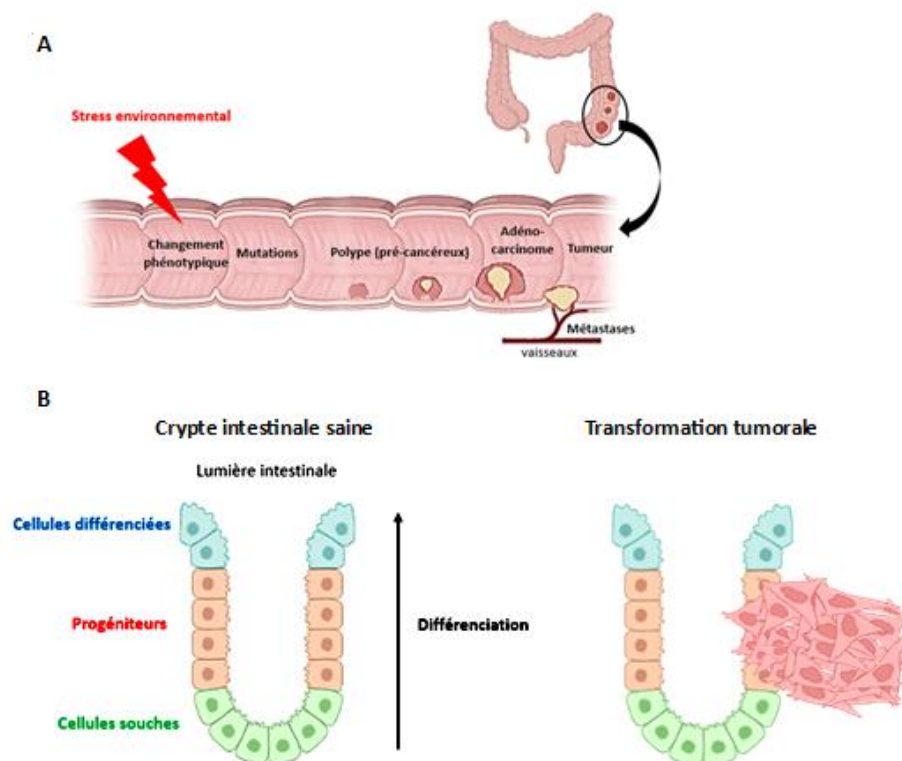


Figure 24: Etapes de la tumorigénèse dans le CCR sporadique et organisation de la crypte intestinale. (A) Dans un contexte de stress environnemental, les cellules souches colorectales s'adaptent pour survivre. Leur changement phénotypique peut persister pendant de nombreuses années et être permissif pour la survenue de mutations géniques qui donneront naissance à des progéniteurs anormaux à l'origine des polypes, puis d'un adénocarcinome et enfin de métastases. (B) A partir des cellules souches, des progéniteurs puis des cellules différenciées à propriétés absorbantes ou sécrétrices sont produits. La zone de transition entre les cellules souches et les progéniteurs est critique dans le contrôle de la prolifération qui doit être coordonnée avec la différenciation et celui de la migration cellulaire qui doit respecter l'axe de la crypte. En cas d'anomalies de ces deux contrôles, une crypte bifide apparaît, représentant la première étape de la transformation tumorale.

L'unité fonctionnelle de l'épithélium intestinal est la crypte (Figure 24B). Il s'agit d'une monocouche de cellules épithéliales, étroitement liées par des jonctions serrées qui, à partir des propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches, parvient à produire en permanence des progéniteurs puis des cellules différenciées ayant des propriétés absorbatives ou sécrétrices. L'épithélium ainsi organisé est renouvelé toutes les deux semaines et permet de maximiser la surface d'absorption des nutriments tout en maintenant la barrière intestinale entre milieux extérieur et intérieur (70, 74). La zone de transition entre les cellules souches et les progéniteurs est très plastique afin de s'adapter aux conditions environnementales. De par la plasticité et le renouvellement cellulaire continu, il y a un risque important de changements phénotypiques et de mutations oncogéniques (activation d'oncogènes ou inactivation de suppresseurs de tumeur) qui peut aboutir à l'apparition de cellules précancéreuses. La prolifération anarchique de ces cellules et leur défaut de différenciation sont associés à une extension hors de l'axe de la crypte sous forme de polype qui peut ensuite évoluer en adénocarcinome, puis en tumeur avec des métastases (89,91,92).

La cancérogénèse colorectale est donc un processus complexe, en plusieurs étapes, impliquant une perturbation de la survie, de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales (93) où les PKCs peuvent jouer un rôle clef en interagissant avec d'autres signaux majeurs. Nous allons évoquer ces signaux et montrer comment le déficit des PKCs peut influencer la carcinogénèse.

## 2. Voies de signalisation du CCR et PKCs

La survenue du CCR implique que des voies de survie et de prolifération/différenciation soient dérégulées au niveau des cellules souches et de leurs progéniteurs. Nous allons aborder les principales voies de signalisation impliquées et leurs relations avec les PKCs.

### a) *La voie GSK3 $\beta$*

Les CCR sporadiques représentent 60 à 80% des CCR et ne sont pas liés à des prédispositions génétiques familiales. Le développement de ce type de cancer est attribué à l'acquisition d'altérations épigénétiques ou de mutations génétiques induites par des facteurs de risque (âge, alimentation, sédentarité, infection...) souvent à l'origine d'un contexte

inflammatoire chronique (85,88). La Glycogène Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) est une sérine/thréonine kinase multifonctionnelle particulièrement impliquée dans ce type de CCR car c'est un acteur important de la réponse au stress cellulaire. En condition physiologique, la GSK3 $\beta$  est inhibée par une phosphorylation sur sa sérine 9 ce qui participe à l'activation de la glycogène synthase permettant le stockage du glycogène (94). En cas de stress, son activation par déphosphorylation induit un changement métabolique important dans la cellule avec l'utilisation d'autres sources énergétiques que le glucose et un ralentissement des mécanismes d'oxydoréduction au niveau mitochondrial. La forme active de GSK3 $\beta$  peut contrer les voies apoptotiques des récepteurs de mort membranaires et de p53 au niveau du réticulum endoplasmique. Cette forme de résistance liée à l'activation de GSK3 $\beta$  peut s'accompagner d'une quiescence cellulaire car la kinase fait partie du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine, un co-facteur transcriptionnel de TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) qui contrôle la prolifération des cellules immatures en réponse au facteur Wnt. Directement dans le noyau, GSK3 $\beta$  peut aussi activer de façon spécifique le facteur de transcription NF- $\kappa$ B pour induire la survie et la prolifération cellulaire dans un contexte inflammatoire (94–96).

Dans les cellules cancéreuses colorectales, le niveau d'expression de la forme active de la GSK3 $\beta$  est augmenté par rapport aux cellules saines (94,95). Ce phénotype est associé à une plus grande résistance à l'apoptose et à un blocage de la différenciation. Toutefois, les cellules de CCR sont proliférantes car des voies alternes d'activation de la voie  $\beta$  caténine/TCF telles que la voie PI3K/Akt ou la voie Wnt5a sont mises en jeu. L'inhibition de GSK3 $\beta$ , en complément des chimiothérapies existantes, est donc une option thérapeutique pour le traitement du CCR. En effet, son inhibition induit l'apoptose et diminue la prolifération des cellules cancéreuses colorectales *in vitro* (95,96).

De façon intéressante, la PKC $\zeta$  pourrait s'opposer à l'adaptation métabolique que confère la GSK3 $\beta$  active aux cellules cancéreuses colorectales (97). Il a été montré que GSK3 $\beta$  interagissait avec PKC $\zeta$  dans les cellules CCR. En réponse à une stimulation Wnt, la PKC $\zeta$  phosphoryle un site spécifique de GSK3 $\beta$  entraînant son activation (98). Cependant, il semble que les autres isoformes de PKCs soient capables de phosphoryler la sérine 9 et d'inhiber GSK3 $\beta$  (99). Il est possible que dans certains contextes, tel que la stimulation adrénergique, la PKC $\zeta$  puisse jouer un rôle indirect dans l'inhibition de GSK3 $\beta$  *via* sa phosphorylation sur la sérine 9 (100). Inversement, la GSK3 $\beta$  peut phosphoryler les PKCs atypiques, entraînant ainsi leur dégradation par le protéasome et un changement de la polarité cellulaire (101). La Figure 25 récapitule les

fonctions exercées par la GSK3 $\beta$  active dans les cellules cancéreuses et les interactions potentielles avec les PKCs.

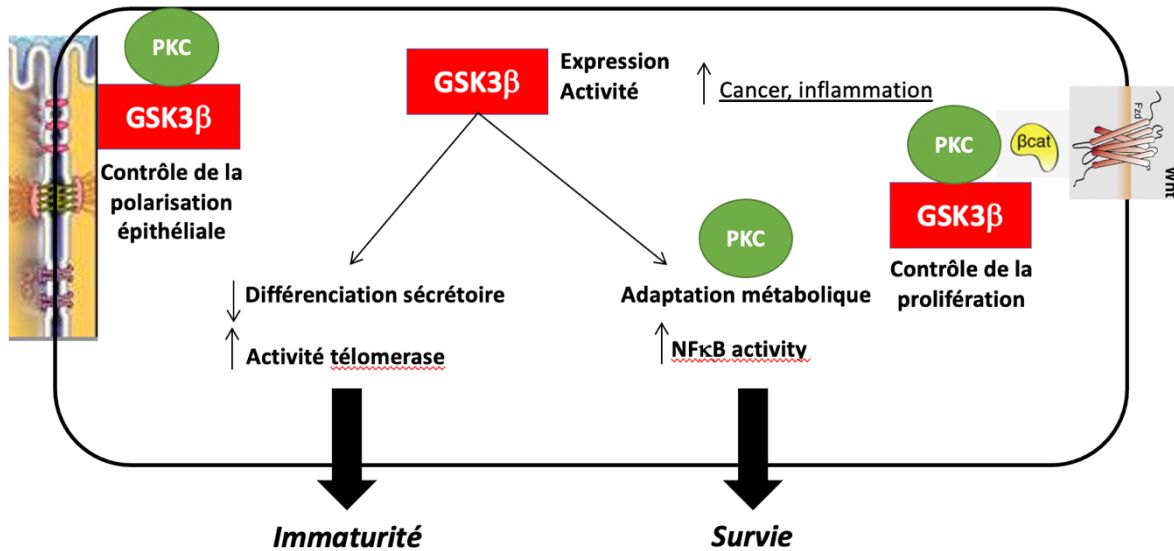


Figure 25 : Rôles de GSK3 $\beta$  dans les cellules épithéliales colorectales et interactions avec les PKCs. La kinase GSK3 $\beta$  a de multiples fonctions dans les cellules épithéliales immatures à travers le contrôle de leurs jonctions adhésives, de leur prolifération et de leur différenciation. L'activité de GSK3 $\beta$  est augmentée en cas de cancérisation et va permettre une meilleure survie cellulaire associée à un blocage de différenciation et une dérégulation de la prolifération. Les données bibliographiques indiquent que GSK3 $\beta$  pourrait interagir avec les PKCs dans le contrôle adhésif, prolifératif et métabolique de la cellule.

### b) Les voies APC/ $\beta$ -caténine, PI3K/Akt et MEK/Erk

Ces voies de signalisation sont responsables d'une dérégulation de la prolifération cellulaire lors du CCR. Elles font souvent l'objet de mutations qui font progresser la carcinogénèse. De plus, elles présentent des régulations croisées avec les kinases GSK3 $\beta$  et PKCs.

Comme la GSK3 $\beta$ , la protéine adaptatrice APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) fait partie du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine et a un rôle suppresseur de tumeur (86,89,92). Sa mutation est très fréquente dans les CCR familiaux et sporadiques (80%) et entraîne une augmentation de la translocation nucléaire de la  $\beta$  caténine et de son rôle prolifératif. La PKC $\zeta$  peut phosphoryler directement la  $\beta$  caténine dans des cellules souches intestinales et entraîner sa dégradation, jouant ainsi un rôle de suppresseur de tumeur (102). Il est à noter qu'elle joue

ce même rôle par la phosphorylation directe d'une autre protéine oncogénique YAP (*Yes-Associated Protein*) (102). La PKC $\alpha$  a également été montrée comme pouvant phosphoryler la  $\beta$  caténine et inhiber son rôle transcriptionnel (103–105).

Les voies PI3K/Akt et MEK/Erk ont la capacité d'inhiber directement GSK3 $\beta$  par phosphorylation (106). Les deux voies PI3K/Akt et MEK/Erk sont sujettes à de fréquentes mutations dans le CCR, aboutissant à une prolifération cellulaire incontrôlée via l'activation des facteurs de transcriptions TCF ou C-Fos. La voie PI3K/Akt est hyperactivée dans plus de 40% des CCR. Les mécanismes les plus communs menant à la suractivation de la voie PI3K/Akt sont : la perte de fonction suppressive de tumeur de la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) par mutation ou deletion et la présence de mutations activatrices de la PI3K ou d'Akt (Figure 26) (107). La voie MEK/ERK, aussi appelée voie des MAPK, est une voie pro-tumorale hyperactivée dans 30% des cancers, incluant le CCR (107). La dérégulation de la voie des MAPK peut être due à une mutation de KRAS (36% des CCR), une mutation de RAF (10% des CCR), ou une suractivation de l'EGFR qui est plus rare (Figure 27) (93).

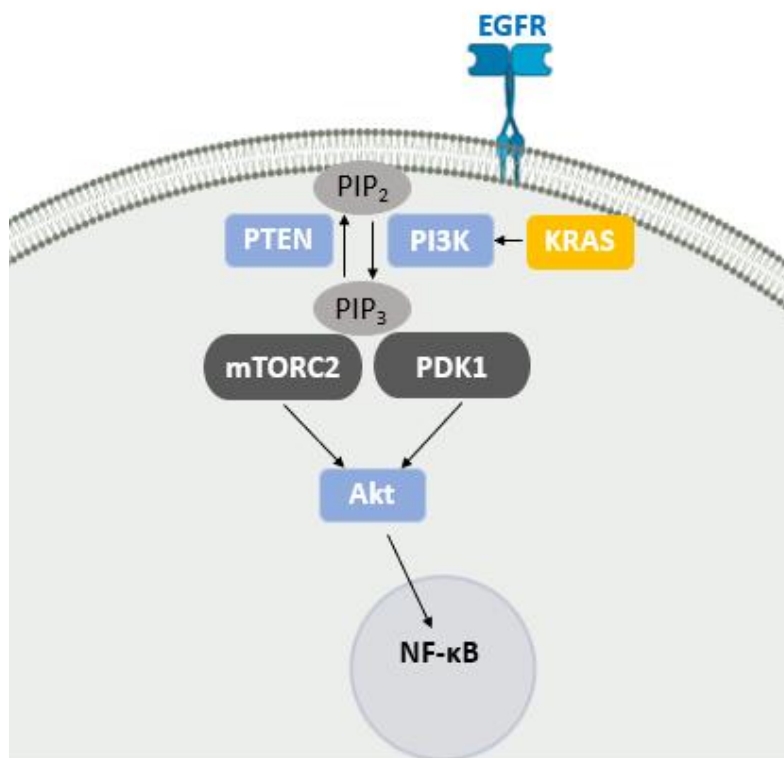


Figure 26: Schéma de la voie PI3K/Akt

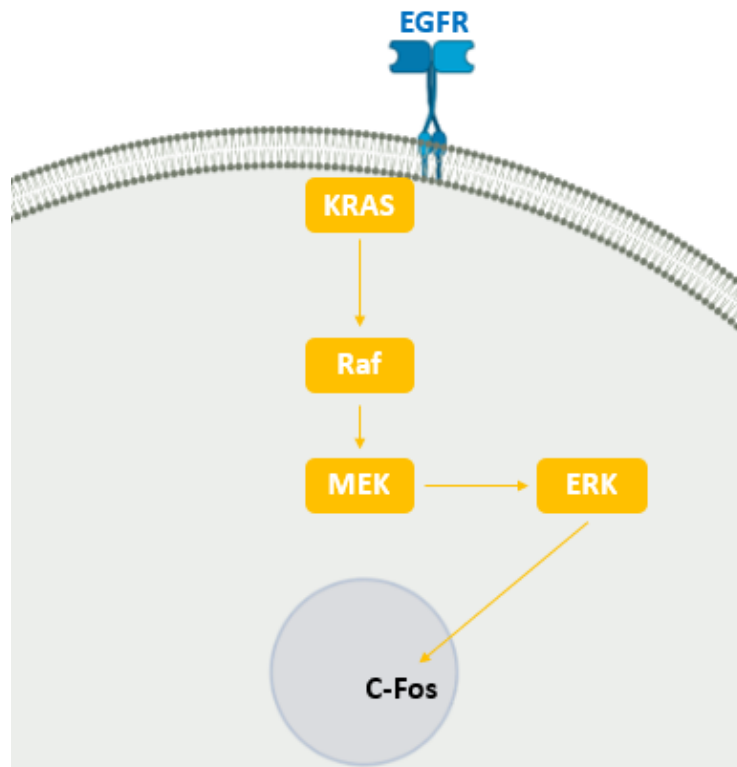


Figure 27: Schéma de la voie des MAPK

Le ciblage des voies PI3K/Akt et MEK/Erk est actuellement un enjeu important des thérapies moléculaires ciblées (108). De façon intéressante, la PKC $\zeta$  inhibe l'activité RAS de manière directe (66) et la PKC $\alpha$  jouerait un rôle important dans le contrôle négatif de la voie Erk dans les cellules épithéliales intestinales (109). Inversement, la PKC $\zeta$  est activable par les produits de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) (66) et peut participer à l'activation de la voie MEK/Erk (110). Ainsi, en fonction du contexte, les PKCs peuvent avoir un rôle dual sur les voies de carcinogénèse (66). La Figure 28 récapitule les régulations croisées entre les voies PI3K/Akt, MEK/Erk et PKCs dans les cellules épithéliales colorectales.

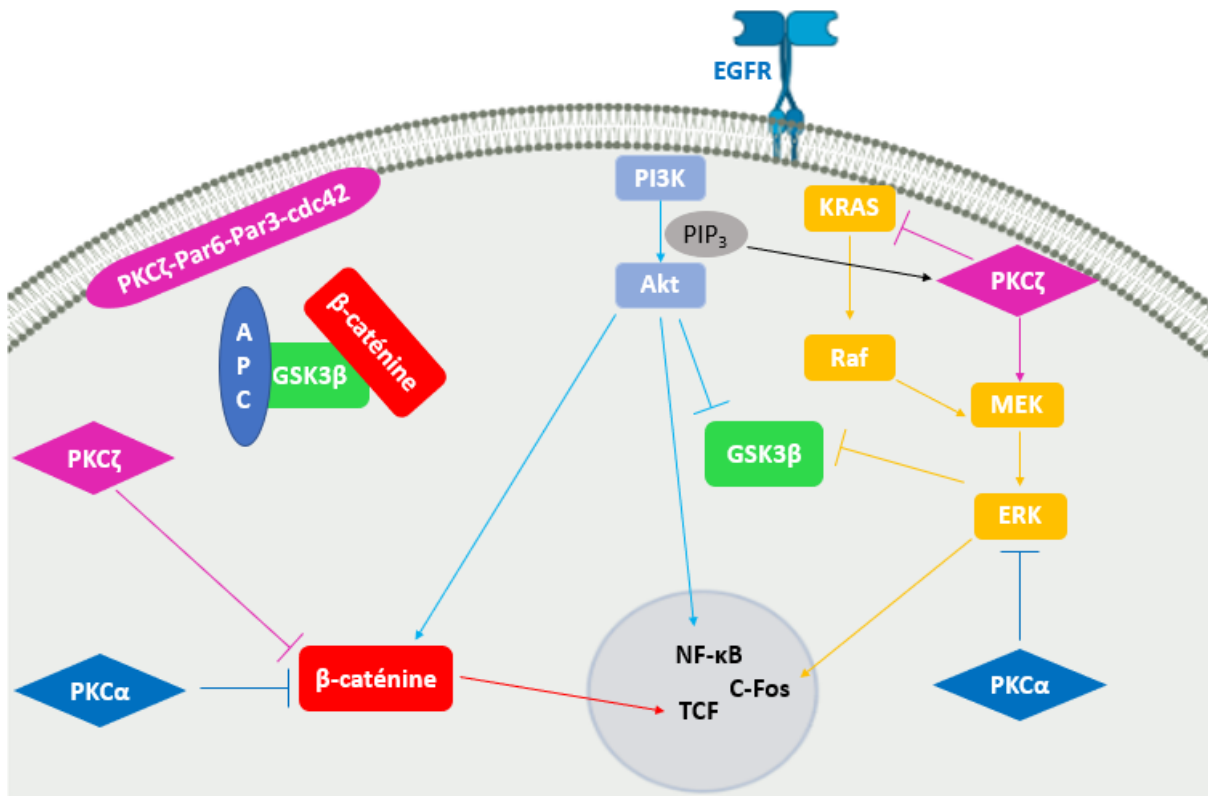


Figure 28: Interaction des PKCs avec les voies PI3K/Akt, MEK/ERK et β caténine.

## V. Le latex de *Hura crepitans* L. et le cancer colorectal

---

Notre introduction bibliographique a mis en avant l'utilité de cibler les PKCs en thérapie anticancéreuse. Dans ce cadre, les diterpènes d'Euphorbiaceae peuvent être des molécules prometteuses pour restaurer les fonctions physiologiques des PKCs qui sont déficientes dans les cellules cancéreuses. Dans un travail précédent, notre laboratoire a exploré le potentiel en composés potentiellement actifs au sein du latex de *H. crepitans* en couplant des étapes de purification avec des tests biologiques sur des cellules de cancer colorectal (33). Ci-dessous, sont résumés les résultats précédemment obtenus.

### A. Une activité cytostatique portée par les daphnanes monoestérifiés

L'extrait éthanolique du latex de *H. crepitans* et son fractionnement bio-guidé ont permis de montrer une activité antiproliférative sur la lignée humaine de cancer colorectal Caco-2, portée par les daphnanes monoestérifiés (Figure 29).



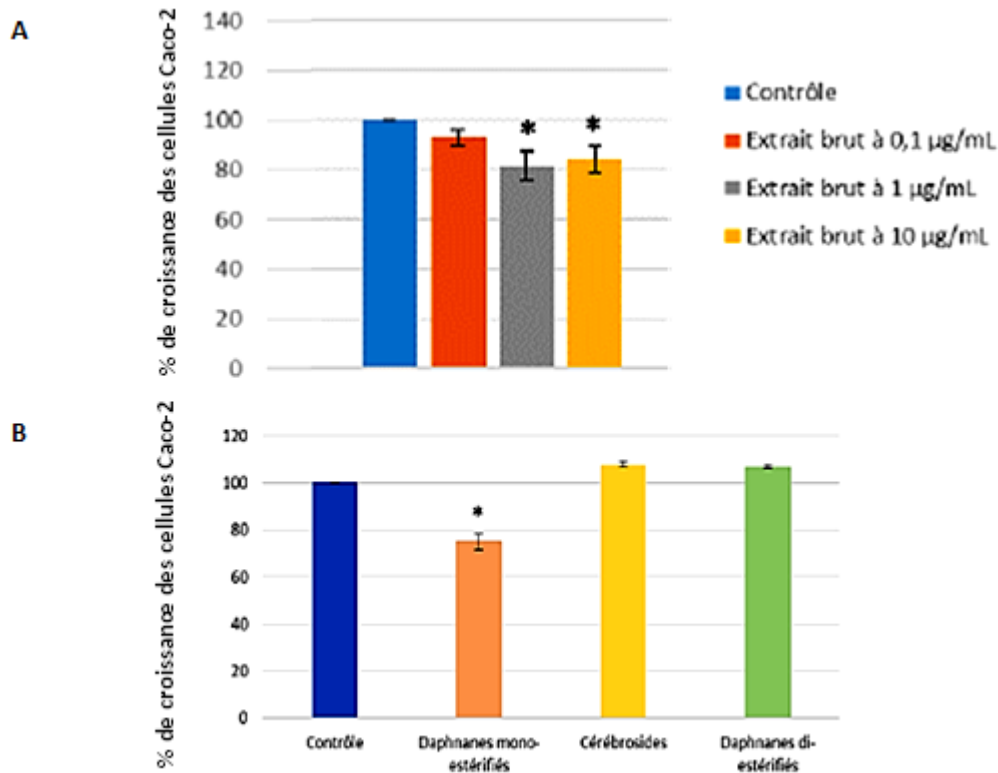


Figure 29: Activité cytostatique des extraits du latex de *H. crepitans*. L'extrait éthanolique (A) puis différentes fractions (B) enrichies (10 µg/mL) en daphnanes monoestérifiés, en cérébrosides et en daphnanes di-estérifiés ont été incubés pendant 48 h avec des cellules cancéreuses colorectales Caco-2. Un test colorimétrique permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes. En l'absence de mortalité cellulaire, la diminution du nombre de cellules a indiqué un effet antiprolifératif. Les données sont représentées en % (n=3, moy ± SEM) par rapport au contrôle traité avec le solvant DMSO. Un test t de Student a été réalisé pour la significativité des résultats : \*p<0.05

Trois daphnanes monoestérifiés ont été isolés (huratoxine, prohuratoxine, stelléralide J) et testés sur les cellules Caco-2 et sur les cellules normales intestinales IEC6 (d'origine murine) à une concentration de 1 µg/mL (Figure 30). La huratoxine possède une chaîne latérale liée à la molécule par un groupe orthoester et un groupe époxyde sur le cycle B ; la prohuratoxine présente une chaîne latérale de type ester et un groupe époxyde sur le cycle B ; tandis que le stelléralide J présente une chaîne latérale de type ester et un diol sur le cycle B (Figure 30). Seule la huratoxine a montré un effet cytostatique sur les cellules Caco-2 et aucun effet sur les cellules IEC6 laissant supposer une sélectivité d'action.

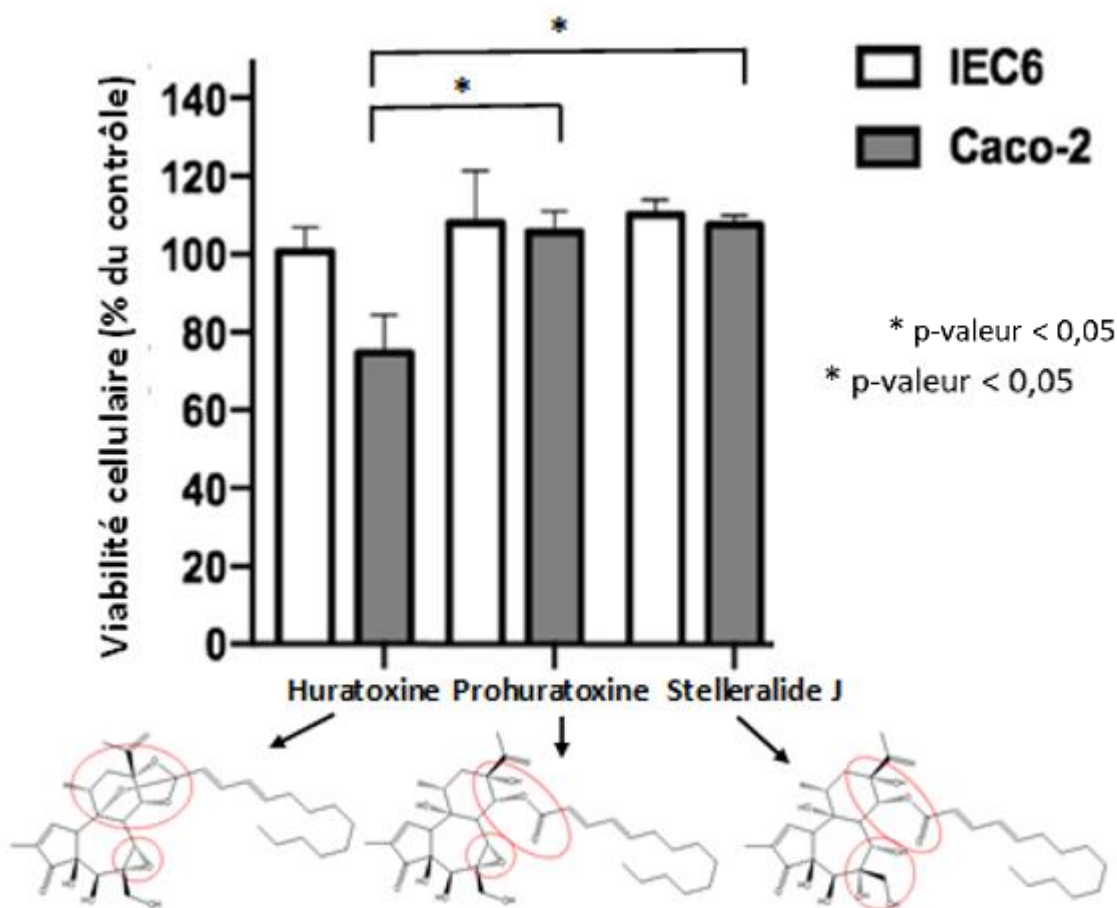


Figure 30: Activités biologiques de la huratoxine, de la prohuratoxine et du stelléralide J. Les trois daphnanes monoestérifiés ayant des structures différentes comme indiqué sur la figure ont été incubés à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  avec les cellules cancéreuses Caco-2 ou les cellules normales intestinales murines IEC6 pendant 48 h avant la réalisation d'un test colorimétrique de viabilité. En l'absence de mortalité cellulaire, la diminution du nombre de cellules a indiqué un effet antiprolifératif. Les données sont représentées en % ( $n=3$ , moy  $\pm$  SEM) par rapport au contrôle traité avec le solvant DMSO. Un test t de Student a été réalisé pour la significativité des résultats : \* $p < 0,05$

Ces résultats indiquent que la chaîne orthoestérifiée pourrait être nécessaire à l'activité cytostatique. Cette hypothèse est partagée par Jin *et al.* dans leur revue sur l'activité biologique des diterpènes de type daphnane publiée en 2019 (55).

## B. Une activité cytostatique couplée à des effets morphologiques pro-différenciants

Les résultats du laboratoire ont montré que l'activité cytostatique des daphnanes monoestérifiés était accompagnée d'effets morphologiques aboutissant à la restauration de l'architecture normale de l'épithélium intestinal. Comme montré sur la Figure 31A, le

traitement par la huratoxine des cellules cancéreuses Caco-2 induit dans un premier temps leur agrégation puis leur organisation en trois dimensions sous forme de bourgeon de crypte intestinale. De plus ce réarrangement est accompagné de l'expression génique de l'intégrine  $\alpha 2$  et de la mucine2 qui sont des marqueurs de la différenciation épithéliale intestinale (Figure 31B).

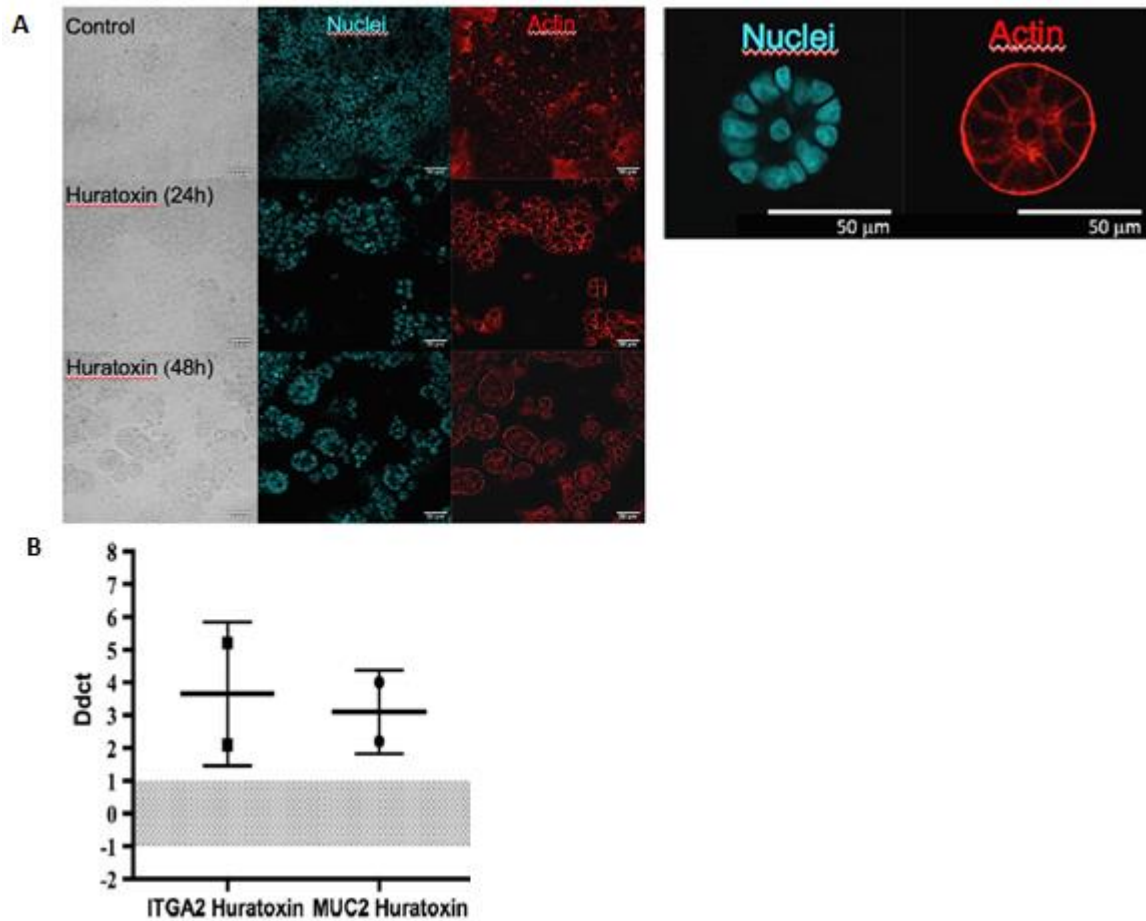


Figure 31: Impact morphogénétique et différenciant sous l'effet de la huratoxine. Après un traitement avec la huratoxine à 1  $\mu\text{g/ml}$ , les cellules cancéreuses Caco-2 sont étudiées par microscopie confocale ou leurs ARNm sont extraits pour une étude de l'expression génique. A) Des images microscopiques de contraste de phase et de fluorescence montrent le réarrangement architectural des cellules cancéreuses Caco-2 traitées par huratoxine. Une image en fort grossissement montre qu'il s'agit de la formation de cryptes de novo avec une monocouche de cellules épithéliales bordant une lumière centrale comme dans le tissu normal. Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI et l'actine est marquée en rouge par la phalloïdine. B) Après 48 h de traitement par la huratoxine, l'expression des gènes de différenciation ITGA2 (intégrine  $\alpha 2$ ) et MUC2 (mucine 2) est augmentée dans les cellules Caco-2. Les données issues de 2 expériences indépendantes sont représentées en « fold increase » par rapport au niveau d'expression dans le contrôle.

### C. Une activité cytostatique corrélée à une inhibition des voies GSK3 $\beta$ et Akt mais indépendante des PKC $\alpha$ et PKC $\delta$

Afin de comprendre le mécanisme d'action de la huratoxine sur les cellules Caco-2, différentes voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse colorectale ont ensuite été étudiées par Western blot. Alors que les résultats obtenus par le laboratoire ont montré que les voies ERK et YAP n'étaient pas significativement modifiées par la huratoxine, la Figure 32 montre que cette dernière impacte fortement les kinases GSK3 $\beta$  et Akt qui sont suractivées dans le CCR. En effet, les formes inhibées de GSK3 $\beta$  (phosphorylée) et d'Akt (déphosphorylée) sont augmentées sous traitement par huratoxine.

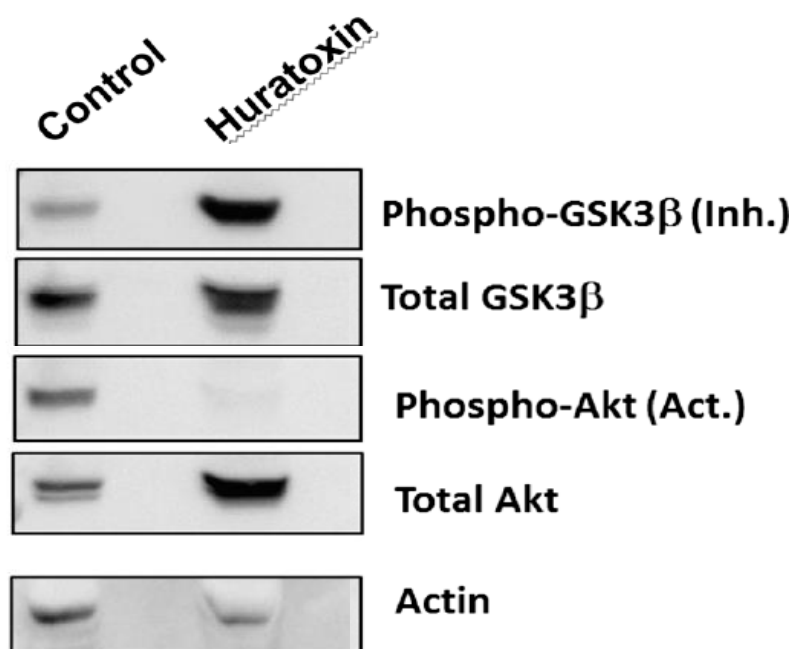


Figure 32: Impact de la huratoxine sur les kinases GSK3 $\beta$  et Akt dans les cellules cancéreuses Caco-2. Après 48 h d'incubation avec du DMSO (contrôle) ou la huratoxine à 1  $\mu$ g/mL, les protéines des cellules Caco-2 ont été extraites et analysées par Western blot. Les formes phosphorylées de GSK3 $\beta$  et d'Akt sont respectivement des formes inhibée et activée. Les résultats représentatifs de deux expériences indépendantes sont montrés.

Ensuite, l'implication des PKCs classiques dans les différents effets de la huratoxine a été étudiée. Les cellules Caco-2 ont été incubées avec un inhibiteur de PKC $\alpha$  (Gö6976) préalablement au traitement par la huratoxine et l'effet cytostatique a été mesuré. Comme le montrent les Figure 33A et 33B, l'inhibition de la PKC $\alpha$  n'impacte ni l'activité cytostatique, ni l'inhibition de la GSK3 $\beta$  et d'Akt par la huratoxine. L'implication des PKCs nouvelles a aussi été

étudiée, les cellules Caco-2 ont été traitées avec la huratoxine et le niveau d'expression de la PKC $\delta$  totale et phosphorylée a été mesuré. Comme le montre la Figure 33C, le traitement par la huratoxine n'impacte pas le niveau d'expression de la PKC $\delta$ .

Les PKCs classiques et nouvelles ne sont donc pas la cible de ce daphnane.

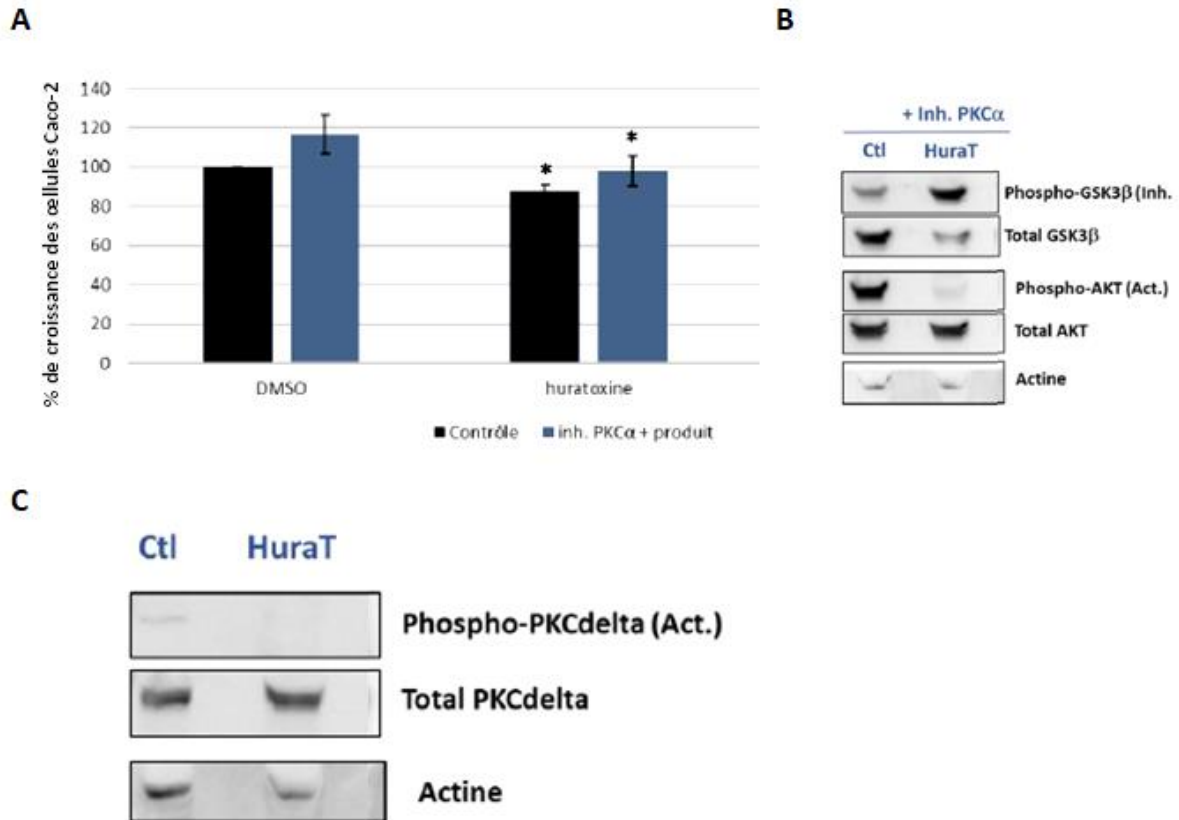


Figure 33: Implication de la PKC $\alpha$  et de la PKC $\delta$  dans les effets de la huratoxine sur les cellules Caco-2. A) Les cellules Caco-2 ont été pré-traitées pendant 15 min avec 0,2  $\mu$ M de l'inhibiteur de PKC $\alpha$  (Gö6976) puis incubées avec la huratoxine à la concentration de 1  $\mu$ g/mL. Après 48 h d'incubation, la quantité de cellules vivantes est mesurée par colorimétrie et l'activité de la huratoxine est calculée relativement au contrôle DMSO (cellules Caco-2 traitées avec le solvant DMSO uniquement). Moyenne  $\pm$  SEM à partir de 3 (n) expériences indépendantes et test statistique de Student par rapport aux contrôles DMSO respectifs en présence ou non de l'inhibiteur de PKC $\alpha$  : \*p<0,05. B) Les cellules Caco-2 ont été pré-traitées pendant 15 min avec 0,2  $\mu$ M de l'inhibiteur de PKC $\alpha$  (Gö6976) avant le traitement par la huratoxine, puis après 48 h d'incubation ont été lysées pour une analyse par Western blot. Les résultats obtenus lors de la révélation des formes phosphorylées et totales de GSK3 $\beta$  et de Akt sont montrés. L'actine montre l'équivalence des dépôts protéiques. C) Les cellules Caco-2 ont été traitées avec la huratoxine, puis après 48 h d'incubation ont été lysées pour une analyse par Western blot. Les résultats obtenus lors de la révélation de la forme phosphorylée (active) et de la forme totale de la PKC $\delta$  sont montrés. L'actine montre l'équivalence des dépôts protéiques.

## VI. Objectifs de l'étude

---

Suite à ces précédents travaux menés au sein du laboratoire montrant que la huratoxine présente une activité antiproliférative intéressante et sélective vis-à-vis des cellules Caco-2, mon objectif de thèse a été d'isoler de la huratoxine ainsi que de nouveaux daphnanes monoestérifiés à partir du latex de *H. crepitans* dans le but de répondre à différentes questions :

- Peut-on trouver des analogues de la huratoxine possédant une meilleure activité antiproliférative ? Dans ce cas peut-on proposer une relation structure-activité pour les daphnanes monoestérifiés ?
- Les PKCs atypiques sont-elles impliquées dans l'activité de la huratoxine et/ou d'autres daphnanes isolés du latex ? Et quelles sont les voies de signalisation impliquées dans l'activité PKC-dépendante des daphnanes les plus actifs ?
- Les daphnanes monoestérifiés conservent-ils leur activité *ex vivo* sur des cellules primaires humaines de CCR ?

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'intérêt majeur que revêt la chimie des produits naturels pour l'isolement de nouvelles molécules bioactives. A partir d'une source naturelle renouvelable telle qu'un latex végétal, il est possible d'espérer isoler différents analogues de la huratoxine alors que la synthèse des daphnanes est très difficile, notamment à cause des nombreux centres chiraux de ce noyau diterpénique. A ce jour, seule la résinifératoxine a pu être synthétisée (56). De plus, notre objectif est d'avancer le plus loin possible dans la connaissance du mécanisme d'action antiprolifératif des daphnanes monoestérifiés du latex de *H. crepitans*. Ces données pharmacologiques sont essentielles avant d'envisager plus avant une valorisation de la huratoxine et/ou de ses analogues comme candidats médicaments.

---

---

## RESULTATS ET DISCUSSION

---

---

## I. Isolement et analyse structurale des daphnes monoestérifiés du latex de *Hura crepitans* L.

---

### A. Extraction du latex de *H. crepitans*

Le latex de *H. crepitans*, utilisé pour l'isolement des daphnes, a été collecté au Pérou. Des entailles sont réalisées dans le tronc de l'arbre afin de collecter le latex qui sera ensuite lyophilisé pour obtenir 1,25 kg de lyophilisat.

Différents protocoles d'extraction sont testés afin de mettre au point le protocole le plus adapté pour extraire les daphnes. Le but est de séparer, dès l'extraction, les daphnes monoestérifiés des autres molécules contenues dans le latex en mettant à profit les différences de polarité des classes de molécules majoritaires (daphnes monoestérifiés, cérébrosides, daphnes diestérifiés). Une extraction à reflux avec l'utilisation successive de cyclohexane, de dichlorométhane et d'éthanol 96 % est testée. Une extraction à reflux avec l'utilisation successive d'heptane et d'éthanol 96 % est également testée.

Une extraction par CO<sub>2</sub> supercritique est aussi envisagée en utilisant du pentane et du méthanol comme co-solvants.

Finalement par comparaison des profils UHPLC-MS, c'est une extraction par chauffage à reflux qui est choisie avec utilisation successive de dichlorométhane et d'éthanol 96 %.

Trois extractions successives par chauffage à reflux sont réalisées sur le lyophilisat (1,25 kg) : deux extractions avec du dichlorométhane et une extraction avec de l'éthanol à 96%. Ainsi 42,53 g d'extrait dichlorométhanique n°1, 6,15 g d'extrait dichlorométhanique n°2 et 36,35 g d'extrait éthanolique sont obtenus. Le rendement total d'extraction s'élève donc à 6,8%.

Les extraits sont injectés en UHPLC-MS avec le gradient 1 (*cf* Matériels et méthodes). Ce gradient très apolaire est utilisé pour les extraits bruts et les premières fractions obtenues qui contiennent des D1, des cérébrosides et des D2 car il permet d'éluer les D2 très apolaires.



Les deux extraits dichlorométhaniques présentent un profil UHPLC-MS similaires (Figure 34). Cependant, certains D1 ne sont présents que dans l'extrait dichlorométhanique n°1. Une première séparation a eu lieu lors de l'extraction, la décision de ne pas rassembler ces deux extraits a donc été prise.

Concernant l'extrait éthanolique, l'analyse de son chromatogramme UHPLC-MS a mis en avant la présence de la majorité des cérébrosides (Figure 34). Ces molécules n'étant pas l'objet de cette étude, cet extrait n'a pas été étudié.

Les efforts de purification se sont concentrés sur l'extrait dichlorométhanique n°1 car il présente le profil UHPLC-MS le plus intéressant avec la présence de la majorité des daphanes monoestérifiés D1.

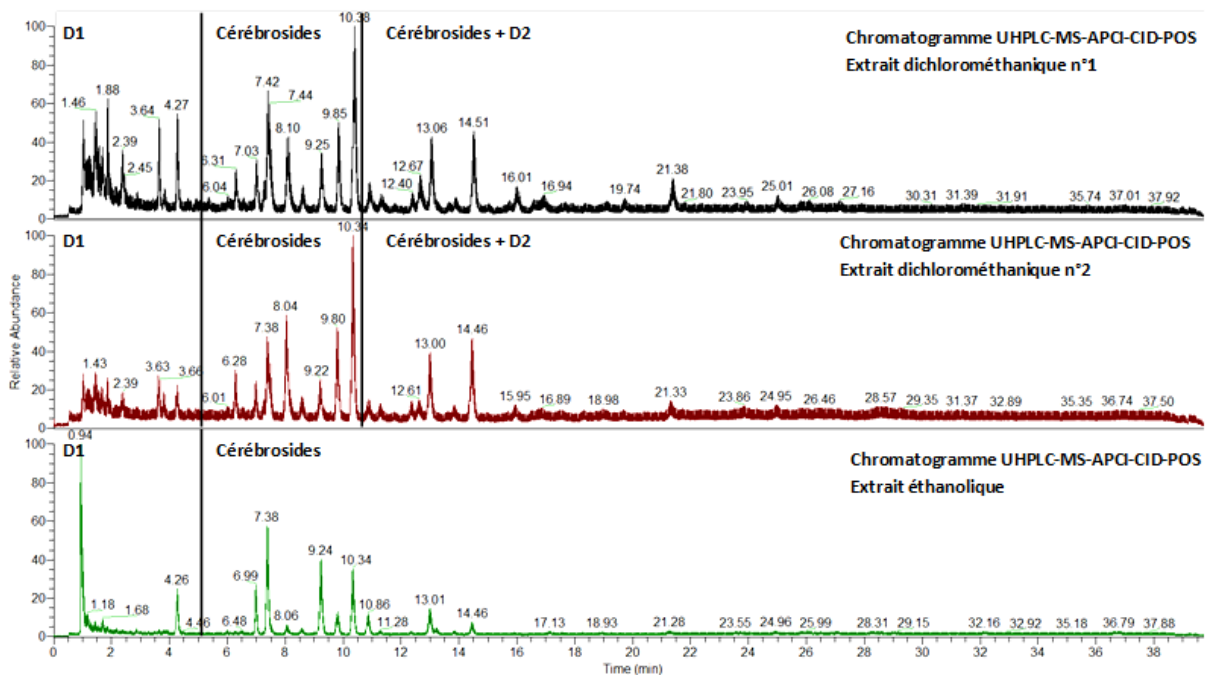


Figure 34 : Chromatogramme UHPLC-MS-APCI-POS des extraits du latex de *Hura crepitans* L.

## B. Détection et élimination des acides gras présents dans l'extrait dichlorométhanique n°1

Une étude antérieure du latex de *H. crepitans* a révélé la présence d'acides gras, en particulier d'acide palmitique (acide gras saturé en C<sub>16</sub>), en grande quantité dans les extraits

bruts ce qui « parasite » l'isolement des molécules d'intérêt. En effet, ces acides gras co-éluent avec les daphanes monoestérifiés tout au long des étapes de purification et rendent difficiles les analyses structurales de ces derniers. Cette observation est cohérente avec la littérature. En effet, en 2019, De Sousa et ses collègues ont mis en avant des acides gras jamais répertoriés auparavant dans le latex d'*Euphorbia tirucalli*. Dans leur étude, l'acide palmitique représentait l'acide gras majoritaire (111). En connaissant ces informations il n'est pas étonnant de découvrir la présence d'acide gras dans le latex d'une autre *Euphorbiaceae* telle que *H. crepitans* (20).

Un travail important a été nécessaire pour mettre au point un protocole de détection et d'élimination de ces acides gras. En effet, les techniques d'analyse des fractions employées jusqu'alors ne permettent pas la détection de ces molécules. Jusqu'à présent les suivis de nos fractions étaient réalisés par CCM sur silice doublement révélée en UV à 254 et 365nm et à la vanilline sulfurique, ainsi que par une analyse par UHPLC-APCI-MS en phase inverse en mode d'ionisation positif. Nous nous sommes aperçus que ces techniques ne permettaient pas de détecter l'acide palmitique et donc des échantillons qui peuvent apparaître purs contiennent en réalité un taux important d'acide palmitique. En effet, cet acide gras est saturé, il n'absorbe donc pas dans le domaine de l'UV, de plus la présence d'une fonction carboxylique en bout de chaîne explique que cette molécule ne s'ionise qu'en mode négatif (20).

## 1. Mise au point d'une méthode de détection des acides gras

Dans la littérature il a été mis en avant des techniques de détection des acides gras par spectrométrie de masse avec une source d'ionisation de type ESI (electrospray ionisation) (112–115). Cette source d'ionisation est disponible au laboratoire, différents tests ont donc été entrepris afin de mettre au point une méthode de détection par UHPLC-ESI-MS, en mode négatif, en phase inverse, adaptée à nos échantillons.

Tout d'abord, un gradient de solvant avec de l'acétonitrile et de l'eau acidifiés avec 0,1 % d'acide formique est essayé, sans résultats. Nous nous sommes ensuite tournés vers les mêmes solvants basifiés avec de l'acétate d'ammonium à 20 mM afin de mettre à profit la fonction ionisable des acides gras. L'acide palmitique, par exemple, possède un pKa de 5, il est donc totalement ionisé à pH = 7 (Figure 35).

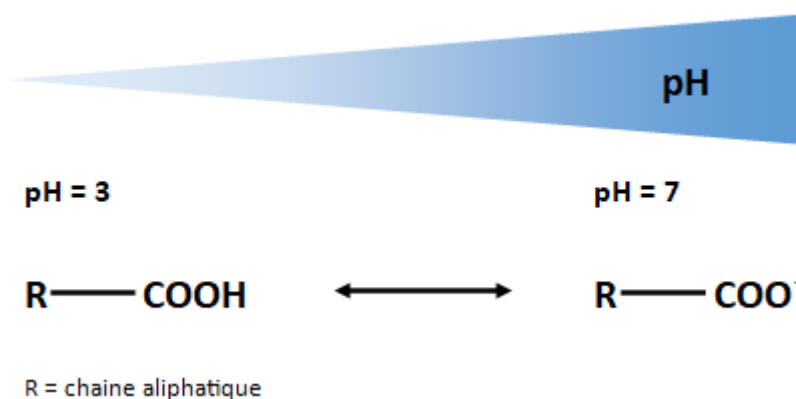


Figure 35: Etat d'ionisation des acides gras en fonction du pH

Cette méthode a donnée de bons résultats, cependant elle pose problème car les D1 sont mieux détectés avec une source d'ionisation de type APCI, fonctionnant en mode positif. L'utilisation de deux sources et de deux modes d'ionisation différents pour détecter nos molécules d'intérêt et les acides gras présents n'est pas faisable en routine.

Notre attention s'est donc tournée vers les révélateurs CCM permettant de détecter les acides gras et les D1. Deux révélateurs sont évoqués dans la littérature : la rhodamine 6G et l'acide phosphomolybdique (116,117). Des essais de sensibilité sont réalisés pour ces deux révélateurs à l'aide d'un standard d'acide palmitique. Un révélateur à base d'acide phosphomolybdique est préféré avec un seuil de détection de 0,01 mg/mL tandis que l'utilisation de rhodamine 6G ne permet d'atteindre un seuil de détection que de 0,1 mg/mL.

## 2. Mise au point d'un protocole d'élimination des acides gras

L'élimination des acides gras a été un grand challenge durant ce travail de thèse. Différentes méthodes ont été testées. Compte tenu du comportement similaire des acides gras et des D1 lors des séparations chromatographiques classiques, il a été décidé de mettre à profit la fonction ionisable des acides gras afin de les éliminer. L'objectif étant de faire passer les acides gras sous forme totalement ionisée afin d'augmenter leur polarité et de les séparer des molécules d'intérêt qui sont apolaires.

Tout d'abord, nous nous sommes tournés vers des méthodes de partage liquide-liquide. Différents systèmes de solvants, basifiés avec 20 mM d'acétate d'ammonium tamponné à pH 9 avec de l'hydroxyde d'ammonium, sont essayés parmi lesquels : cyclohexane/eau 1/1 (v/v), dichlorométhane/eau 1/1 (v/v). Différents tests de charge sont aussi testés en commençant avec 100 mg d'extrait brut puis 10 mg d'extrait brut pour 100 mL de chaque solvant. Une base forte, l'hydroxyde de potassium, est utilisée pour alcaliniser les solvants en seconde intention. Une mise en contact prolongée (1 heure avec agitation) des solvants alcalinisés avec l'extrait brut a aussi été tentée avant de réaliser le partage. Ces tentatives n'ont montré aucun résultat satisfaisant.

Des méthodes d'extraction sur phase solide (SPE) avec des phases échangeuses d'anions ont donc été envisagées.

En premier lieu, une cartouche SPE supel sphere carbone/NH constituée de sphères de carbone et de sphères greffées avec des groupements NH est essayée. En suivant les indications du fabricant le conditionnement d'une cartouche de 500 mg est réalisé avec 30 mL de méthanol, puis 30 mL d'acétone et enfin 30 mL de dichlorométhane car c'est le solvant utilisé pour l'élution. Un dépôt liquide de 5 mg d'extrait brut dissout dans du dichlorométhane est déposé et l'élution est réalisée avec 4 fois 30 mL de dichlorométhane. Ce protocole montre un résultat satisfaisant, les molécules d'intérêts sont éluées et les acides gras sont retenus dans la cartouche SPE. Ce protocole est donc répété sur une cartouche neuve avec 2 fois, puis 10 fois plus d'extrait brut mais sans résultat. La capacité de charge de cette cartouche est donc limitée à 5 mg. De plus, ce protocole n'est faisable qu'une fois sur la même colonne sans perte de résultat et seule cette taille de colonne existe dans le commerce. La commande de phase en vrac est possible, mais vu la capacité de charge très faible, une grande quantité aurait été nécessaire et le prix aurait été très important. La mise au point d'un protocole de régénération de la cartouche est donc nécessaire.

Tout d'abord différents tests de lavage de la cartouche sont essayés avec du méthanol, de l'acétone, de l'acide chlorhydrique à 0,1 M, de l'eau et du méthanol acidifié avec 0,1% d'acide acétique. Les acides gras sont élués en passant 5 volumes colonne de méthanol ou 1 volume colonne de méthanol acidifié avec 0,1 % d'acide acétique. Cette méthode de lavage est donc retenue. Cependant, une fois la colonne lavée et en répétant le protocole mis au point

précédemment on ne retrouve pas le résultat attendu, les acides gras ne sont pas retenus et sont élués avec les molécules d'intérêts. Nous avons donc supposé que les phases stationnaires de la cartouche sont modifiées au cours de la manipulation.

Nous avons donc essayé plusieurs techniques afin de régénérer les phases stationnaires. Tout d'abord nous avons souhaité connaître le pH des phases non utilisées, nous avons donc élué de l'eau et mesuré le pH de l'eau en sortie de cartouche (pH = 5,85). Suite au conditionnement, à l'éluion et au rinçage réalisé comme décrit précédemment nous avons fait passer de l'eau jusqu'à retrouver le pH de départ puis nous avons essayé une deuxième manipulation sur la même cartouche sans résultat. Nous avons ensuite essayé de régénérer la cartouche en faisant passer 1 volume colonne d'eau basifiée avec de l'acétate d'ammonium tamponnée à pH = 7 ce qui a permis de régénérer les phases et une deuxième utilisation de la cartouche a été possible. Nous avons augmenté les volumes de liquide de régénération au fur et à mesure des utilisations afin d'essayer d'en faire le maximum. Malheureusement, la cartouche perd son efficacité au bout de trois utilisations.

Cette méthode est donc efficace pour de petites quantités à traiter, elle pourra être envisagée en fin de purification sur des échantillons de quelques mg, mais n'est pas faisable pour traiter l'extrait brut.

Ce protocole est testé sur d'autres cartouches SPE échangeuses d'anions (faibles et forts) telles que les cartouches Strata-X AW (polymère fonctionnalisé avec un groupement  $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) et les cartouches Waters Sep Pak Vac + QMA (silice fonctionnalisée) sans résultat. Un ajout de charbon actif sur ces deux cartouches est essayé afin de mimer les deux phases de la cartouche précédente sans résultats.

Des essais de séparation par chromatographie de partage centrifuge (CPC) sont ensuite effectués. La mise au point de cette méthode se fait d'abord par partage liquide-liquide suivie d'une analyse CCM, afin d'identifier un système biphasique où les molécules d'intérêt ont un coefficient de partage autour de 1.

Différents systèmes de solvants connus sont essayés tels que la gamme Arizona, composée d'un mélange d'heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol, et d'eau en différentes proportions selon le système ; la gamme OKA (hexane, acétate d'éthyle, butan-1-ol, méthanol, eau) et la

gamme HBAE (heptane, butan-1-ol, acétonitrile, eau) (Annexes I, II et III). Chaque système testé l'est tel quel ou en basifiant la phase aqueuse avec différentes concentrations de triéthylamine ou d'acétate d'ammonium, ou en acidifiant la phase organique avec 10 mM d'acide chlorhydrique et en basifiant la phase aqueuse. L'approche « bon solvant » est aussi essayée. Elle consiste à sélectionner un solvant dans lequel l'échantillon est très soluble et à y ajouter deux autres solvants non miscibles pour constituer un système de solvants ternaire biphasique. L'un des solvant ajouté doit être plus polaire que le « bon solvant » et l'autre plus apolaire. Dans nos travaux nous avons sélectionné le chloroforme comme « bon solvant ».

Finalement, le système HBAE -2 (heptane/butanol/acétonitrile 5/2/3 v/v/v) basifié avec 20 mM de triéthylamine dans la phase inférieure est testé en CPC sur un rotor de 25 mL en phase normale (phase supérieure en tant que phase mobile et phase inférieure en tant que phase stationnaire) et en phase inverse. Malheureusement, dans les deux cas, pendant l'équilibrage les deux phases se sont mélangées et la manipulation n'a pas pu aller plus loin. Nous avons conclu que le système HBAE -2 n'était pas adapté

L'approche bon solvant, avec un système de solvant composé d'un mélange de cyclohexane/chloroforme/acétonitrile 47,6/9,9/42,5 (v/v/v), est essayée sur le rotor de 25 mL en phase normale. Une injection de 50 mg d'extrait brut est réalisée mais la séparation est très mauvaise. Cette technique est donc abandonnée.

Lors de la mise au point de la CPC, un système de solvants a permis le passage de l'acide palmitique dans une seule phase, nous sommes donc revenus à cette technique. D'autres systèmes de solvants ternaires basifiés avec 20 mM de triéthylamine sont essayés parmi lesquels : cyclohexane/acétonitrile/eau 1/1/1 (v/v/v) et cyclohexane/isopropanol/eau 1/1/1 (v/v/v).

Finalement, le système de solvant composé d'un mélange cyclohexane/isopropanol/eau 1/1/1 (v/v/v) basifié avec 20 mM de triéthylamine permet la séparation des molécules d'intérêt et des acides gras. Cette méthode permet de traiter de grandes quantités avec très peu de perte de matière. La phase inférieure, aqueuse basique, composée essentiellement d'eau distillée et

d'isopropanol concentre les acides gras ionisés, et la phase supérieure, organique, à base de cyclohexane et d'isopropanol contient les molécules d'intérêt apolaires.

Lors du scale-up de cette méthode une émulsion importante s'est formée à l'interface. La présence d'une quantité importante de cérébrosides, molécules amphiphiles, dans l'extrait brut pourrait être à l'origine de cette émulsion. Les molécules contenues dans cette interphase ne peuvent pas être récupérées ce qui diminue considérablement le rendement.

Une méthode préalable d'élimination des cérébrosides est donc mise au point. Les cérébrosides sont des molécules plus polaires que les daphnanes, bien qu'ils soient élués après ceux-ci lors d'une séparation CLHP en phase inverse (Figure 36). Nous avons donc voulu mettre à profit cette différence de polarité afin de séparer ces deux classes de molécules.

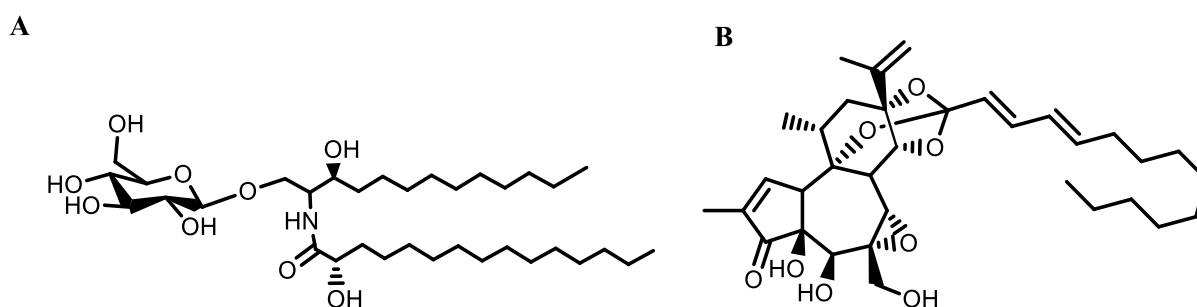


Figure 36: A) Structure des cérébrosides ; B) Structure de la huratoxine

Des essais de précipitation des cérébrosides avec un solvant apolaire sont réalisés. Les 42,53 g d'extrait brut  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  n°1 sont mélangés à du cyclohexane à une concentration de 120 g/L. La suspension est centrifugée, puis le surnageant est prélevé. Le précipité est lavé avec du cyclohexane et les solutions de lavage sont rassemblées avec le surnageant pour former la fraction EC.2.21.B. Ainsi 4,1529 g de précipité (EC.2.21.A) et 38,3203 g de la fraction EC.2.21.B, soit 90 % de la masse initiale, sont récupérés. On peut voir sur les profils UHPLC-MS (gradient 1) de ces deux fractions qu'une partie des cérébrosides a pu être séparée du reste de l'extrait (Figure 37).

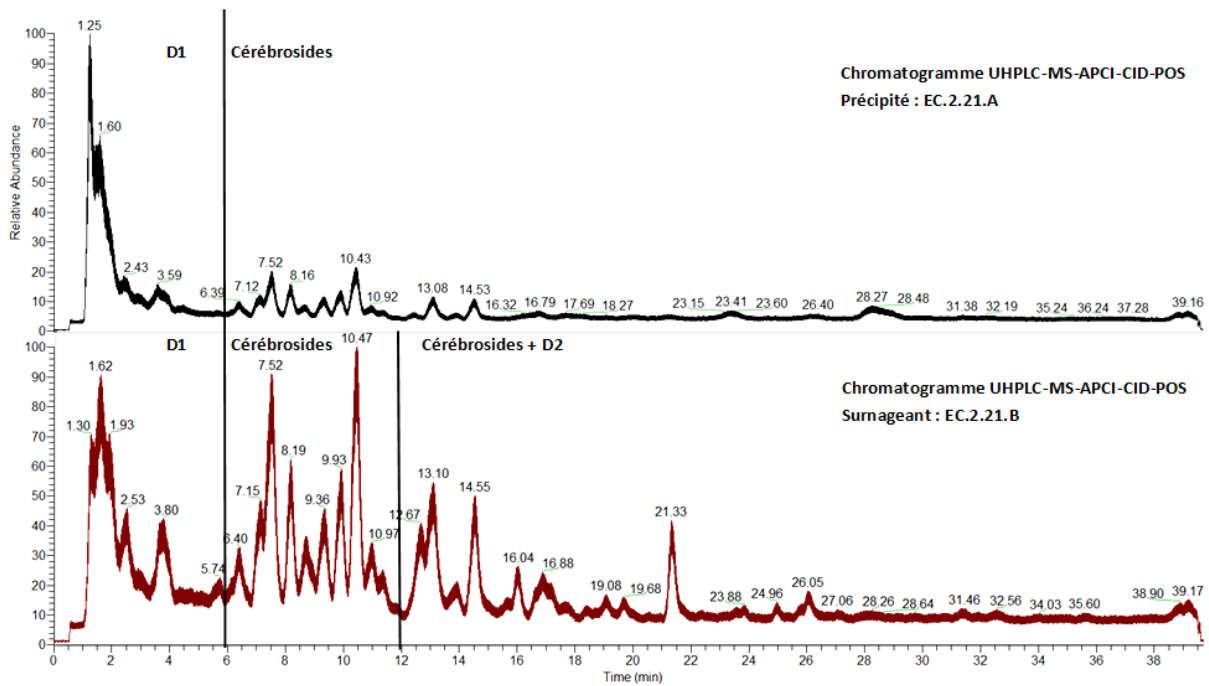


Figure 37: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS du précipité et du surnageant

La majorité des cérébrosides restent localisés dans la fraction EC.2.21.B, cependant, l'élimination d'une partie est suffisante pour diminuer l'émulsion se formant à l'interphase dans l'ampoule à décanter lors de l'élimination des acides gras.

On remarque aussi qu'une partie des D1 est passée dans la fraction EC.2.21.A, cependant on considère cette quantité de D1 négligeable.

La fraction EC.2.21.B est dissoute dans du cyclohexane puis le partage liquide-liquide est réalisé avec un mélange cyclohexane/isopropanol/eau 1/1/1 (v/v/v) basifié avec 20 mM de TEA. La phase inférieure EC.2.23.A (12,30 g) et la phase supérieure EC.2.23.B (25,99 g) sont récupérées. Soixante-huit pour cent de la masse initiale sont retrouvés dans la phase supérieure contenant les molécules d'intérêt. La présence d'acides gras uniquement dans la phase inférieure est vérifiée par CCM avec une révélation par pulvérisation d'acide phosphomolybdique ( Figure 38).



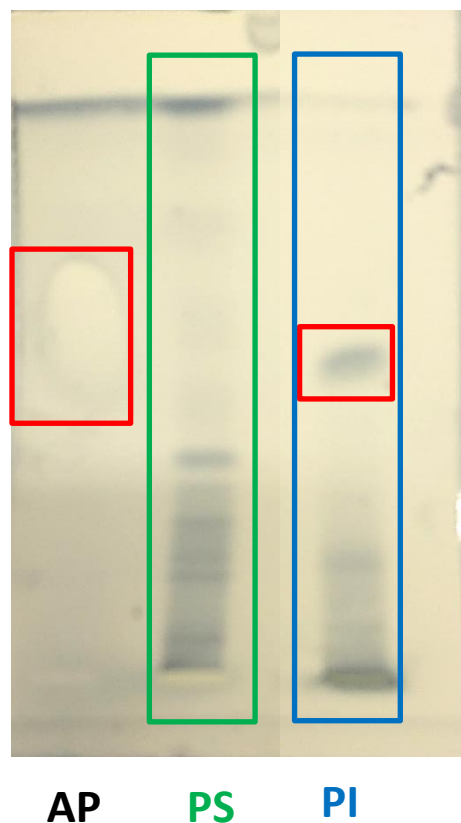


Figure 38: CCM du témoin d'acide palmitique AP (à gauche) et des phases supérieure PS (organique) et inférieure PI (aqueuse) du partage liquide-liquide. Révélation avec de l'acide phosphomolybdique

On voit que la tâche possédant un rapport frontal ( $R_f$ ) égal à celui du témoin d'acide palmitique n'est présente que dans la phase inférieure. Le partage liquide-liquide a donc été efficace,

### C. Isolement des daphnanes monoestérifiés

L'obtention d'une fraction enrichie en daphnanes monoestérifiés est décrite dans la Figure 39 et les différentes étapes de purification sont détaillées dans l'arbre de purification ci-dessous (Figure 40).

L'isolement de chaque molécule sera ensuite détaillé dans les paragraphes suivants.

Les structures des molécules originales seront présentées dans la partie « analyse structurale ».

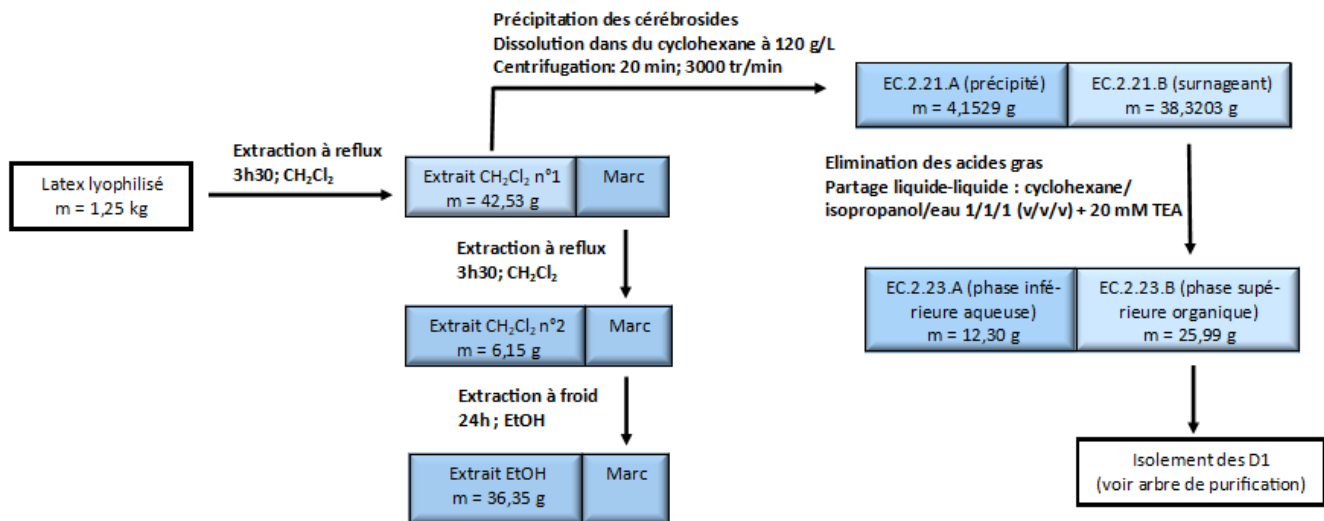


Figure 39: Obtention d'une fraction enrichie en daphanes monoestérifiés

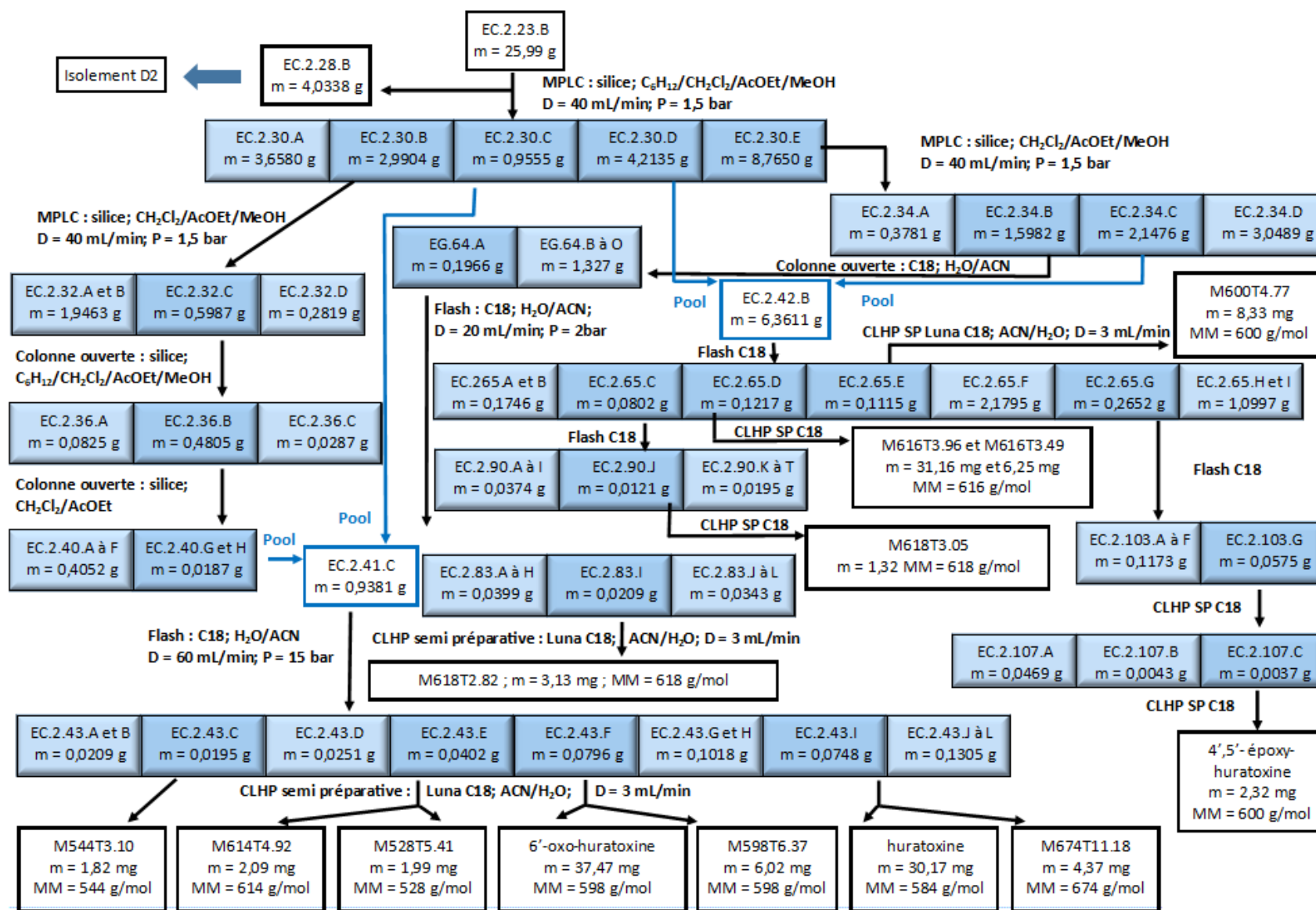


Figure 40: Arbre de purification des daphnanes monoestérifiés

## 1. Fractionnement de la fraction EC.2.23.B

La fraction EC.2.23.B (25,99 g) débarrassée des acides gras est divisée en quatre parties égales et une CLMP en phase normale est effectuée sur chaque partie. L'élution est réalisée successivement avec du cyclohexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. Après regroupement des fractions issues de ces CLMP, selon leurs profils CCM, nous avons obtenu 5 fractions : EC.2.30.A à EC.2.30.E de masse additionnée 20,5824 g soit un rendement de 79%.

Les fractions obtenues sont analysées par UHPLC-MS-APCI-CID-POS avec le gradient 1 (cf matériels et méthodes) (Figure 41).

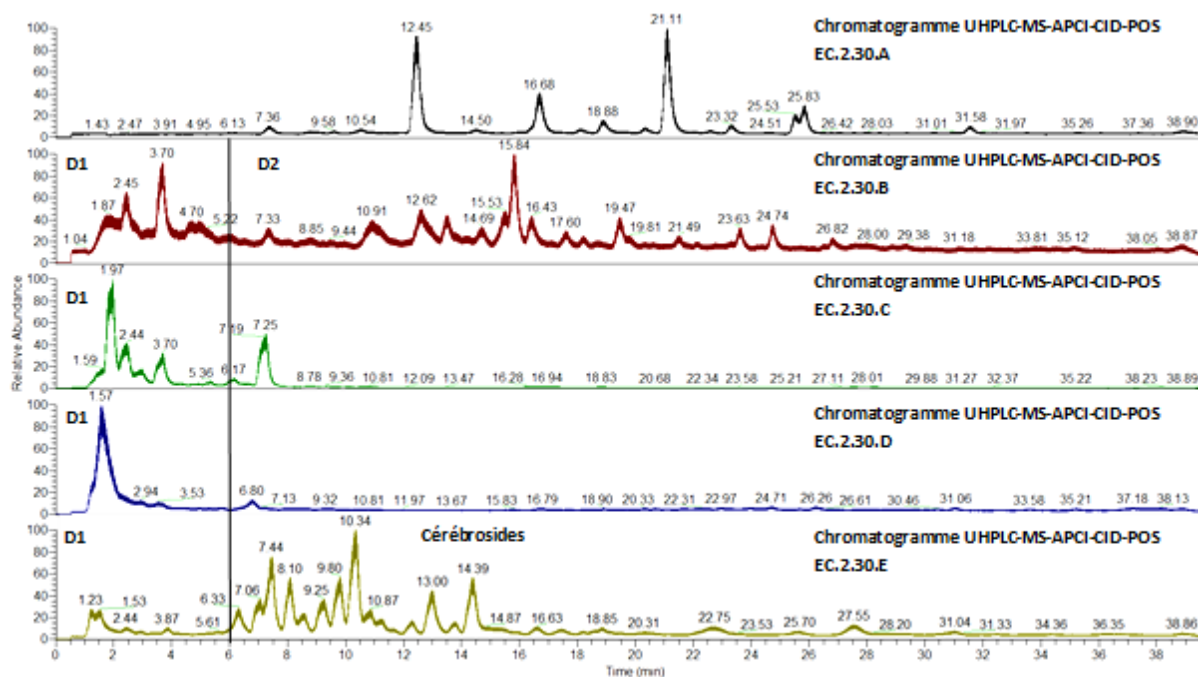
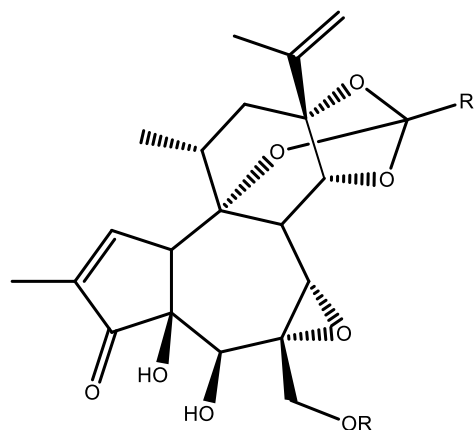


Figure 41: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fraction EC.2.30.A à EC.2.30.E

On remarque que les daphanes monoestérifiés sont répartis dans les fractions EC.2.30.B à EC.2.30.E. Les daphanes diestérifiés très apolaires (Figure 41, Figure 42) sont élués dès la fraction EC.2.30.A. Concernant la fraction EC.2.30.A, les pics majoritaires à 12,44 ; 16,66 et 21,12 minutes sont des molécules de  $m/z$  337,3469 ; 365,3783 et 393,4094 respectivement qui ne correspondent à aucune molécule d'intérêt.

Les fractions EC.2.30.C et EC.2.30.D sont composées presque exclusivement de daphanes monoestérifiés. Enfin, la fraction EC.2.30.E regroupe les daphanes monoestérifiés les plus

polaires et les cérébrosides qui présentent une polarité plus élevée. Cette répartition semble logique car une polarité croissante est observée entre les D2, les D1 et les cérébrosides (Figure 36, Figure 42).



R = chaîne alkyle

Figure 42 : Structure des daphnanes di estérifiés (D2)

Ce premier fractionnement a donc permis une séparation des trois classes de molécules majoritairement présentes dans l'extrait brut du latex de *H. crepitans*. Cependant les fractions EC.2.30.B et EC.2.30.E nécessitent un deuxième fractionnement afin d'isoler les D1 présents.

## 2. Isolement de la huratoxine et de la molécule M674T11.18

Comme illustré précédemment la fraction EC.2.30.B (2,9904 g) est composée d'un mélange de D1 et de D2. Celle-ci est donc traitée par CLMP en phase normale. L'élution est réalisée avec, successivement, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du méthanol afin d'obtenir 4 fractions (EC.2.32.A à EC.2.32.D) de masse cumulée 2,8269 g soit un rendement de 95%. Les fractions sont analysées par UHPLC-MS-APCI-CID-POS avec le gradient 1 (Figure 43). Les fractions EC.2.32.A et EC.2.32.B sont composées de D2. On retrouve les D1, en majorité, dans la fraction EC.2.32.C, avec la huratoxine majoritaire à un temps de rétention ( $t_r$ ) de 3,98 minutes. C'est donc cette fraction qui va être sélectionnée pour la suite des fractionnements. La fraction EC.2.32.D regroupe des D1 et des cérébrosides. Les cérébrosides n'étaient pas visibles dans la fraction de départ EC.2.30.B, ces molécules étant minoritaires.

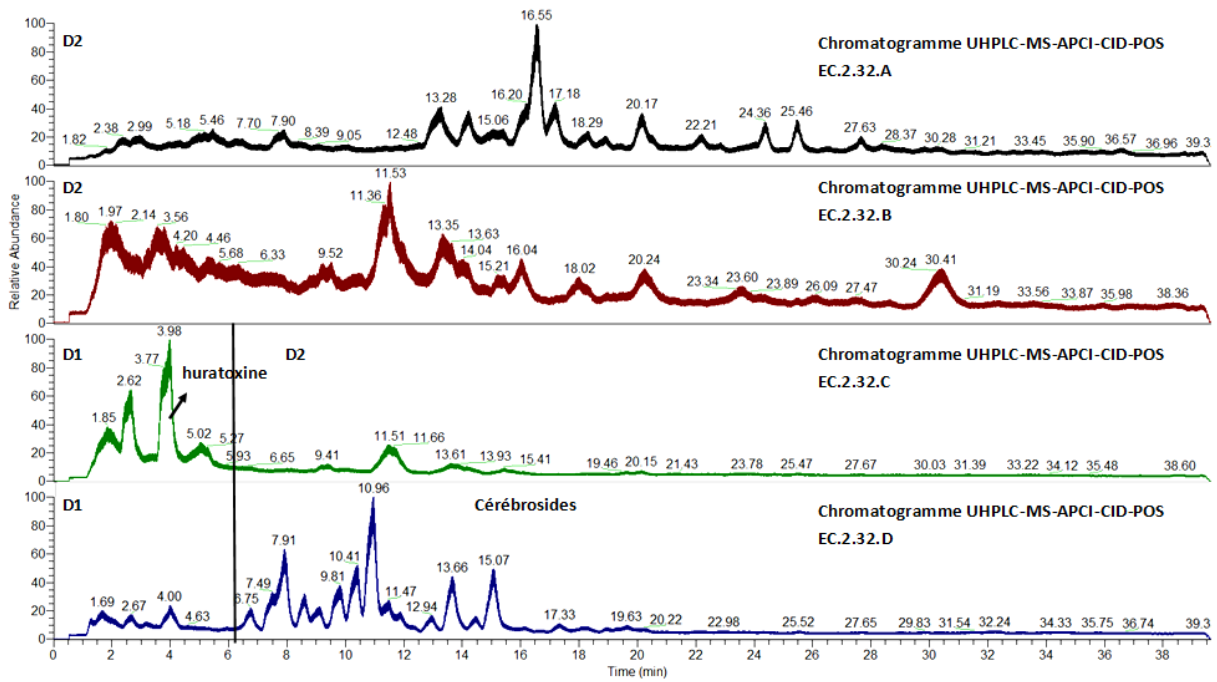


Figure 43 : Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.32.A à EC.2.32.D

La fraction EC.2.32.C (0,5987 g) est éluée sur colonne ouverte en phase normale avec du cyclohexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. La chromatographie sur colonne ouverte a été choisie car elle permet, dans ce cas, une séparation plus fine que la CLMP. Les fractions obtenues sont regroupées en fonction de leur profils CCM afin d'obtenir 3 fractions (EC.2.36.A à EC.2.36.C) de masse totale 0,5917 g soit un rendement de 99% (Figure 44).

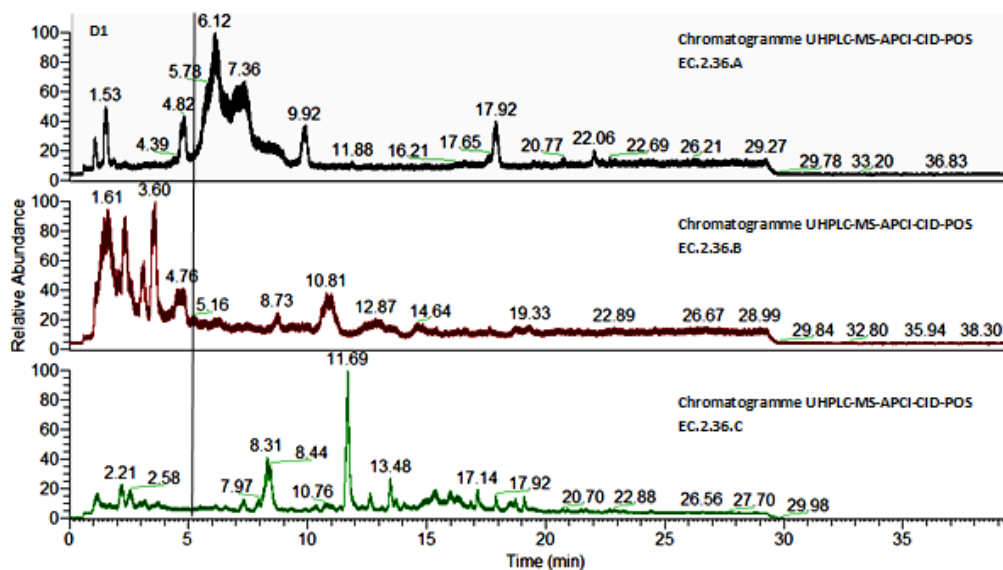


Figure 44: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.36.A à EC.2.36.C

Les D1 sont retrouvés dans la fraction EC.2.36.B (0,4805 g) (Figure 44) qui est éluée sur colonne ouverte en phase normale avec du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle afin d'obtenir huit fractions (EC.2.40.A à EC.2.40.H) de masse cumulée 0,4239 g soit un rendement de 88%.

Au vu des profils UHPLC-MS, les fractions EC.2.40.G, EC.2.40.H et EC.2.30.C sont regroupées pour former la fraction EC.2.41.C (Figure 45). Ces fractions sont injectées en UHPLC-MS avec le gradient 2 (cf Matériels et méthodes), plus polaire et donc plus adapté à la séparation des D1. Ce gradient sera utilisé à toutes les étapes de purification suivantes.

La fraction EC.2.41.C (0,9381 g) est séparée par chromatographie flash en phase inverse. Le gradient d'élution est réalisé sur 60 minutes avec une augmentation de 50 à 100% d'acétonitrile. Ainsi douze fractions (EC.2.43.A à EC.2.43.J) sont obtenues pour une masse totale de 0,4924 g soit un rendement de 52%.

La séparation par chromatographie flash a permis d'obtenir plusieurs fractions peu complexes qui seront ensuite traitées par CLHP semi préparative afin d'isoler des D1 purs. Il est intéressant de noter que les rendements de purification obtenus avec la chromatographie flash sont bien inférieurs à ceux obtenus avec les autres méthodes de séparation employées précédemment. Cela peut être dû à l'appareillage, en effet, l'échantillon est chargé dans un cartouche vide indépendante de la colonne contrairement aux autres techniques. De plus, le solvant de lavage de la colonne n'a pas été récupéré car, grâce au détecteur UV, nous pouvions visualiser l'élution des molécules d'intérêts et donc arrêter la collecte au moment opportun.

La huratoxine est retrouvée dans la fraction EC.2.43.I (0,0748 g). Celle-ci est donc purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse. A l'issue de cette séparation, deux molécules pures ont été isolées : la huratoxine (30,17 mg) et un D1 original de masse molaire 674 g/mol avec un temps de rétention de 11,18 minutes que l'on nommera M674T11.18 (4,37 mg) (Figure 45).

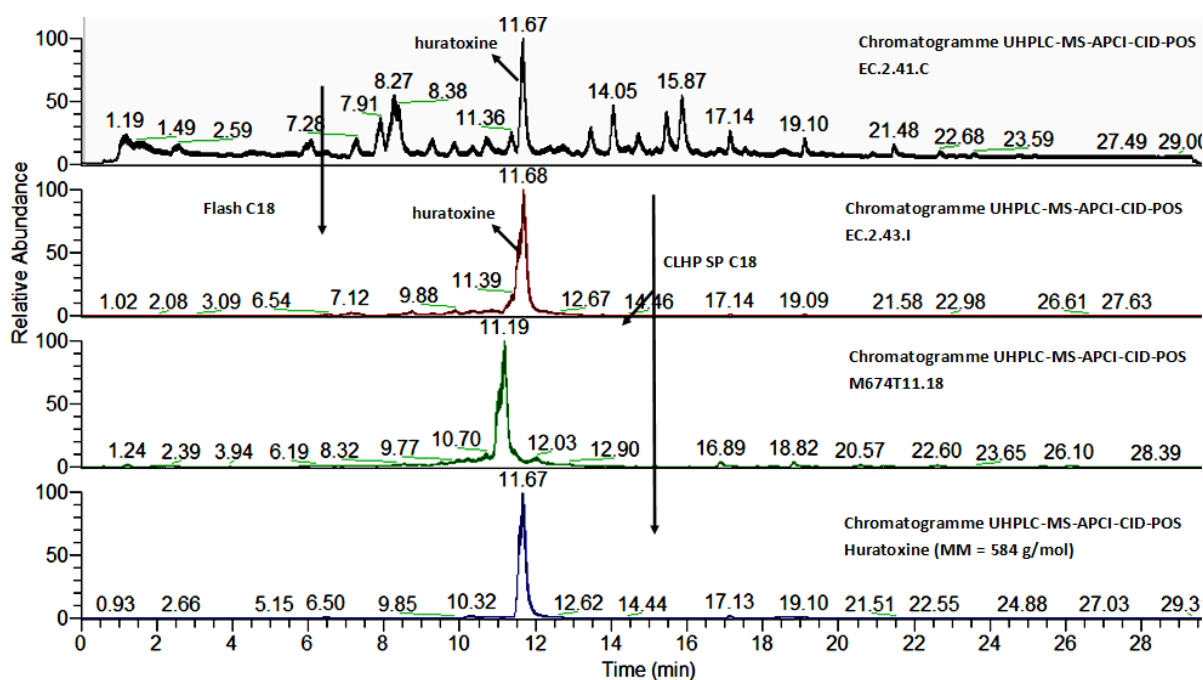


Figure 45: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction EC.2.41.C, EC.2.43. I, de la huratoxine et de la molécule M674T11.18

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la huratoxine est enregistré et comparé à celui de la littérature et aux données déjà collectées au laboratoire (118) ce qui permet de confirmer son identification. Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la huratoxine isolée pendant ces travaux est présenté en Annexe IV.

### 3. Isolement des molécules M544T3.10

La fraction EC.2.43.C (0,0195 g), issue du fractionnement par chromatographie flash de la fraction EC.2.41.C décrite précédemment est purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse. Cette séparation permet l'obtention de 1,82 mg d'un mélange de diastéréoisomères de D1 originaux de masse molaire 544 g/mol avec un temps de rétention de 3,10 minutes que l'on appellera M544T3.10 (Figure 46).



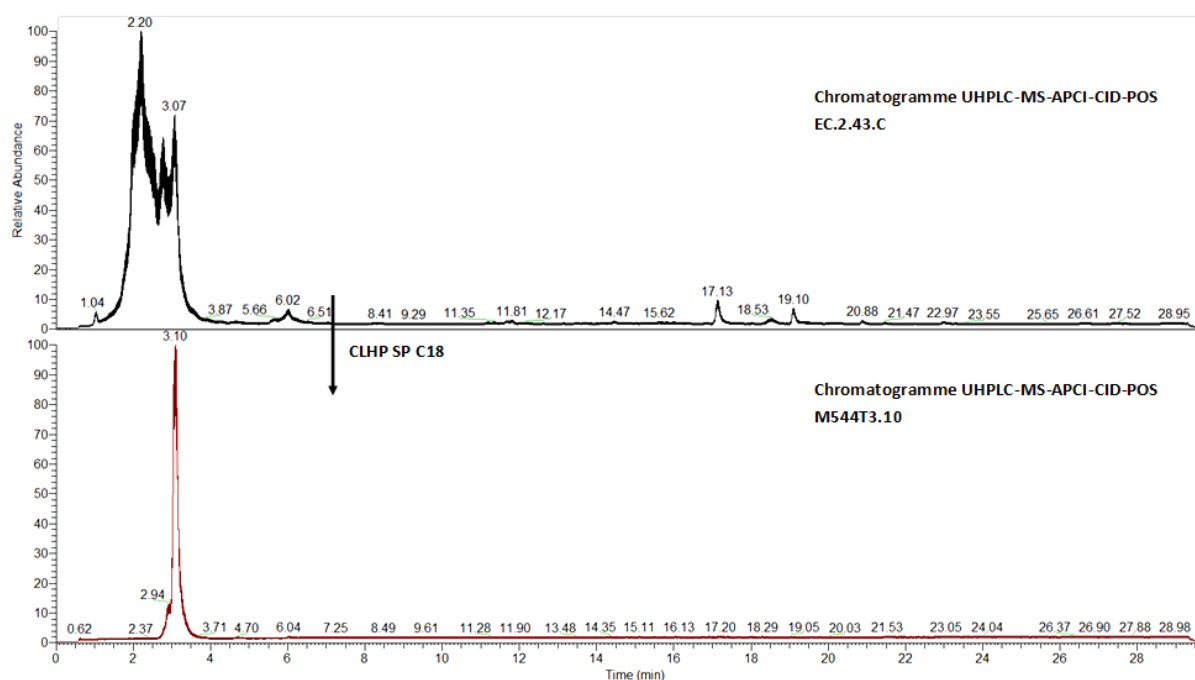


Figure 46: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction EC.2.43.C et de la molécule M544T3.10

#### 4. Isolement des molécules M614T4.92 et M528T5.41

La fraction EC.2.43.E (0,0402 g), issue du fractionnement par chromatographie Flash de la fraction EC.2.41.C décrite précédemment est purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse. Ainsi des D1 originaux sont isolés : 2,09 mg d'un mélange de D1 de masse molaire 614 g/mol avec un temps de rétention à 4,92 minutes que l'on appellera M614T4.92 et 1,99 mg d'un autre mélange de D1 de masse molaire 528 g/mol avec un temps de rétention égal à 5,41 minutes que l'on nommera M528T5.41 (Figure 47).

La structure de ces D1 est présentée dans la partie « analyse structurale ».

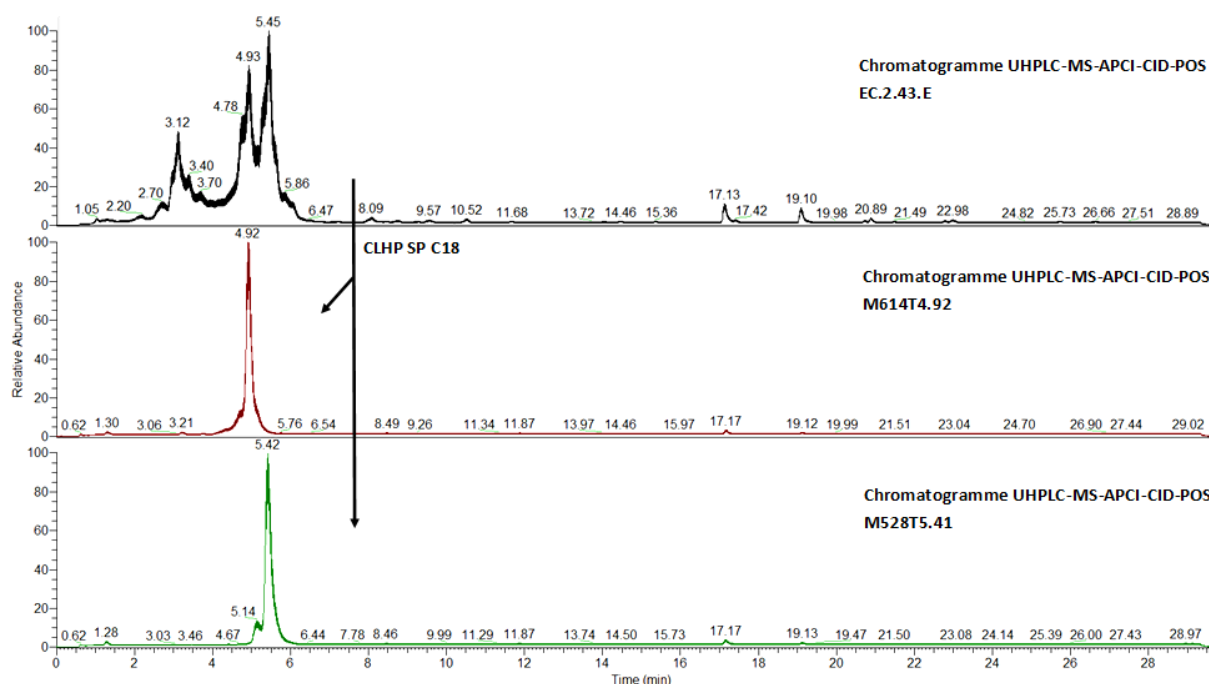


Figure 47: Chromatogrammes de la fraction EC.2.43.E et des molécules M614T4.92 et M528T5.41

## 5. Isolement de la 6'-oxo-huratoxine et de la molécule M598T6.37

La fraction EC.2.43.F (0,0796 g), issue du fractionnement par chromatographie flash de la fraction EC.2.41.C décrite précédemment est purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse afin d'isoler la 6'-oxo-huratoxine (37,47 mg) et la molécule M598T6.37 (6,02 mg) (Figure 48).

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la 6'-oxo-huratoxine sont comparés aux données collectées antérieurement au laboratoire ce qui a permis de confirmer son identification (118). Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la 6'-oxo-huratoxine isolée lors de ces travaux sont présentés en Annexe VI.

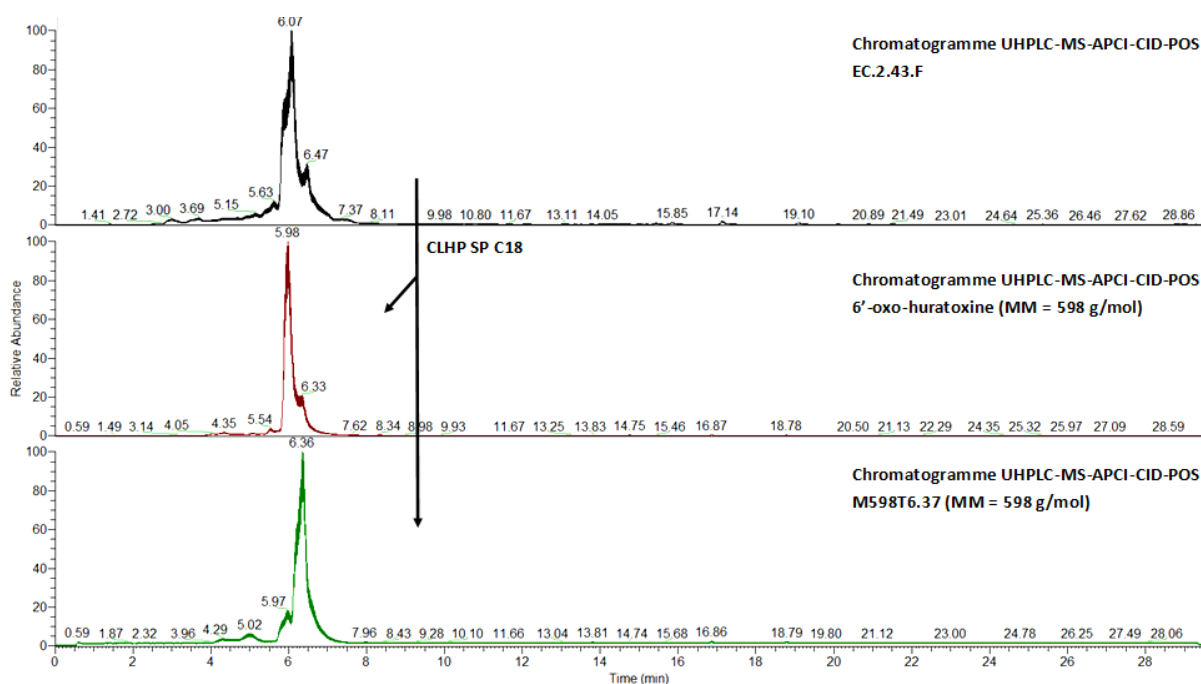


Figure 48: Chromatogrammes de la fraction EC.2.43.F, de la 6'-oxo-huratoxine et de la molécule M598T6.37

## 6. Isolement de la molécule M600T4.77

La fraction EC.2.30.E (8,7650 g), issue du fractionnement de l'extrait brut, contient un mélange de D1 et de cérébrosides (Figure 41). Afin d'isoler les D1 présents, une CLMP est réalisée. Les solvants d'élution utilisés sont le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol.

On remarque que le cyclohexane n'est pas utilisé, en effet, ce solvant très apolaire permet l'élution des D2, notamment, qui sont absents de cette fraction.

Suite à cette séparation chromatographique 4 fractions (EC.2.34.A à EC.2.34.D) de masse totale 7,1728 g sont obtenues, soit un rendement de 82 %.

En prenant en compte les profils UHPLC-APCI-POS-MS, les fractions EC.2.34.C et EC.2.30.D sont regroupées afin de former la fraction EC.2.42.B (6,3611 g).

Celle-ci est ensuite purifiée par chromatographie flash en phase inverse avec un gradient de solvants augmentant de 50 à 100% d'acétonitrile en 60 minutes. Ainsi 9 fractions (EC.2.65.A à EC.2.65.I) de masse additionnée 4,0324 g sont collectées, correspondant à un rendement de 63%.

La fraction EC.2.65.E (0,1115 g) est purifiée par CLHP en phase inverse pour donner 8,33 mg d'un D1 original possédant une masse molaire égale à 600 g/mol et un temps de rétention de 4,77 minutes que l'on appellera M600T4.77 (Figure 49).

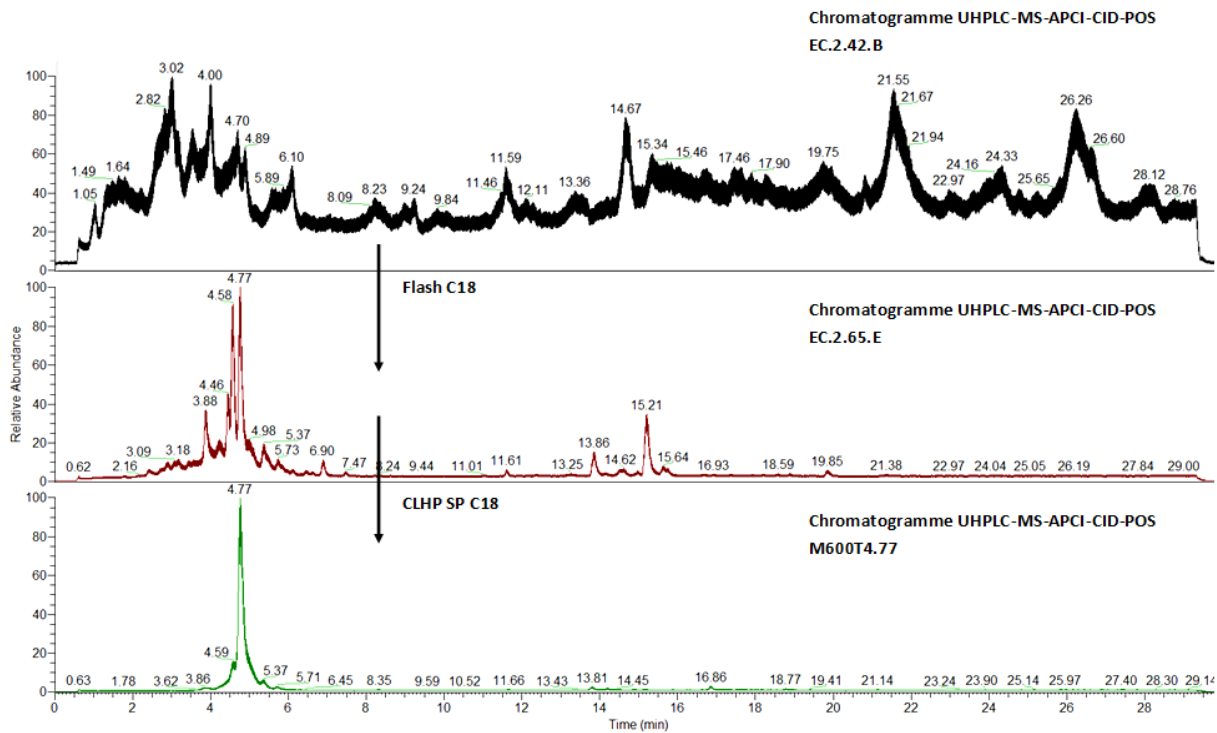


Figure 49: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.42.B, EC.2.65.E et de la molécule M600T4.77

## 7. Isolement des molécules M616T3.49 et M616T3.96

La fraction EC.2.65.D (0,1217 g), issue du fractionnement de la fraction EC.2.42.B décrite précédemment, est purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse. Cette séparation permet l'isolement de D1 originaux de masse molaire 616 g/mol et avec un temps de rétention respectif de 3,49 minutes (6,25 mg) et 3,96 minutes (31,16 mg) (Figure 50). Ces molécules seront appelées M616T3.49 et M616T3.96 pour la suite de ces travaux.

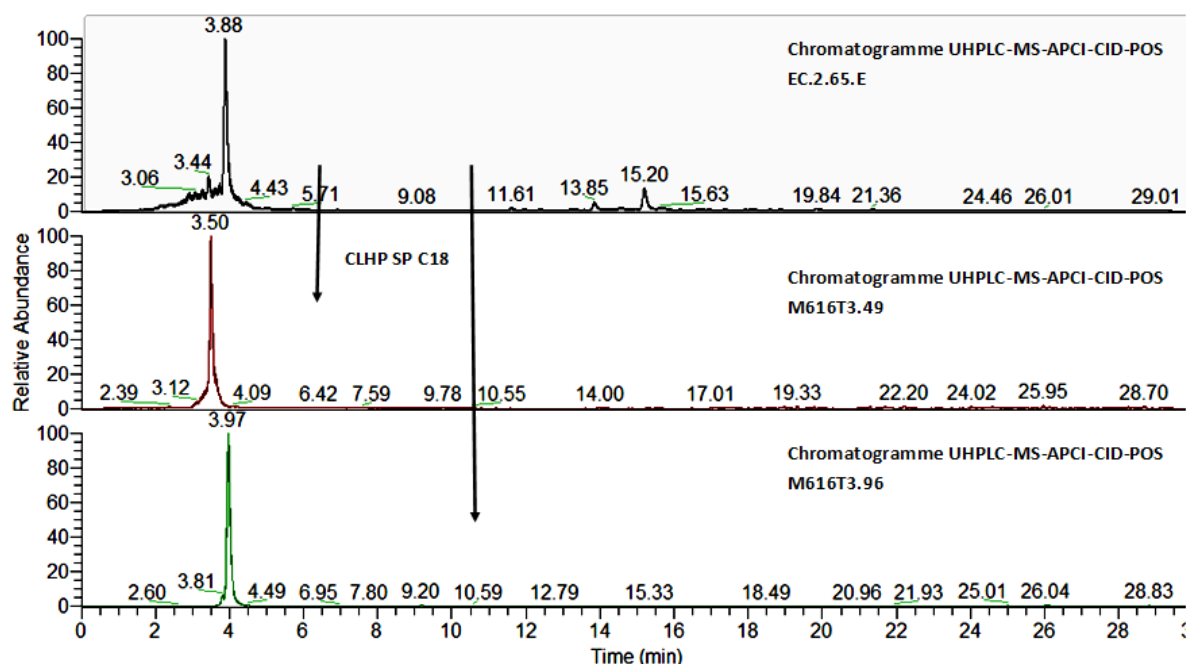


Figure 50: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction EC.2.65.D et des molécules M616T3.49 et M616T3.96

## 8. Isolement de la molécule M618T3.05

La fraction EC.2.65.C (0,0802 g), issue du fractionnement de la fraction EC.2.42.B décrit précédemment, est purifiée par chromatographie flash en phase inverse avec un gradient d'éluion allant de 30 à 70% d'acétonitrile en 60 minutes. Vingt fractions (EC.2.90.A à EC.2.90.T) de masse cumulée 0,0690 g sont collectées, soit un rendement de 86%.

La fraction EC.2.90.J est purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse afin d'obtenir un D1 original : 1,32 mg d'une molécule de masse molaire 618 g/mol avec un temps de rétention de 3,05 minutes que l'on nommera M618T3.05.

Les chromatogrammes UHPLC-MS des différentes étapes de purification sont présentés Figure 51.

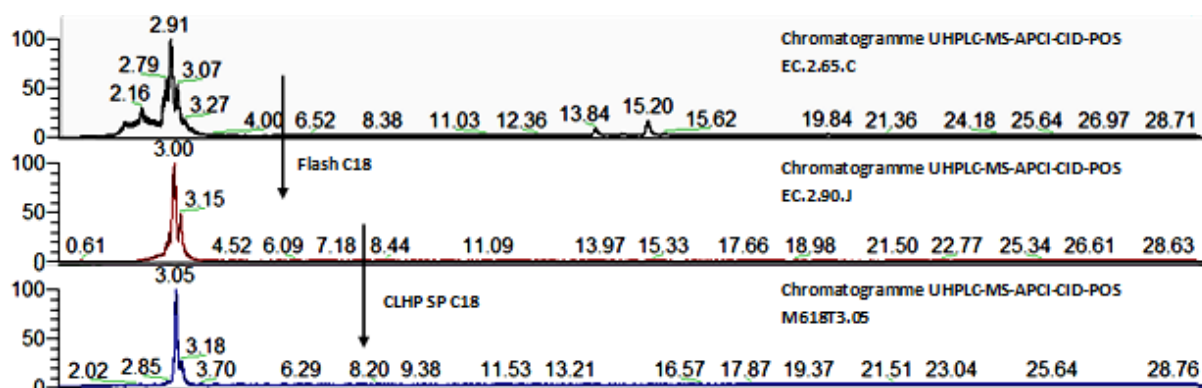


Figure 51: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.65.C, EC.2.90.J et de la molécule M618T3.05

## 9. Isolement de la 4',5'-époxy-huratoxine

La fraction EC.2.65.G (0,2652 g), obtenue suite au fractionnement de la fraction EC.2.42.B, est purifiée par chromatographie Flash en phase inverse avec un gradient d'élution allant de 40 à 80% d'acétonitrile en 60 minutes. Les fractions collectées (EC.2.103.A à EC.2.103.G) ont une masse additionnée de 0,1748 g soit un rendement de 66%.

La fraction EC.2.103.G (0,0575 g) est ensuite purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse afin d'obtenir trois fractions (EC.2.107.A à EC.2.107.C) de masse totale 0,0549 g équivalent à un rendement de 95%.

La fraction EC.2.107.C (0,0037 g) est traitée par CLHP semi préparative en phase inverse afin d'obtenir un D1: la 4',5'-époxyhuratoxine (2,32 mg) (Figure 52). La 4',5'-époxy-huratoxine a été identifié par comparaison de ses données spectrales avec celles collectées précédemment au laboratoire (118). Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  obtenus lors de ces travaux sont présentés en Annexe VIII.

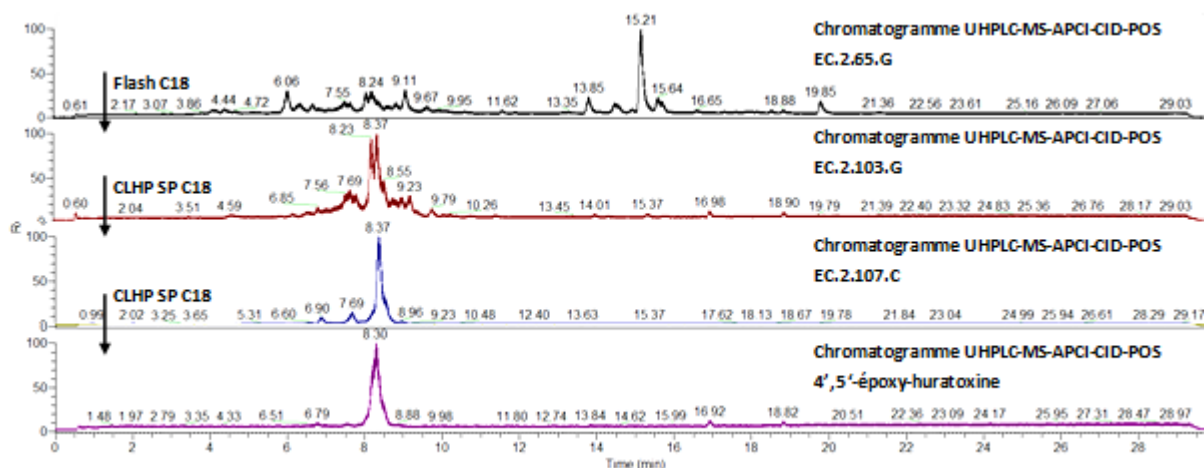


Figure 52: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.65.G, EC.2.103.G et EC.2.107.C et de la 4',5'-époxy-huratoxine

## 10. Isolement des molécules M618T2.82

La fraction EC.2.34.B (1,5982 g), obtenue suite au fractionnement de EC.2.30.E, est purifiée par chromatographie sur colonne ouverte en phase inverse avec de l'acétonitrile et de l'eau comme solvants d'élution. Suite à cette séparation, 15 fractions (EG.64.A à EG.64.O) de masse cumulée 1,5236 g sont collectées soit un rendement de 95%.

La fraction EG.64.A (0,1966 g) est ensuite fractionnée par chromatographie flash en phase inverse avec un gradient allant de 50 à 100% d'acétonitrile en 60 minutes. Douze fractions (EC.2.83.A à EC.2.83.L) sont collectées avec une masse totale de 0,1815 g équivalent à un rendement de 92%.

La fraction EC.2.83.I (0,0209 g) est traitée par CLHP semi préparative en phase inverse afin d'obtenir 3,13 mg d'un mélange de molécules possédant une masse molaire de 618 g/mol avec un temps de rétention de 2,82 minutes que l'on nommera M618T2.82 (Figure 53).

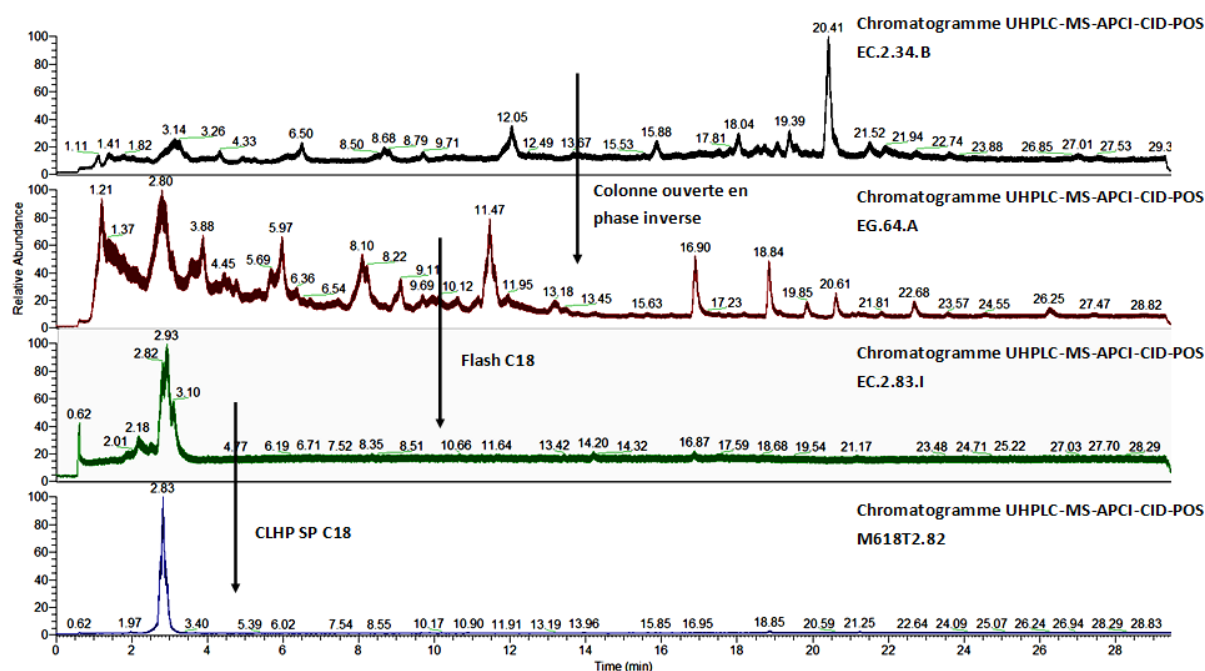


Figure 53: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS des fractions EC.2.34.B, EG.64.A et, EC.2.83.I et des molécules M618T2.82

## 11. Bilan des purifications

L'isolement des D1 a nécessité de nombreuses étapes de purifications. En effet, le latex de *H. crepitans* présente une grande complexité dans sa composition chimique. On peut voir sur le chromatogramme de l'extrait brut n°1 (Figure 34) plus d'une trentaine de pics représentant chacun plusieurs molécules co-éluées. Cet arbre est donc un réservoir intéressant de métabolites originaux et notamment de diterpènes de type daphnane. Cependant, la majorité des D1 sont des produits minoritaires de polarité proche et sont donc difficiles à isoler en quantité suffisante pour réaliser une analyse structurale.

*In fine*, ce travail a permis d'isoler 13 D1 parmi lesquels 10 n'ont jamais été décrits dans la littérature et 3 ont été décrits dans les travaux réalisés précédemment au laboratoire (huratoxine, 4',5'-époxy-huratoxine et 6'-oxo-huratoxine) (118).



## D. Analyse structurale des daphnanes monoestérifiés isolés

Les données structurales de tous les daphnanes monoestérifiés connus isolés lors de ce travail ont été identifiés et comparés avec celles obtenues au laboratoire antérieurement. Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ces molécules sont présentés en Annexe. Dans cette partie nous nous limiterons à la détermination structurale des D1 originaux.

Pour les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , les signaux du  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  ont été calibrés à 5,32 ppm pour le proton et 53,84 ppm pour le carbone et les signaux du  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 3,31 ppm pour le proton et 49,0 ppm pour le carbone.

### 1. Analyse structurale des molécules pures

#### a) *Analyse structurale de la molécule M600T4.77*

##### (1) Analyse par spectroscopie ultraviolet

Le spectre UV de la molécule M600T4.77 présente un maximum d'absorption à 234 nm, semblable à celui de la huratoxine (235 nm).

##### (2) Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire de la molécule M600T4.77 mesuré à 20°C dans du dichlorométhane à une concentration de 4,63 g/L est de  $[\alpha]_{\text{D}} = + 28,49$ .

##### (3) Analyse par spectrométrie de masse

Le spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M600T4.77 présente un ion moléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  601,3361 suggérant une formule brute de  $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_9$  pour la molécule neutre (Figure 54). Un daphnane possédant la même formule brute a déjà été isolé au laboratoire : il s'agit de la 4',5'-époxy-huratoxine (118). De plus, le spectre MS-MS de la

molécule M600T4.77 présente tous les fragments caractéristiques du noyau huratoxigénine (Figure 55).

Cette molécule semble donc être un isomère de la 4',5'-époxy-huratoxine.

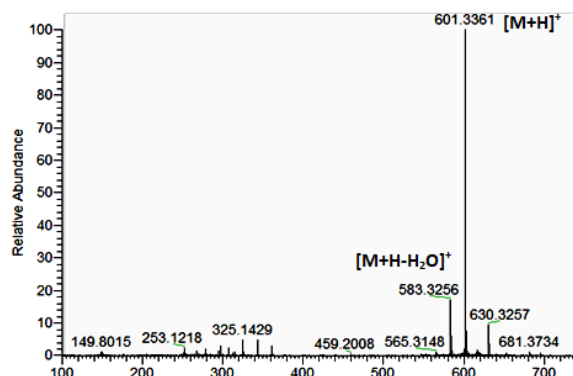


Figure 54 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M600T4.77

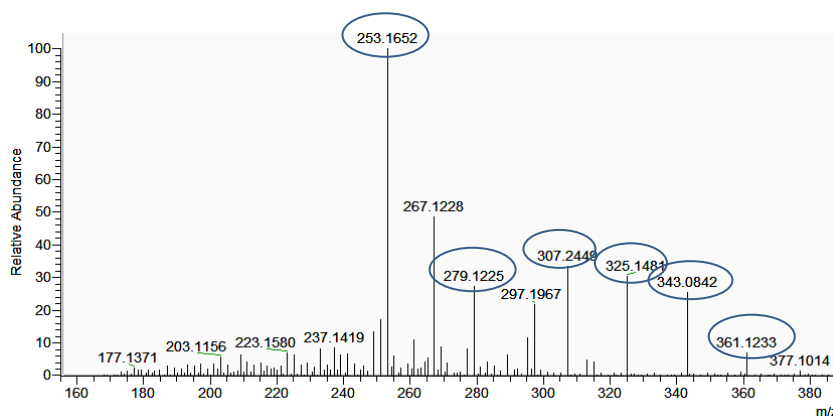


Figure 55: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M600T4.77

#### (4) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La présence d'un noyau huratoxigénine a été mise en évidence par la présence de tous les signaux caractéristiques de ce type de noyau sur les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la molécule M600T4.77 (Figure 57, Figure 58, Tableau 4); et notamment une cétone  $\alpha,\beta$ -conjuguée, les hydroxyles en C-4, C-5 et C-20 ainsi que l'époxyde en C-6/C-7. La démonstration de l'attribution de tous ces signaux grâce aux corrélations HSQC, HMBC et COSY va être réalisée

pour cette molécule. Pour les molécules suivantes, qui sont des analogues de celle-ci, seules les différences structurales au niveau de la chaîne latérale seront détaillées.

- Nous remarquons des déplacements chimiques caractéristiques d'une double liaison proche d'un groupement carbonyle et d'un groupement hydroxyle, correspondant à la structure du cycle A du noyau daphnane (Figure 56). En effet, le multiplet à  $\delta_H$  7,61 (H-1) montre une corrélation HSQC avec un carbone à  $\delta_C$  161,1 et une corrélation HMBC avec des carbones quaternaires à  $\delta_C$  72,7 ; 137,3 et 210,0. Nous pouvons donc positionner le C-1 (CH) à  $\delta_C$  161,1, le C-2 (C) à  $\delta_C$  137,3, le C-3 (C=O) à  $\delta_C$  210,0 et le C-4 (C-OH) à  $\delta_C$  72,7. H-1 ( $\delta_H$  7,61) montre aussi une corrélation HMBC avec un carbone à  $\delta_C$  10,1 qui représente le carbone du groupement méthyle en position 19.
- Les signaux à  $\delta_C$  61,1 et 64,3 signent la présence d'un groupement époxyde, celui-ci est proche d'un groupement CH<sub>2</sub>-OH et CH-OH caractéristiques de la structure du cycle B du noyau daphnane. En effet, le singulet à  $\delta_H$  4,25 (H-5), porté par un carbone à  $\delta_C$  72,1 (C-5 : C-OH), corrèle, sur le spectre HMBC, avec le C-4 et avec les deux carbones du groupement époxyde, à  $\delta_C$  61,1 et 64,3 pour les carbones C-6 et C-7, respectivement. C-6 ( $\delta_C$  61,1) corrèle en HMBC avec deux protons à  $\delta_H$  3,77 et 3,81 (H-20a et H-20b) portés par un carbone à  $\delta_C$  65,4 (CH<sub>2</sub>OH). De plus, les corrélations COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H entre H-1 ( $\delta_H$  7,61) et un multiplet à  $\delta_H$  3,77; et H-7 ( $\delta_H$  3,40) avec un doublet à  $\delta_H$  2,95 permettent d'assigner le H-10 ( $\delta_H$  3,77) et le H-8 ( $\delta_H$  2,95) avec leur carbone respectif à  $\delta_C$  48,5 (CH) et  $\delta_C$  37,1 (CH). Enfin, H-8 corrèle en HMBC avec un carbone quaternaire à  $\delta_C$  80,1 (C) correspondant au C-9.
- La présence de deux carbones éthyléniques à  $\delta_C$  146,7 (C) et  $\delta_C$  111,2 (CH<sub>2</sub>) et d'un signal à  $\delta_C$  19,2 (CH<sub>3</sub>) sont caractéristiques du groupement isoprényle présent sur le cycle C du noyau daphnane et marquant une différence importante avec les noyaux diterpéniques de type tigliane. Ces signaux ont pu être attribués aux C-15 (C), C-16 (CH<sub>2</sub>) et C-17 (CH<sub>3</sub>) avec leurs protons à  $\delta_H$  5,02 (H-16b),  $\delta_H$  4,91 (H-16a) et  $\delta_H$  1,78 (H<sub>3</sub>-17). En effet, un doublet à  $\delta_H$  1,65 (H-12a) corrèle en HMBC avec le C-15 et avec un carbone quaternaire supplémentaire à  $\delta_C$  85,0 (C-13). H-12a montre aussi une corrélation COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H avec un doublet dédoublé à  $\delta_H$  2,24 (H-12b) qui lui-même corrèle avec un multiplet à  $\delta_H$  2,49 (H-11). Les carbones 11 et 12 ont donc pu être associés aux signaux à  $\delta_C$  35,3 (CH) et  $\delta_C$  36,8 (CH<sub>2</sub>), respectivement.

Un doublet à  $\delta_H$  1,15, correspondant aux protons d'un groupement méthyle encore non attribué, corrèle avec H-11 permettant son identification (H<sub>3</sub>-18) et celle du carbone correspondant à  $\delta_C$  20,5 (C-18). Le dernier signal du noyau daphnane est attribué grâce à la corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  du H-8 avec un doublet à  $\delta_H$  4,44 que l'on peut identifier comme étant le H-14 porté car le C-14 (CH) à  $\delta_C$  82,3.

Ainsi tous les signaux caractéristiques du noyau diterpénique ont pu être attribués. La présence d'un carbone quaternaire à  $\delta_C$  116,4 est caractéristique d'une fonction orthoester. De plus, H-14 corrèle en HMBC avec ce signal. La molécule M600T4.77 est donc un daphnane orthoestérifié en C-9, C-13, C-14 dont la structure de la chaîne orthoester reste à être démontrée.

- Quatre carbones éthyléniques à  $\delta_C$  125,9 ; 134,0 ; 128,5 et 140,7 sont présents sur le spectre de RMN  $^{13}C$  de la molécule M600T4.77, elle présente donc deux insaturations sur sa chaîne latérale. Grâce aux corrélations 2D, nous sommes en mesure de placer ces doubles liaisons en 2',3' et en 4',5'. En effet, un doublet à  $\delta_H$  5,80 corrèle en HMBC avec le C-1' ce qui permet de le positionner en 2'. H-2' ( $\delta_H$  5,80) est porté par le carbone à  $\delta_C$  125,9 (C-2'). H-2' montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un doublet dédoublé à  $\delta_H$  6,71 qui lui-même montre une corrélation avec un doublet dédoublé à  $\delta_H$  6,25. Ainsi H-3' ( $\delta_H$  6,71) et H-4' ( $\delta_H$  6,25) ont pu être placés sur la chaîne ; ils sont portés par des carbones à  $\delta_C$  134,0 (C-3') et 128,5 (C-4') respectivement. H-4' ( $\delta_H$  6,25) montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un proton éthylénique à  $\delta_H$  5,89 placé en H-5' et porté par un carbone à  $\delta_C$  140,7 (C-5'). Si l'on observe les constantes de couplage des protons H-2', H-3', H-4' et H-5' de la molécule M600T4.77, on remarque une constante de couplage de 15,5 Hz entre H-2' et H-3', et de 15,3 Hz entre H-4' et H-5' (Tableau 4). Les deux insaturations sont donc en configuration *E*.
- Nous remarquons aussi la présence d'un signal à  $\delta_C$  72,6 correspondant à un carbone portant une fonction hydroxyle que l'on peut identifier comme le C-6' (CH-OH) grâce à la corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  du H-5' avec un quadruplet à  $\delta_H$  4,16 (H-6') porté par le carbone à  $\delta_C$  72,6 (C-6').
- Le reste de la chaîne latérale consiste en un enchainement (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub> : H-6' montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un signal à  $\delta_H$  1,52 que l'on identifie comme étant les H<sub>2</sub>-7' porté

par un carbone à  $\delta_C$  37,7 (C-7'). H<sub>2</sub>-7' corrèlent en HMBC avec le C-8' à  $\delta_C$  27,7 qui lui-même corrèle avec les H<sub>2</sub>-8' à  $\delta_H$  1,28. Ce singulet élargi à  $\delta_H$  1,28 intègre pour 10 protons supplémentaires et corrèle en HSQC avec un massif à  $\delta_C$  29,7-30,0 ; et deux carbones à  $\delta_C$  32,3 et 23,1. D'après la littérature nous pouvons attribuer les signaux compris entre  $\delta_C$  29,7-30,0 aux carbones C-9', C-10' et C-11', le signal à  $\delta_C$  32,3 au carbone C-12' et le signal à  $\delta_C$  23,1 au C-13' (118). Le signal correspondant au carbone d'un groupement méthyle encore non attribué à  $\delta_C$  14,3 corrèle en HSQC avec un multiplet à  $\delta_H$  0,88. C'est donc le groupement méthyle en fin de chaîne latérale en C-14' ( $\delta_C$  14,3).

Ainsi tous les signaux de la molécule M600T4.77 ont pu être attribué grâce aux corrélations HSQC, HMBC et COSY (Figure 56), celle-ci a pu être identifiée et nommée : 6'-hydroxy-huratoxine (Figure 56).

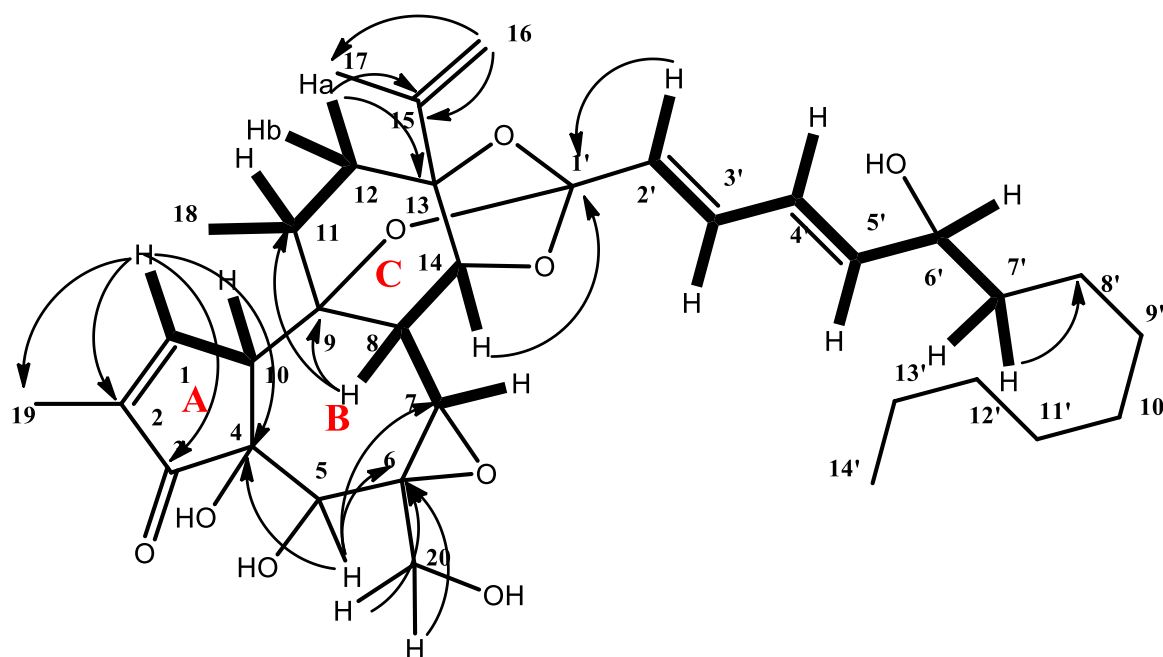


Figure 56: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M600T4.77

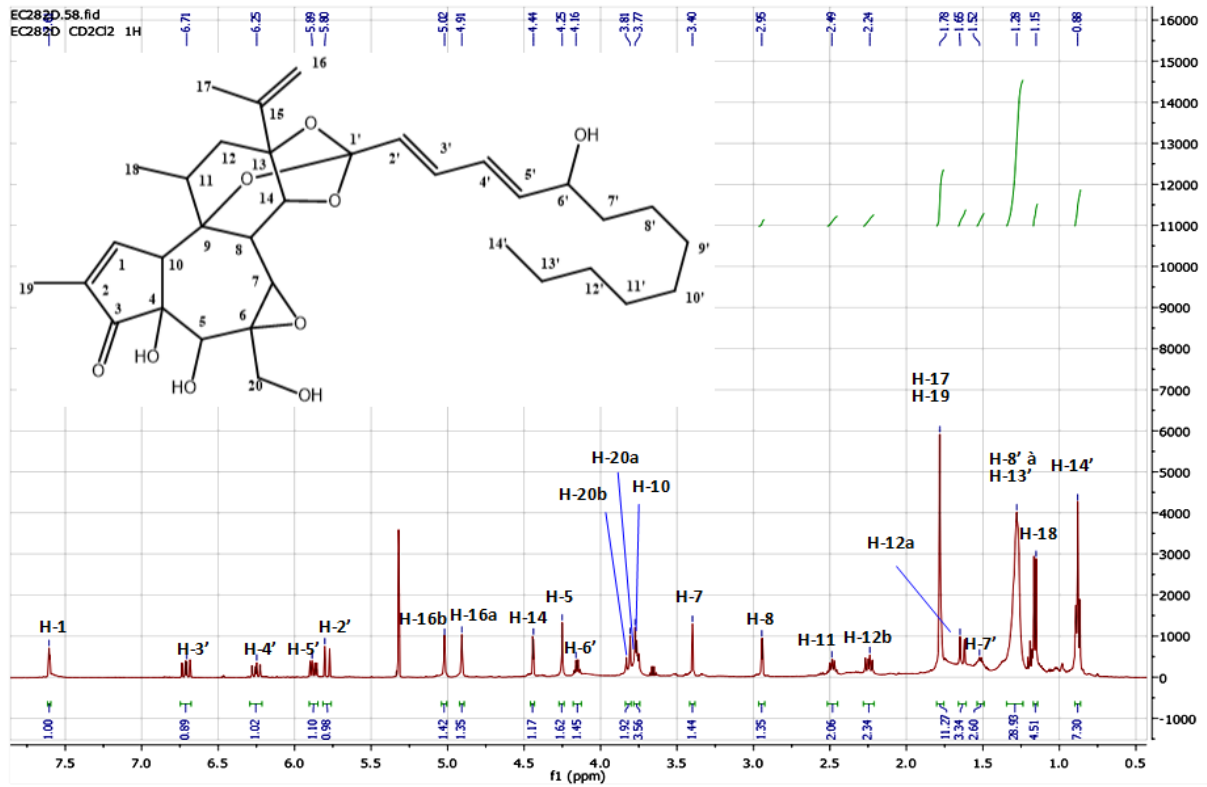


Figure 57: Spectre de RMN <sup>1</sup>H de la molécule M600T4.77 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

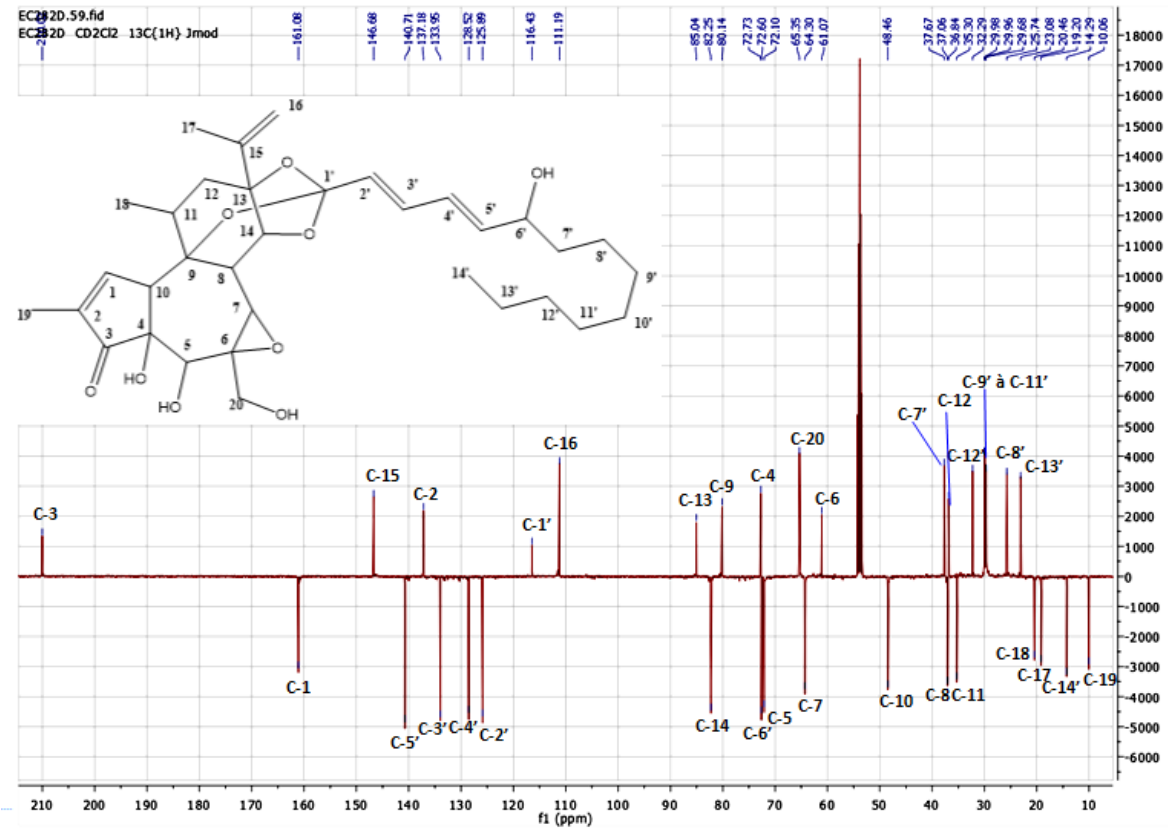


Figure 58: Spectre de RMN <sup>13</sup>C de la molécule M600T4.77 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 4: Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M600T4.77 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,61 ; m ; 1H	161,1
2	-	137,3
3	-	210,0
4	-	72,7
5	4,25 ; s ; 1H	72,1
6	-	61,1
7	3,40 ; s ; 1H	64,3
8	2,95 ; d (2,5) ; 1H	37,1
9	-	80,1
10	3,77 ; m ; 1H	48,5
11	2,49 ; m ; 1H	35,3
12a	1,65 ; d (14,4) ; 1H	36,8
12b	2,24 ; dd (14,4 ; 8,6) ; 1H	
13	-	85,0
14	4,44 ; d (2,5) ; 1H	82,3
15	-	146,7
16a	4,91 ; m ; 1H	111,2
16b	5,02 ; se ; 1H	
17	1,78 ; m ; 3H	19,2
18	1,15 ; d (7,1) ; 3H	20,5
19	1,78 ; m ; 3H	10,1
20a	3,77 ; m ; 1H	65,4
20b	3,81 ; d (12,1) ; 1H	
1'	-	116,4
2'	5,80 ; d (15,5) ; 1H	125,9
3'	6,71 ; dd (15,5 ; 10,8) ; 1H	134,0
4'	6,25 ; dd (15,3 ; 10,8) ; 1H	128,5
5'	5,89 ; dd (15,3 ; 6,5) ; 1H	140,7
6'	4,16 ; q (6,5) ; 1H	72,6
7'	1,52 ; m ; 2H	37,7
8'	1,28 ; se ; 8H	25,7
9'		29,7 – 30,0
10'		
11'		
12'	1,28 ; se ; 2H	32,3
13'	1,28 ; se ; 2H	23,1
14'	0,88 ; t (6,9) ; 3H	14,3

## (5) Configuration de la molécule M600T4.77

La détermination de la configuration des daphnanes isolés a été réalisée grâce à l'interprétation des corrélations NOESY, de la multiplicité des signaux des différents protons de la molécule et au calcul des déplacements chimiques de RMN. A notre connaissance, la configuration du noyau daphnane est conservée entre les différents daphnanes isolés de *Hura crepitans*. Les corrélations NOESY vont être détaillées pour cette molécule puis seule la configuration de la chaîne latérale sera discutée pour les composés suivants.

Les protons H-5 ( $\delta_H$  4,25) et H-10 ( $\delta_H$  3,77) corrélient seulement entre eux et avec aucun autre proton du noyau daphnane, ils sont en  $\alpha$  par rapport au plan du cycle B car leurs déplacements chimiques sont très similaires à ceux de la huratoxine dont la configuration absolue a déjà été décrite (119) (Figure 59). Des corrélations NOESY sont présentes entre H-11/H12b ( $\delta_H$  2,24), H-11/H-8 ( $\delta_H$  2,95), H-12b/H-8, H-12b/H-16b ( $\delta_H$  5,02), H-16a ( $\delta_H$  4,91) /H<sub>3</sub>-17 ( $\delta_H$  1,78), H-16b/H-14 ( $\delta_H$  4,44) et H-14/H-8. D'après la similitude entre les déplacements chimiques des protons de la molécule M600T4.77 et ceux de la huratoxine nous pouvons conclure que les protons H-8, H-11, H-12b, H-14 et le groupement isoprényle sont situés en  $\beta$  par rapport au plan du cycle C. De la même manière les déplacements chimiques et les corrélations NOESY entre les protons H-14/H-7 ( $\delta_H$  3,40) et H-7/H-20b ( $\delta_H$  3,81) nous indiquent que H-7 et le groupement méthylène oxygéné en C-20 sont situés en  $\beta$  par rapport au plan du cycle B. D'autres corrélations sont observables entre des protons proches les uns des autres tels que H-11 /H<sub>3</sub>-18 ( $\delta_H$  1,15), H<sub>3</sub>-18/H-1 ( $\delta_H$  7,61) et H-1/H<sub>3</sub>-19 ( $\delta_H$  1,78).



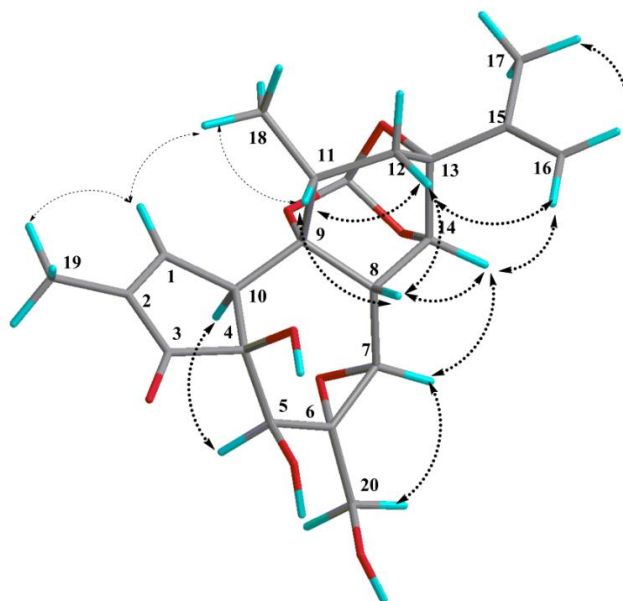


Figure 59: Principales corrélations NOESY du noyau daphnane de la molécule M600T4.77

L'observation du spectre de dichroïsme circulaire (Figure 61) nous confirme que la configuration absolue du noyau daphnane est semblable entre la molécule M600T4.77 et la huratoxine. En effet, on observe un effet Cotton négatif à 228 nm, et un effet Cotton positif à 245 nm comme pour la huratoxine qui présente un effet Cotton négatif à 230 nm et un effet Cotton positif à 249 nm (Figure 60) (118). Dans le cas de la molécule M600T4.77, on remarque un léger effet Cotton négatif supplémentaire à 255 nm.

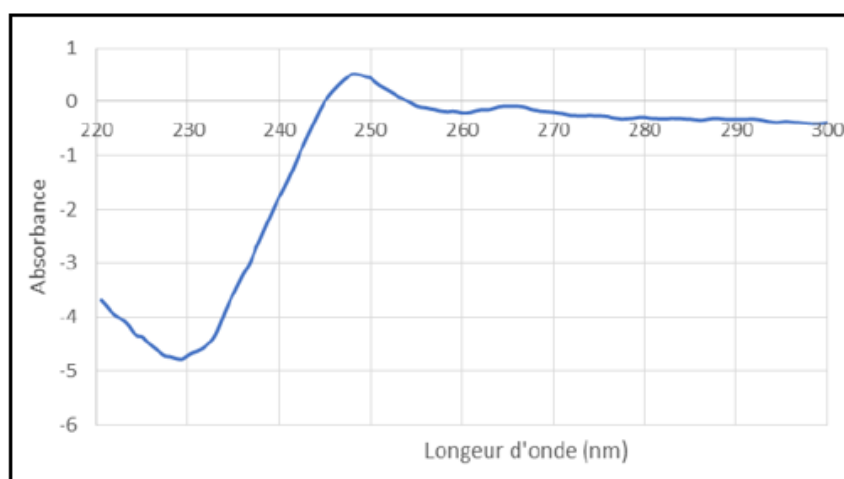


Figure 60: Spectre de dichroïsme circulaire de la huratoxine (118)

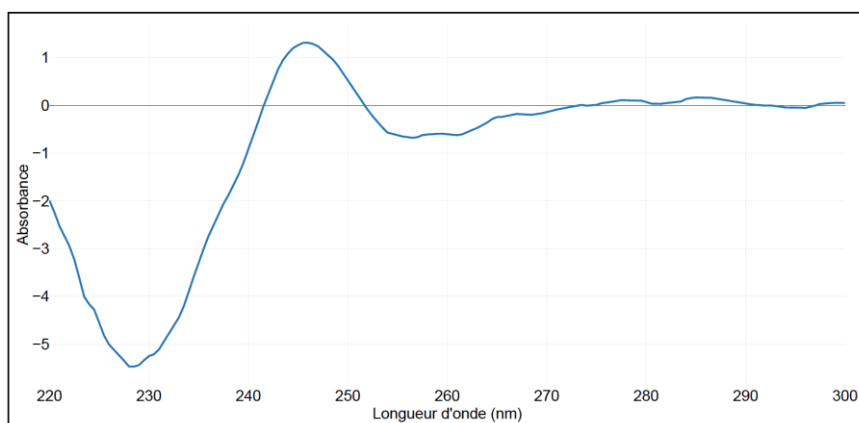


Figure 61: Spectre de dichroïsme circulaire de la molécule M600T4.77 dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Afin de déterminer la configuration relative du C-6', nous avons fait appel au Dr Jean-Luc Stigliani, du laboratoire de chimie de coordination de Toulouse (LCC, CNRS), qui a réalisé les calculs des déplacements chimiques de RMN des différentes configurations possibles (calculs de RMN par la méthode *des orbitales atomiques jauge invariante* (GIAO)). Les calculs DP4 donnent, pour la modélisation des spectres RMN  $^{13}\text{C}$ , une probabilité de 94,57 % et 5,43 % pour les dérivés 6'R et 6'S respectivement. Si on prend en compte les calculs concernant les spectres protons, cette probabilité est de 85,89 % pour la configuration 6'R et 14,11 % pour la configuration 6'S. La combinaison des 2 est en faveur de la configuration 6'R à 99,07 %. La molécule est nommée 6'R-hydroxy-huratoxine (Figure 62).

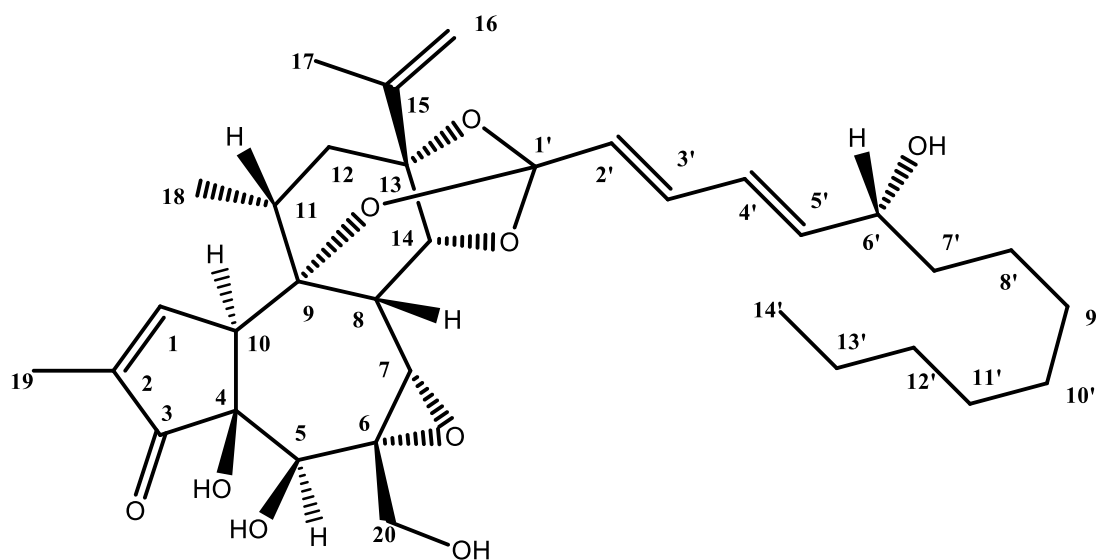


Figure 62: Configuration absolue de la molécule M600T4.77

## b) *Analyse structurale de la molécule M618T3.05*

### (1) *Analyse par spectroscopie ultraviolet*

Le spectre UV de la molécule M618T3.05 présente un maximum d'absorption à 225 nm inférieure à celui de la huratoxine de 10 nm.

### (2) *Pouvoir rotatoire*

Le pouvoir rotatoire de la molécule M618T3.05 mesuré à 20°C dans un mélange dichlorométhane/méthanol 50/50 (v/v) à une concentration de 0,73 g/L est de  $[\alpha]_D = + 26,71$ .

### (3) *Analyse par spectrométrie de masse*

La molécule M618T3.05 présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  619,3475 suggérant une formule brute de  $C_{34}H_{50}O_{10}$  pour la molécule neutre (Figure 63). On remarque une différence de 18 uma avec la molécule M600T4.77, due à l'addition de 2 H et d'un O qui peut correspondre à la réduction d'une double liaison et à un hydroxyle supplémentaire sur la chaîne latérale. De plus, si l'on observe le spectre MS-MS de cette molécule on remarque les ions diagnostiques du noyau huratoxigénine, mais aussi un ion intermédiaire à  $m/z$  463 et d'intensité relative proche de 50% (Figure 64). En prenant en compte la masse haute résolution et la fragmentation de la molécule M618T3.05, nous proposons qu'elle présente une chaîne latérale avec une insaturation en 2',3' et deux fonctions alcools en lieu et place de la double liaison 4'-5'. Cet enchainement permet la coupure de la chaîne latérale par un réarrangement de type Mc Lafferty afin d'obtenir l'ion de  $m/z$  463 (Figure 65).

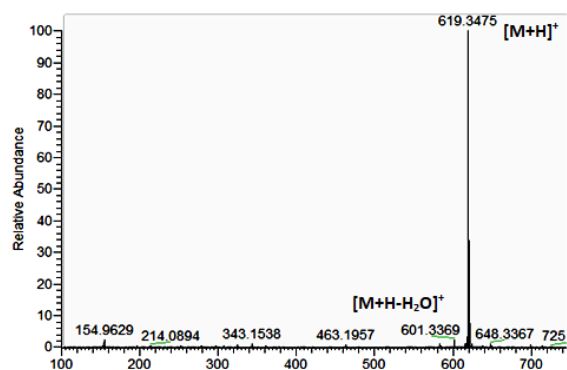


Figure 63 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M618T3.05

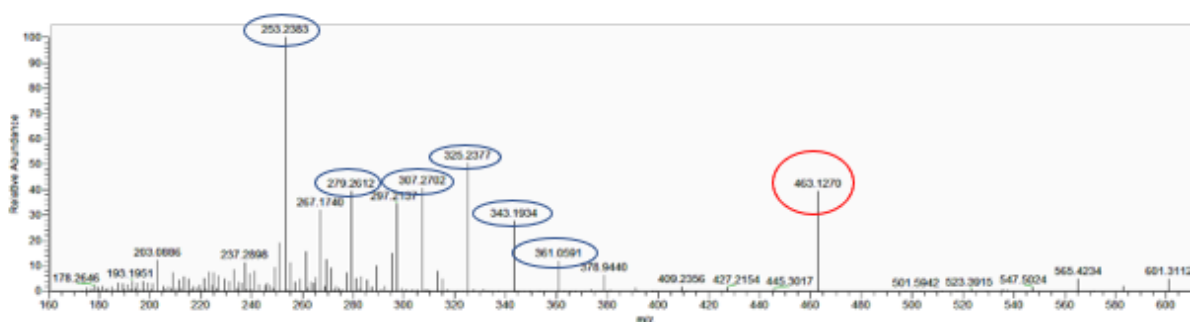


Figure 64: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M618T3.05

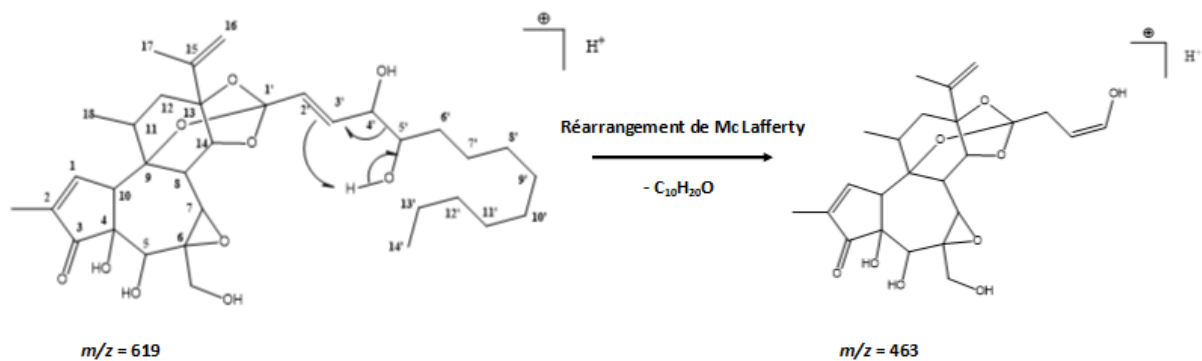


Figure 65: Proposition de fragmentation pour la molécule M618T3.05

#### (4) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

Nous avons proposé que la différence structurale entre la molécule M600T4.77 et la molécule M618T3.05 se situe sur la chaîne latérale. Cette proposition peut être vérifiée grâce aux spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figure 67, Figure 68, Tableau 5). En effet, tous les signaux

caractéristiques du noyau huratoxignénine sont présents sur les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la molécule M618T3.05 (Figure 66, Figure 67, Figure 68). De plus, H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  4,40) corrèle en HMBC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  116,6 identifié comme le C-1'(C), confirmant la position de la chaîne latérale orthoestérifiée.

- La présence de seulement deux signaux correspondant à des carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  125,9 et  $\delta_{\text{C}}$  135,3 confirme la présence d'une seule insaturation sur la chaîne latérale de la molécule M618T3.05. Celle-ci a pu être placée en 2', 3' grâce à la corrélation HMBC d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  5,84 avec le C-1'. H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  5,84) est porté par le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  125,9 (C-2'). De plus, H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  5,84) montre une corrélation COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec un doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}}$  6,29 (H-3') associé au carbone à  $\delta_{\text{C}}$  135,3 (C-3'). Les constantes de couplages des protons éthyléniques H-2' et H-3' sont égales à 15,7 Hz, la double liaison possède donc une configuration *E*.
- Des signaux à  $\delta_{\text{C}}$  75,0 et  $\delta_{\text{C}}$  74,8 sont caractéristiques de deux groupements CH-OH. H-3' corrèle avec un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  4,00 (H-4') qui lui-même montre une corrélation COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  3,50 (H-5') permettant leur attribution ainsi que celle de leurs carbones respectifs à  $\delta_{\text{C}}$  75,0 (C-4') et  $\delta_{\text{C}}$  74,8 (C-5').

Cette molécule est donc identifiée comme étant la 4',5'-dihydroxy-huratoxine (Figure 66), confirmant notre hypothèse de départ.

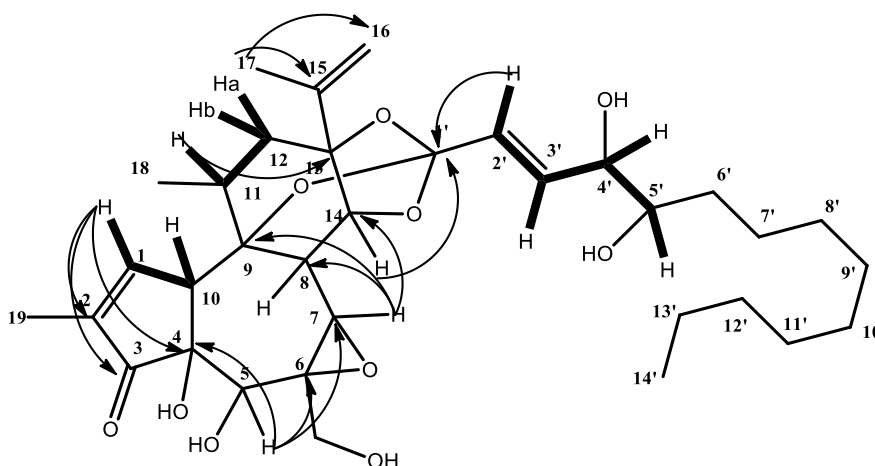


Figure 66: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M618T3,05

Cependant, l'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  révèle la présence d'une impureté. Par intégration des signaux des protons de la 4',5'-dihydroxy-huratoxine et de l'impureté, nous pouvons estimer une pureté de 77%. Il semblerait que l'impureté présente soit un diastéréoisomère de la 4',5'-dihydroxy-huratoxine car les déplacements chimiques sont très proches de ceux de la molécule majoritaire.

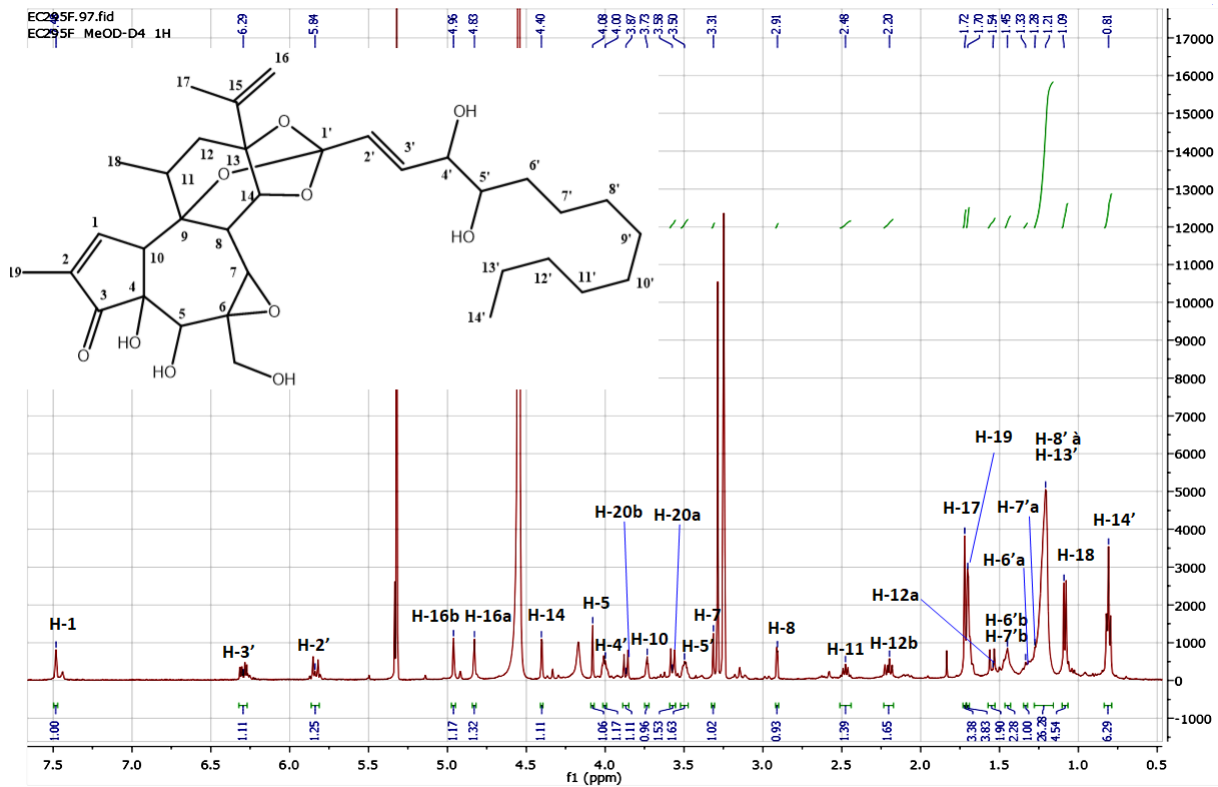


Figure 67: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la molécule M618T3,05 dans un mélange de  $\text{CD}_2\text{Cl}_2 / \text{CD}_3\text{OD}$

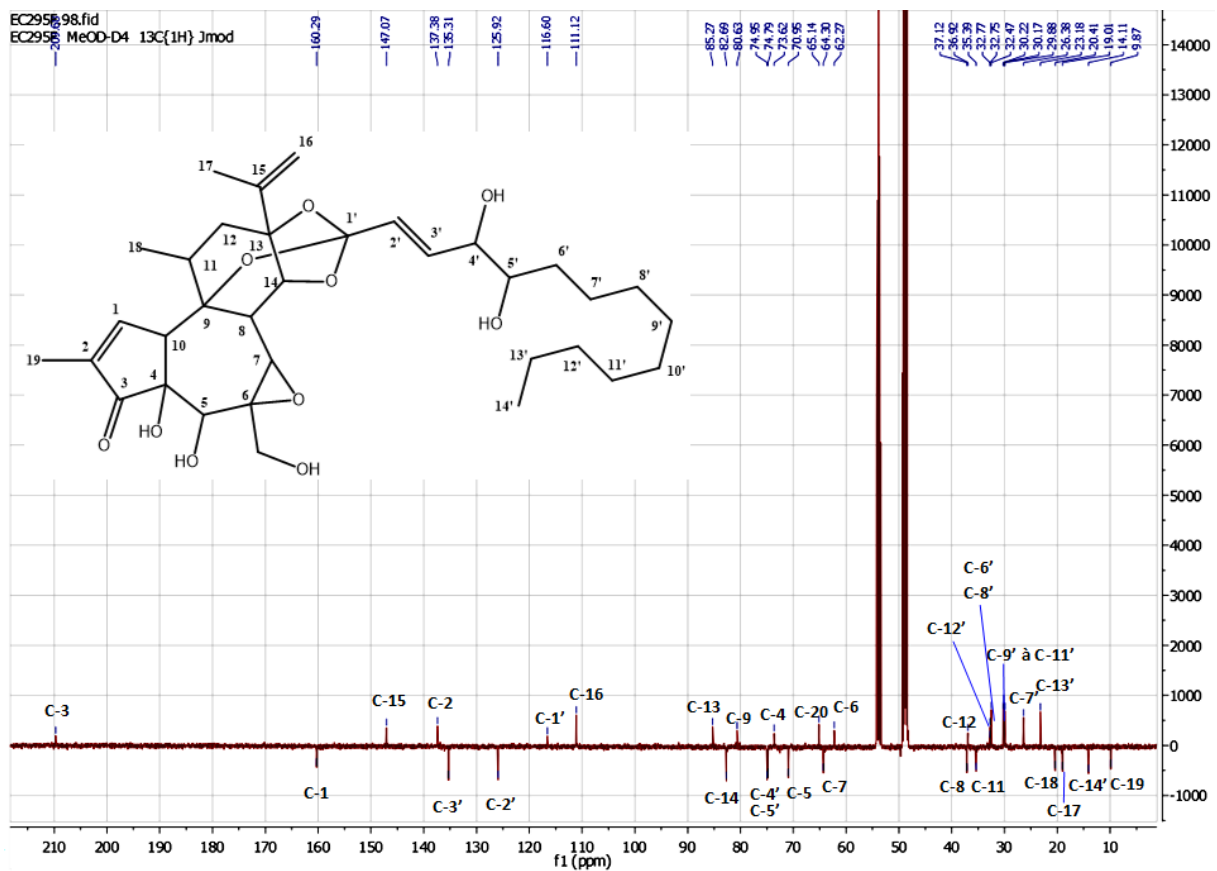


Figure 68: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  de la molécule M618T3,05 dans un mélange de  $\text{CD}_2\text{Cl}_2 / \text{CD}_3\text{OD}$

Tableau 5: Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M618T3.05 dans un mélange de CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CD<sub>3</sub>OD

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,48 ; s ; 1H	160,3
2	-	137,4
3	-	209,7
4	-	73,6
5	4,08 ; s ; 1H	71,0
6	-	62,3
7	3,31 ; s ; 1H	64,3
8	2,91 ; d (2,4) ; 1H	37,1
9	-	80,6
10	3,73 ; m ; 1H	48,8
11	2,48 ; m ; 1H	35,4
12a	1,54 ; d (14,4) ; 1H	36,9
12b	2,20 ; dd (14,4 ; 8,6) ; 1H	
13	-	85,3
14	4,40 ; d (2,3) ; 1H	82,7
15	-	147,1
16a	4,83 ; s ; 1H	111,1
16b	4,96 ; s ; 1H	
17	1,72 ; se ; 3H	19,0
18	1,09 ; d (7,0) ; 3H	20,4
19	1,70 ; se ; 3H	9,90
20a	3,58 ; d (12,4) ; 1H	65,1
20b	3,87 ; d (12,4) ; 1H	
1'	-	116,6
2'	5,84 ; d (15,7) ; 1H	125,9
3'	6,29 ; dd (15,7 ; 6,0) ; 1H	135,3
4'	4,00 ; m ; 1H	75,0
5'	3,50 ; m ; 1H	74,8
6'a	1,33 ; m ; 1H	32,8
6'b	1,45 ; m ; 1H	
7'a	1,26 ; m ; 1H	26,4
7'b	1,45 ; m ; 1H	
8'	1,21 ; se ; 2H	32,8
9'	1,21 ; se ; 6H	29,9 – 30,2
10'		
11'		
12'	1,21 ; se ; 2H	32,5
13'	1,21 ; se ; 2H	23,2
14'	0,81 ; t (6,8) ; 3H	14,1



### (5) Configuration relative de la molécule M618T3.05

D'après les différentes corrélations NOESY, la configuration du noyau daphnane de la 4',5'-dihydroxy-huratoxine est identique à celle de la molécule précédente et de la huratoxine (Figure 59). L'observation du spectre de dichroïsme circulaire (Figure 69) montre un effet Cotton négatif à 255 nm. Ce décalage par rapport à la huratoxine peut être dû à la perte de la conjugaison sur la chaîne latérale. Cependant, on observe un effet Cotton positif supplémentaire à 225 nm pour la 4',5'-dihydroxy-huratoxine, il est donc difficile de conclure quant à la configuration absolue de la molécule M618T3.05.

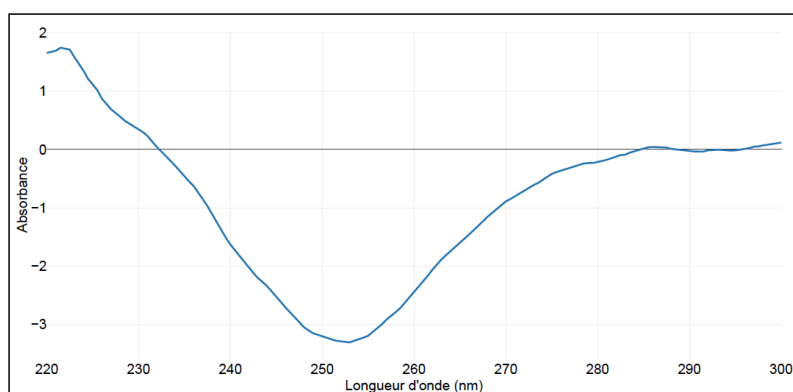


Figure 69: Spectre de dichroïsme circulaire de la molécule M618T3.05 dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$

Concernant la configuration de la chaîne latérale, les calculs de modélisation des déplacements chimiques de RMN de la molécule M618T3.05 (Figure 70), nous ont permis de déterminer la configuration relative des carbones 4' et 5' qui possèdent tous deux une configuration S. En effet, les calculs DP4 donnent, pour la modélisation des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  une probabilité de 77,01 % ; 0 % ; 1,35 % et 4,42 % pour les dérivés 4'S-5'S ; 4'S-5'R ; 4'R-5'R et 4'R-5'S respectivement. Lorsqu'on considère les calculs sur les spectres protons, cette probabilité est de 94,22 % ; 0,01 % ; 22,97 % et 0 % pour dérivés 4'S-5'S ; 4'S-5'R ; 4'R-5'R et 4'R-5'S respectivement. La combinaison des 2 est en faveur de la configuration 4S-5S à 99,57 %. La molécule est nommée 4'S\*, 5'S\*-dihydroxy-huratoxine (Figure 71).

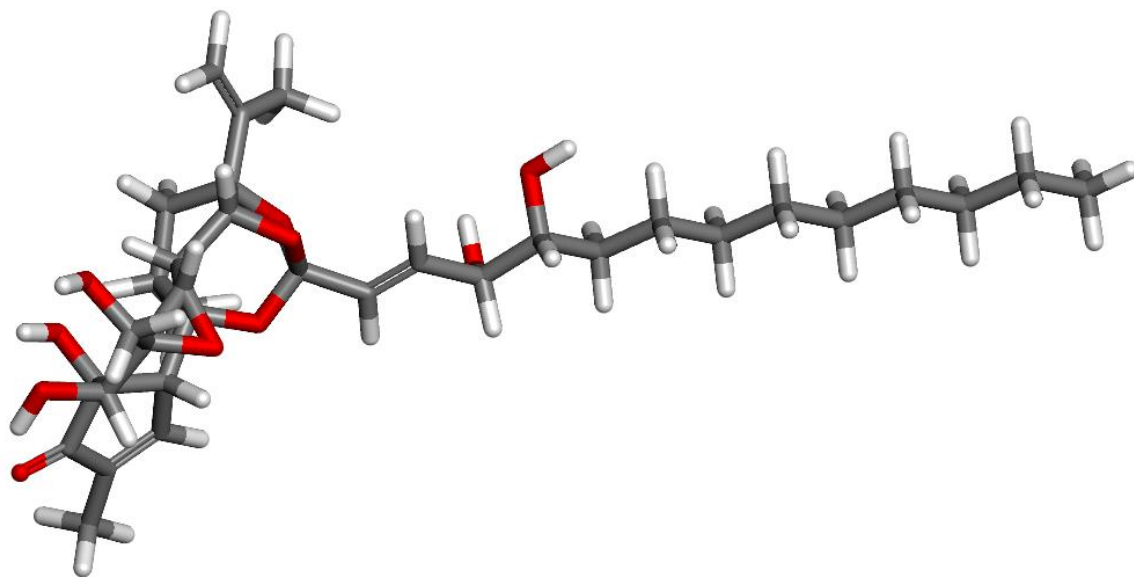


Figure 70: Modèle 3D de la molécule M618T3.05

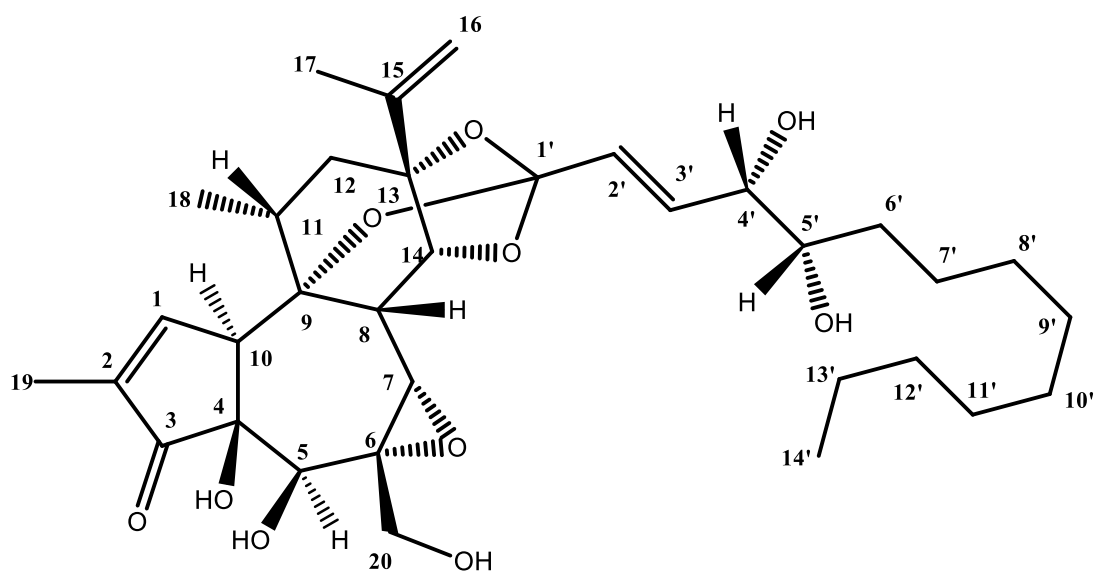


Figure 71: Configuration relative de la molécule M618T3.05

### c) Analyse structurale de la molécule M598T6.37

#### (1) Analyse par spectroscopie ultraviolet

Le spectre UV de la molécule M598T6.37 présente un maximum d'absorption à 259 nm similaire à celui de la 6'-oxo-huratoxine (260 nm) déjà isolée au laboratoire (118).

#### (2) Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire de la molécule M598T6.37 mesuré à 20°C dans du dichlorométhane à une concentration de 3,34 g/L est de  $[\alpha]_D = +30,12$ .

#### (3) Analyse par spectrométrie de masse

Le spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M598T6.37 présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  599,3205 suggérant une formule brute de  $C_{34}H_{46}O_9$  pour la molécule neutre (Figure 72), correspondant à celle d'un daphnane déjà isolé, la 6'-oxo-huratoxine. De plus, son spectre MS-MS présente tous les fragments caractéristiques du noyau huratoxigénine (Figure 73). Cette molécule semble donc être un isomère de la 6'-oxo-huratoxine.

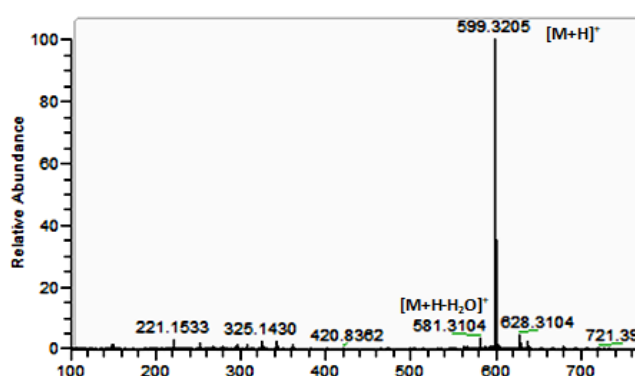


Figure 72 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M598T5.41

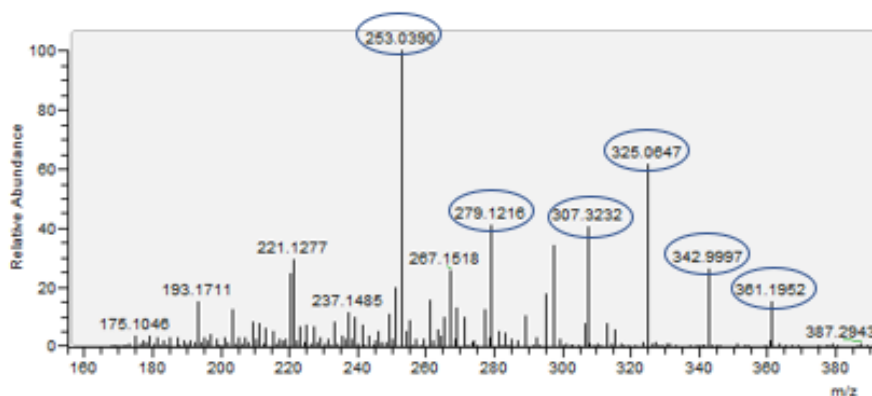


Figure 73: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M598T5.41

#### (4) Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Cette molécule étant un analogue de la molécule M600T4.77 seules les différences structurales situées sur la chaîne latérale seront détaillées. Les autres déplacements chimiques et corrélations HSQC, HMBC et COSY sont détaillées Figure 74, Figure 75, Figure 76 et Tableau 6.

- Le spectre  $^{13}\text{C}$  de la molécule M598T6.37 présente un signal à  $\delta_{\text{C}}$  115,6 (C-1') qui confirme la présence d'une chaîne latérale orthoestérifiée, et, la corrélation HMBC du H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  4,46) avec ce signal confirme sa position.
- Nous remarquons la présence de quatre carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  134,6 ; 130,7 ; 139,7 et 128,0 que l'on peut placer en positions 2', 3', 4' et 5' respectivement. En effet, un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  6,10 (H-2') corrèle en HMBC avec le C-1' et montre une corrélation COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec un doublet de doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}}$  7,86 (H-3'). H-3' montre une corrélation COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec un doublet de doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}}$  6,43 (H-4') qui lui-même montre une corrélation COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  6,18 (H-5'). Si l'on observe les constantes de couplages  $J_{2',3'} = 15,6$  Hz et  $J_{4',5'} = 11,4$  Hz on peut déduire que l'insaturation en 2',3' possède une configuration *E* et celle en 4',5' une configuration *Z*.

- De plus, un signal à  $\delta_c$  201,6 (C-6') signe la présence d'une fonction cétone. H-5' et H-4' montrent une corrélation HMBC ce signal ce qui permet de lui attribuer la position 6'.

MT598T6,37 est donc identifié comme étant la 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine (Figure 74).

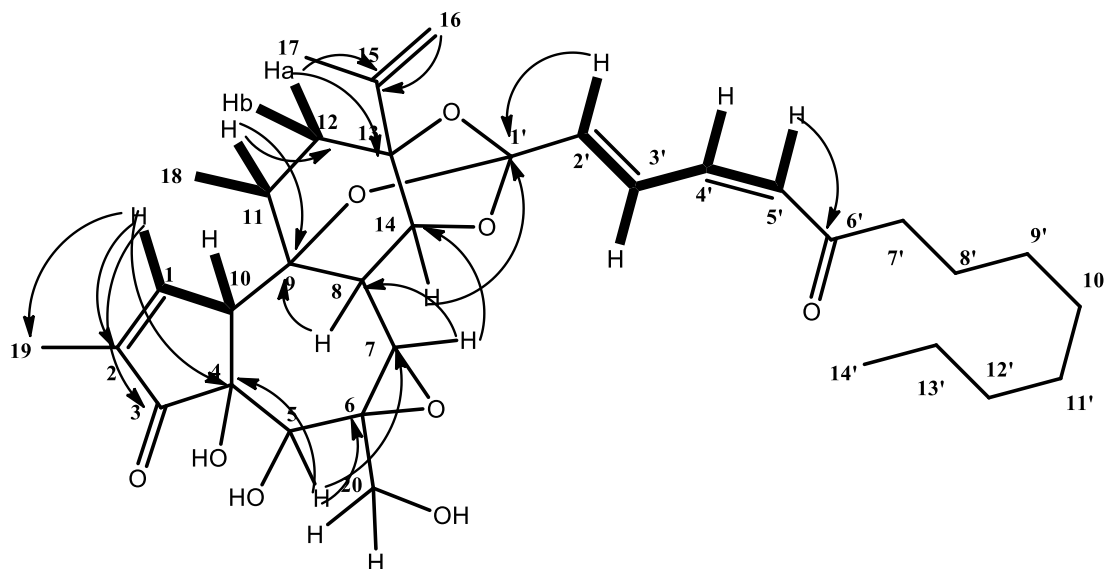


Figure 74: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M598T6,37

En observant les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine on remarque la présence de signaux faibles à  $\delta_{\text{H}}$  6,82 et 7,15 ainsi qu'entre  $\delta_{\text{C}}$  132 et 133. On suppose que cette fraction présente un mélange d'isomères *E/E* et *E/Z* avec la 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine majoritaire à 79%, d'après l'intégration des signaux sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$ .

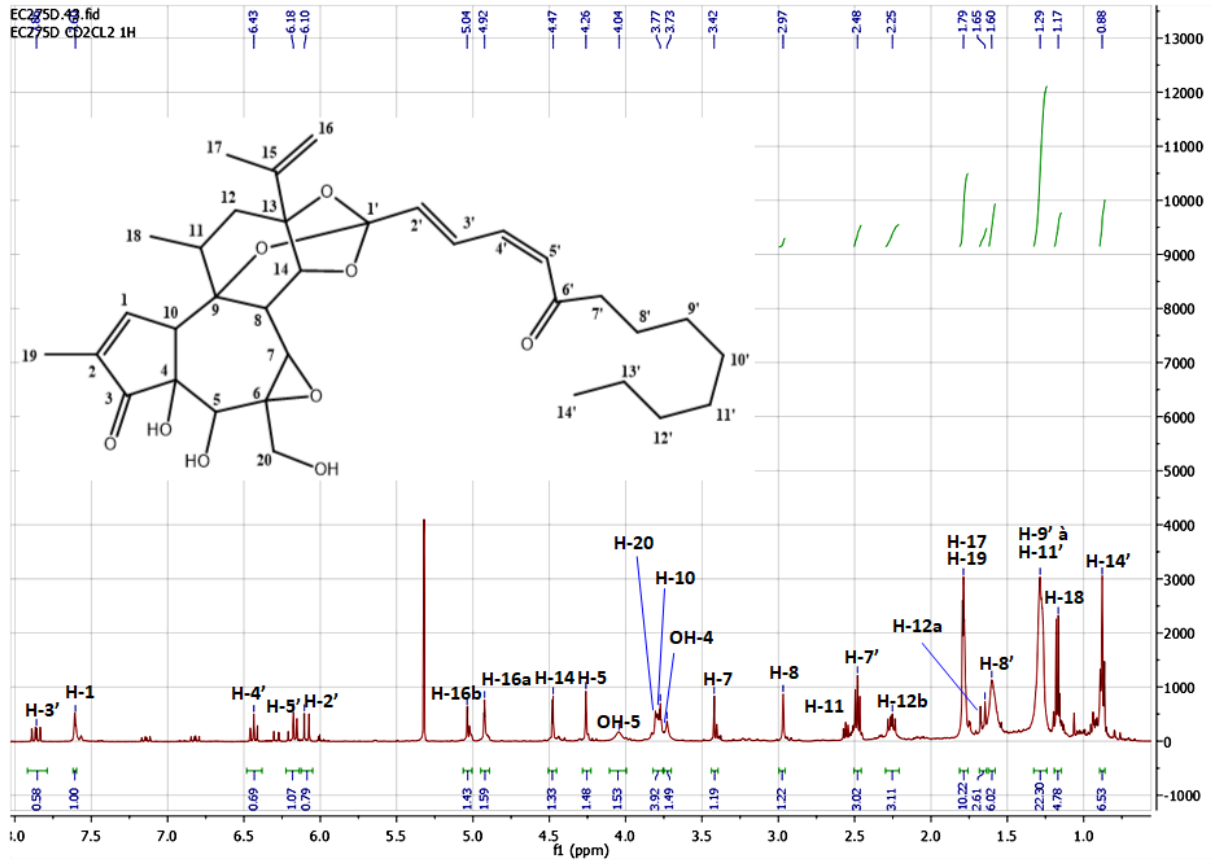


Figure 75: Spectre de RMN <sup>1</sup>H de la molécule M598T6.37 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

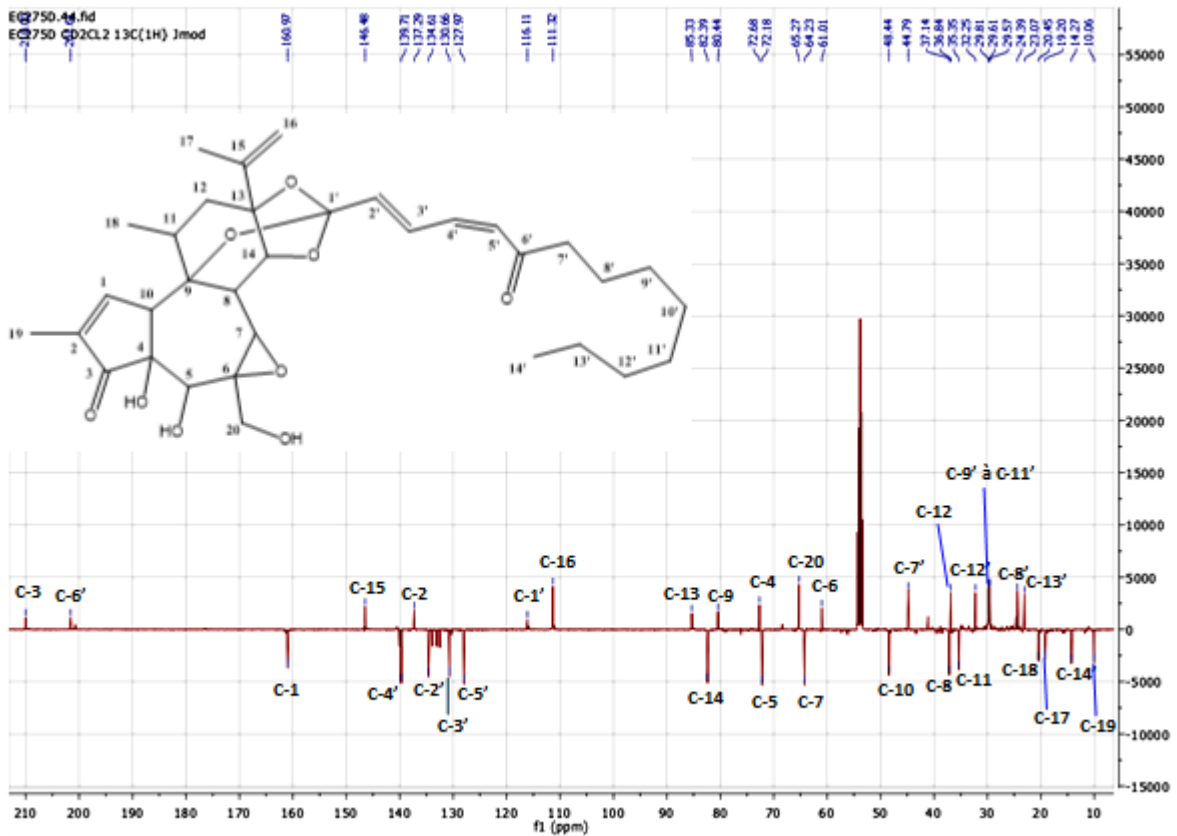


Figure 76: Spectre de RMN <sup>13</sup>C de la molécule M598T6.37 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons et carbones de la 6'-oxo-huratoxine (gauche) dans le CDCl<sub>3</sub> et de la molécule M598T6.37 (droite) dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des protons et carbones	$\delta_H$ (J en Hz) dans le CDCl <sub>3</sub> (118)	$\delta_C$ de dans le CDCl <sub>3</sub> (118)	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,62 ; m ; 1H	160,8	7,60 ; m ; 1H	161,0
2	-	137,0	-	137,3
3	-	209,7	-	210,0
4	-	72,2	-	72,7
5	4,27 ; se ; 1H	72,0	4,26 ; s ; 1H	72,2
6	-	60,5	-	61,0
7	3,46 ; s ; 1H	64,1	3,42 ; s ; 1H	64,2
8	2,98 ; d (2,6) ; 1H	36,8	2,97 ; d (2,5) ; 1H	37,1
9	-	80,1	-	80,4
10	3,81 ; m ; 1H	48,1	3,77 ; m ; 1H	48,4
11	2,51 ; m ; 1H	34,9	2,48 ; m ; 1H	35,4
12a	1,71 ; dd (14,4 ; 8,5) ; 1H	34,9	1,65 ; d (14, 4) ; 1H	36,8
12b	2,26 ; m ; 1H		2,25 ; dd (14,4 ; 8,6) ; 1H	
13	-	84,9	-	85,3
14	4,46 ; d (2,6) ; 1H	82,1	4,47 ; d (2,5) ; 1H	82,4
15	-	145,7	-	146,5
16a	4,93 ; m ; 1H	111,7	4,92 ; m ; 1H	111,3
16b	5,02 ; se ; 1H		5,04 ; m ; 1H	
17	1,81 ; m ; 3H	19,0	1,79 ; m ; 3H	19,2
18	1,19 ; d (7,1) ; 3H	20,4	1,17 ; d (7,1) ; 3H	20,5
19	1,81 ; m ; 3H	10,0	1,79 ; m ; 3H	10,1
20a	3,78 ; d (12,6) ; 1H	65,1	3,77 ; m ; 2H	65,3
20b	3,90 ; d (12,6) ; 1H			
1'	-	115,6	-	116,1
2'	6,21 ; d (15,4) ; 1H	133,5	6,10 ; d (15,6) ; 1H	134,6
3'	6,82 ; dd (15,4 ; 11,1) ; 1H	132,2	7,86 ; ddd (15,6 ; 12,6 ; 1,1) ; 1H	130,7
4'	7,15 ; dd (15,5 ; 11,1) ; 1H	140,1	6,43 ; ddd (12,6 ; 11,4 ; 0,7) ; 1H	139,7
5'	6,28 ; d (15,5) ; 1H	132,6	6,18 ; d (11,4) ; 1H	128,0
6'	-	200,7	-	201,6
7'	2,55 ; t (7,3.) ; 2H	40,9	2,48 ; m ; 2H	44,8
8'	1,63 ; m ; 2H	24,4	1,60 ; m ; 2H	24,4
9'	1,28 ; m ; 2H	29,0	1,27 – 1,29 ; m ; 6H	29,6 – 29,8
10'	1,24 – 1,29 ; m ; 4H	29,2 – 29,5		
11'				
12'	1,28 ; m ; 2H	31,9	1,29 ; m ; 2H	32,3
13'	1,29 ; m ; 2H	22,7	1,29 ; m ; 2H	23,1
14'	0,88 ; te (7) ; 3H	14,1	0,88 ; t (7,0) ; 3H	14,3
OH-4	-	-	3,73 ; s ; 1H	-
OH-5	-	-	4,04 ; s ; 1H	-

### (5) Configuration de la molécule M598T6.37

L'interprétation des corrélations NOESY des protons de la molécule M598T6.37 permet de mettre en évidence une configuration relative du noyau daphnane identique à celle des molécules précédentes (Figure 59). L'observation du spectre de dichroïsme circulaire (Figure 77) confirme la configuration absolue de la 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine similaire à celle de la 6'-oxo-huratoxine (120). En effet, on observe un effet Cotton négatif à 245 nm, et un effet Cotton positif à 266 nm proche de ceux de la 6'-oxo-huratoxine (118).

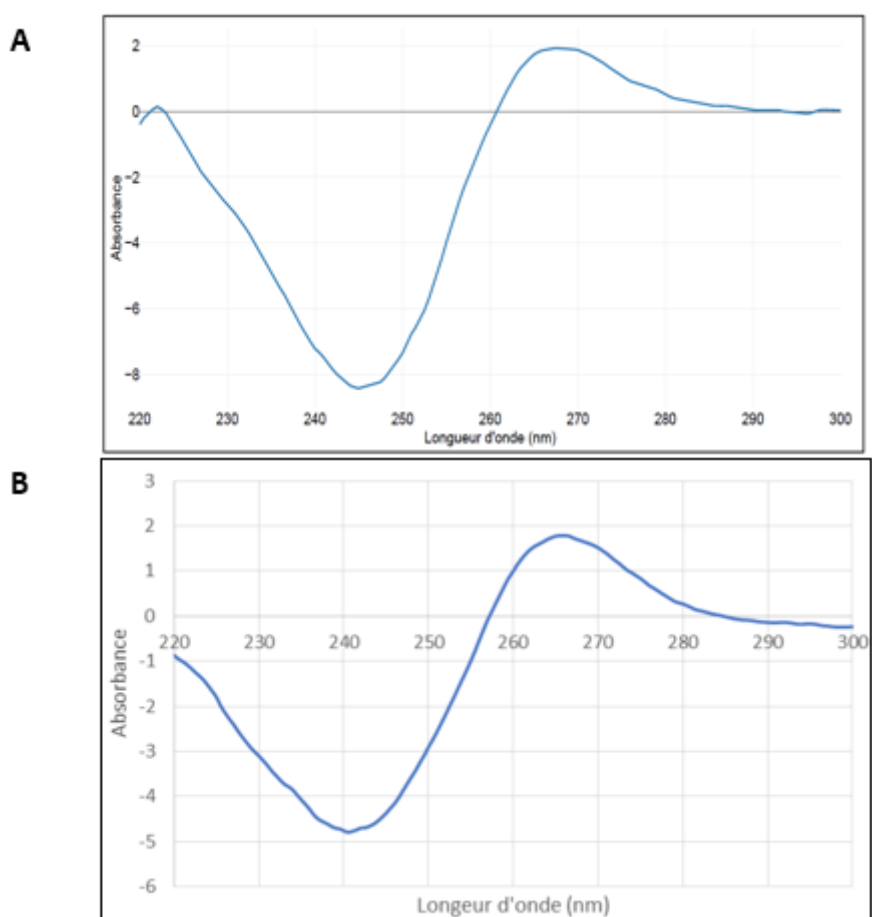


Figure 77: Spectre de dichroïsme circulaire de la 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (A) et de la 6'-oxo-huratoxine (B)



## d) *Analyse structurale de la molécule M674T11.18*

### (1) Spectroscopie Ultraviolet

Le spectre UV de la molécule M674T11.18 présente un maximum d'absorption à 247 nm.

### (2) Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire de la molécule M674T11.18 mesuré à 20°C dans du dichlorométhane à une concentration de 2,43 g/L est de  $[\alpha]_D = -21,98$ .

### (3) Spectrométrie de masse

Le spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M674T11.18 présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  675,4455 suggérant une formule brute de  $C_{39}H_{62}O_9$  pour la molécule neutre (Figure 78). Aucune molécule de type daphnane possédant cette formule brute n'a été décrite dans la littérature.

Cette molécule semble être un analogue de la huratoxine car son spectre MS-MS présente tous les fragments caractéristiques du noyau huratoxigénine mais avec des intensités relatives beaucoup plus faibles (Figure 79) (118). Selon sa formule brute ce composé posséderait une chaîne latérale mono-oxygénée à 19 atomes de carbones.

De plus, le spectre de masse montre des ions résultant de cinq déshydratations à partir de l'ion moléculaire, on peut donc supposer la présence de cinq fonctions hydroxyles sur la molécule, ce qui est en faveur d'un daphnane estérifié et non orthoestérifié. En effet, les daphnanes orthoestérifiés ne possèdent que 3 fonctions hydroxyles en position 4, 5 et 20. La longueur de la chaîne latérale à 19 atomes de carbone est inhabituelle pour un daphnane monoestérifié. Cependant, il ne s'agit probablement pas d'un daphnane di-estérifié car on n'observe pas de fragment intermédiaire entre les déshydratations de l'ion moléculaire et les fragments

caractéristiques du noyau daphnane qui débutent à  $m/z$  379, qui signerait la perte d'une seconde chaîne latérale (118).

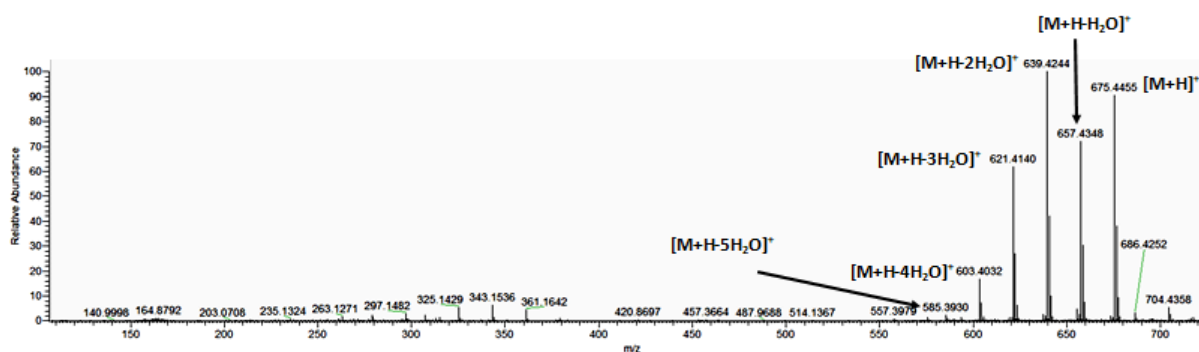


Figure 78: Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M674T11.18

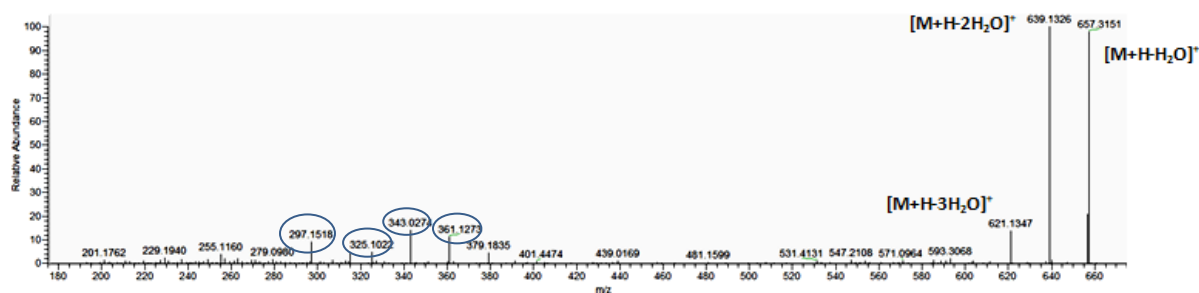


Figure 79: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M674T11.18

#### (4) Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La molécule M674T11.18 présentant la formule brute  $C_{39}H_{62}O_9$  n'a jamais été décrite dans la littérature. L'attribution des carbones et des protons du noyau daphnane a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de RMN 1D et 2D (Figure 80). Tous les signaux caractéristiques du noyau daphnane sont présents, cependant on remarque quelques différences notables avec les signaux décrits pour les daphnanes orthoestérifiés précédents.

- Les signaux correspondant aux C-6 ( $\delta_C$  78.3 au lieu de 61) et C-7 ( $\delta_C$  80.8 au lieu de 64) sont plus déblindés et le singulet correspondant au H-5 ( $\delta_H$  3.64) est plus blindé que pour les daphnanes précédents ( $\delta_H$  voisin de 4,25).

- La présence d'un signal à  $\delta_C$  175.7 (C-1') est caractéristique d'un carbone impliqué dans une fonction ester. La corrélation HMBC entre les protons H<sub>2</sub>-20 ( $\delta_H$  4.34 et 4.44) et le signal à  $\delta_C$  175.7 indique la présence d'une chaîne latérale estérifiée en C-20, ce qui explique la modification des déplacements chimiques des carbones en positions 6 et 7 et du proton H-5.
- Si l'on observe les déplacements chimiques des carbones C-13 ( $\delta_C$  74,7) et C-14 ( $\delta_C$  77,8), on remarque qu'ils sont plus blindés que dans le cas de daphanes orthoestérifiés. Cette observation est cohérente avec les données de la littérature. En effet, en 2020, Otsuki *et al.* rapportent l'isolement et l'élucidation structurale de diterpènes de type daphnane non-orthoestérifiés présentant des déplacements chimiques semblables pour les carbones en positions 9, 13, et 14 (121).

La molécule M674T11.18 est donc un daphnane estérifié en C-20 avec une chaîne latérale à 19 atomes de carbone.

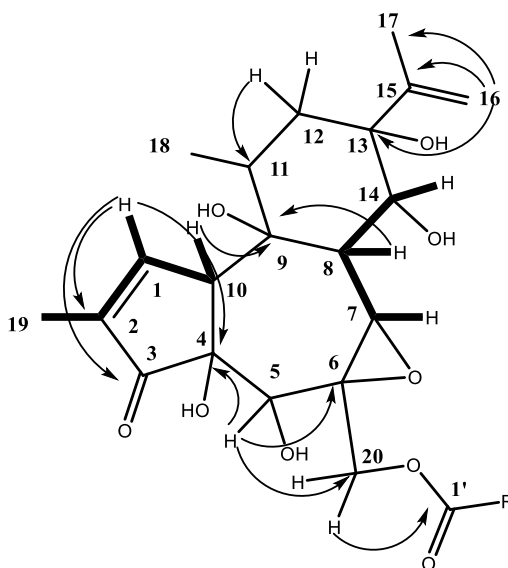


Figure 80: Corrélation HMBC (flèches) et COSY (gras) du noyau daphnane de la molécule M674T11.18

Les signaux des carbones et protons de la chaîne latérale sont attribués avec la même méthode :

- La chaîne latérale de la molécule M674T11.18 débute avec un enchaînement de 8 CH<sub>2</sub>. En effet, un triplet à  $\delta_H$  2,39 (H-2') corrèle en HMBC avec le C-1' ( $\delta_C$  175,7) et montre une corrélation COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H avec un multiplet à  $\delta_H$  1,59 que l'on positionne en H-3'. On peut grâce aux corrélations HSQC attribuer les signaux des carbones C-2' ( $\delta_C$  34,7) et C-3' ( $\delta_C$  25,4). H-3' corrèle avec un massif représentant 6 carbones entre  $\delta_C$  29,5 et 30,1 correspondants aux carbones C-4' à C-9' dont les protons ont un déplacement chimique de  $\delta_H$  1,26.
- On remarque un triplet à  $\delta_H$  0,88, caractéristique d'un méthyle en bout de chaîne, porté par un carbone à  $\delta_C$  14,3. De plus, un signal correspondant au carbone d'un méthyle à  $\delta_C$  21,1 est encore non attribué, nous supposons donc la présence d'une ramification méthyle sur la chaîne latérale. On place donc le C-18' à  $\delta_C$  14,3 et la ramification méthyle que l'on nomme C-1'' à  $\delta_C$  21,1 avec le doublet correspondant aux protons H<sub>3</sub>-1'' à  $\delta_H$  0,94.
- On peut aussi déterminer la fin de la chaîne latérale constituée d'un enchaînement (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>. En effet, H<sub>3</sub>-18' ( $\delta_H$  0,88) montre une corrélation COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H avec un singulet à  $\delta_H$  1,26 qui corrèle en HSQC avec le massif à  $\delta_C$  29,5-30,1 et avec quatre signaux à  $\delta_C$  23,1 ; 27,7 ; 32,3 et 37,6. D'après la littérature, les carbones situés en bout de chaîne latérale possèdent des déplacements chimiques caractéristiques (118). Nous avons donc pu positionner le C-17' à  $\delta_C$  23,1 ; le C-16' à  $\delta_C$  32,3 et le C-15' à  $\delta_C$  27,7.
- Nous pouvons aussi affirmer que le méthyle ramifié se situe proche d'une double liaison. En effet, H-1'' ( $\delta_H$  0,94) montre une corrélation COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H avec un multiplet à  $\delta_H$  2,02 (porté par un carbone à  $\delta_C$  37,1 (CH)) qui lui-même corrèle avec deux signaux à  $\delta_H$  1,26 et 5,25. Le carbone portant la ramification méthyle ( $\delta_C$  37,1) est donc entouré par un carbone éthylénique à  $\delta_C$  136,8 portant le proton à  $\delta_H$  5,25 et par le dernier carbone corrélant avec le signal à  $\delta_H$  1,26 qui possède un déplacement chimique de  $\delta_C$  37,6 (CH<sub>2</sub>).

- Le doublet dédoublé à  $\delta_H$  5,25 montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un autre doublet dédoublé à  $\delta_H$  5,36 porté par un carbone à  $\delta_C$  129,9 ce qui correspond au déplacement chimique de protons et de carbones éthyléniques. La constante de couplage des protons éthyléniques est de 15,6 Hz correspondant à une configuration *E*.
- Enfin, le doublet dédoublé à  $\delta_H$  5,36 montre une deuxième corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un quadruplet à  $\delta_H$  1,97 porté par un carbone à  $\delta_C$  33,0 ( $CH_2$ ).

Le milieu de la chaîne latérale de cette molécule consiste donc en un enchainement de type  $CH_2-CH=CH-CH-CH_3-CH_2$  (Figure 81). Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de positionner précisément les signaux à  $\delta_C$  33,0 et 37,6. En effet, le signal à  $\delta_H$  1,26 corrèle en HMBC avec ces deux carbones, mais il représente les protons H-4' à H-9' et H-15' à H-17'. Les signaux à  $\delta_C$  33,0 et 37,6 peuvent donc tous les deux être en position 10' ou 14' (Figure 81). Nous pouvons donc faire deux propositions de structure pour cette molécule. Cependant la proposition 1 est plus probable d'un point de vue biosynthétique car la double liaison est en  $\omega$ 6 (Figure 82).

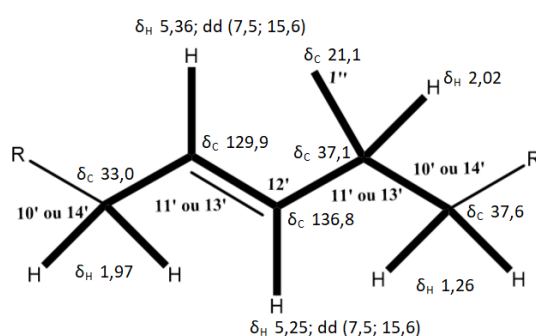


Figure 81: Corrélation COSY gras du milieu de la chaîne latérale de la molécule M674T11.18

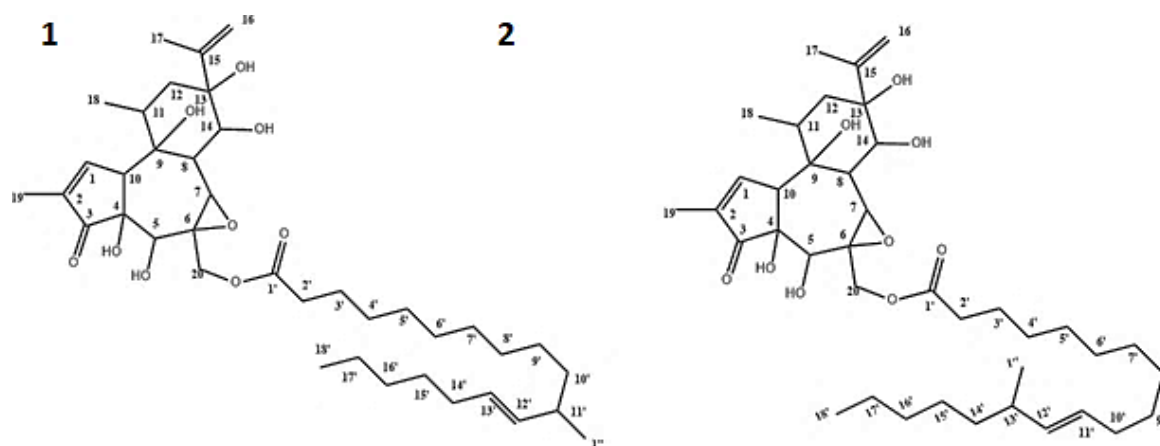


Figure 82: Proposition de structure pour la molécule M674T11.18

Les calculs de modélisation RMN, nous ont permis de confirmer que la structure de la molécule M674T11.18 correspond à la proposition n°1. La modélisation a été réalisée pour les 2 structures possibles d'acide gras branché en C-20 (Figure 83). Les histogrammes ci-dessous (Figure 84 et Figure 85) représentent les écarts entre les déplacements chimiques calculés et expérimentaux :  $\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}}$ . On peut constater que les profils RMN des 2 isomères *mol1* et *mol2* sont très similaires et ne permettent pas à première vue de discriminer la configuration correcte. Les calculs DP4+, donnent dans le cas des protons une probabilité de 100% en faveur de la configuration n°2, alors que pour les C, c'est la configuration n°1 qui est privilégiée avec une probabilité de 95,3%. Finalement, la combinaison des 2 est nettement en faveur du dérivé n°1 qui sort avec une probabilité de 100%.

Lorsque l'on combine les configurations *cis* et *trans* des 2 structures, le résultat permet d'éliminer sans aucune ambiguïté les configurations *cis* qui sont défavorisées (probabilités égales à 0%) par rapport aux dérivés *trans*. La configuration n°1 *trans* sort quant à elle avec une probabilité proche de 100%.

La molécule M674T11.18 est identifiée comme étant la huratoxigénine-20-(11'-méthyl-octadéc-12'-énoate).

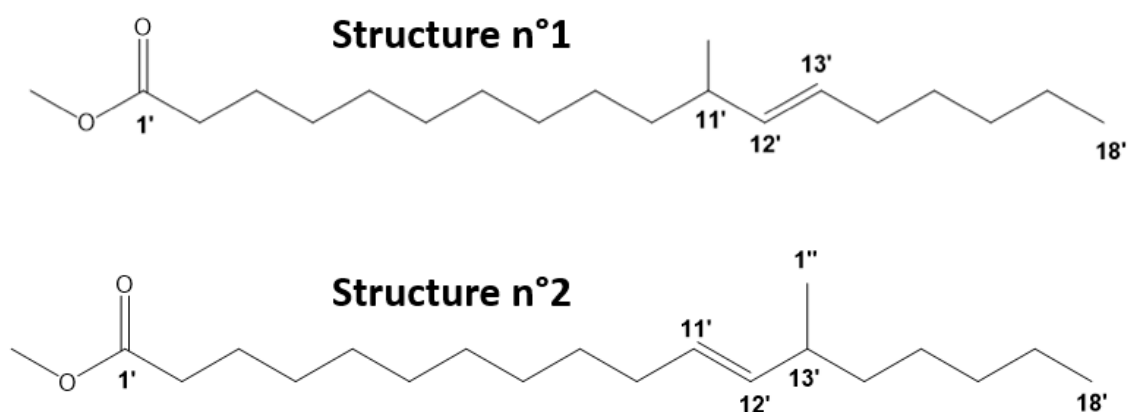


Figure 83: Structure simplifiée de la molécule M674T11.18 utilisée pour la modélisation des déplacements chimiques de RMN

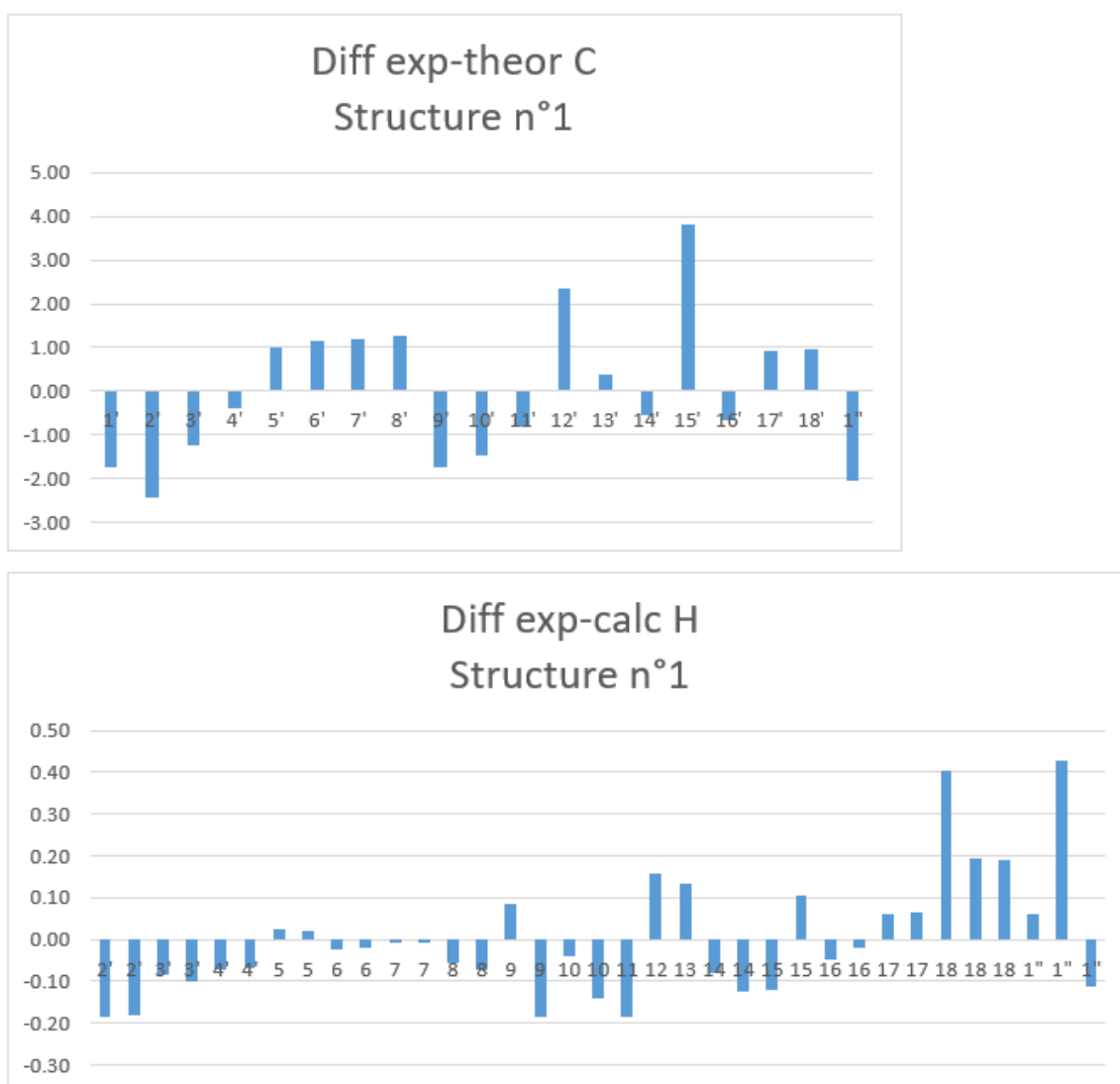


Figure 84: Différences des déplacements chimiques expérimentaux et calculés avec la structure n°1

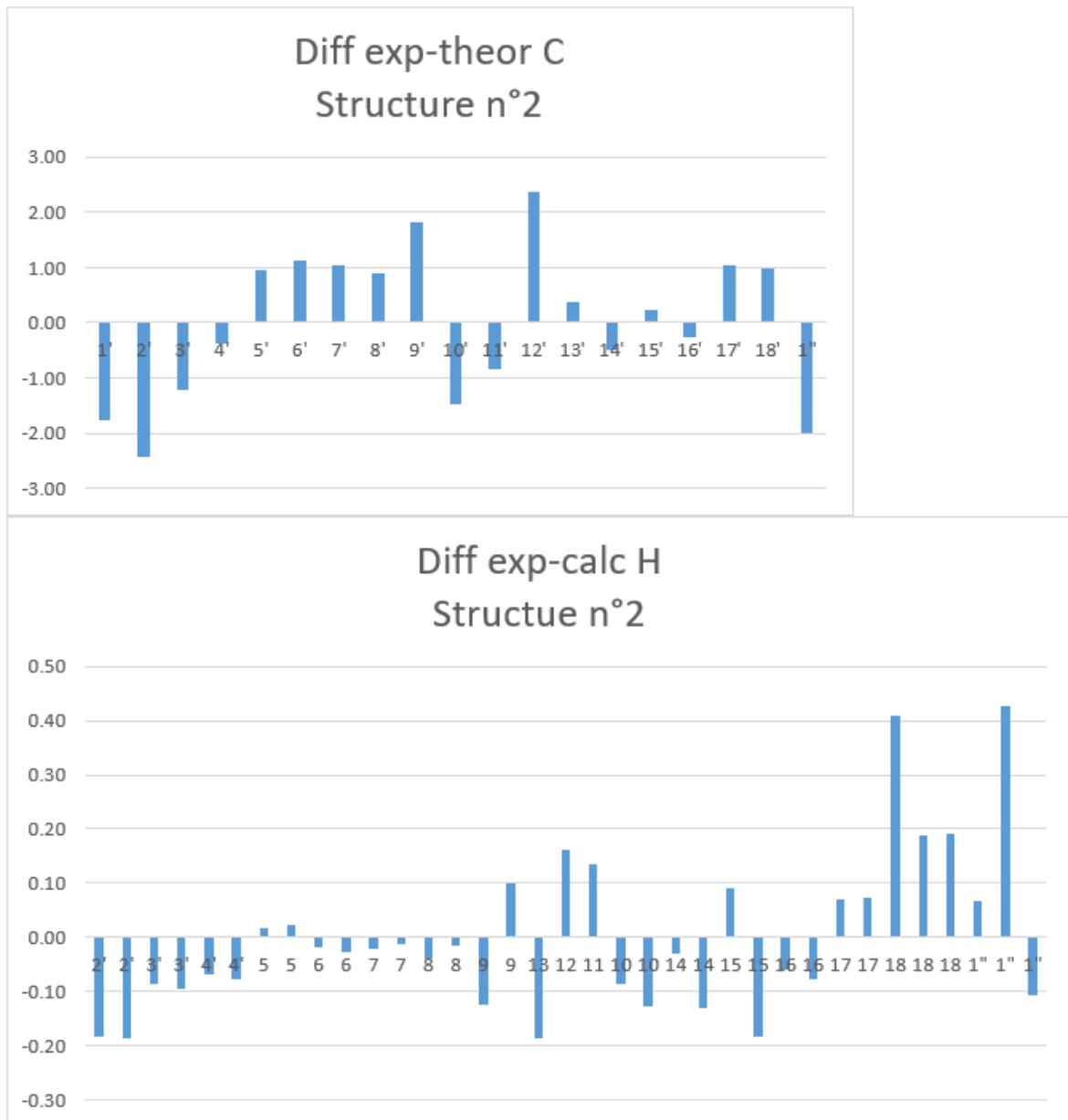


Figure 85: Différences des déplacements chimiques expérimentaux et calculés avec la structure n°2



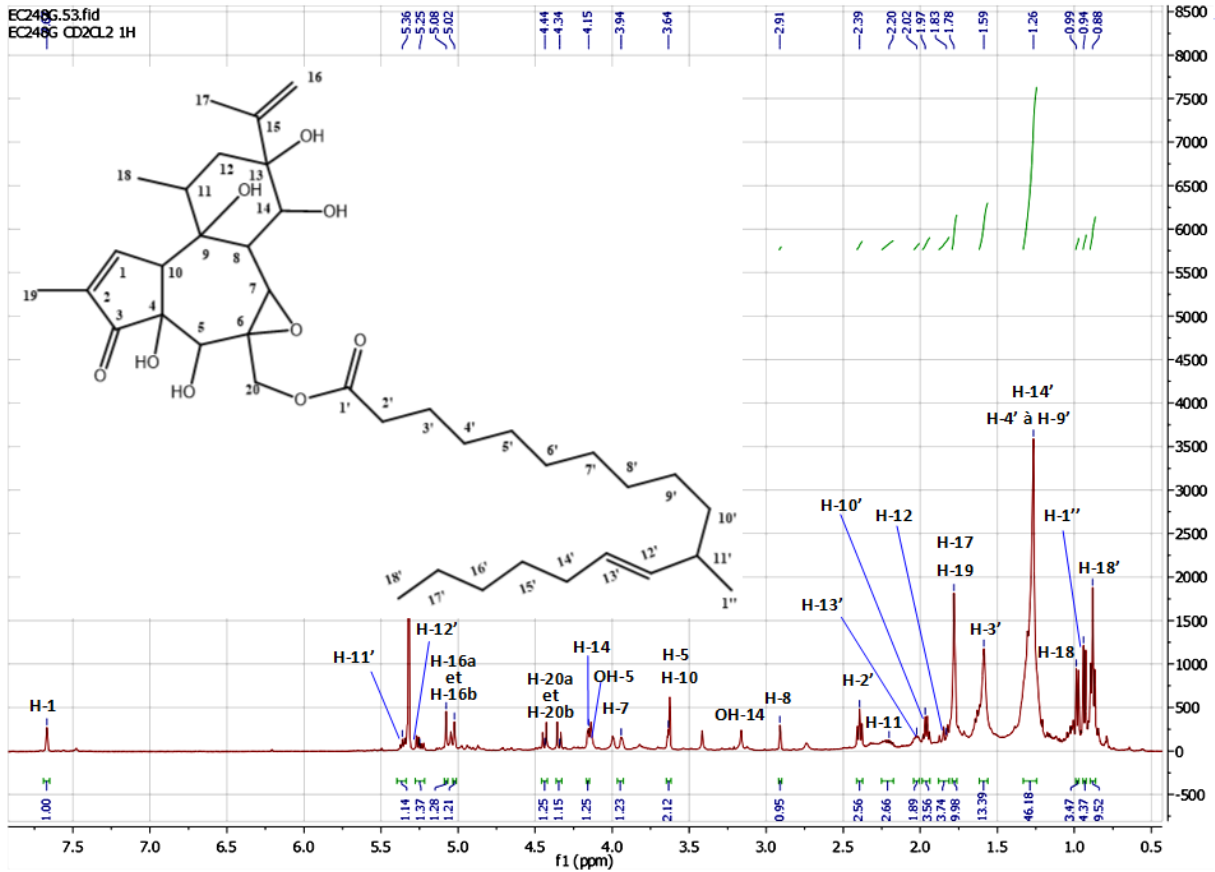


Figure 86: Spectre de RMN <sup>1</sup>H de la molécule M674T11.16 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

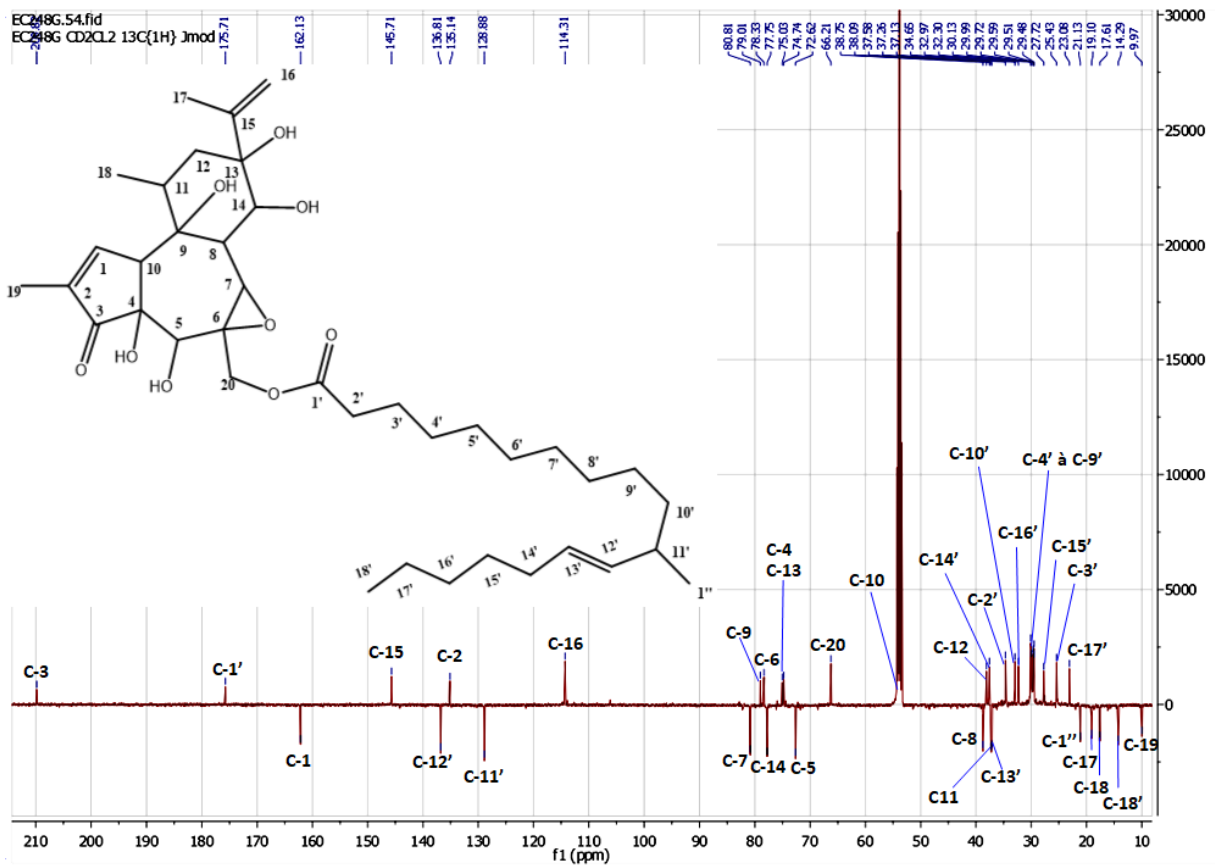


Figure 87: Spectre de RMN <sup>13</sup>C de la molécule M674T11.18 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 7: Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M674T11.18 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en comparaison des déplacements chimiques des protons et des carbones de la daphnéodrine F dans le CDCl<sub>3</sub> (121)

N° des protons et carbones	$\delta_H$ (J en Hz) de la daphnéodrine F dans le CDCl <sub>3</sub> (121)	$\delta_C$ de la daphnéodrine F dans le CDCl <sub>3</sub> (121)	$\delta_H$ (J en Hz) de la molécule M674T8,16 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	$\delta_C$ de la molécule M674T8,16 dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
1	7,66 ; m ; 1H	160,2	7,67 ; m ; 1H	162,1
2	-	137,0	-	135,1
3	-	209,3	-	209,8
4	-	72,3	-	75,0
5	4,25 ; s ; 1H	71,3	3,64 ; s ; 1H	72,6
6	-	61,8	-	78,3
7	3,29 ; s ; 1H	62,6	3,94 ; m ; 1H	80,8
8	4,16 ; d (5,1) ; 1H	40,0	2,91 ; m ; 1H	38,8
9	-	75,2	-	79,0
10	3,58 ; m ; 1H	50,8	3,64 ; m ; 1H	53,5
11	2,41 ; dd (7,5 ; 3,0) ; 1H	42,9	2,20 ; m ; 1H	37,3
12	5,01 ; d (3,0) ; 1H	79,3	1,83 ; m ; 2H	38,1
13	-	75,8	-	74,7
14	5,98 ; d (5,1) ; 1H	72,9	4,15 ; d (3,7) ; 1H	77,8
15	-	144,7	-	145,7
16a	5,05 ; se ; 1H	115,0	5,02 ; s ; 1H	114,3
16b	5,29 ; s ; 1H		5,08 ; s ; 1H	
17	1,87 ; se ; 3H	19,7	1,78 ; s ; 3H	19,1
18	1,32 ; d (7,5) ; 3H	16,1	0,99 ; d (6,7) ; 3H	17,6
19	1,78 ; dd (2,6 ; 1,1) ; 3H	9,9	1,78 ; s ; 3H	9,97
20a	3,72 ; d (12,3) ; 1H	65,6	4,34 ; d (11,9) ; 1H	66,2
20b	3,81 ; d (12,3) ; 1H		4,44 ; d (11,9) ; 1H	
1'	-		-	175,7
2'			2,39 ; t (7,5) ; 2H	34,7
3'			1,59 ; m ; 2H	25,4
4'			1,26 ; s ; 12H	29,5 - 30,1
5'				
6'				
7'				
8'				
9'				
10'				
11'			2,02 ; m ; 1H	37,1
12'			5,25 ; dd (15, 6 ; 7,5) ; 1H	136,8
13'			5,36 ; dd (15,6 ; 6,8) ; 1H	129,9
14'			1,97 ; q (6,8) ; 2H	33,0
15'	---	---	1,26 ; se ; 2H	27,7
16'	---	---	1,26 ; se ; 2H	32,3
17'	---	---	1,26 ; se ; 2H	23,1
18'	---	---	0,88 ; t (6,7) ; 3H	14,3
1''	---	---	0,94 ; d (6,7) ; 3H	21,1
OH-5	---	---	4,13 ; se ; 1H	---
OH-14	---	---	3,16 ; s ; 1H	---

### (5) Configuration relative de la molécule M674T11.18

La configuration relative du noyau daphnane est déterminée grâce aux différentes corrélations NOESY et par comparaison avec les données obtenues pour les molécules décrites précédemment.

Nous observons des corrélations NOESY entre H-11 ( $\delta_H$  2,20) /H-8 ( $\delta_H$  2,91), H-11/H-16b ( $\delta_H$  5,08) et H<sub>2</sub>-16/H<sub>3</sub>-17 ( $\delta_H$  1,78). D'après ces corrélations NOESY et la similitude de leur déplacement chimique avec ceux de la huratoxine les protons H-11, H-8 et le groupement isoprényle ont une orientation en  $\beta$  du cycle C. On remarque que H-10 ( $\delta_H$  3,64) et H-5 ( $\delta_H$  3,64) ne corrélerent avec aucun proton. H-10 et H-5 possédant le même déplacement chimique, il n'est pas possible d'observer une corrélation NOESY entre eux. Cependant, en se basant sur la littérature, nous supposons que H-5 et H-10 ont une orientation en  $\alpha$  du cycle B (118). D'autres protons situés proches les uns des autres montrent une corrélation NOESY tels que H-1 ( $\delta_H$  7,67) /H<sub>3</sub>-19 ( $\delta_H$  1,78), H-1/H<sub>3</sub>-18 ( $\delta_H$  0,99) et H<sub>3</sub>-18/H-11 ( $\delta_H$  2,20).

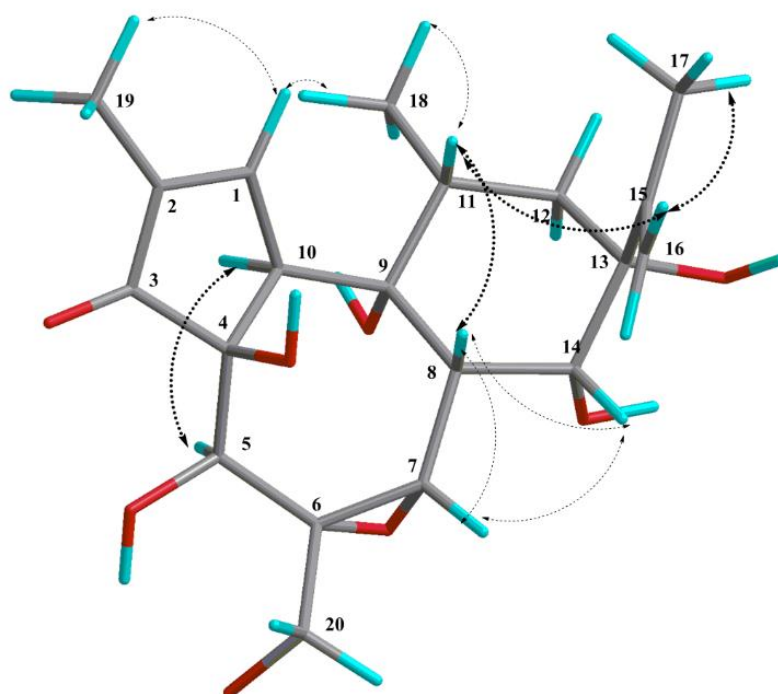


Figure 88: Structure 3D du noyau daphnane de la molécule M674T11.18

L'observation du spectre de dichroïsme circulaire (Figure 89) de la molécule M674T8,16 montre un effet Cotton positif à 225 nm puis un effet Cotton négatif à 255 nm contrairement à la huratoxine où l'on observe un effet Cotton négatif à 230 nm puis un effet Cotton positif à 249 nm (118). La structure étant différente de celle de la huratoxine, il est difficile de conclure sur la configuration absolue de la molécule au vu de son spectre de dichroïsme circulaire.

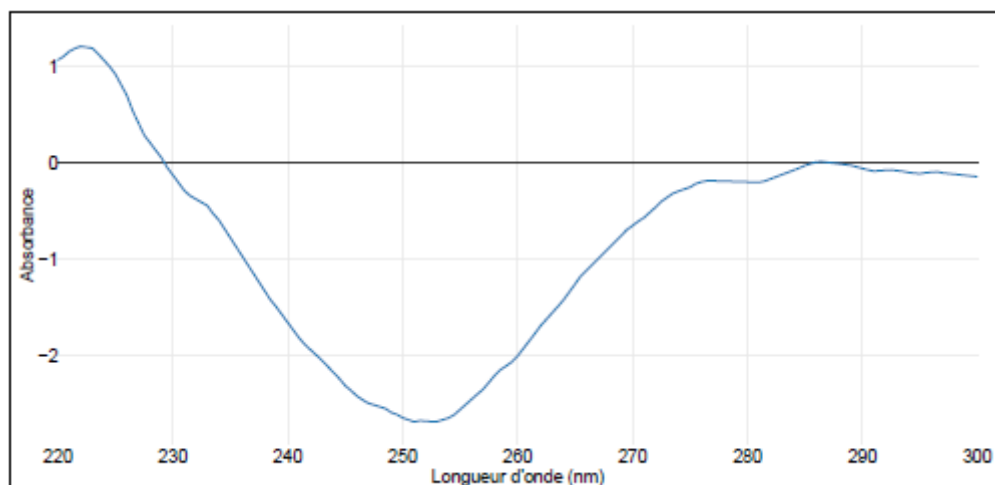


Figure 89: Spectre de dichroïsme circulaire de la molécule M674T8,16 dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

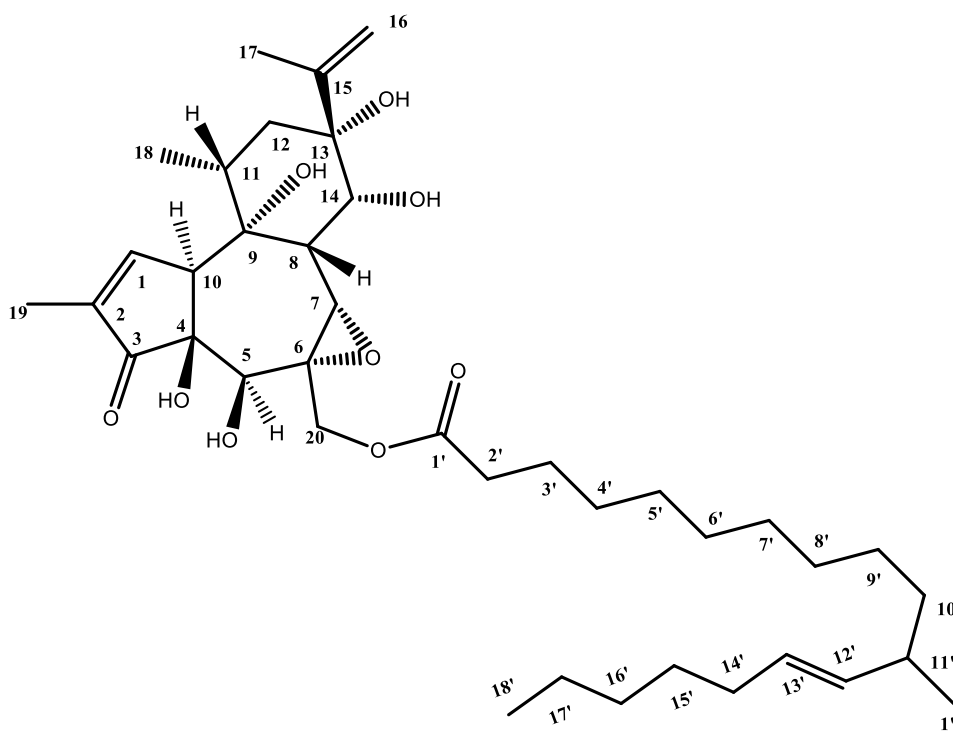


Figure 90: Configuration relative de la molécule M674T11.18

## 2. Analyse structurale de mélanges

Lors de l'analyse structurale des différentes molécules isolées, nous nous sommes rendus compte que plusieurs d'entre elles sont en fait en mélange, en majorité à cause de la présence de diastéréoisomères. C'est le cas notamment de plusieurs molécules ayant subi une oxydation sur l'une des doubles liaisons de la chaîne latérale de la huratoxine (en C-2'/C-3' ou en C-4'/C-5'). Nous supposons que ces oxydations sont survenues après la biosynthèse des daphnanes par la plante et ces dernières ne sont donc pas diastéréosélectives. La réaction d'oxydation a pu se produire pendant la collecte du latex, ou lors des différentes étapes d'extraction et de purification. Pour ces molécules, les analyses de pouvoir rotatoire, de dichroïsme circulaire et de configuration relative ne sont par conséquent pas présentées. Les déplacements chimiques dédoublés sont représentés en bleu dans les tableaux récapitulant les déplacements chimiques de RMN.

### a) *Analyse structurale du mélange M616T3.96*

#### (1) Analyse par spectroscopie ultraviolet

Le spectre UV de la molécule M616T3.96 présente un maximum d'absorption à 230 nm proche de celui de la huratoxine (235 nm).

#### (2) Analyse par spectrométrie de masse

La fraction pour laquelle la présence d'un mélange de deux diastéréoisomères est la plus flagrante est la M616T3.96. Cette fraction est donc prise en exemple pour la démonstration des deux systèmes de signaux. Les molécules suivantes seront donc décrites plus succinctement.

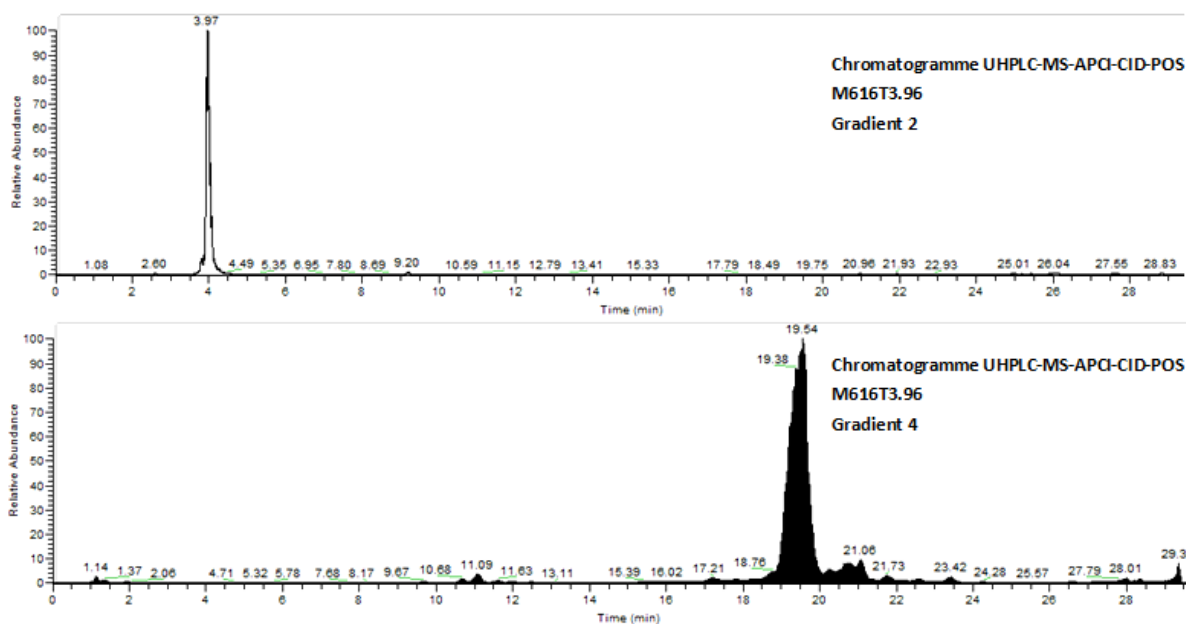


Figure 91: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS avec le gradient 2 et le gradient 4

L'analyse du chromatogramme UHPLC-MS de la fraction M616T3.96 montre un seul pic avec le gradient 2. Cependant, lors de l'utilisation d'un gradient optimisé (gradient 4) on remarque un élargissement du pic laissant supposer deux pics à 19,38 et 19,54 minutes (Figure 91), ce qui nous laisse penser que nous sommes en présence d'un mélange de molécules de polarité très proche et de même masse molaire. En effet, le spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la fraction M616T3.96 présente un seul ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  617,3323 pour les deux pics présents sur le chromatogramme obtenu avec le gradient 4, indiquant la présence de deux isomères. La formule brute associée à cette masse molaire est  $C_{34}H_{48}O_{10}$  pour la molécule neutre (Figure 92). Aucune molécule de type daphnane possédant cette formule brute n'a été décrite dans la littérature.

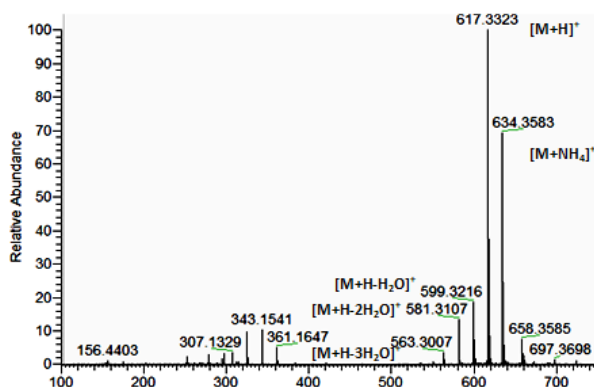


Figure 92 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M616T3.96

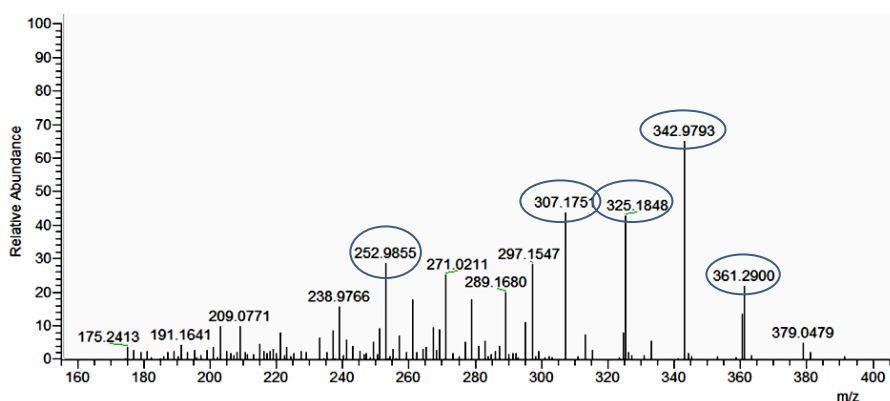


Figure 93: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M616T3.96

Cette fraction semble donc contenir deux analogues de la huratoxine car leurs spectres MS-MS présentent tous les fragments caractéristiques du noyau huratoxigénine (Figure 93). Selon leur formule brute, ces isomères posséderaient une chaîne latérale à 14 atomes de carbones avec 2 atomes d'oxygènes.

### (3) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

L'analyse des spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  de la fraction M616T3.96 met en évidence deux systèmes avec des déplacements chimiques très proches. Cela est en faveur d'un mélange de diastéréoisomères avec une proportion 40/60 selon l'intégration des pics des systèmes respectifs. Nous avons été en mesure de différencier les deux systèmes pour un certains nombres de signaux. Cependant, certains signaux sont trop confondus pour que l'on puisse les différencier, notamment dans la zone des protons les plus blindés.

Les deux systèmes de signaux ont été attribués notamment grâce à la hauteur des pics, représentant l'abondance du diastéréoisomère dans le mélange, ainsi que par les différentes corrélations 2D.

Tous les signaux du noyau huratoxigénine ont pu être attribués sur les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , grâce aux différentes corrélations HSQC, HMBC et COSY, comme décrit pour les molécules pures (Figure 95, Figure 96, Tableau 8).

Nous avons pris les déplacements chimiques du diastéréoisomère A majoritaire pour la démonstration de la structure de la chaîne latérale.

- Le signal à  $\delta_C$  117,7 (C-1') signe la présence d'un groupement orthoester. H-14 ( $\delta_H$  4,49) corrèle en HMBC avec le carbone à  $\delta_C$  117,7 confirmant la position de la chaîne latérale.
- Ces molécules possèdent une fonction hydroxyle en C-2'. En effet, un doublet dédoublé à  $\delta_H$  4,55 corrèle en HMBC avec le C-1' ( $\delta_C$  117,7), ce proton est positionné en H-2' et est porté par le C-2' (CH-OH) à  $\delta_C$  72,28.
- La présence d'une insaturation en 3',4' est mise en évidence par la corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  entre H-2' et un doublet dédoublé à  $\delta_H$  6,94 qui lui-même montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un autre doublet dédoublé à  $\delta_H$  6,45. Nous pouvons ainsi placer les protons éthyléniques H-3' ( $\delta_H$  6,94) et H-4' ( $\delta_H$  6,45) ; portés par les carbones C-3' ( $\delta_C$  142,0) et C-4' ( $\delta_C$  130,7). Les constantes de couplages de ces protons sont égales à 16,1 Hz pour les deux diastéréoisomères ce qui indique une configuration *E* de la double liaison en 3', 4'.
- Enfin, H-4' ( $\delta_H$  6,45) corrèle avec un signal à  $\delta_C$  200,8 caractéristique d'un carbone portant une fonction cétone, que l'on positionnera en C-5' (C) (Figure 94).

Les molécules M616T3,96 présentent donc un noyau huratoxigénine avec une chaîne latérale orthoestérifiée présentant une fonction alcool en 2', une insaturation en 3',4' et une fonction cétone en 5'. Nous supposons que la présence de deux diastéréoisomères est due au carbone asymétrique C-2'. En effet, c'est celui-ci qui présente le déplacement chimique le plus différent entre les deux diastéréoisomères ( $\delta_C$  72,3 pour le système A ;  $\delta_C$  71,5 pour le système B). L'analyse du chromatogramme UHPLC-MS de l'extrait brut du latex de *H. crepitans* montre la présence de cette molécule. Il est possible que l'oxydation ai eu lieu lors de la collecte du latex ou lors de l'extraction.



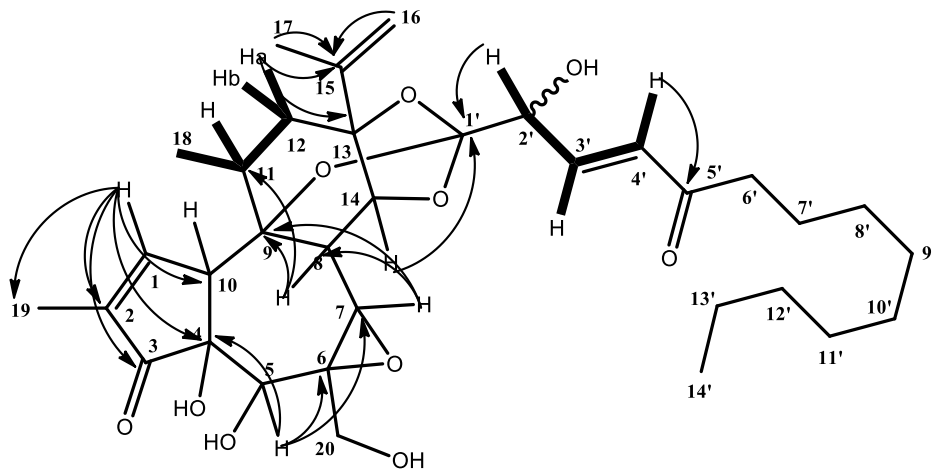


Figure 94: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la chaîne latérale des diastéréoisomères M616T3.96

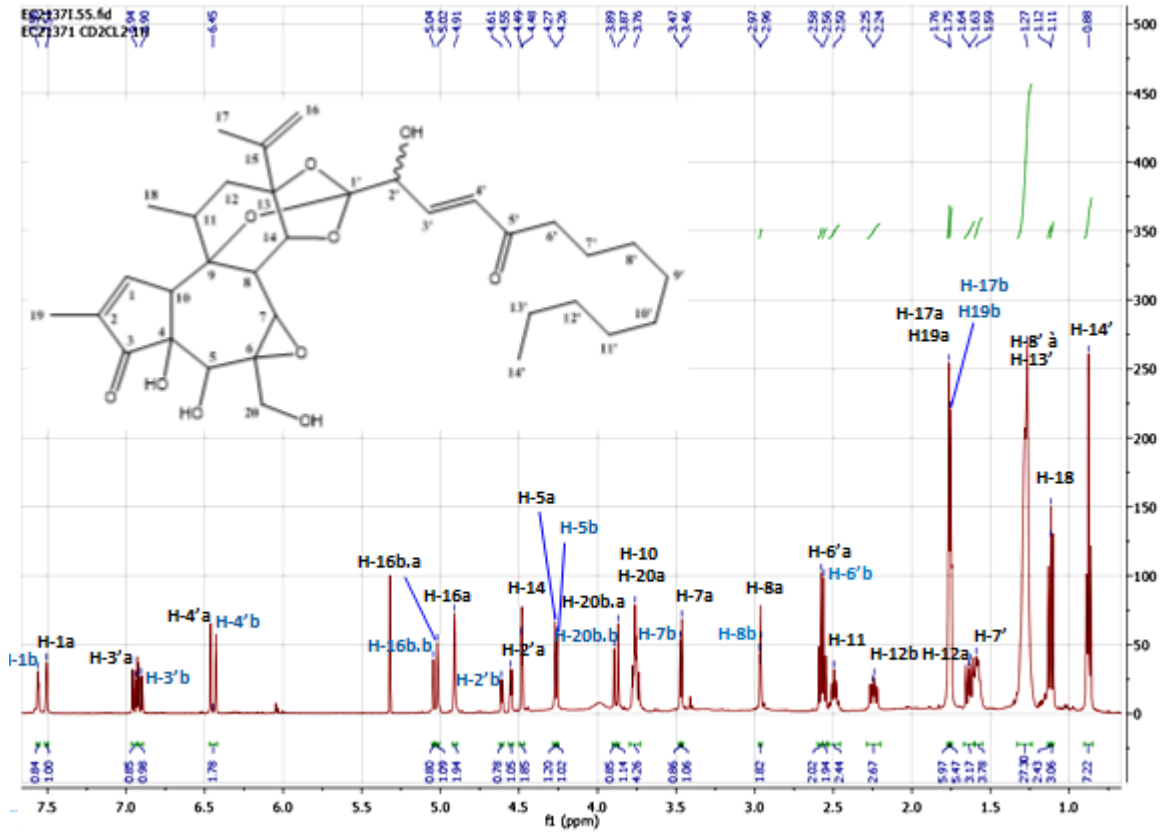


Figure 95: Spectre RMN <sup>1</sup>H de la fraction M616T3.96 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

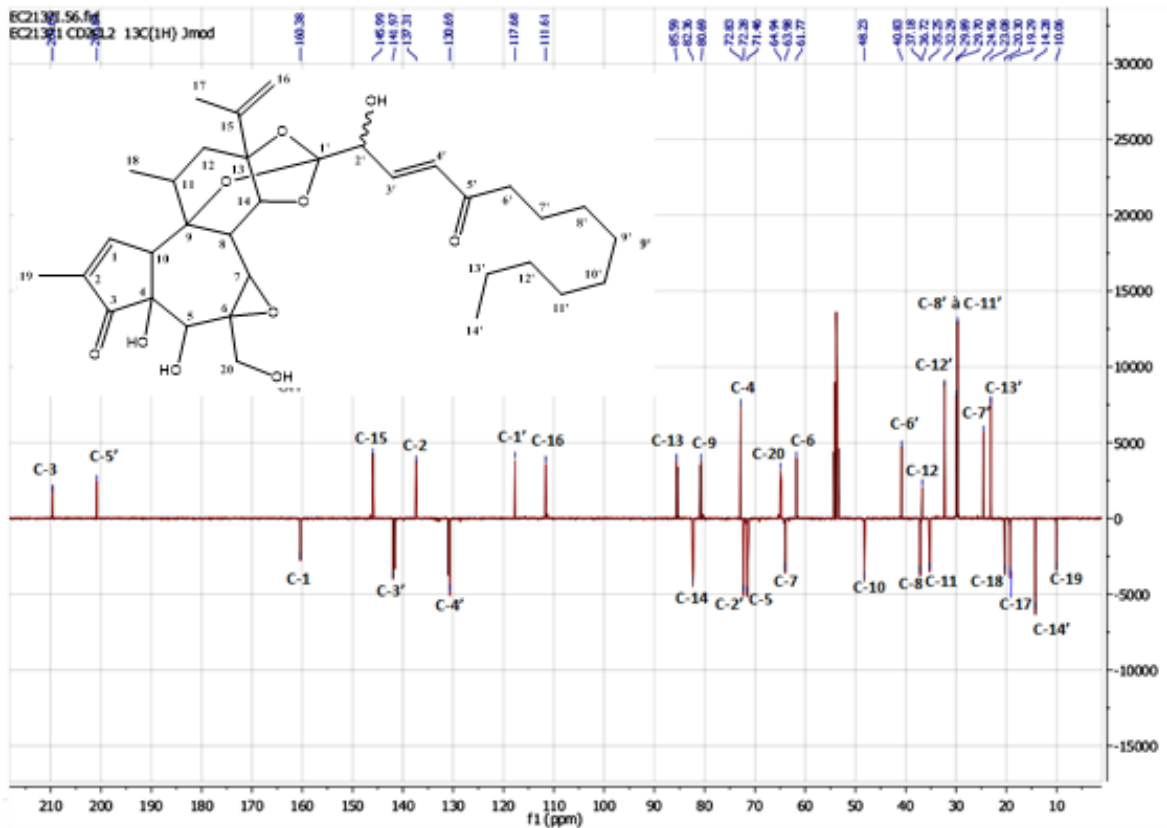


Figure 96: Spectre RMN <sup>13</sup>C de la fraction M616T3.96 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 8: Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M616T3.96 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz) Système A	$\delta_C$ Système A	$\delta_H$ (J en Hz) Système B	$\delta_C$ Système B
1	7,51 ; m ; 1H	160,4	7,56 ; m ; 1H	160,4
2	-	137,3	-	137,4
3	-	209,6	-	209,7
4	-	72,8	-	72,8
5	4,27 ; s ; 1H	71,4	4,26 ; s ; 1H	71,4
6	-	61,8	-	61,8
7	3,46 ; s ; 1H	64,0	3,47 ; s ; 1H	63,9
8	2,96 ; d (2,2) ; 1H	37,2	2,97 ; d (2,2) ; 1H	37,2
9	-	80,7	-	80,9
10	3,76 ; m ; 1H	48,2	3,76 ; m ; 1H	48,3
11	2,50 ; m ; 1H	35,3	2,50 ; m ; 1H	35,2
12a	1,64 ; d (14,4) ; 1H	36,7	1,63 ; d (14,4) ; 1H	36,8
12b	2,25 ; dd (14,4 ; 8,6) ; 1H		2,24 ; dd (14,4 ; 8,6) ; 1H	
13	-	85,6	-	85,4
14	4,49 ; d (2,2) ; 1H	82,4	4,48 ; d (2,2) ; 1H	82,2
15	-	146,0	-	145,9
16a	4,91 ; m ; 1H	111,6	4,91 ; m ; 1H	111,7
16b	5,02 ; s ; 1H		5,04 ; s ; 1H	
17	1,76 ; m ; 3H	19,3	1,75 ; m ; 3H	19,4
18	1,11 ; d (8,6) ; 3H	20,3	1,12 ; d (8,6) ; 3H	20,4
19	1,76 ; m ; 3H	10,1	1,75 ; m ; 3H	10,1
20a	3,76 ; m ; 1H	64,9	3,76 ; m ; 1H	64,8
20b	3,87 ; s ; 1H		3,89 ; s ; 1H	
1'	-	117,7	-	117,8
2'	4,55 ; dd (4,3 ; 1,8) ; 1H	72,3	4,61 ; dd (4,3 ; 1,8) ; 1H	71,5
3'	6,94 ; dd (16,1 ; 4,3) ; 1H	142,0	6,90 ; dd (16,1 ; 4,3) ; 1H	141,6
4'	6,45 ; dd (16,1 ; 1,8) ; 1H	130,7	6,45 ; dd (16,1 ; 1,8) ; 1H	131,0
5'	-	200,8	-	200,7
6'	2,58 ; t (7,1) ; 2H	40,8	2,56 ; t (7,1) ; 2H	40,9
7'	1,59 ; m ; 2H	24,6	1,59 ; m ; 2H	24,5
8'	1,27 ; m ; 2H	29,7 – 29,9	1,27 ; m ; 2H	29,7 – 29,9
9'	1,27 ; m ; 6H		1,27 ; m ; 6H	
10'				
11'				
12'	1,27 ; m ; 2H	32,3	1,27 ; m ; 2H	32,3
13'	1,27 ; m ; 2H	23,1	1,27 ; m ; 2H	23,1
14'	0,88 ; t (6,9) ; 3H	14,3	0,88 ; t (6,9) ; 3H	14,3

## b) Analyse structurale des molécules M618T2.82

### (1) Analyse par spectroscopie ultraviolet

Le spectre UV des molécules M618T2.82 présente un maximum d'absorption à 245 nm.

### (2) Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse du chromatogramme UHPLC-MS de la molécule M618T2.82 avec un gradient optimisé montre la présence de deux pics avec des temps de rétention proche à 11,01 et 11,39 minutes (Figure 97).

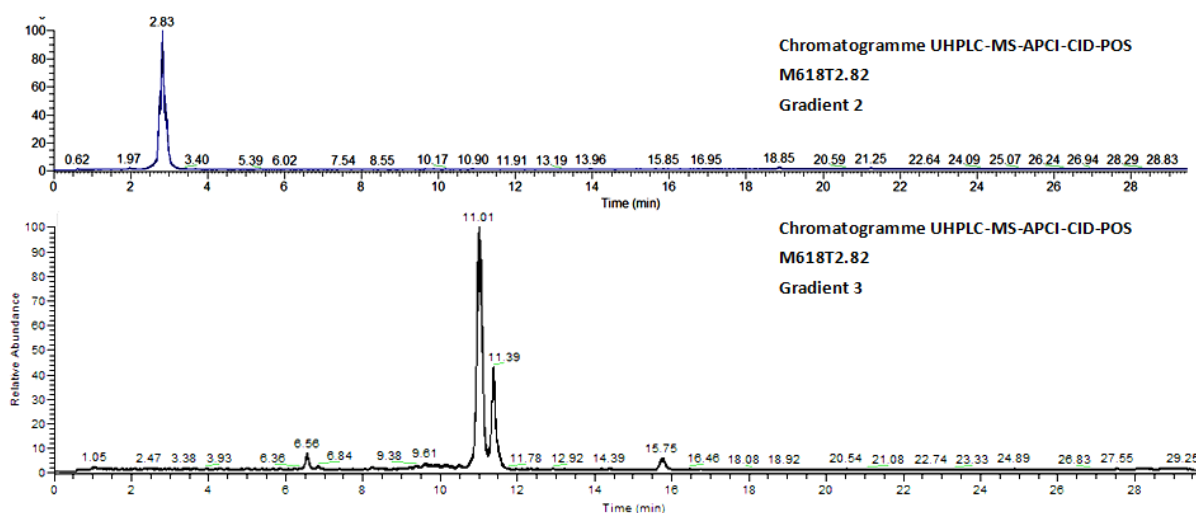


Figure 97: Chromatogrammes UHPLC-MS des molécules M618T2.82 avec le gradient 2 et le gradient optimisé 3

Les spectres de masse APCI-CID-POS haute résolution pour les deux pics sont identiques et présentent des adduits mais pas l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  (Figure 98). Cependant, en observant le spectre de masse haute résolution APCI-CID-NEG on peut voir un ion moléculaire  $[M-H]^-$  de  $m/z$  617,3320 suggérant une formule brute de  $C_{34}H_{50}O_{10}$  pour les molécules neutres (Figure 99). Nous sommes donc en présence de deux isomères présentant une différence de deux protons par rapport à la molécule précédente M616T3.96, qui pourrait provenir de la réduction de la fonction cétone en fonction alcool. Comme pour les molécules précédentes tous les fragments caractéristiques du noyau huratoxigénine sont présents (Figure 100).

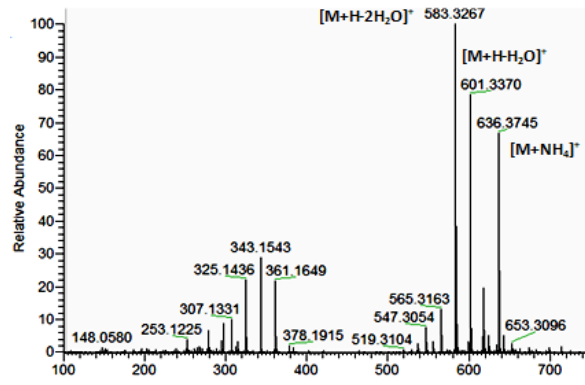


Figure 98 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M618T2.82

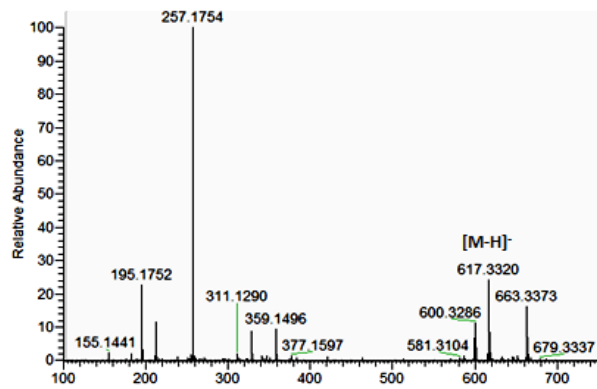


Figure 99 : Spectre de masse APCI-CID-NEG haute résolution de la molécule M618T2.82

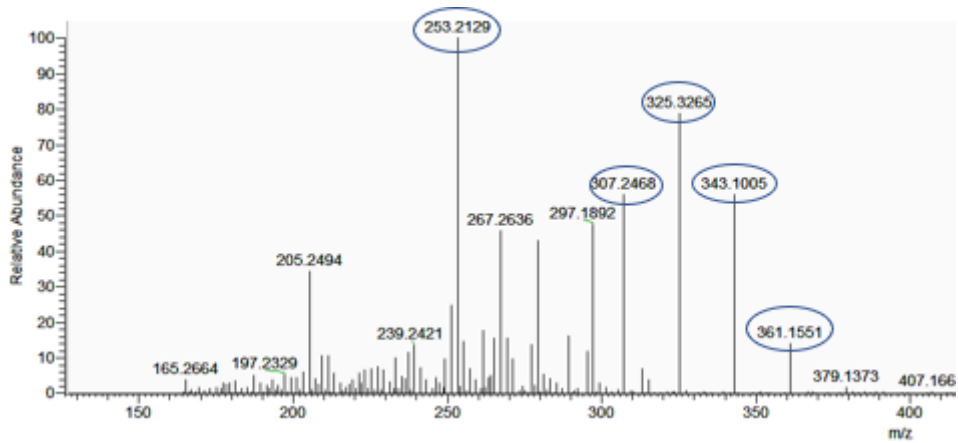


Figure 100: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M618T2.82

### (3) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

Nous avons émis l'hypothèse que les molécules M618T2.82 présentent la même structure que les molécules M616T3.96, hormis la réduction de la fonction cétone en 5' en une fonction alcool. L'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  nous a permis de confirmer cette hypothèse. En effet, le signal à  $\delta_{\text{C}}$  200,8 est absent et un signal supplémentaire apparaît à  $\delta_{\text{C}}$  72,4. Etant donné que tous les signaux correspondant au noyau daphnane sont présents, nous supposons qu'il s'agit bien de la fonction cétone en 5' qui est réduite (Figure 102, Figure 103, Tableau 9). Nous pouvons aisément confirmer la position de la fonction hydroxyle grâce aux différentes corrélations HSQC, HMBC et COSY (Figure 101).

- H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  4,46) corrèle en HMBC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  118,1 identifié comme le C-1'(C), confirmant la position de la chaîne latérale.
- Un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  4,38 corrèle en HMBC avec le C-1' ce qui permet de le positionner en 2'. H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  4,38) est porté par un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  72,5 (C-2') caractéristique d'un carbone portant une fonction alcool.
- H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  4,38) montre une corrélation COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  5,88 intégrant pour deux protons éthyléniques et qui lui-même montre une corrélation avec un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  4,13. Ainsi, H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  5,88), H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  5,88) et H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  4,13) sont positionnés sur la chaîne ; ils sont portés par des carbones à  $\delta_{\text{C}}$  137,3 (C-3'), 126,8 (C-4') et 72,4 (C-5'), respectivement.

Cette molécule présente donc une insaturation sur sa chaîne latérale en position 3',4' et deux fonctions alcools en 2' et 5' ce qui confirme notre hypothèse de départ. Les signaux des deux protons éthyléniques étant confondus, nous n'avons pas pu déterminer de constante de couplage. Cependant, nous avons enregistré un spectre de RMN  $^1\text{H}$  dans du benzène deutéré ce qui a permis de séparer les deux signaux. La résolution n'est toujours pas optimale mais nous pouvons déduire la présence de deux doublets dédoublés avec des constantes de 15,3 Hz et 5,6 Hz. Nous pouvons donc en déduire que la double liaison en 3',4' est en configuration *E*.

Si l'on observe les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du mélange M618T2.82 on ne remarque pas deux systèmes bien définis comme pour la molécule M616T3.96. Cependant, certains carbones sont dédoublés mais possèdent des déplacements chimiques très proches. Ils sont indiqués en bleu dans le Tableau 9. Nous supposons que ces molécules sont des diastéréoisomères avec une différence de configuration au niveau du C-2' et/ou C-5'. Cependant, on observe aussi la présence de signaux faibles à  $\delta_c$  136,7 et 125,5. La présence d'un mélange d'isomères *Z* et *E* peut aussi être conjecturé.

D'après l'intégration des signaux du spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ , le mélange a une proportion 75/25 en faveur de l'un des isomères.

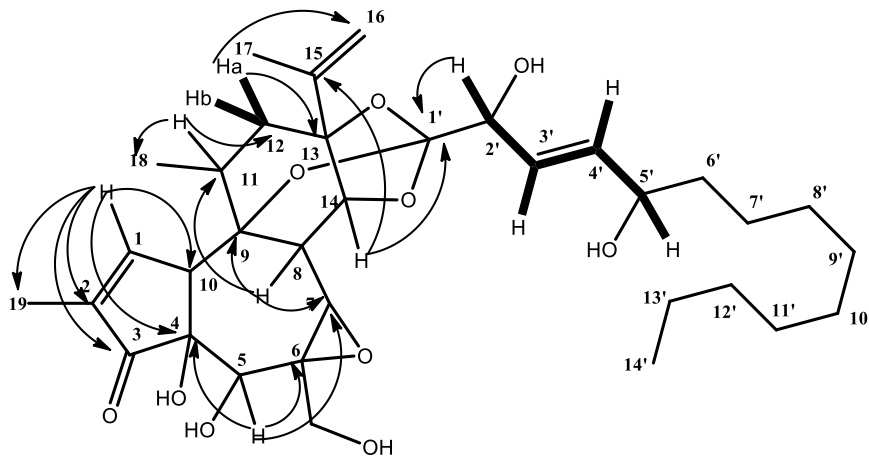


Figure 101: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M618T2.82

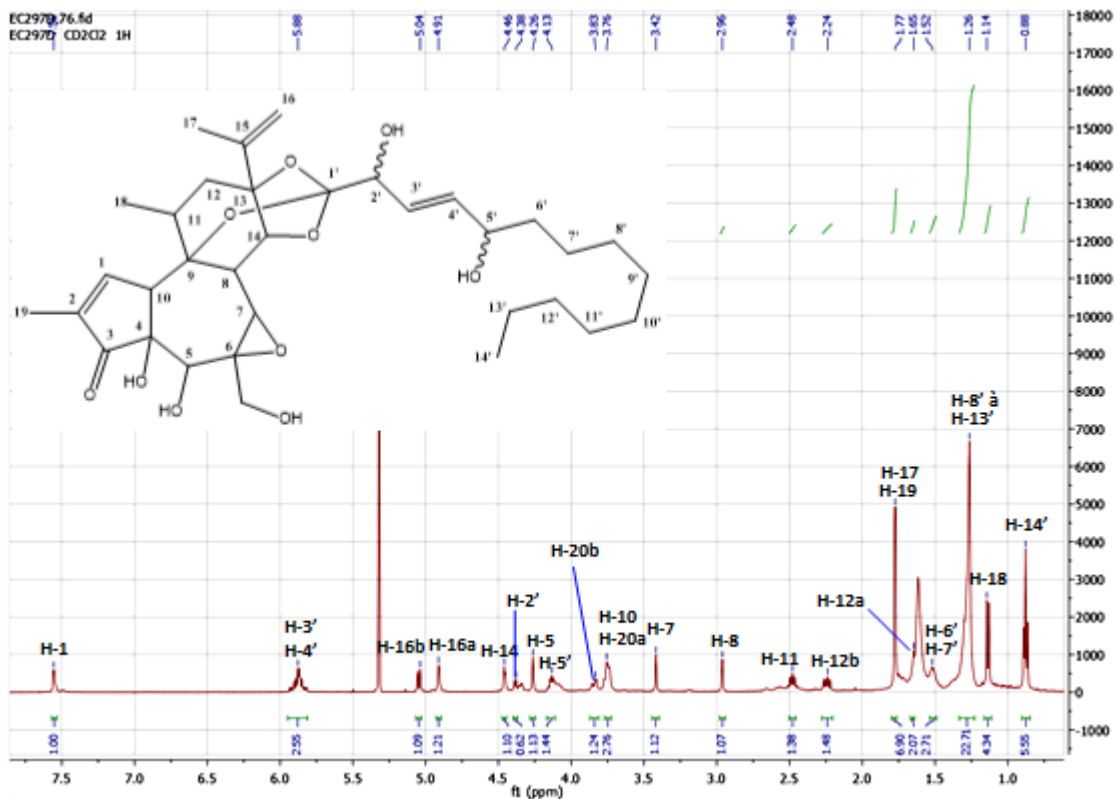


Figure 102: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la molécule M618T2.82 dans du  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$

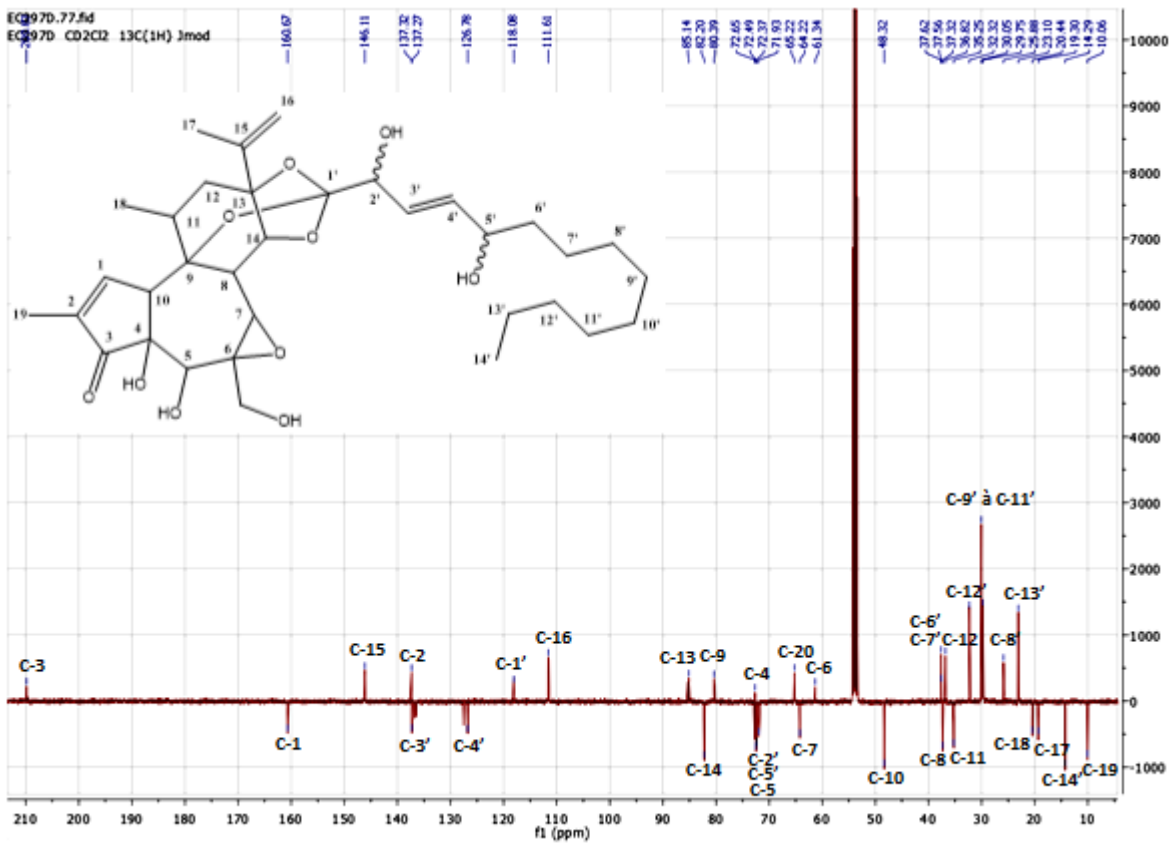


Figure 103: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  de la molécule M618T2.82 dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$



Tableau 9: Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M618T2.82 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,56 ; se ; 1H	160,7
2	-	137,3
3	-	209,8
4	-	72,7
5	4,26 ; s ; 1H	71,9
6	-	61,3
7	3,42 ; s ; 1H	64,2
8	2,96 ; m ; 1H	37,3
9	-	80,4
10	3,76 ; m ; 1H	48,3
11	2,48 ; m ; 1H	35,3
12a	1,65 ; m ; 1H	36,8
12b	2,24 ; dd (14,5 ; 8,6) ; 1H	
13	-	85,1
14	4,46 ; m ; 1H	82,2
15	-	146,1
16a	4,91 ; m ; 1H	111,6
16b	5,04 ; s ; 1H	
17	1,77 ; se ; 3H	19,3
18	1,14 ; d (7,0) ; 3H	20,4
19	1,77 ; se ; 3H	10,1
20a	3,76 ; m ; 1H	65,2
20b	3,83 ; m ; 1H	
1'	-	118,1
2'	4,38 ; d (5,6) ; 1H	72,5
3'	5,88 ; m ; 1H	137,3
4'	5,88 ; m ; 1H	126,8
5'	4,13 ; m ; 1H	72,4
6'	1,52 ; m ; 2H	37,6
7'	1,26 ; se ; 2H	25,9
8'	1,26 ; se ; 8H	29,8 – 30,1
9'		
10'		
11'		
12'	1,26 ; se ; 2H	32,3
13'	1,26 ; se ; 2H	23,1
14'	0,88 ; t (6,9) ; 3H	14,3

### c) Analyse structurale des molécules M616T3.49

#### (1) Analyse par spectroscopie ultraviolet

Le spectre UV des molécules M616T3.49 présente un maximum d'absorption à 242 nm.

#### (2) Analyse par spectrométrie de masse

La fraction M616T3.49 est aussi un mélange de plusieurs molécules. En effet, lors de son analyse avec un gradient optimisé (gradient 3), 4 pics apparaissent sur le chromatogramme (Figure 104).

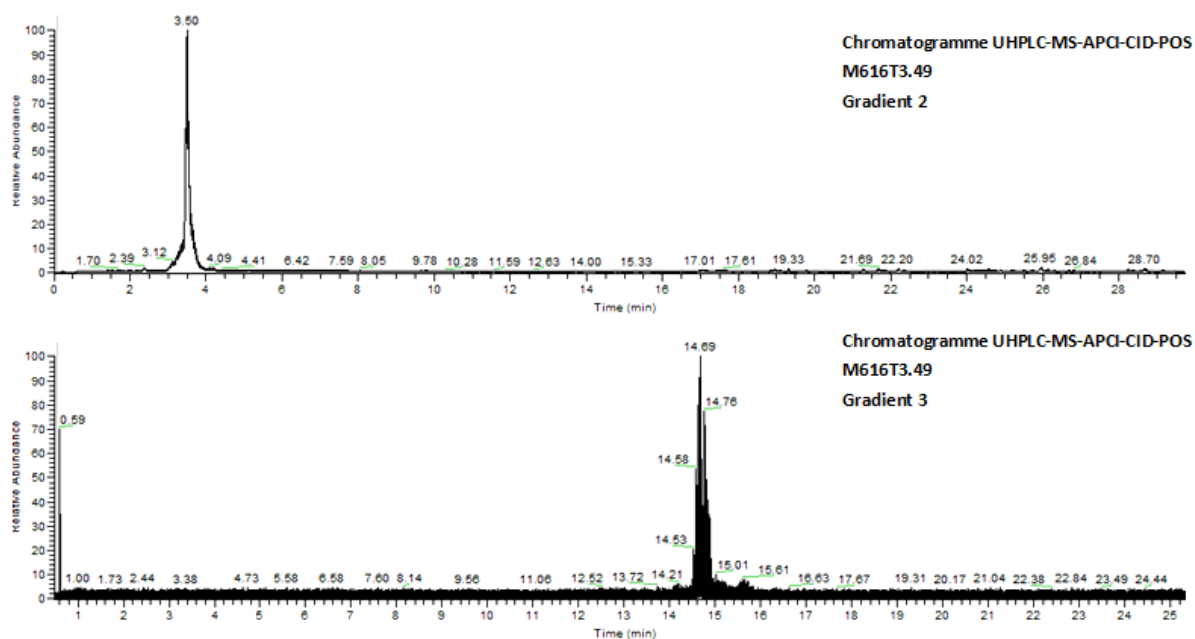


Figure 104: Chromatogrammes UHPLC-MS-APCI-CID-POS de la fraction M616T3.49

Si l'on s'intéresse aux spectres MS de ces quatre pics on remarque que tous possèdent un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  617,3326 suggérant une formule brute de  $C_{34}H_{48}O_{10}$  pour les molécules neutres (Figure 105), comme les molécules M616T3.96 (OH-2' et céto-5').

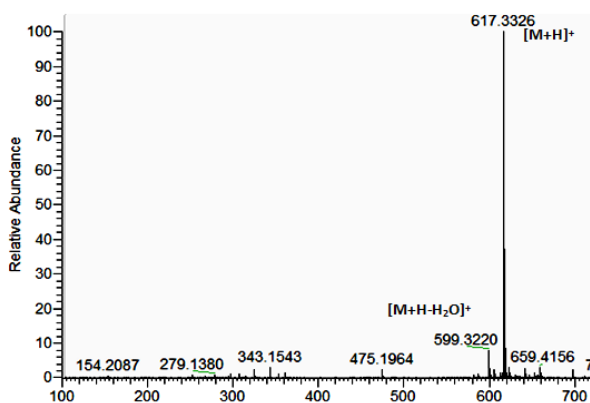


Figure 105 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M616T3.49

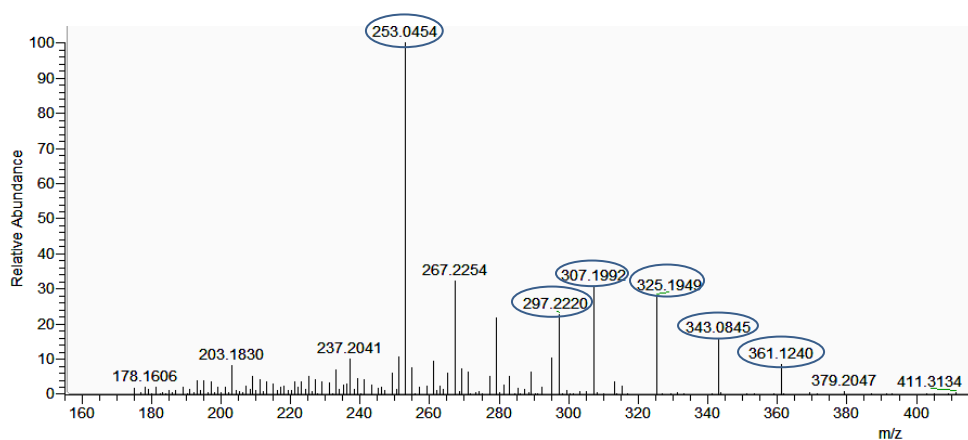


Figure 106: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M616T3.49

Tous les fragments caractéristiques de la huratoxigénine (Figure 106) sont présents, ces molécules sont donc des isomères de la molécule M616T3.96.

### (3) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

De la même manière que pour les molécules précédentes, la présence d'un noyau huratoxigénine a été mise en évidence par la présence de tous les signaux caractéristiques de ce type de noyau sur les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figure 108, Figure 109).

Celle-ci présente aussi une chaîne latérale orthoestérifiée. En effet, on voit un signal à  $\delta_{\text{C}}$  115,9 (C-1') qui signe la présence d'un groupement orthoester. Grâce aux différentes corrélations HSQC, HMBC et COSY la structure de la chaîne latérale a pu être élucidée.

- Ces molécules possèdent une insaturation en 2',3'. En effet, un doublet élargi à  $\delta_H$  5,97 corrèle en HMBC avec le C-1' ( $\delta_C$  115,9), ce proton est positionné en H-2' et est porté par le C-2' (CH) à  $\delta_C$  126,3. H-2' ( $\delta_H$  5,97) montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un doublet de doublet dédoublé à  $\delta_H$  6,28 associé à un carbone éthylénique à  $\delta_C$  133,7 (C-3'). Les constantes de couplage des protons éthyléniques sont égales à 15,8 Hz. La double liaison est donc en configuration *E*.
- Nous pouvons aussi mettre en évidence une fonction hydroxyle en 4', grâce à la corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  entre H-3' et un multiplet à  $\delta_H$  4,33. Nous pouvons ainsi placer le protons H-4' ( $\delta_H$  4,33) et son carbone correspondant C-4' à  $\delta_C$  69,5 (CH-OH).
- On remarque la présence de deux signaux caractéristiques de carbones impliqués dans une fonction époxyde à  $\delta_C$  60,1 et 55,8. Le proton à  $\delta_H$  2,86 corrèle en HMBC avec le signal à  $\delta_C$  55,8 et montre aussi une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec H-4'. Ainsi, nous avons pu placer les protons H-5' ( $\delta_H$  2,86) et H-6' ( $\delta_H$  2,97) portés par les carbones C-5' (CH) à  $\delta_C$  60,1 et C-6' (CH) à  $\delta_C$  55,8.

La molécule M616T3.49 présente donc un noyau huratoxigénine avec une chaîne latérale orthoestérifiée possédant une double liaison en 2',3' ; une fonction hydroxyle en 4' et une fonction époxyde en 5',6'. La présence d'une fonction hydroxyle en C-4' et époxyde en C-5'/C-6' permet la présence de  $2^3 = 8$  diastéréoisomères différents. Si l'on observe les spectres de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  du mélange M616T3.49 on remarque certains carbones dédoublés, indiqués en bleu dans le Tableau 10. Parmi les 3 carbones asymétriques oxydés, seul C-5' n'est pas dédoublé.

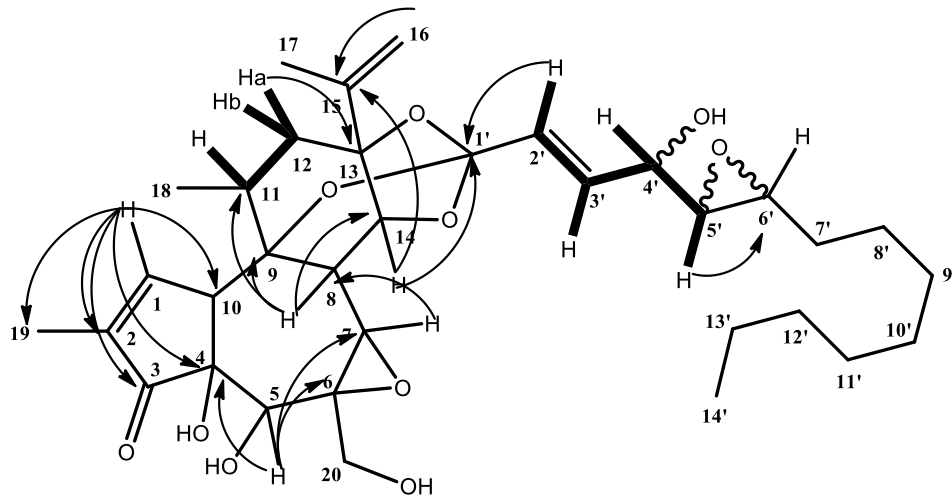


Figure 107: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M616T3.49

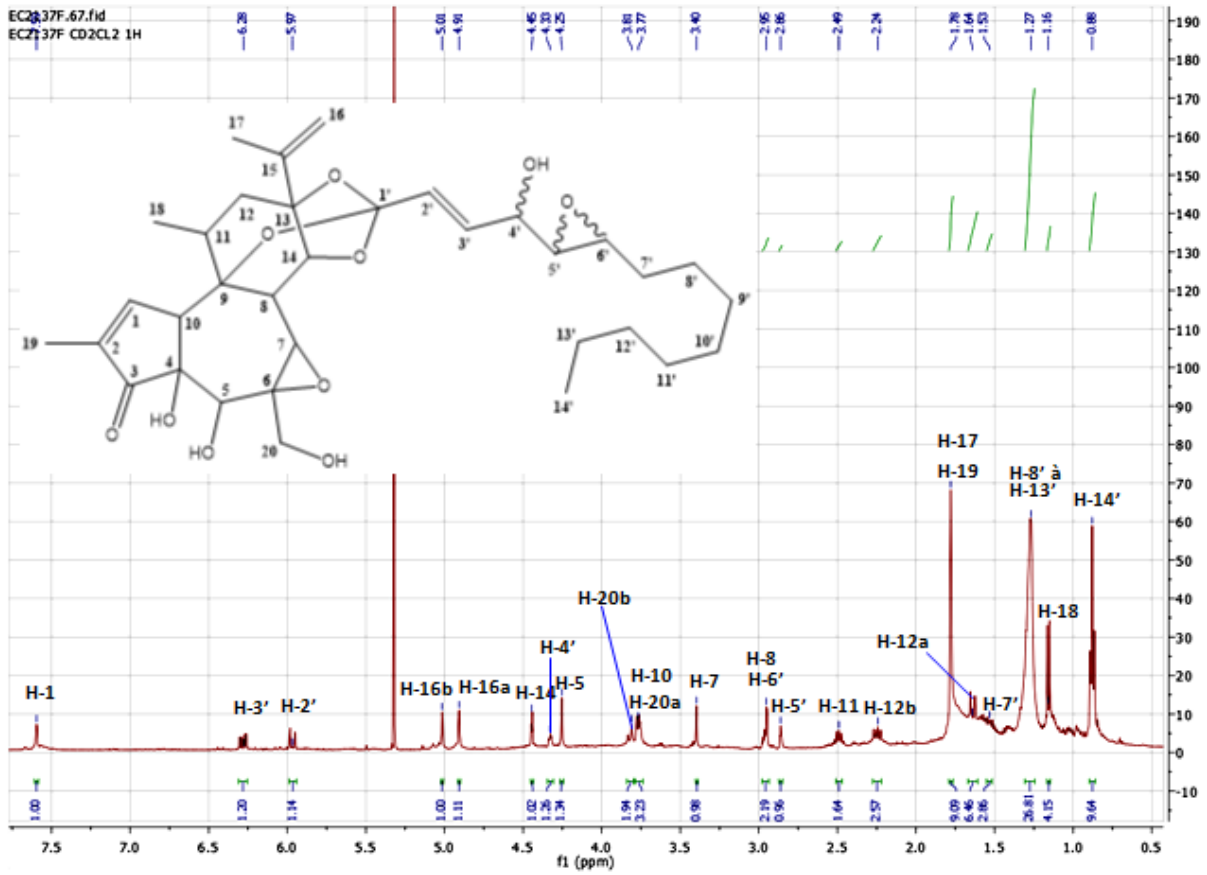


Figure 108: Spectre RMN <sup>1</sup>H de la fraction M616T3.49 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

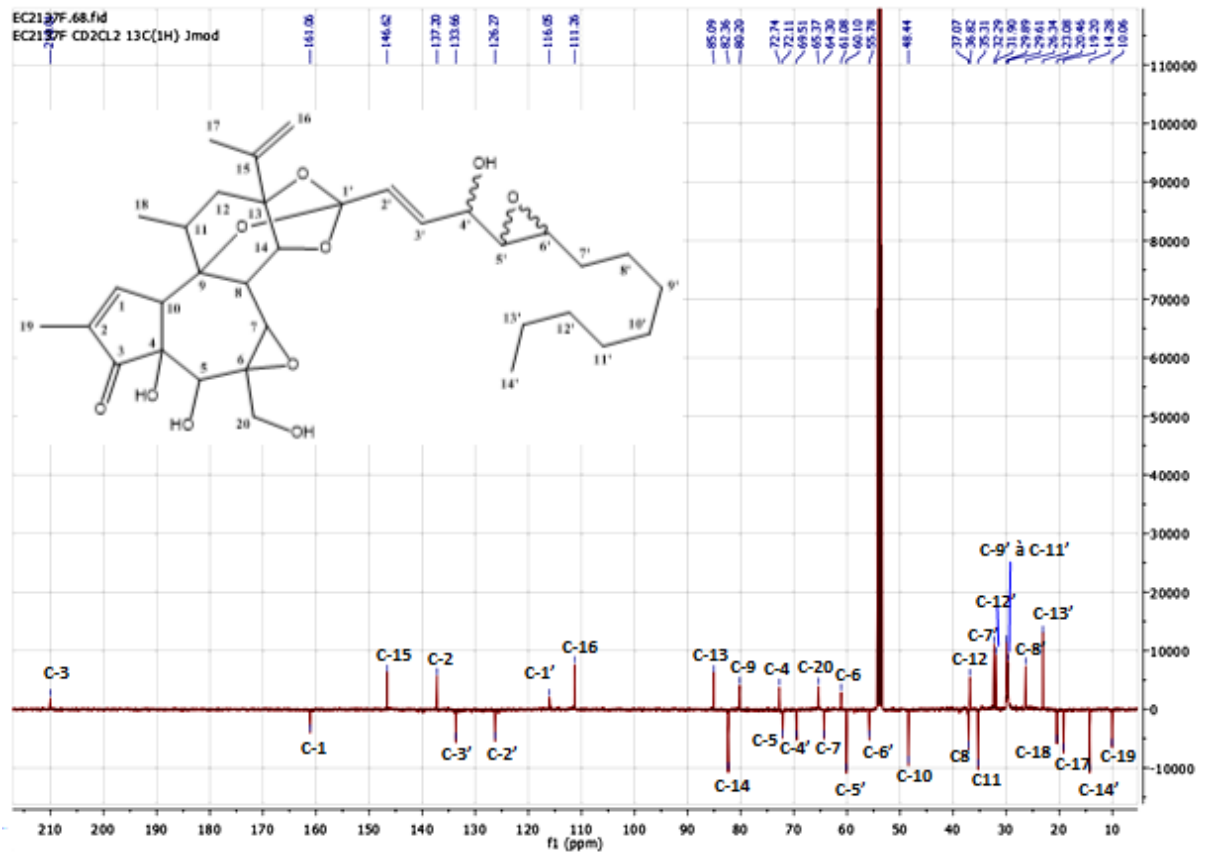


Figure 109: Spectre RMN <sup>13</sup>C de la fraction M616T3.49 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 10: Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M616T3.49 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,59 ; m ; 1H	161,1
2	-	137,2
3	-	210,0
4	-	72,7
5	4,25 ; s ; 1H	72,1
6	-	61,1
7	3,40 ; s ; 1H	64,3
8	2,95 ; d (2,4) ; 1H	37,1
9	-	80,2
10	3,77 ; m ; 1H	48,4
11	2,49 ; m ; 1H	35,3
12a	1,64 ; d (14,4) ; 1H	36,8
12b	2,24 ; dd (14,4 ; 8,6) ; 1H	
13	-	85,1
14	4,45 ; d (2,4) ; 1H	82,4
15	-	146,6
16a	4,91 ; se ; 1H	111,3
16b	5,01 ; se ; 1H	
17	1,78 ; s ; 3H	19,2
18	1,16 ; d (7,1) ; 3H	20,5
19	1,78 ; s ; 3H	10,1
20a	3,77 ; m ; 1H	65,4
20b	3,81 ; d (12,4) ; 1H	
1'	-	<i>116,1</i>
2'	5,97 ; de (15,8) ; 1H	<i>126,3</i>
3'	6,28 ; ddd (15,8 ; 5,6 ; 2,0) ; 1H	<i>133,7</i>
4'	4,33 ; m ; 1H	<i>69,5</i>
5'	2,86 ; m ; 1H	60,1
6'	2,97 ; m ; 1H	<i>55,8</i>
7'	1,53 ; m ; 2H	31,9
8'	1,27 ; m ; 2H	26,3
9'	1,27 ; m ; 6H	29,6 – 29,9
10'		
11'		
12'	1,27 ; m ; 2H	32,3
13'	1,27 ; m ; 2H	23,1
14'	0,88 ; t (6,9) ; 3H	14,3

d) *Analyse structurale des molécules M544T3.10*(1) *Analyse par spectroscopie ultraviolet*

Le spectre UV des molécules M544T3.10 présente un maximum d'absorption à 245 nm.

(2) *Analyse par spectrométrie de masse*

De la même manière que pour les molécules précédentes, l'analyse du chromatogramme UHPLC-MS de la molécule M544T3.10 met en évidence deux pics avec des temps de rétention très proches (Figure 110).

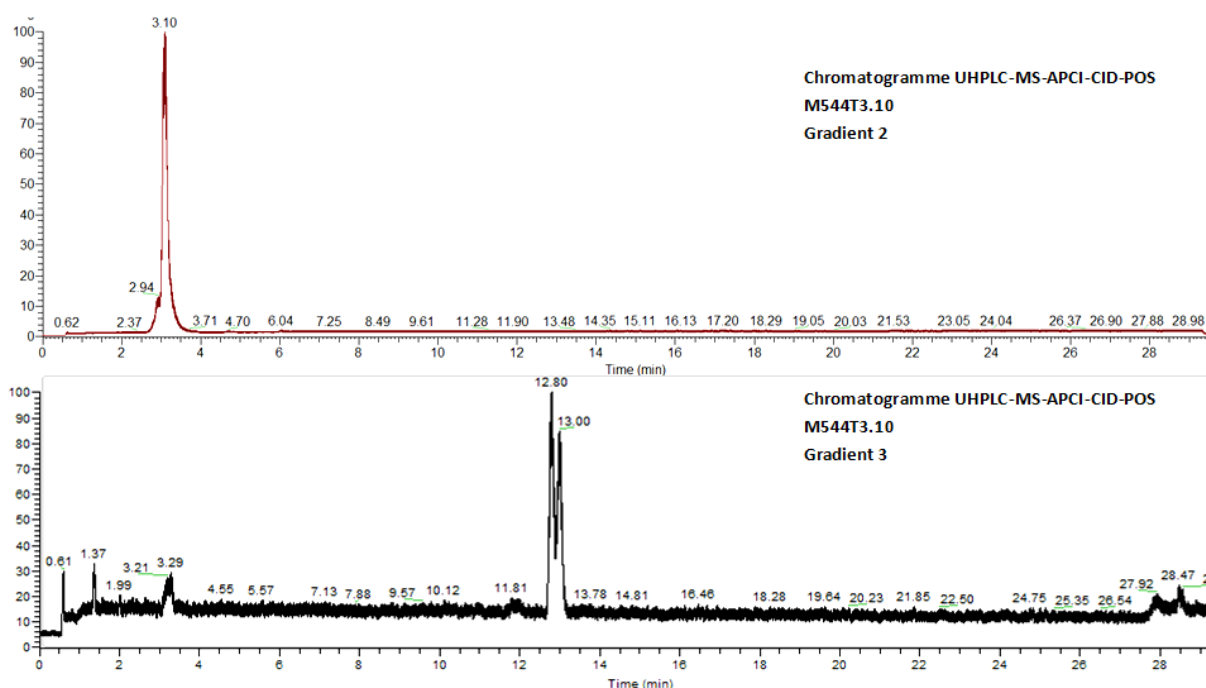


Figure 110: Chromatogrammes UHPLC-MS des molécules M544T3.10 avec le gradient 2 et le gradient optimisé 3

Le spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution des molécules M544T3.10 présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  545,2751, pour les deux pics, ce qui permet de déduire une formule brute de  $C_{30}H_{40}O_9$  (Figure 111). Aucune molécule de type daphnane possédant cette formule brute n'a été décrite dans la littérature. Ces molécules semblent être des analogues de la huratoxine car leur spectres MS-MS présentent tous les fragments caractéristiques du noyau



huratoxigénine (Figure 112). Selon leur formule brute ces composés posséderaient une chaîne latérale à 10 atomes de carbones avec un atome d'oxygène.

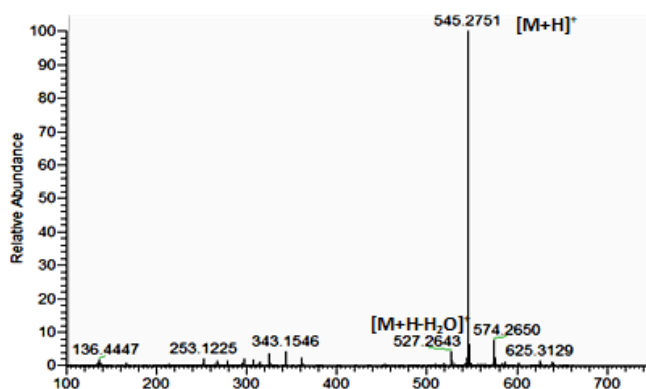


Figure 111: Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M544T3.10

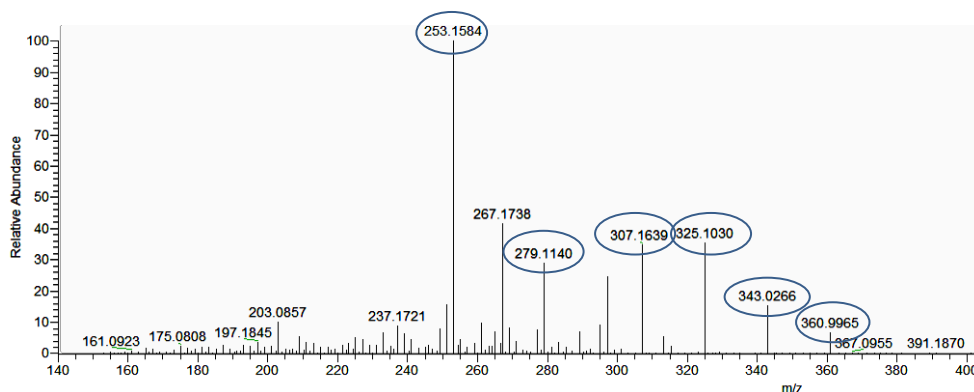


Figure 112: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M544T3.10

### (3) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La présence d'un noyau huratoxigénine, pour les molécules M544T3.10, a été mise en évidence par la présence de tous les signaux caractéristiques de ce type de noyau sur les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figure 113, Figure 114, Figure 115, Tableau 11). Concernant la chaîne latérale orthoestérifiée, l'analyse des différentes corrélations HSQC, HMBC et COSY nous a permis de déterminer sa structure.

- H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  4,43) corrèle en HMBC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  115,8, identifié comme le C-1', confirmant la position de la chaîne latérale orthoestérifiée.

- Ces molécules présentent une double liaison en 2',3'. En effet, un multiplet à  $\delta_H$  6,00 (H-2' et H-3') corrèle en HMBC avec le C-1'. Ces protons sont portés par des carbones éthyléniques à  $\delta_C$  127,9 et 133,9 positionnés en C-2' (CH) et C-3' (CH) respectivement. Les protons H-2' et H-3' étant confondus nous n'avons pas été en mesure de déterminer une constante de couplage. Nous avons réalisé des spectres de RMN  $^1H$  dans du benzène et du méthanol deutérés afin de les séparer, mais sans résultats. Nous ne sommes donc pas en mesure de déterminer la configuration de la double liaison en 2',3'.
- Les signaux à  $\delta_C$  57,3 et 61,1 signent la présence d'un groupement époxyde sur la chaîne latérale des molécules M544T3.10. H-2'/H-3' présentent une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un multiplet à  $\delta_H$  3,13 qui lui-même présente une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un multiplet à  $\delta_H$  2,87. Ces protons ont pu être placés en position H-4' ( $\delta_H$  3,13) et H-5' ( $\delta_H$  2,87), porté par les carbones à  $\delta_C$  57,3 (C-5') et 61,1 (C-6'), respectivement.

Les molécules M544T3.10 présentent donc un noyau huratoxigénine avec une chaîne orthoestérifiée à 10 carbones présentant une double liaison en 2',3' et une fonction époxyde en 4',5'. La présence de cette fonction époxyde autorise donc quatre diastéréoisomères qui peuvent être présents en mélange. Les signaux des carbones dédoublés sont indiqués en bleu dans le Tableau 11.

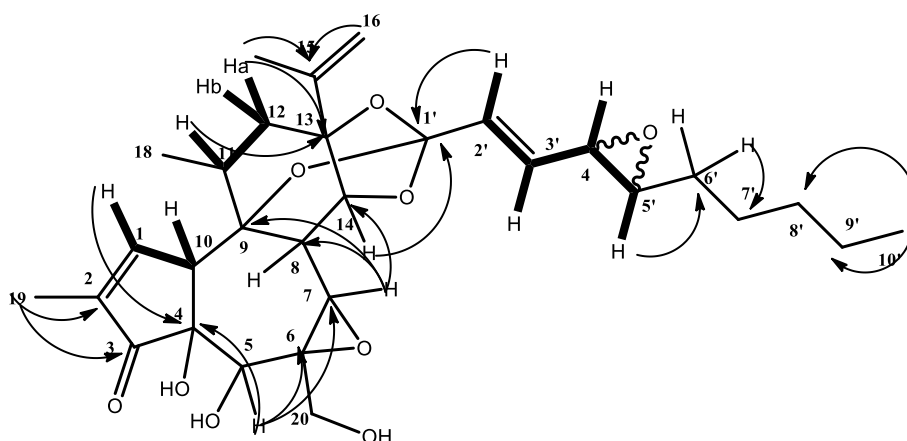


Figure 113: Structure de la molécule M544T3,10 avec les corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras)

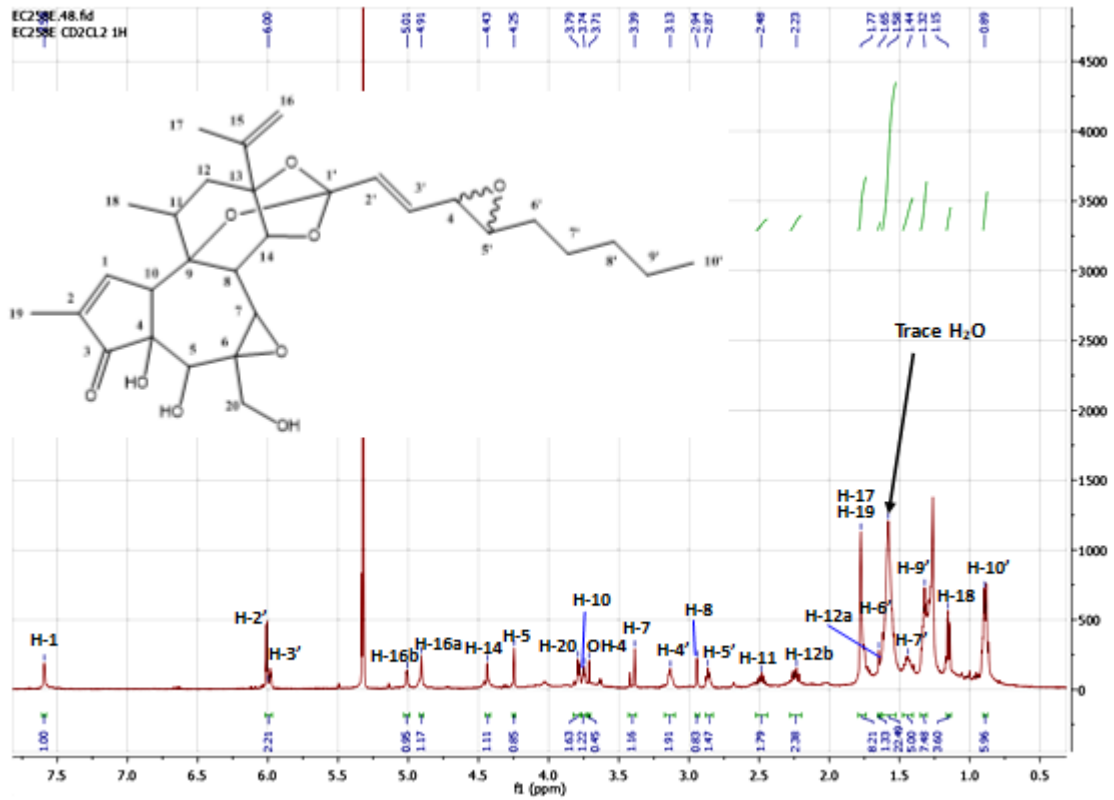


Figure 114: Spectre RMN <sup>1</sup>H de la molécule M544T3,10 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

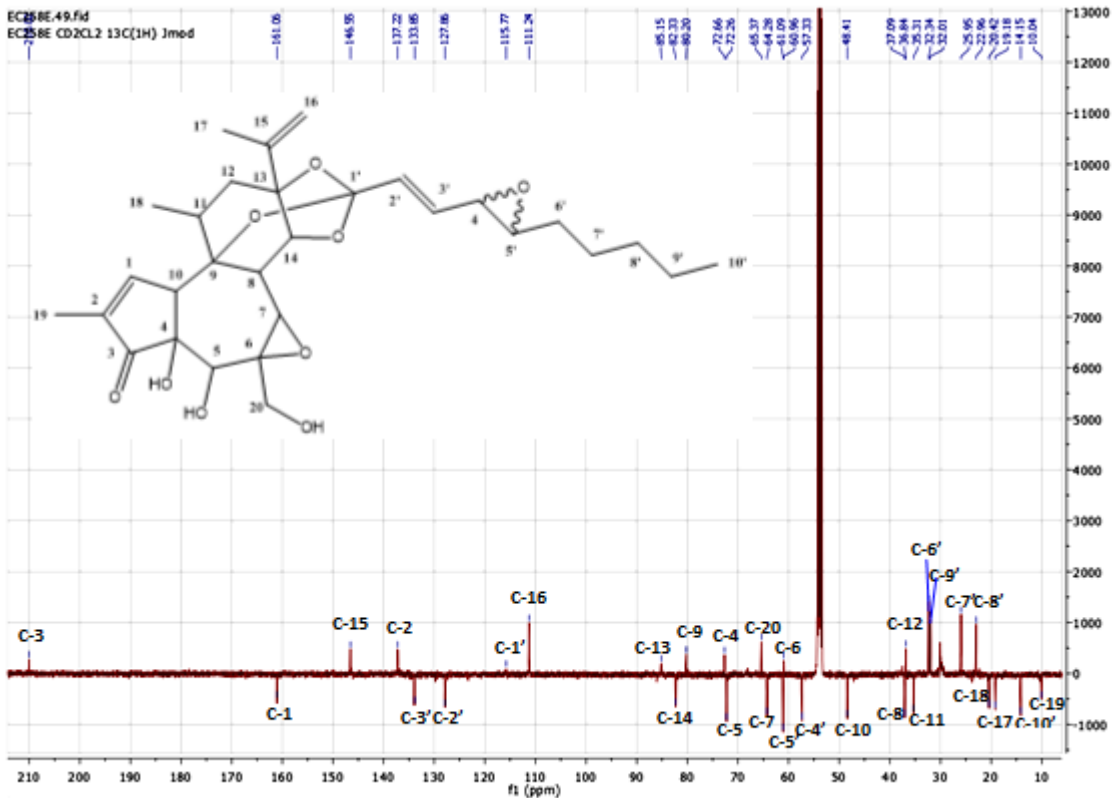


Figure 115: Spectre RMN <sup>13</sup>C de la molécule M544T3,10 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 11 : Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M544T3.10 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,59 ; m ; 1H	161,1
2	-	137,2
3	-	210,0
4	-	72,7
5	4,25 ; s ; 1H	72,3
6	-	61,0
7	3,39 ; s ; 1H	64,3
8	2,94 ; d (2,5) ; 1H	37,1
9	-	80,2
10	3,74 ; m ; 1H	48,4
11	2,48 ; m ; 1H	35,3
12a	2,23 ; m ; 1H	36,8
12b	1,65 ; d (14,4) ; 1H	
13	-	85,2
14	4,43 ; d (2,5) ; 1H	82,3
15	-	146,6
16a	4,91 ; m ; 1H	111,2
16b	5,01 ; m ; 1H	
17	1,77 ; s ; 3H	19,2
18	1,15 ; d (7,2) ; 3H	20,4
19	1,77 ; s ; 3H	10,0
20a	3,77 ; d (12,7) ; 1H	65,4
20b	3,80 ; d (12,7) ; 1H	
1'	-	115,8
2'	6,00 ; m ; 1H	127,9
3'	6,00 ; m ; 1H	133,9
4'	3,13 ; m ; 1H	57,3
5'	2,87 ; m ; 1H	61,1
6'	1,58 ; s ; 2H	32,3
7'	1,44 ; m ; 2H	26,0
8'	1,32 ; m ; 2H	23,0
9'	1,32 ; m ; 2H	32,0
10'	0,89 ; m ; 3H	14,2
OH-4	3,71 ; s ; 1H	-

### e) Analyse structurale des molécules M614T4.92

#### (1) Analyse par spectroscopie ultraviolet

Le spectre UV de la molécule M614T4.92 présente un maximum d'absorption à 245 nm.

#### (2) Analyse par spectrométrie de masse

Contrairement aux molécules précédentes, l'analyse du chromatogramme UHPLC-MS de la molécule M614T4.92 ne montre qu'un seul pic (Figure 116) quel que soit le gradient de solvant utilisé.

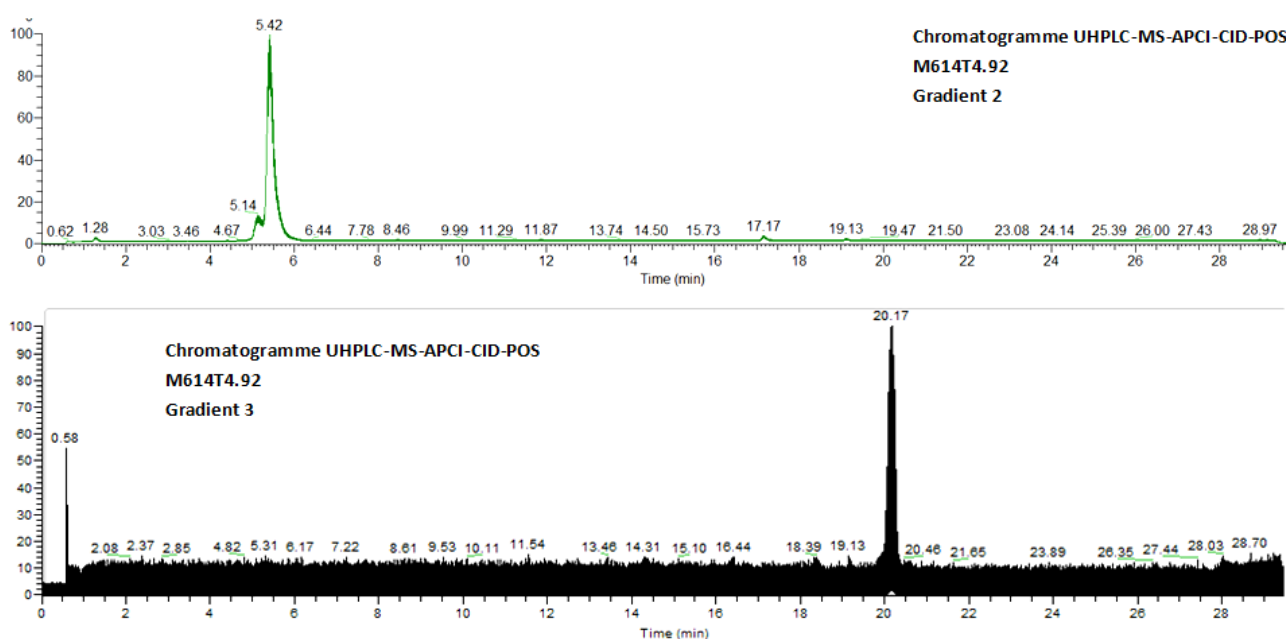


Figure 116: Chromatogrammes UHPLC-MS de la molécule M614T4.92 avec le gradient 2 et la gradient optimisé 3

Le spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la fraction M614T4.92 présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  615,3173 suggérant une formule brute de  $C_{34}H_{46}O_{10}$  pour la molécule neutre (Figure 117). Cette molécule présente donc une différence de 2 uma avec la molécule M616T3.49. Nous émettons l'hypothèse que cette différence soit due à l'oxydation de la fonction hydroxyle en 4' en fonction cétone. Le spectre MS-MS de la molécule M614T4.92

présente les ions diagnostiques du noyau huratoxigénine (Figure 118). Nous proposons donc que cette molécule possède un noyau huratoxigénine avec une chaîne latérale orthoestérifiée présentant une double liaison en 2',3', une fonction cétone en 4' et une fonction époxyde en 5',6'.

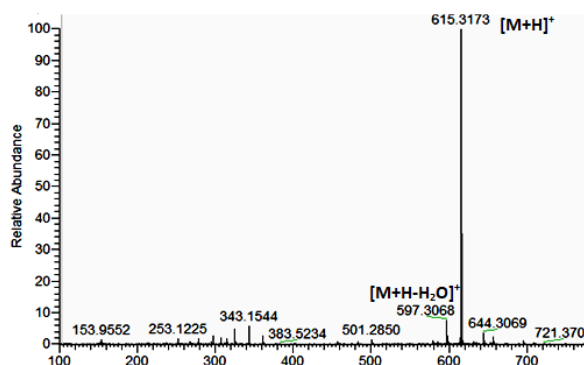


Figure 117 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M614T4.92

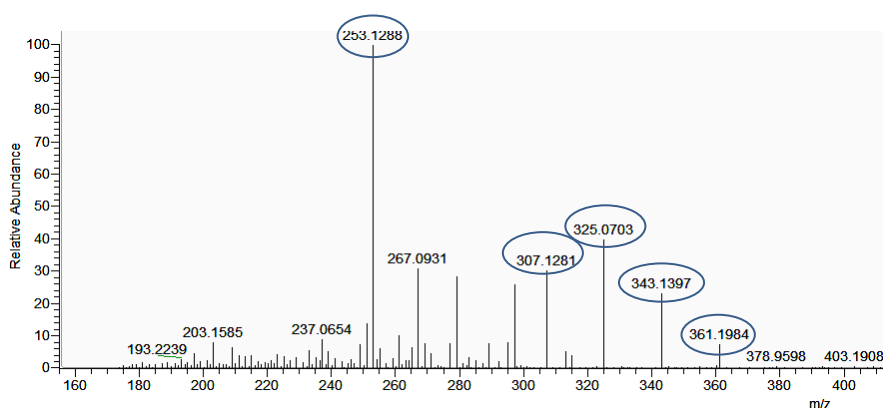


Figure 118: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M614T4.92

### (3) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

Grâce aux différentes corrélations HSQC, HMBC et COSY tous les signaux du noyau daphnane de la molécule M614T4.92 ont pu être attribués (Tableau 12, Figure 120, Figure 121). Les carbones quaternaires C-3 ( $\delta_C$  210,0) et C-1' ( $\delta_C$  115,4) ne relaxent pas sur le spectre de RMN  $^{13}C$ . Ils ont pu être attribués grâce à leurs corrélations HMBC respectives avec H-1 ( $\delta_H$  7,58) et H-14 ( $\delta_H$  4,45) (Figure 119). Cette molécule étant un analogue des molécules précédentes, seules les différences structurales sur la chaîne latérale vont être détaillées ici.

- H-14 ( $\delta_H$  4,45) corrèle en HMBC avec le carbone à  $\delta_C$  115,4 identifié comme le C-1'(C), confirmant la position de la chaîne latérale orthoestérifiée.
- La présence d'une insaturation en 2',3' est confirmée par les corrélations HMBC entre un doublet dédoublé à  $\delta_H$  6,01 qui corrèle à la fois avec le C-1' ( $\delta_C$  115,4) et avec un signal à  $\delta_C$  130,3. Ce proton est positionné en H-3' ( $\delta_H$  6,01) et est porté par le C-3' (CH) à  $\delta_C$  131,4. En effet, nous ne positionnons pas ce proton en H-2' car il montre aussi une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un signal à  $\delta_H$  3,50 porté par un carbone à  $\delta_C$  57,0 placé en 4'. Le carbone à  $\delta_C$  130,3 est donc positionné en C-2' (CH) et porte un proton à  $\delta_H$  6,11. Les déplacements chimiques du C-2' ( $\delta_C$  130,3) et C-3' ( $\delta_C$  131,4) sont caractéristiques de carbones éthyléniques. Les constantes de couplage des protons H-2' et H-3' sont de l'ordre de 15 Hz. La double liaison en 2',3' possède donc une configuration *E*.
- C-4' ( $\delta_C$  57,0) présente un déplacement chimique caractéristique d'un carbone impliqué dans une fonction époxyde. De plus, H-4' ( $\delta_H$  3,50) corrèle en HMBC avec un signal à  $\delta_C$  61,0 (C-5') qui porte un proton à  $\delta_H$  3,44 (H-5'). La molécule M614T4.92 présente donc une fonction époxyde en 4',5'.
- De plus, on remarque un signal à  $\delta_C$  206,1 caractéristique d'un carbone impliqué dans un groupement cétone. Celui-ci a pu être placé en C-6' grâce à la corrélation HMBC entre H-5' ( $\delta_H$  3,44) et C-6' ( $\delta_C$  206,1).

Cette molécule présente donc un noyau huratoxigénine avec une chaîne latérale orthoestérifiée comportant une insaturation en 2',3', une fonction époxyde en 4',5' et une fonction cétone en 6'. Cependant, l'analyse des spectres de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  met en avant la présence d'un mélange. En effet, de nombreux signaux de carbones et de protons sont dédoublés. Ils sont indiqués en bleu dans le Tableau 12. Au vu des déplacements chimiques très proches des deux systèmes de signaux, ainsi qu'à la présence d'un seul pic et d'un seul ion moléculaire sur les chromatogrammes UHPLC-MS, nous supposons que nous sommes en présence d'un mélange de diastéréoisomères qui peuvent être co-élués malgré la mise au point

d'un gradient optimisé. En effet, la fonction époxyde en 4',5' peut entraîner quatre configurations différentes.

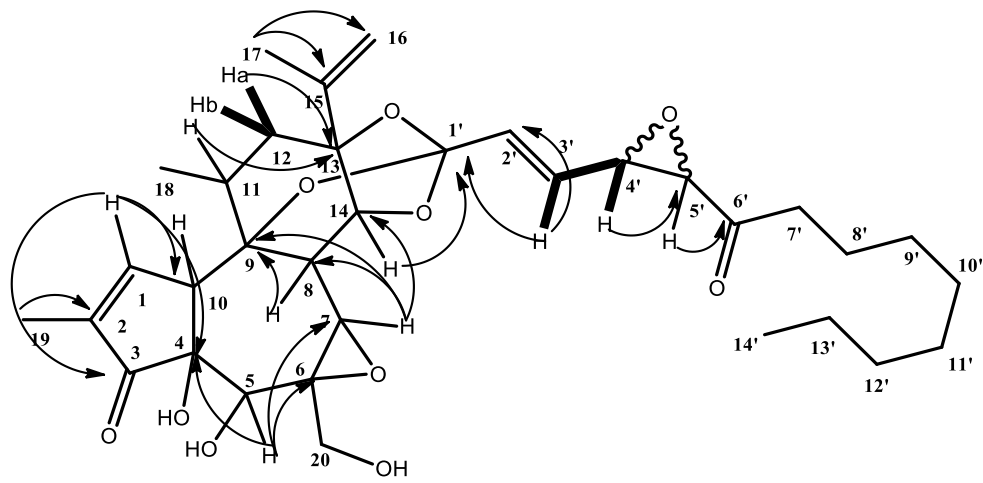


Figure 119: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M614T4.92



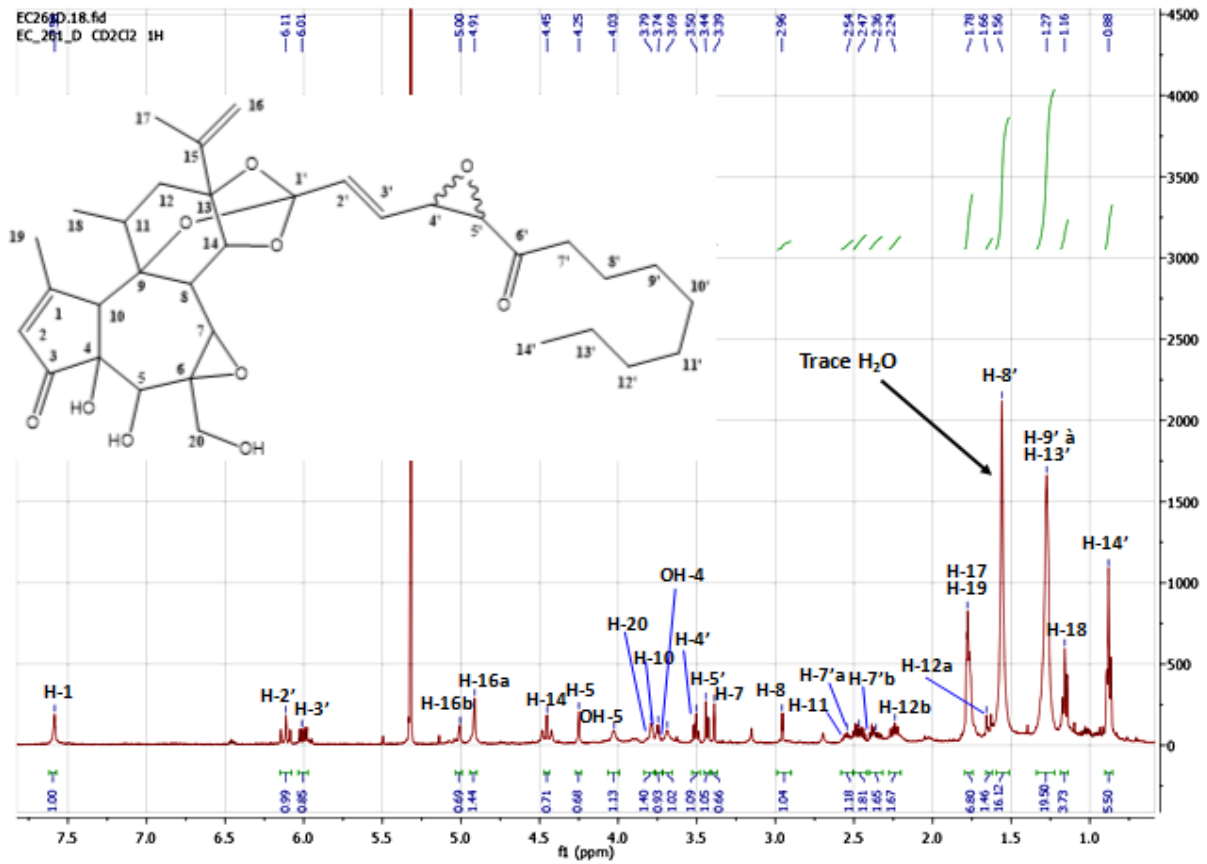


Figure 120: Spectre de RMN <sup>1</sup>H de la molécule M614T4.92 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

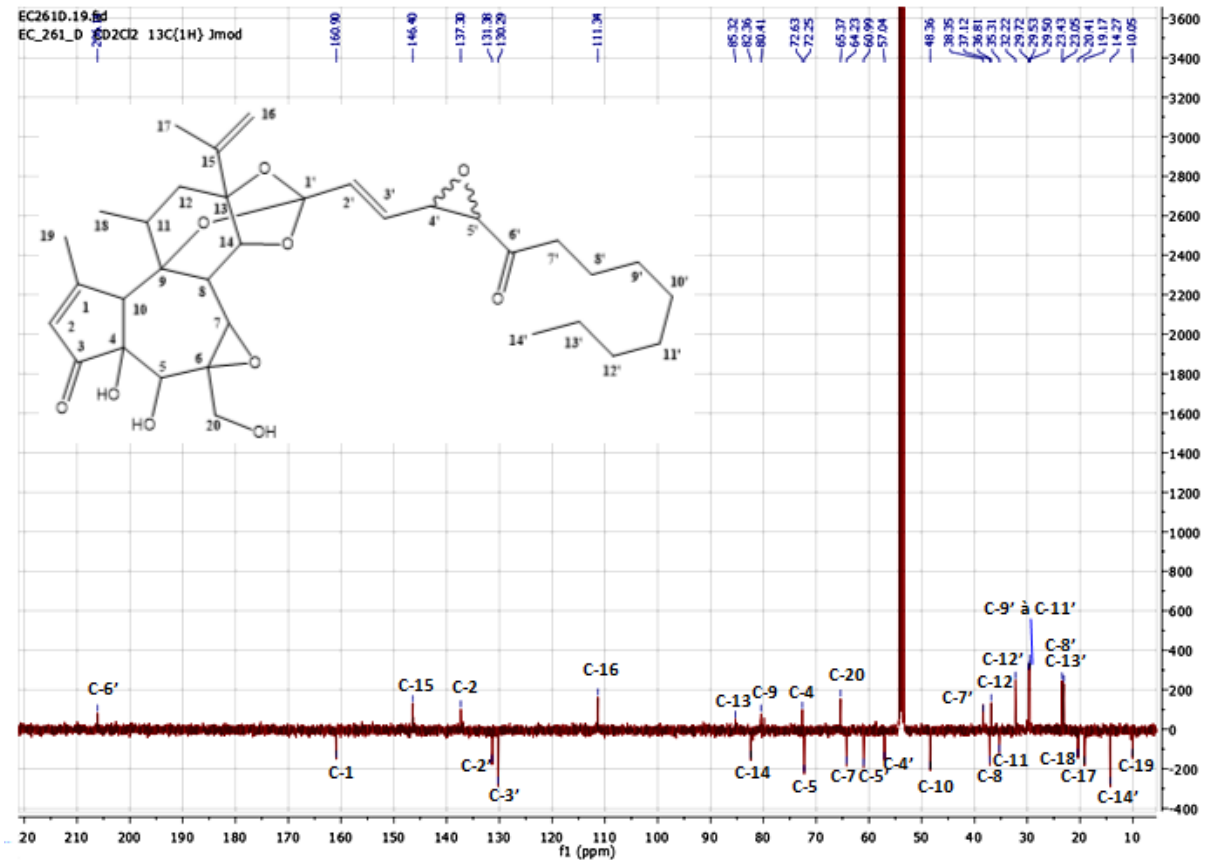


Figure 121 : Spectre de RMN <sup>13</sup>C de la molécule M614T4.92 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 12: Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M614T4.92 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$	
1	7,58 ; m ; 1H	160,9	
2	-	137,3	
3	-	210,0	
4	-	72,6	
5	4,25 ; s ; 1H	72,3	
6	-	61,2	
7	3,39 ; s ; 1H	64,2	
8	2,96 ; d (2,5) ; 1H	37,1	
9	-	80,4	
10	3,74 ; m ; 1H	48,4	
11	2,54 ; m ; 1H	35,3	
12a	1,66 ; d (14,4) ; 1H	36,8	
12b	2,24 ; dd (8,6 ; 14,4) ; 1H		
13	-	85,3	
14	4,45 ; d (2,6) ; 1H	82,4	
15	-	146,4	
16a	4,91 ; m ; 1H	111,3	
16b	5,00 ; m ; 1H		
17	1,78 ; m ; 3H	19,2	
18	1,16 ; d (7,2) ; 3H	20,4	
19	1,78 ; m ; 3H	10,1	
20	3,79 ; se ; 2H	65,4	
1'	-	115,4	
2'	6,11 ; dd (1,8 ; 15,7) ; 1H	130,3	
3'	6,01 ; dd (15,7 ; 7,5) ; 1H	131,4	
4'	3,50 ; dd (7,5 ; 1,8) ; 1H	57,0	
5'	3,44 ; m ; 1H	61,0	
6'	-	206,1	
7'a	2,47 ; m ; 1H	38,4	
7'b	2,36 ; m ; 1H		
8'	1,56 ; s ; 2H	23,4	
9'	1,27 ; s ; 10H	29,5 à 29,7	
10'			
11'			
12'			32,2
13'			23,1
14'	0,88 ; t (7,0) ; 3H	14,3	
OH-4	3,69 ; se ; 1H	-	
OH-5	4,03 ; se ; 1H	-	

f) *Analyse structurale de la molécule M528T5.41*(1) *Analyse par spectroscopie ultraviolet*

Le spectre UV de la molécule M528T3.41 présente un maximum d'absorption à 235 nm identique à celui de la huratoxine (235 nm).

(2) *Analyse par spectrométrie de masse*

De la même manière que pour la molécule précédente, l'analyse du chromatogramme UHPLC-MS de la molécule M528T5.41, obtenu avec le gradient optimisé, ne révèle la présence que d'un seul pic majoritaire.

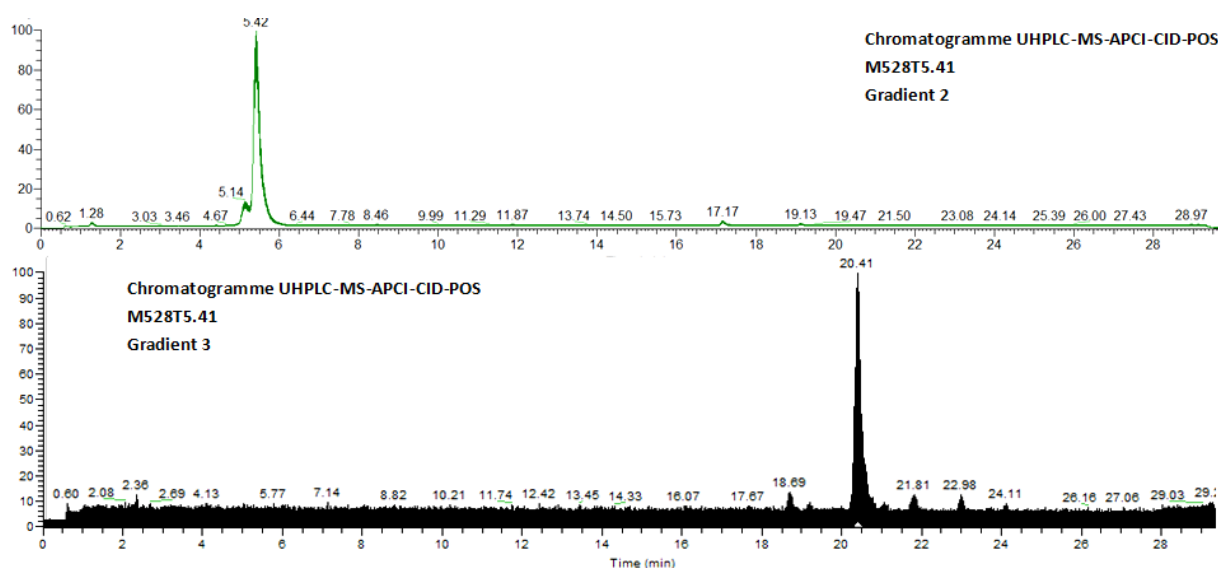


Figure 122: Chromatogrammes UHPLC-MS des molécules M528T3.41 avec le gradient 2 et le gradient optimisé 3

Le spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M528T5.41 présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  529,2798 suggérant une formule brute de  $C_{30}H_{40}O_8$  pour la molécule neutre (Figure 123). Aucune molécule de type daphnane possédant cette formule brute n'a été décrite dans la littérature. Cette molécule semble être un analogue de la huratoxine car son spectre MS-MS présente tous les fragments caractéristiques du noyau huratoxigénine (Figure 124). Selon sa formule brute ce composé posséderait une chaîne

latérale à 10 atomes de carbones avec deux insaturations. Sa différence avec la huratoxine résiderait donc dans la longueur de la chaîne latérale.

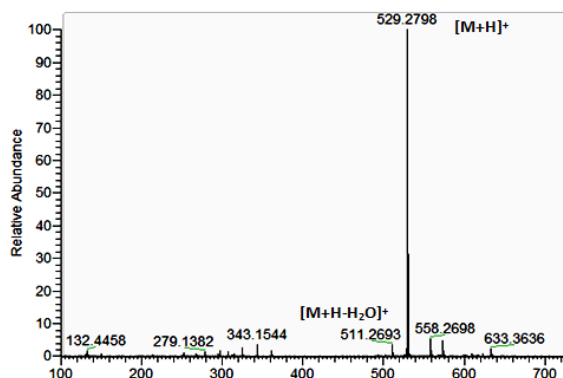


Figure 123 : Spectre de masse APCI-CID-POS haute résolution de la molécule M528T5.41

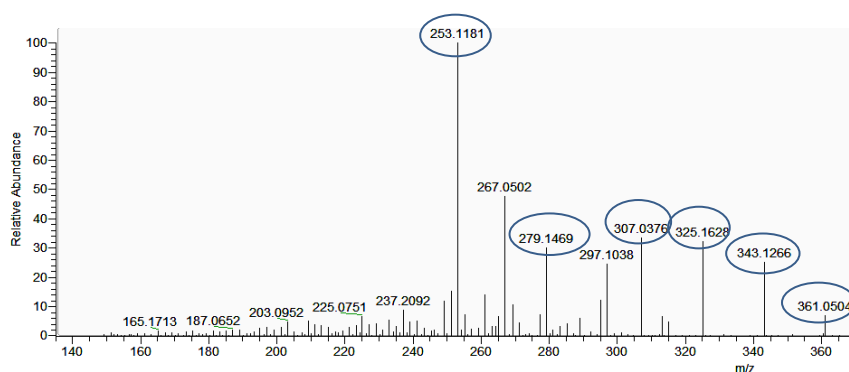


Figure 124: Spectre MS-MS-APCI-CID-POS de la molécule M528T5.41

### (3) Analyse par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La molécule M528T5.41 est un analogue des molécules analysées précédemment. En effet, les signaux caractéristiques et les corrélations du noyau daphnane sont détaillés Tableau 13, Figure 125, Figure 126, et Figure 127. Dans le cas de cette molécule, les carbones quaternaires C-3 ( $\delta_C$  210,1) et C-1' ( $\delta_C$  116,6) ne relaxent pas sur le spectre de RMN  $^{13}C$ . Ils ont pu être attribués grâce à leur corrélation HMBC respective avec H-1 ( $\delta_H$  7,61) et H-14 ( $\delta_H$  4,43).

- La molécule M528T5.41 possède une chaîne latérale orthoestérifiée. En effet, le signal à  $\delta_C$  116,6 signe la présence d'un groupement orthoester. De plus, H-14 ( $\delta_H$  4,43) corrèle en

HMBC avec le carbone à  $\delta_C$  116,6 identifié comme le C-1'(C), confirmant la position de la chaîne latérale.

- La présence de deux insaturations est confirmée par les quatre signaux correspondant à des carbones éthyléniques à  $\delta_C$  123,5 ; 134,9 ; 129,0 et 134,9. Nous avons pu les positionner sur la chaîne latérale grâce aux différentes corrélations 2D et à la multiplicité des signaux. Deux protons à  $\delta_H$  5,65 (doublet) et 6,65 (doublet dédoublé) corrélient avec le C-1' ( $\delta_C$  116,6) permettant de les placer en H-2' et H-3' respectivement. Ces protons sont portés par les carbones à  $\delta_C$  123,5 (C-2') et 134,9 (C-3'). H-3' ( $\delta_H$  6,65) montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un doublet dédoublé à  $\delta_H$  6,08 qui lui-même montre une corrélation COSY  $^1H$ - $^1H$  avec un doublet de triplet à  $\delta_H$  5,89, ces deux protons sont positionnés en H-4' ( $\delta_H$  6,08) et H-5' ( $\delta_H$  5,89) respectivement. H-4' est porté par le carbone à  $\delta_C$  129,0 (C-4') et H-5' par le carbone à  $\delta_C$  139,5 (C-5'). Les constantes de couplage de ces quatre protons éthyléniques sont de l'ordre de 15 Hz, les deux doubles liaisons sont donc en configuration *E*.

L'analyse du spectre de RMN  $^1H$  de la molécule M528T5.41 montre la présence d'une impureté en mélange avec cette molécule. Les signaux des protons éthyléniques, notamment, sont parasités par cette impureté. De plus, on remarque des signaux faibles entre  $\delta_C$  29,5 et 30,2 sur le spectre  $^{13}C$ . Ces signaux correspondent aux carbones C-8' à C-11' des molécules possédant une chaîne latérale à 14 atomes de carbone. Nous supposons que cette molécule est en présence d'un autre daphnane monoestérifié présentant une chaîne latérale à 14 atomes de carbone. D'après l'intégration des signaux dédoublés, qui sont représentés en bleu dans le Tableau 13, la molécule M528T5.41 est pure à environ 65%.

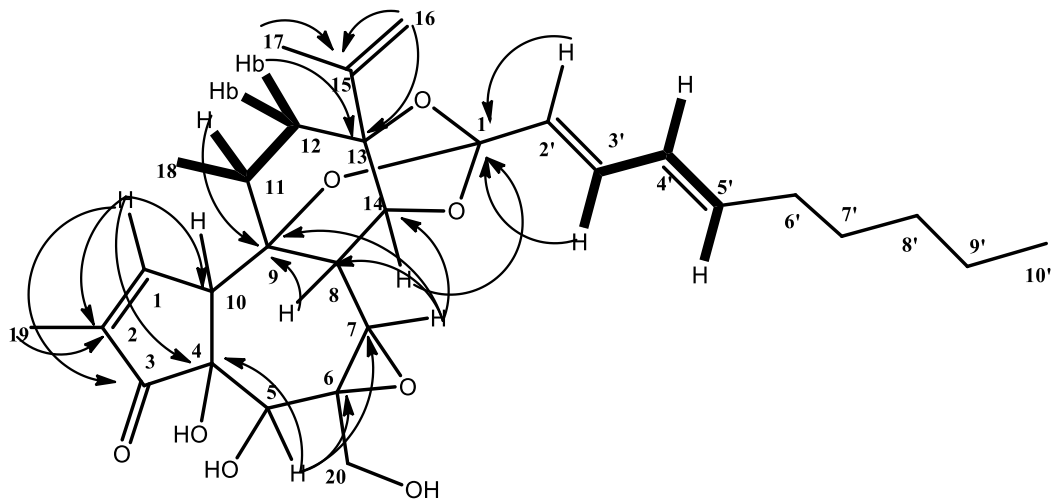


Figure 125: Principales corrélations HMBC (flèches) et COSY (gras) de la molécule M528T5.41

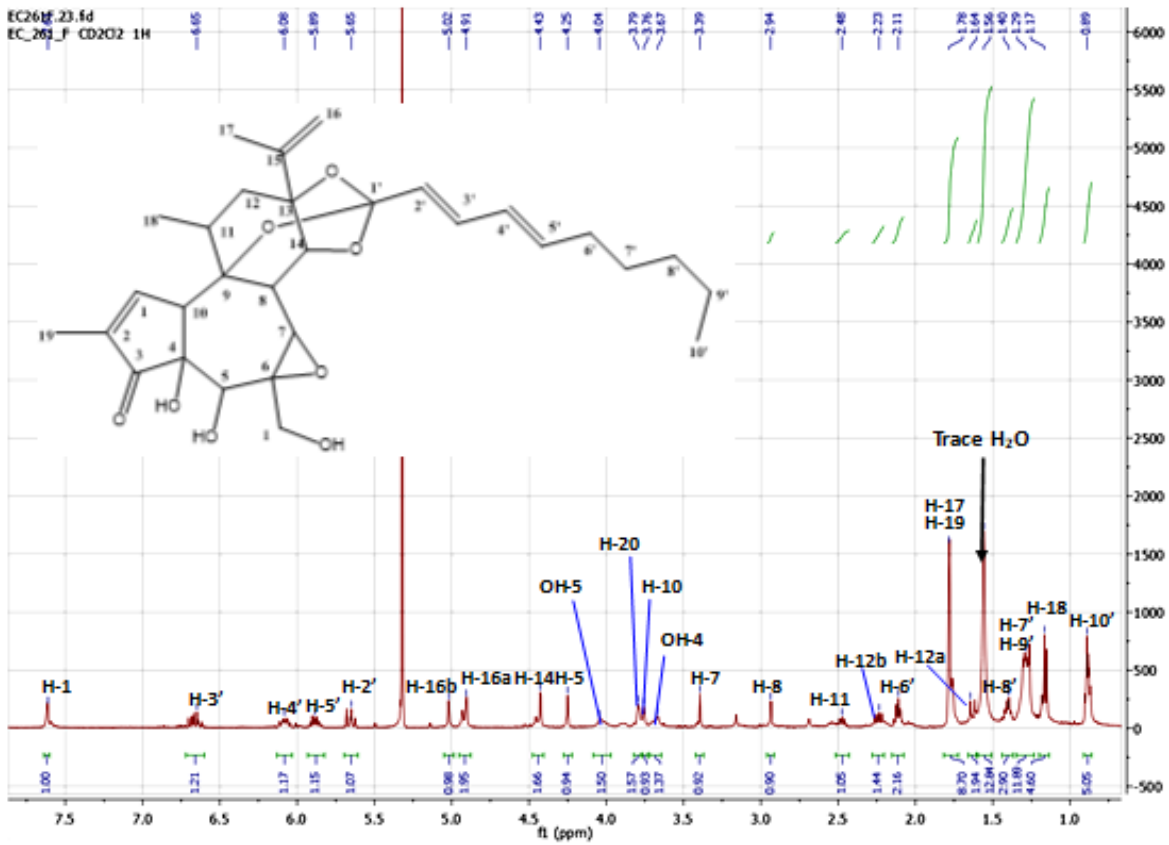


Figure 126: Spectre de RMN <sup>1</sup>H de la molécule M528T5.41 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

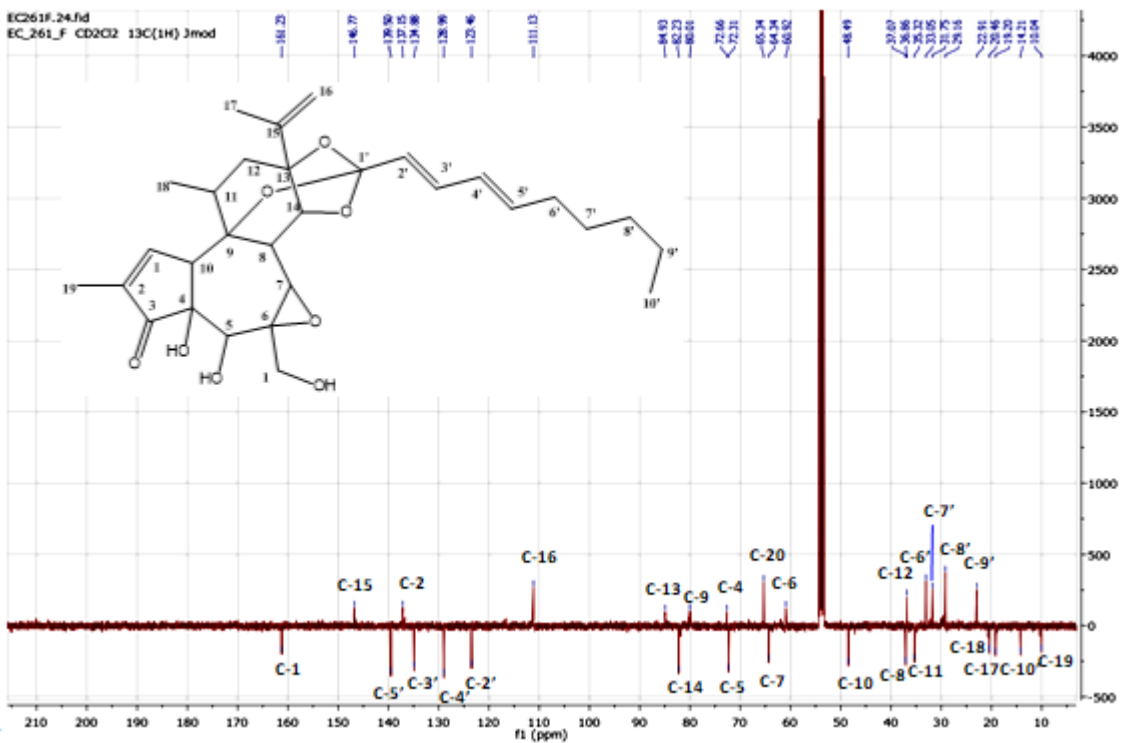


Figure 127: Spectre de RMN <sup>13</sup>C de la molécule M528T5.41 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tableau 13 : Déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule M528T3.41 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

N° des carbones et protons	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,61 ; m ; 1H	161,2
2	-	137,2
3	-	210,1
4	-	72,7
5	4,25 ; s ; 1H	72,3
6	-	60,9
7	3,39 ; s ; 1H	64,3
8	2,94 ; d (2,4) ; 1H	37,1
9	-	80,0
10	3,76 ; m ; 1H	48,5
11	2,48 ; m ; 1H	35,3
12a	1,64 ; d (14,4) ; 1H	36,9
12b	2,23 ; dd (14,4 ; 8,5) ; 1H	
13	-	84,9
14	<i>4,43 ; d (2,4) ; 1H</i>	82,2
15	-	146,8
16a	<i>4,91 ; m ; 1H</i>	<i>111,1</i>
16b	5,02 ; se ; 1H	
17	1,78 ; m ; 3H	<i>19,2</i>
18	1,17 ; d (7,4) ; 3H	<i>20,5</i>
19	1,78 ; m ; 3H	<i>10,0</i>
20	3,79 ; m ; 2H	65,3
1'	-	116,6
2'	<i>5,65 ; d (15,8) ; 1H</i>	<i>123,5</i>
3'	<i>6,65 ; dd (15,8 ; 10,3) ; 1H</i>	134,9
4'	<i>6,08 ; dd (15,2 ; 10,3) ; 1H</i>	129,0
5'	<i>5,89 ; dt (15,2 ; 7,0) ; 1H</i>	139,5
6'	2,11 ; m ; 2H	33,1
7'	1,29 ; m ; 2H	31,8
8'	1,40 ; m ; 2H	29,2
9'	1,29 ; m ; 2H	<i>22,9</i>
10'	0,89 ; m ; 3H	<i>14,2</i>
OH-4	3,67 ; se ; 1H	-
OH-5	4,04 ; se ; 1H	-



## E. Bilan de l'analyse structurale des daphnanes isolés

Ces travaux ont permis l'isolement de 4 nouveaux dérivés de la huratoxine (6'*R*-huratoxine, 4'*S*\*,5'*S*\*-dihydroxyhuratoxine, 4',5'(Z)-6'-oxo-huratoxine et huratoxigénine-20-(11'-méthyl-octadéc-12'-énoate)), ainsi que de trois daphnanes connus (huratoxine, 6'-oxo-huratoxine et 4',5'-époxy-huratoxine). Nous avons été confrontés à des difficultés lors de l'isolement des daphnanes du latex de *H. crepitans*. En effet, 5 molécules originales ont été isolées en mélange. La présence de nombreux diastéréoisomères et de daphnanes de structures proches, ainsi que les faibles quantités des produits présents dans les extraits rendent la purification très compliquée. La structures des différentes molécules et mélanges obtenus sont résumés dans les Figure 128 et Figure 129.

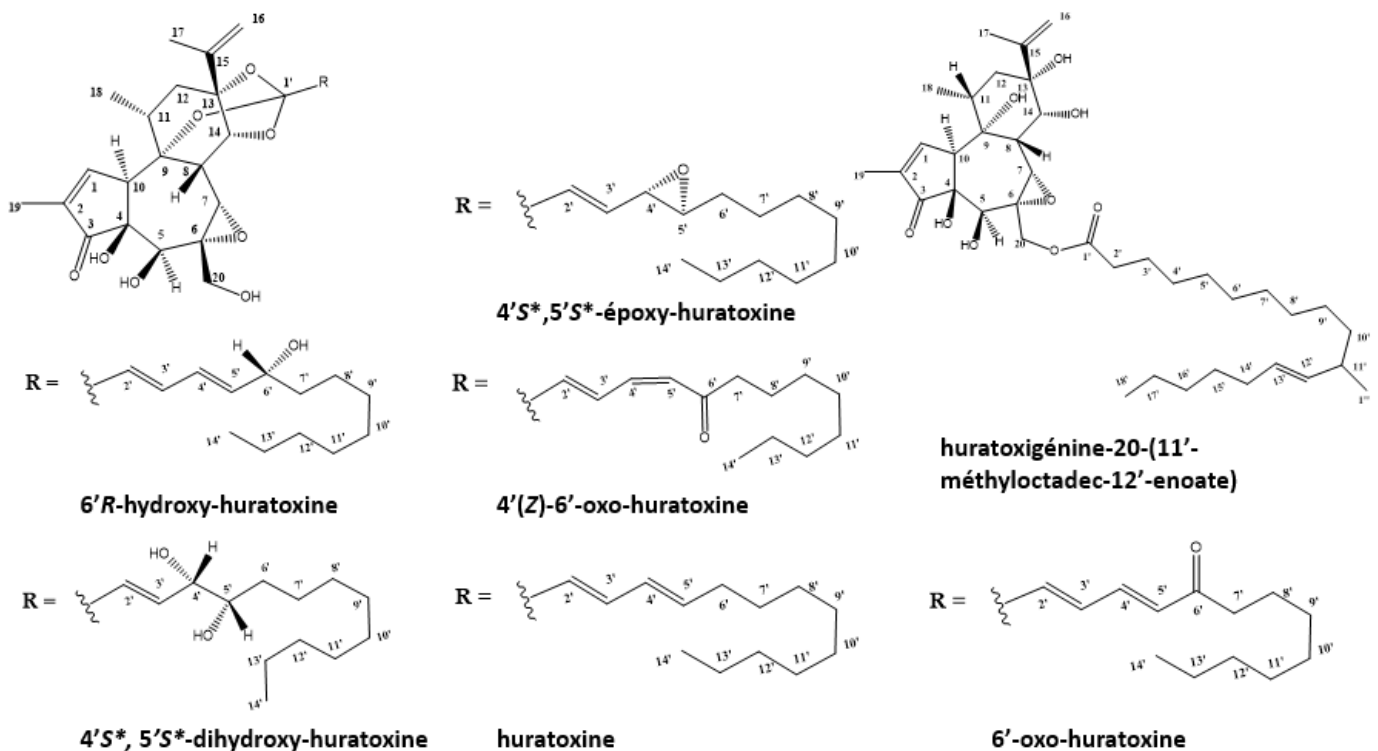


Figure 128: Structure des molécules pures isolées

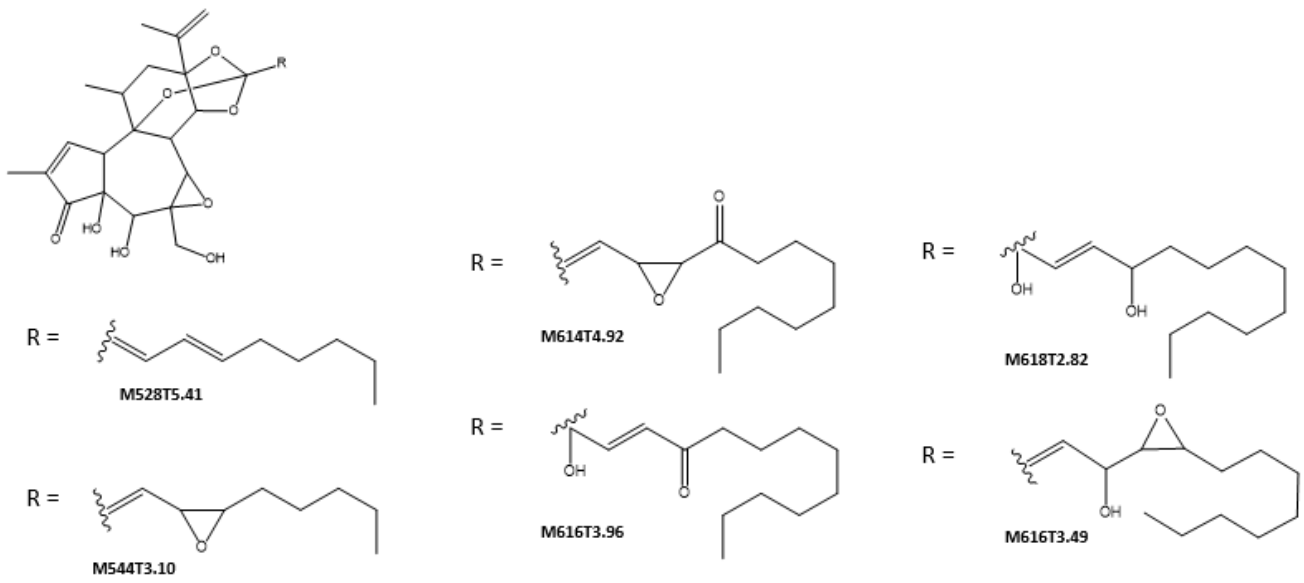


Figure 129: Structure des daphnanes monoestérifiés isolés en mélange

## II. Tests biologiques

### A. Activité anticancéreuse

#### 1. Relation structure-activité des daphnanes

Parmi les treize daphnanes monoestérifiés isolés, seulement dix d'entre eux ont été utilisés lors des tests de cytotoxicité avec les cellules Caco-2 en raison de la quantité de produit isolée et de la temporalité des travaux.

Trois daphnanes connus et 8 daphnanes originaux ont été incubés avec les cellules Caco-2, à une concentration de 1 µg/mL, pendant 48 h et la quantité de cellules vivantes a été mesurée par colorimétrie (Figure 130). Il est à noter qu'aucun des composés n'a induit une mortalité cellulaire ce qui est cohérent avec les résultats obtenus pour la huratoxine dans nos précédents travaux (33).

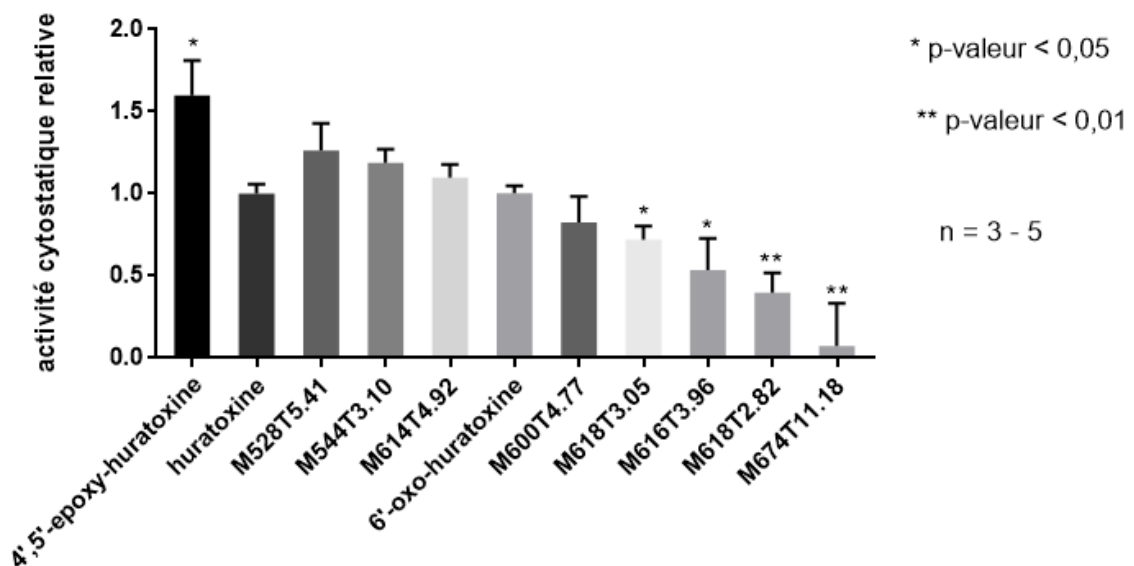


Figure 130 : Activité cytotatique d'une sélection de daphnanes sur les cellules Caco-2. Au bout de 48 h d'incubation à la concentration de 1 µg/mL avec les cellules Caco-2, la quantité de cellules vivantes est mesurée par colorimétrie et l'activité cytotatique des daphnanes est calculée relativement à celle de la huratoxine (dont l'activité est normalisée à 1). Moyenne ± SEM, Test statistique de Student par rapport à la huratoxine à partir de 3 à 5 (n) expériences indépendantes.

L'activité cytotatique de la huratoxine (environ 25%) déjà mesurée dans nos travaux précédents (33) est confirmée. De plus, neuf daphnanes sur dix ont montré des capacités

cytostatiques vis-à-vis des cellules Caco-2. Cinq de ces daphnanes possèdent une activité cytostatique similaire à celle de la huratoxine : M528T5.41 ; M544T3.10 ; M614T4.92 ; 6'-oxo-huratoxine et M600T4.77 (Figure 130). Ces molécules possèdent un noyau daphnane orthoestérifié avec une chaîne latérale comportant au moins deux doubles liaisons conjuguées ou une double liaison et une fonction époxyde (Figure 131).

La 4',5'-époxy-huratoxine possède une activité cytostatique 1,5 fois plus importante que la huratoxine (Figure 130). Cette molécule possède un noyau daphnane orthoestérifié avec une chaîne latérale comportant une double liaison et une fonction époxyde (Figure 131).

Trois molécules ont une activité cytostatique plus faible que la huratoxine : M618T3.05 ; M616T3.96 et M618T2.82 (Figure 130). Celles-ci ne présentent pas de doubles liaisons conjuguées ou de fonction époxyde sur leur chaîne latérale (Figure 131). Quant au daphnane M674T11.18 sans activité cytostatique (Figure 130), il possède une structure différente des molécules précédentes avec une chaîne latérale estérifiée en C-20 (Figure 131).

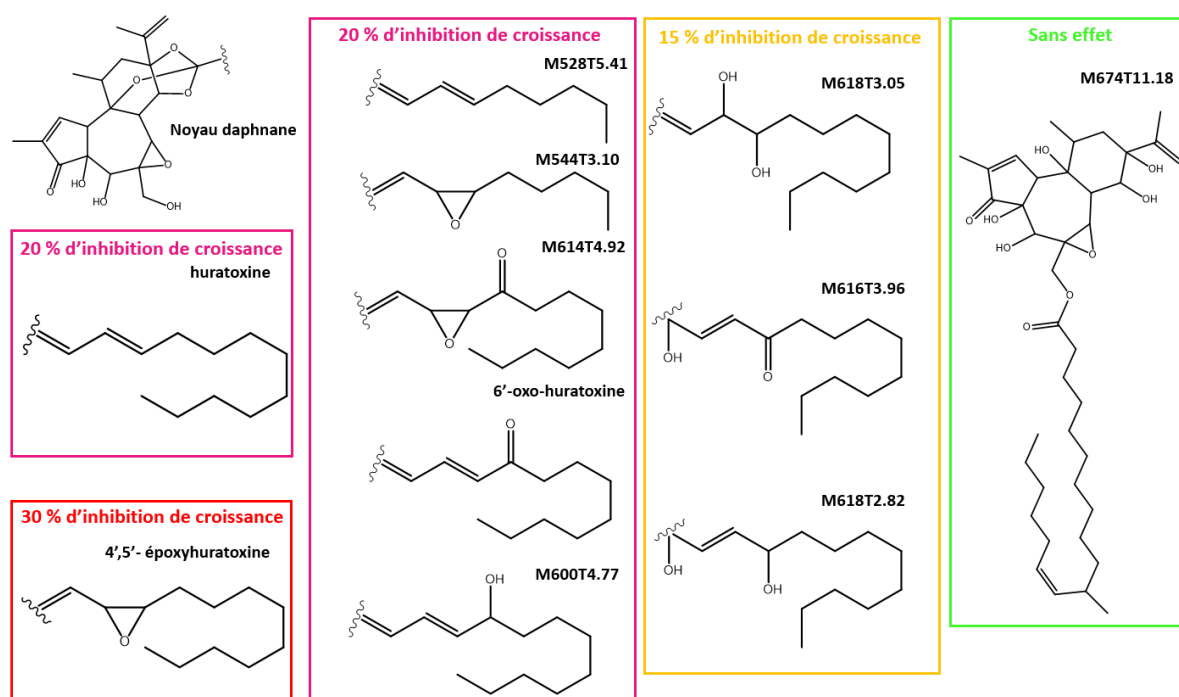


Figure 131 : Structure du noyau daphnane et des différentes chaînes latérales des daphnanes mono-estérifiés utilisés lors des tests cytotoxiques sur les cellules Caco-2 et classement selon leur activité.

Les résultats précédents obtenus au sein de l'équipe (1) ont montré que l'orthoesterification du noyau daphnane est nécessaire pour l'activité cytostatique. En effet, comparativement à la prohuratoxine et au stelleralide J, seule la huratoxine possède un noyau daphnane

orthoestérifié et a présenté une activité cytostatique (33). Nos présents résultats obtenus avec des daphnanes possédant un noyau daphnane orthoestérifié en positions C-9, C-13, C-14 ou estérifié en C-20 confirment ces résultats.

De plus, nos résultats montrent ici l'importance de la structure de la chaîne latérale pour l'activité cytostatique. En effet, la présence d'une double liaison avec un époxyde entraîne une activité cytostatique plus forte comparativement à la présence de deux doubles liaisons conjuguées. De même, la comparaison de la 4',5'-époxy-huratoxine avec M614T4.92 et celle de la huratoxine avec la 6'-oxo-huratoxine, suggèrent que la présence d'une fonction oxygénée autre que l'époxyde n'est pas favorable à l'activité. La longueur de la chaîne latérale semble aussi avoir une influence. En effet, si l'on compare l'activité de la 4',5'-époxy-huratoxine et de la molécule M544T3,10 ; il semblerait qu'une chaîne à 14 atomes de carbone soit d'avantage favorable à l'activité qu'une chaîne à 10 atomes de carbone. La même tendance est observée pour la huratoxine et la molécule M528T5.41.

Grâce à ces résultats nous pouvons proposer des relations structure-activité pour les diterpènes de type daphnane où l'activité cytostatique reposerait sur un noyau daphnane orthoestérifié en C-9, C-13, C-14 avec une chaîne latérale d'au moins 14 carbones possédant deux doubles liaisons conjuguées ou une double liaison associée avec une fonction époxyde (Figure 132).

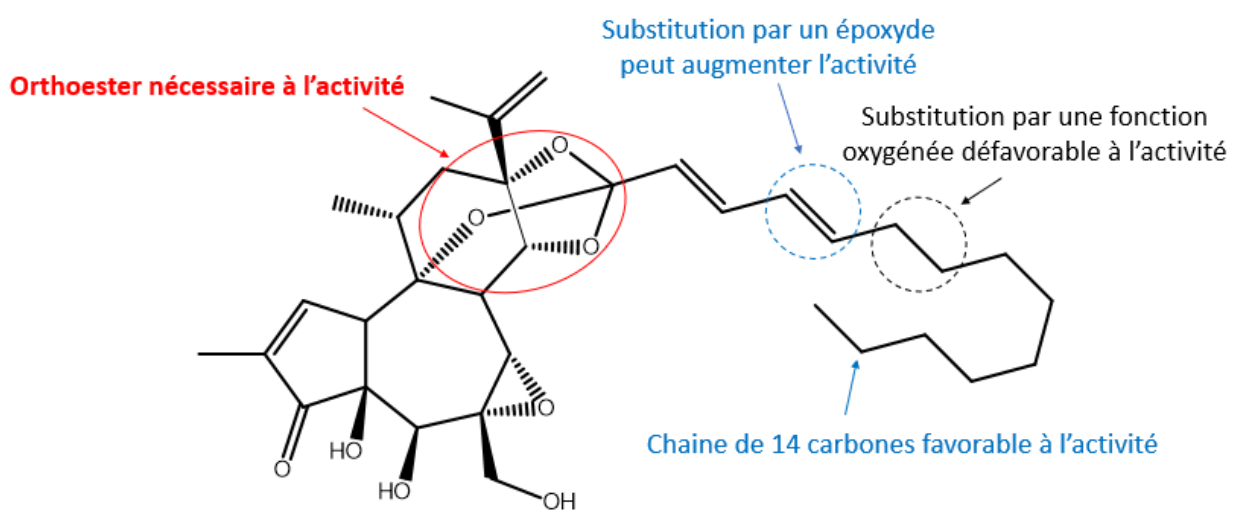


Figure 132 : Eléments structuraux des daphnanes importants pour leur activité cytostatique sur les cellules Caco-2.

## 2. Effet dose-réponse de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine

Les deux molécules les plus actives lors des tests de cytotoxicité ont été la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine. Nous avons établi des courbes dose-réponse pour ces deux daphnanes.

Différentes concentrations (0,125 ; 0,5 et 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de huratoxine et de 4',5'-époxy-huratoxine ont été incubées avec les cellules Caco-2 et au bout de 48 h la quantité de cellules vivantes a été mesurée par colorimétrie (Figure 133).

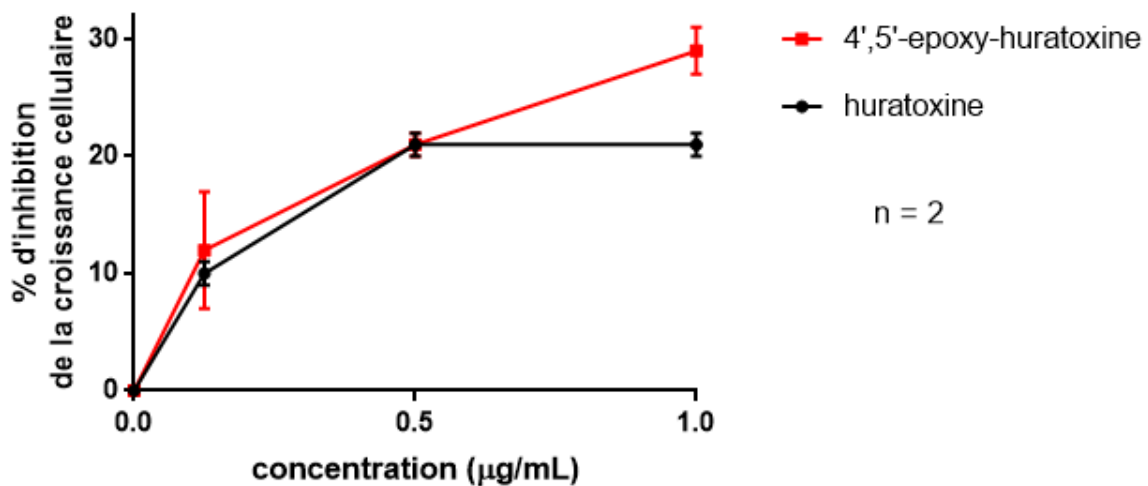


Figure 133 : Activités cytotatiques sur cellules Caco-2 de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine à différentes concentrations. Au bout de 48 h d'incubation aux concentrations de 0,125, 0,5 ou 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la quantité de cellules vivantes est mesurée par colorimétrie et l'activité cytotatique des daphnanes est calculée relativement aux cellules Caco-2 traitées avec le solvant DMSO uniquement. Moyenne  $\pm$  SEM, Test statistique de Student par rapport à la huratoxine à partir de 2 (n) expériences indépendantes : pas de différences significatives entre HT et EHT.

L'activité cytotatique de la huratoxine atteint un palier à 20% d'inhibition de croissance cellulaire dès 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , alors que la 4'-5'-époxy-huratoxine atteint 30% d'inhibition de croissance cellulaire à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ces observations sont en accord avec les résultats précédents (Figure 130) mettant en avant une activité cytotatique 1,5 fois plus importante de la 4',5'-époxy-huratoxine comparée à celle de la huratoxine, à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3. Activité cytostatique sélective de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine

Selon le même protocole qu'avec les cellules cancéreuses Caco-2, la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine ont été testées sur les cellules intestinales humaines saines HIEC-6 (Figure 134).

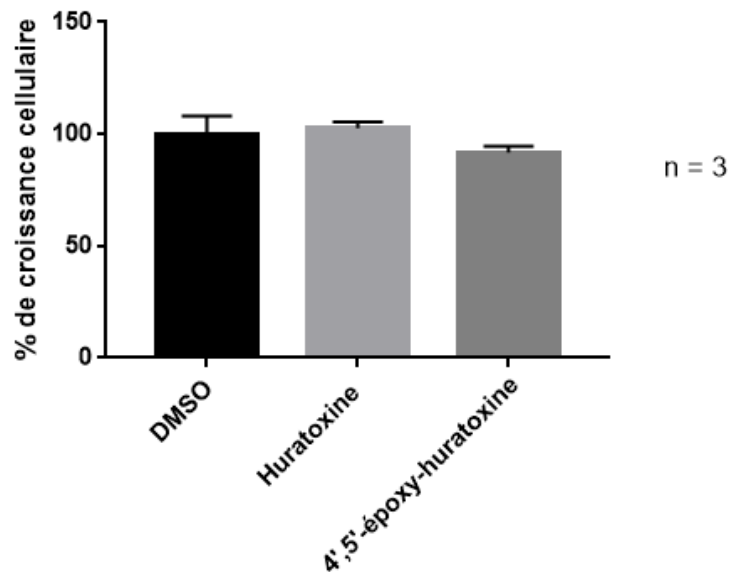


Figure 134: Effets de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine sur la croissance des cellules intestinales saines HIEC-6. Au bout de 48 h d'incubation, à la concentration de 1µg/mL, la quantité de cellules vivantes est mesurée par colorimétrie et l'activité des daphnanes est calculée relativement aux cellules HIEC-6 traitées avec du DMSO uniquement. Moyenne ± SEM, Test statistique de Student par rapport au DMSO non significatif, à partir de 3 (n) expériences indépendantes.

Les travaux précédents de l'équipe avaient montré (33) que la huratoxine ne modifie pas la croissance de cellules intestinales murines non cancéreuses. Nous montrons de plus maintenant que la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine sont sans effet délétère sur des cellules intestinales saines humaines. Ces deux daphnanes présentent donc une activité cytostatique sélective des cellules cancéreuses Caco-2.

### 4. Effets morphologiques de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine

Les travaux précédents menés au sein de l'équipe (120) ayant montré qu'à côté de son effet cytostatique, la huratoxine a des effets morphologiques sur les cellules Caco-2, nous avons

voulu vérifier si tel était le cas pour la 4',5'-époxy-huratoxine. La Figure 135 montre que, comme la huratoxine, la 4',5'-époxy-huratoxine provoque un réarrangement du tapis cellulaire des cellules Caco-2 avec la formation d'agrégats cellulaires dès 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

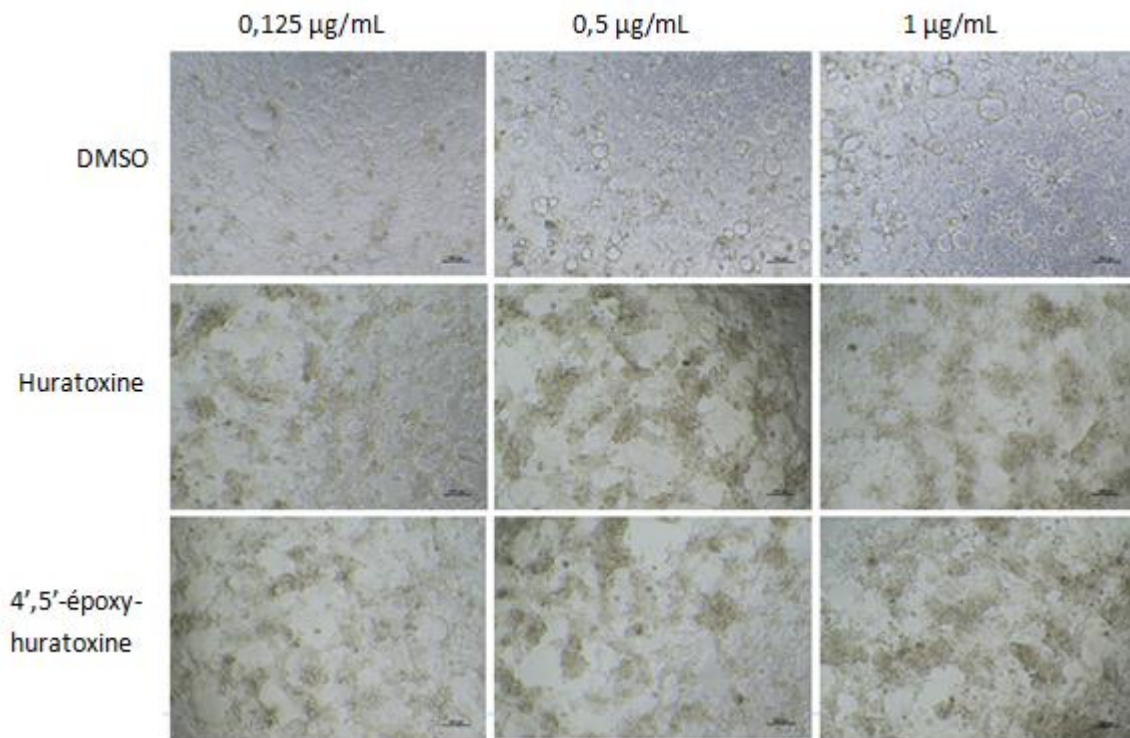


Figure 135: Activités morphologiques sur les cellules Caco-2 de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine. Au bout de 48 h d'incubation des daphnanes à la concentration de 0,125, 0,5 ou 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , des observations sont réalisées par microscopie optique et des photographies sont prises à l'objectif 10x (échelle de taille = 100  $\mu\text{m}$ ). Dans les essais contrôles, les cellules Caco-2 sont traitées par le DMSO. Données représentatives de 3 expériences indépendantes.

Les daphnanes influencent donc à la fois les capacités prolifératives et adhésives des cellules épithéliales intestinales cancéreuses. Ces capacités sont particulièrement importantes dans la maturation des cellules épithéliales intestinales au sein de la crypte, unité régénérative de l'intestin et du colon (122). Pour aller plus loin dans l'analyse des changements dans les fonctions cellulaires provoqués par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine, nous avons réalisé un marquage des noyaux, du cytosquelette et du réticulum endoplasmique (Figure 136).



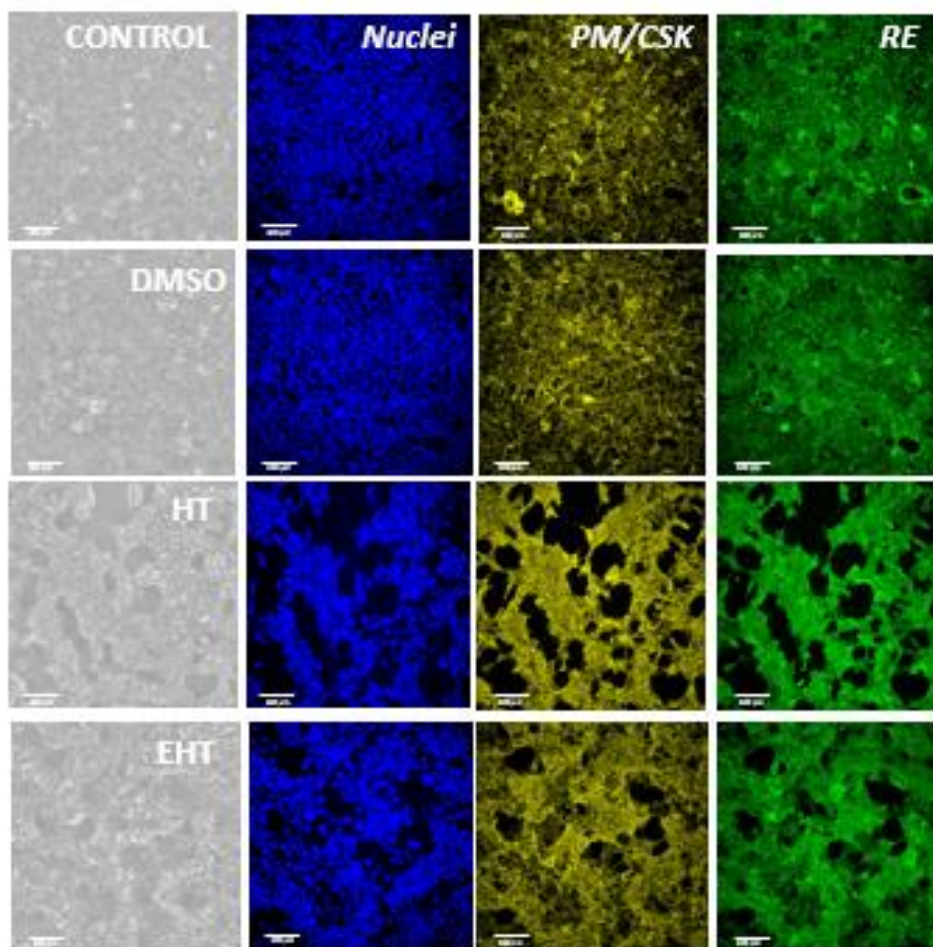


Figure 136: Impact du traitement des cellules Caco-2 avec la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine sur le cytosquelette et les organites. 48 h après le traitement par les daphnanes (huratoxine, HT ; 4',5'-époxy-huratoxine, EHT; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou le DMSO, un marquage fluorescent du cytosquelette et des différents organites a été réalisé avec un kit Cell painting et les résultats ont été observés par microscopie confocale (OPERA Phenix®, objectif 20X, échelle de taille= 100  $\mu\text{m}$ ). Les images sans marquage (brightfield) sont montrées à gauche et à droite les marquages fluorescents sont en suivant : Bleu=noyaux (nuclei), jaune=cytosquelette (CSK) et membrane plasmique (PM), vert=réticulum endoplasmique (RE). Les photographies sont représentatives de duplicats à partir d'une expérience (n=1).

Les résultats obtenus montrent que les changements morphologiques induits par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine sont accompagnés d'une densification du marquage du cytosquelette et du réticulum endoplasmique. Ces observations sont en faveur d'un remaniement de l'architecture du tissu épithélial associé à des changements métaboliques. Les travaux précédents de l'équipe ayant montré que la huratoxine promeut la formation de néocryptes et la différenciation des cellules Caco-2 (120), il est probable que les changements que nous observons ici témoignent d'une première étape dans ce processus engendré par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine. Ainsi, nos deux daphnanes apparaissent à nouveau comme de bons candidats pour de futures thérapies anticancéreuses visant à restaurer les

fonctions normales des tissus, c'est-à-dire une prolifération contrôlée et une différenciation complète, fonctions perdues lors de la transformation tumorale (91).

## 5. Implication de la PKC $\zeta$ dans les effets de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine

La PKC $\zeta$  joue un rôle très important dans l'identité de la crypte intestinale. En effet, cette protéine kinase régule à la fois les fonctions prolifératives, adhésives et de différenciation des cellules épithéliales (72,102). Nous avons donc recherché son implication dans les effets induits par les daphnanes monoestérifiés.

Pour cette étude, un inhibiteur des aPKCs, le CRT0066854 hydrochloride, a été incubé avec les cellules Caco-2, 30 min avant le traitement par les daphnanes. Cet inhibiteur des PKCs atypiques ( $\zeta$  et  $\iota$ ) se lie au site de liaison de l'ATP de l'enzyme et sur un résidu proche ce qui induit sa conformation inactive (84). La Figure 137 montre l'impact de cet inhibiteur sur la croissance et la morphologie des cellules Caco-2 après 48 h d'incubation avec les daphnanes.

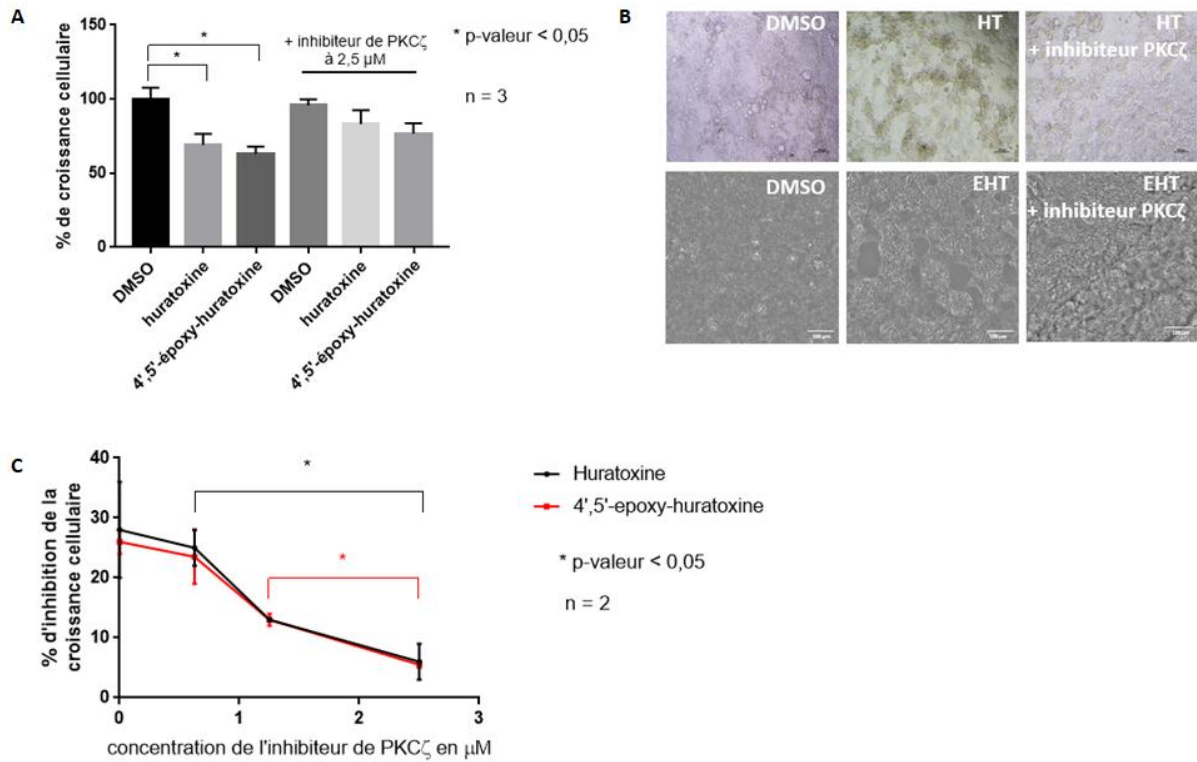


Figure 137: Impact de l'inhibition de PKCζ sur les activités cytotostatiques et morphologiques de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine. A- Les cellules Caco-2 ont été pré-traitées pendant 30 min avec 2,5 μM de l'inhibiteur de PKCζ (CRT0066854 hydrochloride) puis incubées avec les daphnanes à la concentration de 1 μg/mL. Après 48 h d'incubation, la quantité de cellules vivantes est mesurée par colorimétrie et l'activité des daphnanes est calculée relativement au contrôle DMSO (en absence de l'inhibiteur de PKCζ). Moyenne ± SEM à partir de 3 (n) expériences indépendantes et test statistique de Student par rapport aux contrôles DMSO respectifs en présence ou non de l'inhibiteur de PKCζ. B- Impact du prétraitement par l'inhibiteur de PKCζ sur les modifications morphologiques induites par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine. Les images brightfield sont montrées en haut pour la huratoxine (microscopie optique objectif 10X, échelle de taille = 100 μm) et en bas, pour la 4',5'-époxy-huratoxine (OPERA Phenix®, objectif 20X, échelle de taille = 100 μm). Dans les essais contrôles, les cellules Caco-2 sont traitées avec le DMSO. Données représentatives de 1-3 expériences indépendantes réalisées en duplicats. C- Etude dose-réponse des activités cytotostatiques des daphnanes (1 μg/ml) en présence des concentrations 0,625, 1,25 et 2,5 μM de l'inhibiteur de PKCζ. Moyenne ± SEM à partir de 2 (n) expériences indépendantes et test statistique de Student.

Les résultats obtenus montrent que l'inhibiteur des PKCs atypiques induit de façon dose-dépendante l'inhibition des effets cytotostatiques de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine. Cet effet est associé à une perte des changements morphologiques induits par les deux daphnanes. Etant donné que par rapport à l'isoforme ι, l'isoforme ζ joue un rôle prépondérant dans la morphogenèse des cellules Caco-2 (123), ces résultats suggèrent fortement l'implication de la PKCζ dans les effets cytotostatiques et adhésifs des daphnanes monoestérifiés.

## 6. Signalisation adhésive et proliférative sous traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine

Du fait de son rôle au niveau de la membrane plasmique (complexe de polarité épithéliale notamment) (71), le rôle clef que pourrait jouer la PKC $\zeta$  dans les effets adhésifs et cytostatiques de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine passe nécessairement par des signaux relais. Nous avons concentré notre investigation sur la régulation de la PKC $\zeta$  et de ses partenaires potentiels : la Glycogène Synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), Akt, MEK et la  $\beta$ -caténine. La Figure 138A montre l'immunomarquage de la PKC $\zeta$  dans les cellules Caco-2 traitées par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine. Dans l'essai contrôle (DMSO), la PKC $\zeta$  est localisée au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique, avec un renforcement de cette localisation dans des zones riches en actine. Lors du remaniement tissulaire avec la formation d'agrégats cellulaires induits par les deux daphnanes, la localisation de la PKC $\zeta$  et de l'actine au niveau de la membrane plasmique est augmentée par rapport au contrôle. Cette relocalisation est accompagnée d'une phosphorylation sur la thréonine 410 de la PKC $\zeta$ , spécifiquement lors du traitement par la huratoxine (Figure 138B). Cette thréonine se situe au niveau de la boucle d'activation de la protéine kinase et sa phosphorylation par la phosphoinositide-dépendent kinase PDK1 induit le déplacement du pseudo substrat inhibant le site actif de l'enzyme (124), conduisant donc à une activation de l'enzyme PKC $\zeta$ . La Figure 138B montre aussi que l'inhibiteur des aPKCs CRT0066854 hydrochloride n'agit pas sur la phosphorylation de la PKC $\zeta$  au niveau de la thréonine 410. En effet, cet inhibiteur bloque le site de liaison à l'ATP et induit un changement conformationnel de la kinase pour la rendre inactive, mais n'intervient pas au niveau de sa boucle d'activation (84).

Il est à noter que l'action de la huratoxine sur la PKC $\zeta$  n'induit pas de modification au niveau de son expression génique (Figure 138C). Cette expérience avait été réalisé par May Yassine sous la direction de Claire Racaud Sultan.

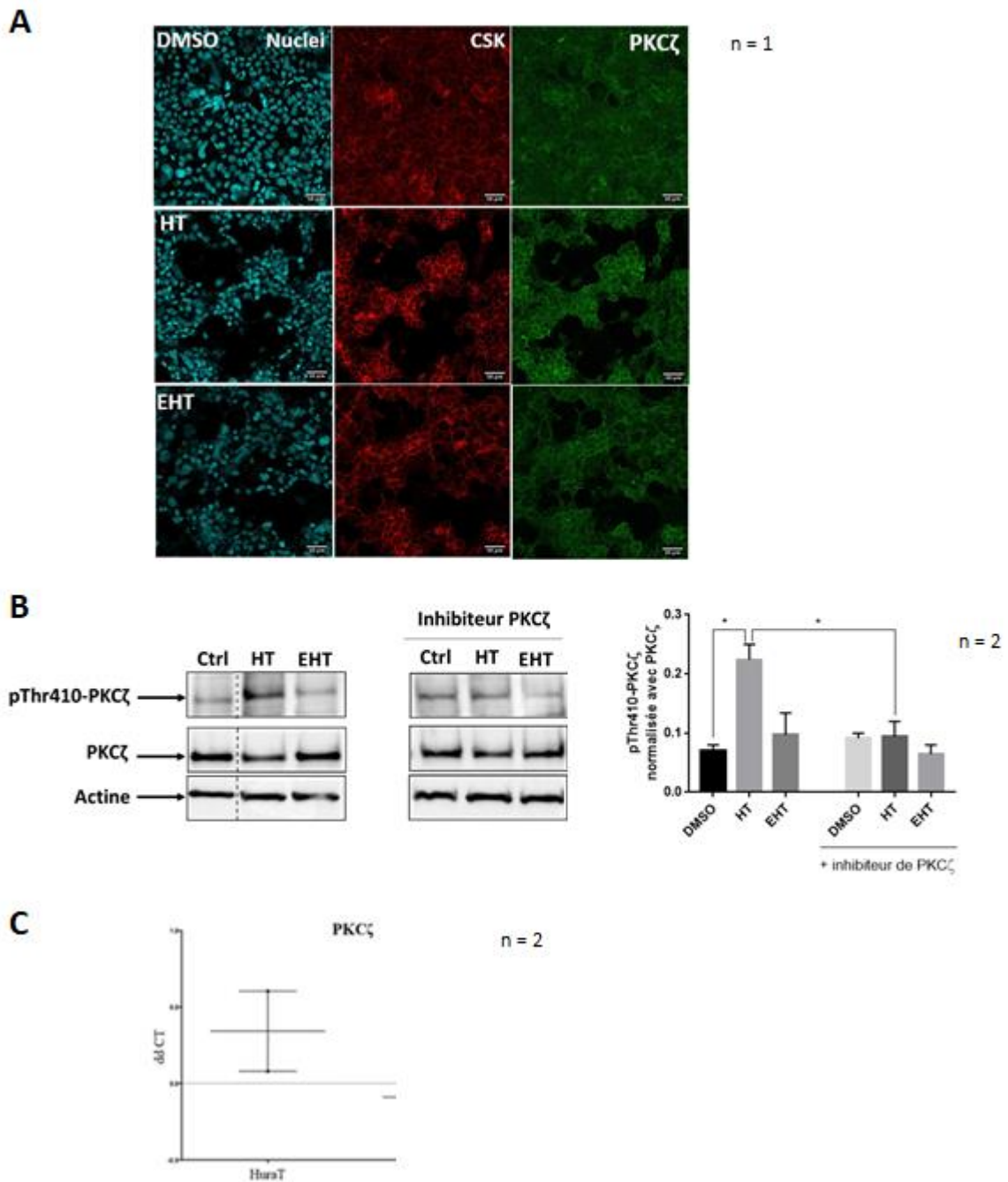


Figure 138: Régulation de la PKC $\zeta$  lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine. A- Les cellules Caco-2 ont été incubées avec les daphnanes ou du DMSO (contrôle) à la concentration de 1  $\mu$ g/mL et après 48 h d'incubation, un immunomarquage de la PKC $\zeta$  a été réalisé (vert). Les marquages des noyaux (cyan) et du cytosquelette (rouge) sont montrés. Vues confocales, objectif 20X, échelle de taille = 50 $\mu$ m, représentatives de duplicats à partir d'une expérience (n=1). B- Les cellules Caco-2 ont été pré-traitées pendant 30 min avec 2,5  $\mu$ M de l'inhibiteur de PKC $\zeta$  (CRT0066854 hydrochloride) avant le traitement par la huratoxine (HT) ou la 4',5'-époxy-huratoxine (EHT) puis après 48 h d'incubation ont été lysées pour une analyse par Western blot. Les résultats obtenus lors de la révélation de la forme phosphorylée (pThr410) et de la forme totale de PKC $\zeta$ , ainsi que leur quantification, sont montrés. L'actine montre l'équivalence des dépôts protéiques. Moyenne  $\pm$  SEM à partir de 2 (n) expériences indépendantes et test statistique de Student (\*p<0,05) par rapport au contrôle DMSO ou au traitement en absence d'inhibiteur de la PKC $\zeta$ . C- L'expression génique de la PKC $\zeta$  est évaluée par qRT-PCR après 48 h de traitement par la huratoxine (n=2 expériences indépendantes). Par rapport au contrôle DMSO, le fold change (ddCT) est inférieur à 1et non significatif.

Ces résultats confirment que la PKC $\zeta$  est bien impliquée dans les changements cellulaires induits par les daphnanes monoestérifiés, d'une part par sa relocalisation membranaire et d'autre part par sa phosphorylation activatrice dans le cas de la huratoxine. Il est à noter que cette phosphorylation sur la thréonine 410 augmente l'activité de la kinase mais ne lui est pas absolument indispensable car le changement conformationnel libérant la kinase est maintenu (125,126). Ainsi, les deux daphnanes, huratoxine et 4',5'-époxy-huratoxine, seraient capables d'activer la PKC $\zeta$  mais par des mécanismes différents.

Dans le CCR, un signal majeur contrôle la prolifération et l'adhésion des cellules cancéreuses : la sérine-thréonine kinase GSK3 $\beta$  (127,128). La sérine 147 de cette kinase est un substrat de la PKC $\zeta$ , ce qui permet son activité basale dans les cellules épithéliales coliques (98). Si dans les cellules normales, l'activation de la voie Wnt (canonique proliférative et alterne migratoire) entraîne une diminution de la phosphorylation de la sérine 147 et de l'activité GSK3 $\beta$ , à l'inverse celles-ci sont augmentées dans les cellules cancéreuses (98). De plus, en réponse à un stimulus d'hyperprolifération de l'épithélium colique, une forte association entre la PKC $\zeta$  et la GSK3 $\beta$  survient et est associée à une phosphorylation sur la sérine 9 de GSK3 $\beta$ , signant son inactivation (129). Nous avons donc étudié le statut d'activation de la GSK3 $\beta$  par mesure de sa phosphorylation sur la sérine 9 lors du traitement par les daphnanes monoestérifiés et nous avons évalué l'influence d'une inhibition de la PKC $\zeta$  (Figure 139).

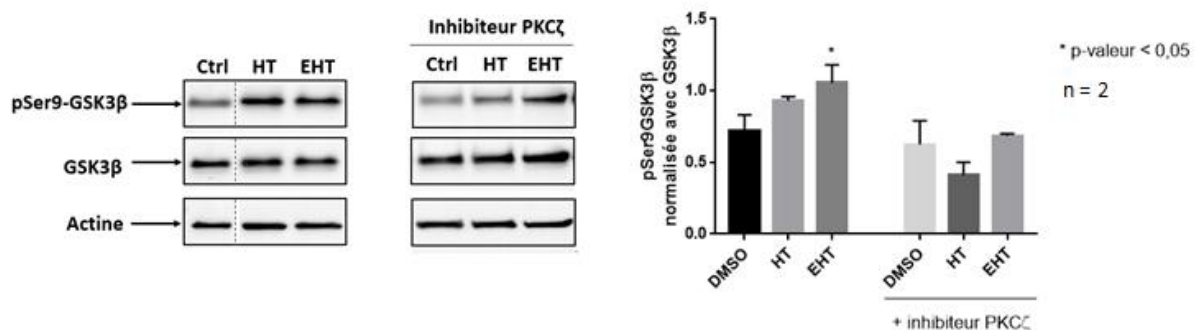


Figure 139: Régulation de la GSK3 $\beta$  lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine et influence de la PKC $\zeta$ . Les cellules Caco-2 ont été incubées avec la huratoxine (HT) ou la 4',5'-époxy-huratoxine (EHT) ou le DMSO (contrôle, Ctrl) à la concentration de 1  $\mu$ g/mL et après 48 h d'incubation ont été lysées pour une analyse par Western blot. Dans certains essais, les cellules ont été traitées pendant 30 min avec 2,5  $\mu$ M de l'inhibiteur de PKC $\zeta$  (CRT0066854 hydrochloride) avant le traitement par les daphnanes. Les résultats obtenus lors de la révélation de la forme phosphorylée (pSer9) et de la forme totale de GSK3 $\beta$ , ainsi que leur quantification, sont montrés. L'actine montre l'équivalence des dépôts protéiques. Moyenne  $\pm$  SEM à partir de 2 (n) expériences indépendantes et test statistique de Student par rapport au contrôle DMSO.

Suite au traitement avec la huratoxine ou la 4',5'-époxy-huratoxine, la forme inhibée (pSer9) de GSK3 $\beta$  est augmentée. En accord avec les travaux précédents de l'équipe (120), la huratoxine provoque une inhibition de GSK3 $\beta$ , et ici nous montrons que la 4',5'-époxy-huratoxine est encore plus efficace. De façon intéressante, un métabolite époxydé de l'acide arachidonique, l'acide 14,15-époxydocosapentaénoïque, est aussi capable d'induire l'inhibition de GSK3 $\beta$  dans des cellules rénales (130). De plus, la Figure 139 montre que l'incubation préalable des cellules avec l'inhibiteur des aPKCs annule l'augmentation de la pSer9-GSK3 $\beta$  lors du traitement par les daphnanes monoestérifiés, suggérant que l'activation de la PKC $\zeta$  par ces composés est requise pour l'inhibition de GSK3 $\beta$ .

Un rôle direct de la PKC $\zeta$  dans la phosphorylation sur la sérine 9 de GSK3 $\beta$  n'a pas été réellement démontré à notre connaissance. Si des peptides compétiteurs dérivés de la PKC $\zeta$  (ZIP) activent directement GSK3 $\beta$  (131), la PKC $\zeta$  recombinante ne semble pas capable de phosphoryler *in vitro* une GSK3 $\beta$  purifiée (99). Ainsi, il nous est apparu important de rechercher d'éventuels signaux relais pouvant expliquer la régulation de GSK3 $\beta$  par la PKC $\zeta$ .

La sérine-thréonine kinase Akt joue un rôle majeur dans la phosphorylation de la sérine 9 de GSK3 $\beta$  dans divers contextes, y compris le CCR (132). Comme la PKC $\zeta$ , c'est à la membrane plasmique qu'elle est régulée par PDK1(133). La Figure 140 montre une extinction de la forme active (pSer473) d'Akt suite au traitement par la huratoxine, comme précédemment montré (120), ou par la 4',5'-époxy-huratoxine. Cet effet n'est pas modifié en présence de l'inhibiteur de la PKC $\zeta$ .

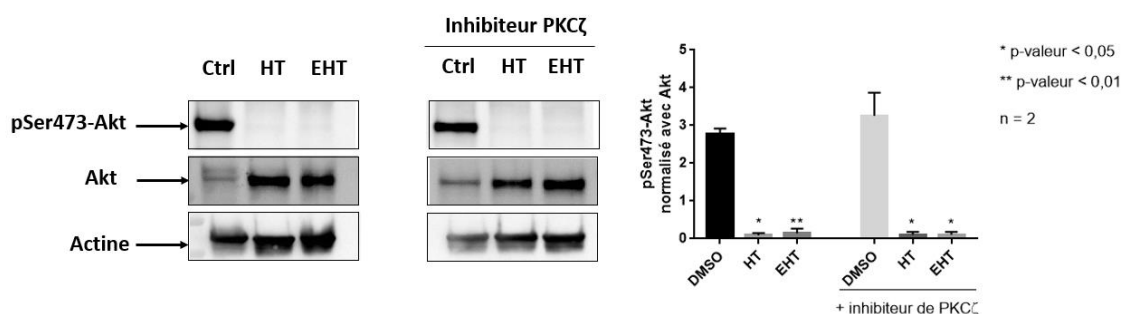


Figure 140: Régulation de la kinase Akt lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine et influence de la PKC $\zeta$ . Les cellules Caco-2 ont été incubées avec la huratoxine (HT) ou la 4',5'-époxy-huratoxine (EHT) ou le DMSO (contrôle, Ctrl) à la concentration de 1  $\mu$ g/mL et après 48 h d'incubation ont été lysées pour une analyse par Western blot. Dans certains essais, les cellules ont été traitées pendant 30 min avec 2,5  $\mu$ M de l'inhibiteur de PKC $\zeta$  (CRT0066854 hydrochloride) avant le traitement par les daphnanes. Les résultats obtenus lors de la révélation de la forme phosphorylée (pSer473) et de la forme totale d'Akt, ainsi que leur quantification, sont montrés. L'actine montre l'équivalence des dépôts protéiques. Moyenne  $\pm$  SEM à partir de 2 (n) expériences indépendantes et tests statistiques de Student par rapport aux contrôles DMSO.

Ainsi l'activation d'Akt n'est pas responsable de l'inhibition de GSK3 $\beta$  secondaire au traitement par les daphnanes monoestérifiés. De plus, contrairement aux céramides (combinaison d'une sphingosine et d'une chaîne d'acide gras) dont l'application entraîne une déphosphorylation de pSer473-Akt secondaire à l'activation de la PKC $\zeta$  (81), la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine inhibent très fortement Akt de manière indépendante de la PKC $\zeta$ .

D'autres partenaires de signalisation de la PKC $\zeta$  tels que les Mitogen-activated protein kinase kinase MEK pourraient être impliqués dans la régulation PKC $\zeta$ -dépendante de GSK3 $\beta$ . En effet, la voie MEK est activable directement par la PKC $\zeta$  (110) et surtout est capable de phosphoryler la sérine 9 de GSK3 $\beta$  alors que la forme activée (pSer473) d'Akt est diminuée dans des cellules de CCR (134). MEK pourrait donc être l'effecteur intermédiaire permettant l'inactivation PKC $\zeta$ -dépendante de GSK3 $\beta$ .

La Figure 141A montre que l'activation de MEK (pSer217/221) est inchangée lors du traitement des cellules Caco-2 par la huratoxine ou la 4',5'-époxy-huratoxine. Cependant, l'importance de MEK est démontrée car son inhibition abolit l'effet cytostatique de la huratoxine, comme il avait été montré précédemment dans l'équipe lors des travaux de thèse de Manon Trinel (33) (Figure 141B). De plus, les résultats antérieurs de l'équipe ont démontré que la huratoxine n'entraîne pas une activation des Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) en aval de MEK (33). Ces résultats suggèrent que MEK, dont l'activité est maintenue sous traitement par les daphnanes monoestérifiés, pourrait phosphoryler GSK3 $\beta$  au sein d'un complexe tripartite PKC $\zeta$ /MEK/GSK3 $\beta$ .

Cependant, en présence de l'inhibiteur de PKC $\zeta$ , l'expression de la forme active de MEK augmente sous traitement par les daphnanes monoestérifiés (Figure 141A). Cette suractivation de MEK en présence de l'inhibiteur de PKC $\zeta$  peut être corrélée à l'abolition de l'effet cytostatique des daphnanes et pourrait être le résultat d'une relocalisation de MEK auprès d'un récepteur membranaire tel que l'Epidermal Growth Factor (EGF) entraînant l'activation de la voie MEK/ERK. En effet, il a été décrit que l'action anti-proliférative d'un diterpène de type daphnane, la yuanhuadine, sur des cellules de cancer du poumon, pourrait dépendre d'une inhibition du récepteur de l'EGF et des signaux ERK et Akt en aval (135). Toutefois, à l'opposé de nos résultats obtenus avec la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine, le traitement par la yuanhuadine induit une déphosphorylation de la sérine 9 de GSK3 $\beta$ .



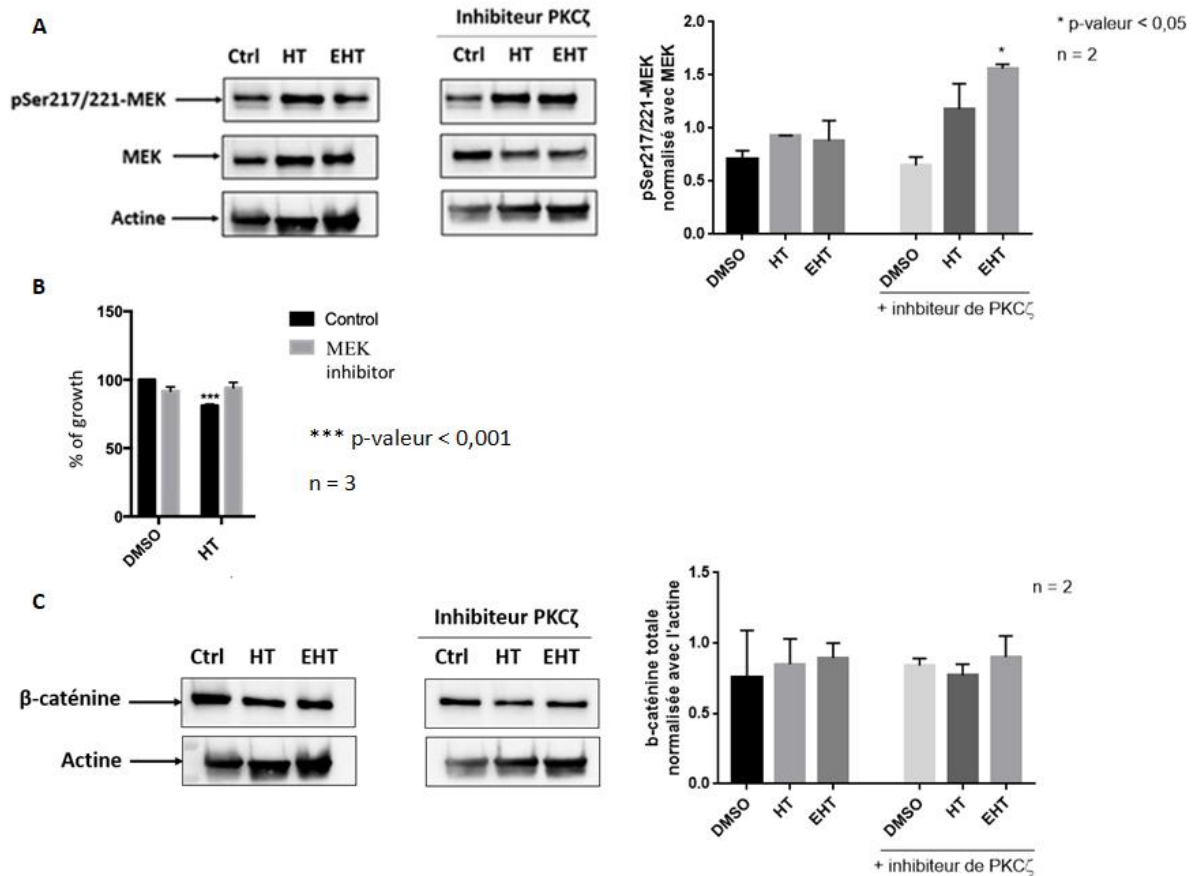


Figure 141: Implication de la kinase MEK lors du traitement par la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine et influence de la PKCζ. A- Les cellules Caco-2 ont été incubées avec la huratoxine (HT) ou la 4',5'-époxy-huratoxine (EHT) ou le DMSO (contrôle, Ctrl) à la concentration de 1 µg/mL et après 48 h d'incubation ont été lysées pour une analyse par Western blot. Dans certains essais, les cellules ont été traitées pendant 30 min avec 2,5 µM de l'inhibiteur de PKCζ (CRT0066854 hydrochloride) avant le traitement avec les daphnanes. Les résultats obtenus montrent la forme phosphorylée (pSer217/221) et la forme totale de MEK. L'actine montre l'équivalence des dépôts protéiques. Moyenne ± SEM à partir de 2 (n) expériences indépendantes et tests statistiques de Student non significatifs par rapport aux contrôles DMSO. B- Les cellules Caco-2 ont été prétraitées pendant 15 min avec 0,5 µM de l'inhibiteur de MEK (PD-0325901) avant le traitement avec la huratoxine. Moyenne ± SEM à partir de 3 (n) expériences indépendantes et test statistique de Student par rapport au DMSO \*\*\*p<0.001. C- Dans les mêmes conditions que la révélation de MEK en A, l'expression de la β caténine totale est montrée ainsi que sa quantification par rapport à l'actine. Moyenne ± SEM à partir de 2 (n) expériences indépendantes.

Il a été suggéré que l'activité de MEK vis-à-vis de GSK3β pourrait cibler l'enzyme quand elle est associée à l'axine et donc impliquée dans la régulation de la voie Wnt/β-caténine (134). Il était donc important de vérifier si l'inhibition de GSK3β induite par le complexe PKCζ/MEK pouvait modifier le signal prolifératif β-caténine crucial dans le CCR (92). Comme la Figure 141C le montre, aucun changement d'expression de la β caténine n'est mesuré lors du traitement par les daphnanes monoestérifiés en présence ou non de l'inhibiteur de la PKCζ. Ainsi, une thérapeutique basée sur l'utilisation des daphnanes monoestérifiés pourrait offrir l'avantage de ne pas plus déréguler la voie Wnt/β-caténine dans les cellules cancéreuses, tout en préservant cette voie pour les cellules souches intestinales saines.

## 7. Tests sur cellules primaires humaines

A ce stade de nos investigations, il est apparu important de vérifier l'activité des daphnanes monoestérifiés *ex vivo*. Pour cela, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité sur des cellules primaires humaines provenant de colons contrôles et CCR, cultivées en 3D sous forme d'organoïdes. En effet, les organoïdes issus de cellules primaires de patients sont cultivés sur la base des propriétés de survie et de prolifération des cellules immatures épithéliales, et reproduisent les caractéristiques des tumeurs *in vivo* permettant une évaluation pré-clinique (136).

Les organoïdes contrôles (non cancéreux) et cancéreux ont été incubés 48 h avec la huratoxine, la 4',5'-époxy-huratoxine ou leur solvant seul (DMSO) à différentes concentrations (0,01 ; 0,1 ; 1 µg/mL) et la viabilité cellulaire a été mesurée par luminescence grâce au réactif CellTiter-Glo. La floxuridine (FUdR) à 1 µg/mL a été utilisée comme contrôle positif d'une action anti-proliférative dans nos essais. Le FUdR est un antimétabolite analogue de la pyrimidine ayant une activité antitumorale sur les lignées humaines de CCR et sur différents modèles tumoraux animaux (137). La Figure 142A montre que la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine à 1 µg/mL présentent une activité cytostatique à la fois sur les organoïdes contrôles et sur les organoïdes CCR, avec une plus forte tendance sur les organoïdes CCR. La Figure 142A montre également que la FUdR ne modifie l'activité de croissance d'aucun type d'organoïde. Il semblerait donc que les cellules de nos deux échantillons CCR soient résistantes à la FUdR. Comme montré sur la Figure 142B, les daphnanes induisent une diminution de la taille des organoïdes coliques sans signe de mort cellulaire. Ainsi, les daphnanes monoestérifiés possèdent une activité cytostatique sur les cellules résistantes aux chimiothérapies dépendantes d'un antimétabolite tel qu'un analogue de la pyrimidine.

Afin de rechercher une concentration de daphnane qui ne modifierait pas les capacités prolifératives des cellules épithéliales saines, nous avons incubé les organoïdes avec différentes concentrations de huratoxine et de 4',5'-époxy-huratoxine. La Figure 142C montre qu'à une concentration de 0,1 µg/mL, les daphnanes monoestérifiés induisent 40% d'inhibition de croissance des organoïdes CCR alors qu'ils n'ont aucun effet sur les organoïdes contrôles. Ainsi, comme avec les modèles de lignées cellulaires normales et cancéreuses, nous montrons que les daphnanes monoestérifiés peuvent montrer une sélectivité d'action antiproliférative vis à

vis des cellules primaires CCR. Ces résultats sont donc encourageants pour la transposition de nos résultats cytostatiques à des modèles *in vivo*.

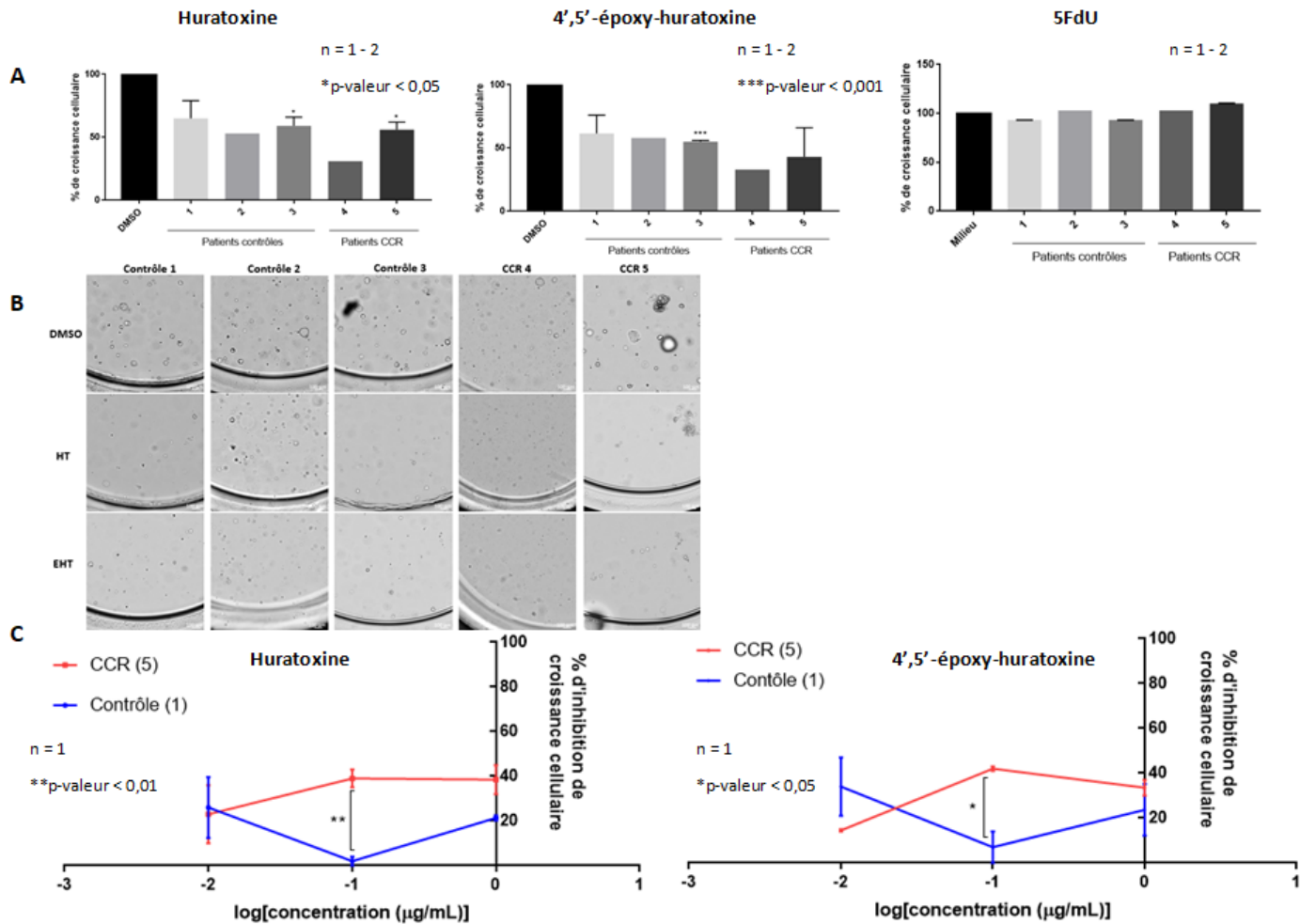


Figure 142: Activité cytostatique de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine sur des organoïdes coliques humains. Des organoïdes épithéliaux ont été cultivés à partir de prélèvements contrôles (patients N° 1, 2, 3) et CCR (patients N°4,5). Pendant 48 h, ils ont été traités avec la huratoxine, la 4',5'-époxy-huratoxine, le 5FdU ou le DMSO comme solvant. Ensuite, la viabilité cellulaire a été mesurée par luminescence (test CellTiter-Glo) et l'activité des composés a été calculée comparativement au contrôle (DMSO ou milieu). A) Les composés ont été incubés à la concentration de 1 µg/mL. Moyenne ± SEM à partir de 1 (patients N°2, 4) ou 2 (patients N°1,3,5) expériences indépendantes) et t-test de Student par comparaison avec le contrôle : \*p<0,05 ; \*\*\*p<0.001. B) Après un traitement par les daphnanes comme en A, des images brightfield (OPERA Phenix®, objectif 20X, échelle de taille = 100 µm) ont été prises montrant la diminution de taille des organoïdes par rapport au contrôle. C) 48 h après avoir été traités avec la huratoxine ou la 4',5'-époxy-huratoxine à 0,01, 0,1 ou 1 µg/mL, la viabilité cellulaire a été mesurée par luminescence et la croissance des organoïdes a été calculée comparativement au contrôle (DMSO). Moyenne ± SEM à partir de 1 (n) expérience, réalisée en duplicats.

## 8. Conclusion

La huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine ont montré, dans ces travaux, leurs capacités à contrôler la prolifération et l'adhésion de cellules coliques cancéreuses. Comme d'autres

composés possédant des chaînes d'acide gras (céramides, cérebrosides), ces molécules perturbent l'organisation lipidique de la membrane plasmique entraînant le regroupement et l'activation d'acteurs de la signalisation cellulaire (138).

Une des cibles précoces que nous avons étudiées est la PKC $\zeta$ . En effet, les daphnanes monoestérifiés font partie des esters de phorbol activateurs des PKCs et les travaux précédents menés au sein de l'équipe avaient éliminé les PKC $\alpha$  et les PKC $\delta$  comme cibles de la huratoxine (33). L'incubation de la huratoxine ou de la 4',5'-époxy-huratoxine entraîne l'activation de la PKC $\zeta$ . Cette activation peut être directe par l'induction d'un changement conformationnel de l'enzyme après association avec une autre protéine telle que la phospholipase D (139) ou indirecte après sa phosphorylation par la PDK1. Dans ce dernier cas, l'activation en amont d'un autre récepteur par les daphnanes n'est pas exclue. Cependant, certaines de nos expériences (non montrées ici) avec un antagoniste du récepteur aux dérivés de l'acide arachidonique avec une fonction époxyde (EET) n'ont pas donné de résultats concluants. Les céramides sont connus pour activer la PKC $\zeta$  en se liant directement sur sa partie C-terminale (140) mais à notre connaissance, notre travail est le premier à montrer un rôle activateur des daphnanes monoestérifiés sur cette enzyme.

Nos résultats suggèrent que la kinase MEK pourrait s'associer à la PKC $\zeta$  activée pour former ensuite un complexe tripartite avec la GSK3 $\beta$  au niveau de la membrane plasmique. Une telle proximité favoriserait l'inhibition de GSK3 $\beta$  entraînant des modifications majeures dans le métabolisme, l'adhésion et la prolifération des cellules cancéreuses. Sur le plan métabolique d'abord, les deux enzymes GSK3 $\beta$  et PKC $\zeta$  jouent des rôles clés mais opposés dans l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses en cas de non utilisation du glucose (97,141). Ainsi, l'activation de la PKC $\zeta$  et l'inhibition de la GSK3 $\beta$  peuvent induire un changement du métabolisme énergétique vers une utilisation du glucose, entraînant une fragilisation des cellules cancéreuses en cas de stress nutritif. Sur le plan adhésif, ces deux enzymes ancestrales ont respectivement un rôle dans la plasticité (GSK3 $\beta$ ) et l'identité (PKC $\zeta$ ) tissulaires (102,142). Autrement dit, l'activation de la PKC $\zeta$  et l'inhibition de la GSK3 $\beta$  favoriseront la restauration de l'architecture de la crypte intestinale et la différenciation des progéniteurs coliques normaux comme les travaux précédents de l'équipe l'avaient montré dans le cas d'un traitement par la huratoxine (33).

L'adhésion, la différenciation et la prolifération des progéniteurs intestinaux sont étroitement contrôlées et coordonnées au sein de la crypte (122). Un effet cytostatique progressif naturel est opéré tout au long de la formation des cellules différenciées. Les daphnanes ont un effet cytostatique sur les cellules coliques cancéreuses. Parmi les signaux prolifératifs majeurs du CCR, l'expression des formes actives de GSK3 $\beta$  et d'Akt, mais pas celle de la  $\beta$ -caténine, sont inhibées par les daphnanes. Cependant à la différence des céramides (81), l'inhibition d'Akt est d'une part indépendante de la PKC $\zeta$  et d'autre part insuffisante pour l'activité cytostatique. De plus, la spécificité de l'action cytostatique de la huratoxine et de la 4',5'-époxy-huratoxine sur les cellules cancéreuses et l'absence de modulation de la voie  $\beta$ -caténine sont des résultats encourageants pour leur potentielle application en thérapeutique dans le cadre du cancer colorectal. Enfin, l'activité cytostatique sélective de ces deux daphnanes sur les organoïdes cancéreux à 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nous montre que leur activité est maintenue dans des conditions de culture 3D, représentatives des tumeurs *in vivo*.

Suite aux différents tests effectués, il semble que la chaîne latérale orthoestérifiée soit l'élément déterminant pour l'activité cytostatique des daphnanes. Comparée aux céramides, cette chaîne comporte une double liaison supplémentaire et parfois une fonction époxyde. Cette fonction présente dans la 4',5'-époxy-huratoxine pourrait supporter un mode de régulation spécifique de la PKC $\zeta$  associé à une meilleure inhibition de la GSK3 $\beta$  et une plus grande efficacité de l'effet cytostatique. Si la position de la fonction époxyde sur la chaîne d'acide gras apparaît critique pour la régulation de l'activité GSK3 $\beta$  (130), il reste à déterminer son impact sur celle de la PKC $\zeta$ .

La huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine sont donc des activateurs sélectifs de la PKC $\zeta$ , ce qui est un résultat important étant donné la difficulté à cibler une isoforme particulière de PKC. De façon intéressante, par rapport aux céramides qui sont aussi des activateurs de la PKC $\zeta$ , les daphnanes monoestérifiés présenteraient un mode de régulation particulier de la PKC $\zeta$  et des signaux en aval (Figure 143). D'ailleurs, alors que les céramides sont connus pour avoir des propriétés apoptotiques dans les cellules intestinales cancéreuses (143) ou non transformées (144), les daphnanes monoestérifiés n'ont pas induit cet effet cytotoxique. Ainsi, d'une façon générale, les daphnanes monoestérifiés pourraient être des outils thérapeutiques utiles dans de nombreuses pathologies où la PKC $\zeta$  est déficiente (cancers, maladies neurodégénératives...).

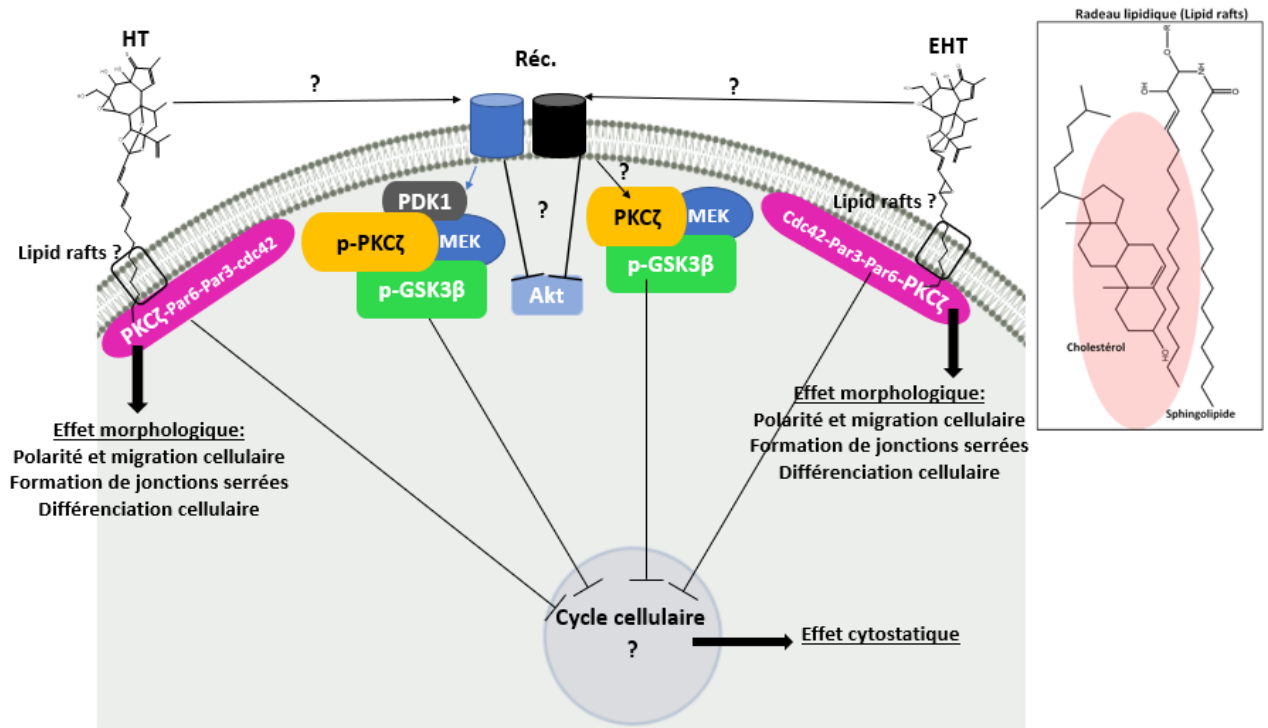


Figure 143: Schéma bilan du mécanisme d'action proposé pour la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine dans les cellules cancéreuses colorectales

## B. Activités antivirales

Etant données les activités antivirales des diterpènes d'Euphorbiaceae rapportées dans la littérature (*cf* p.35), il n'est pas exclu que les daphnanes monoestérifiés isolés du latex d'*Hura crepitans* L. puissent avoir une telle activité. Ainsi, grâce à une collaboration avec l'UMR PIMIT à la Réunion, et plus particulièrement avec Chaker El Kalamouni et Patrick Mavingui, des tests sur deux souches virales ont pu être effectués (virus Zika et SARS-CoV-2).

Les cellules Vero E6 ont été mises en contact avec des daphnanes monoestérifiés à différentes concentrations (huratoxine, 4',5'-epoxy-huratoxine, 6'-oxo-huratoxine et M616T3.96), puis, immédiatement, les cellules ont été infectées par le virus Zika et incubées 24 h. Aucune activité antivirale n'a été détectée pour ces composés.

De la même manière, des cellules pulmonaires humaines (A549<sup>ACE2, TMPRSS2</sup>) ont été mises en contact avec les mêmes composés à différentes concentrations et infectées avec le SARS-CoV-2, puis incubées pendant 24 h. A dose non toxique pour les cellules, les différents composés ne réduisent pas la production virale du SARS-CoV-2 au sein des cellules pulmonaires avec des IC<sub>50</sub> allant de 23,07 µg/mL pour la 6'-oxo-huratoxine, jusqu'à 421,4 µg/mL pour les molécules M616T3.96. Cette observation est étonnante car il a été rapporté dans la littérature que la phosphorylation de la protéine nucléocapside (N) du SARS-CoV-2 par la kinase GSK3 est nécessaire pour l'interaction du virus avec les cellules hôtes, ainsi que pour la transcription et la réplication virale (145,146). Ainsi des molécules telles que la huratoxine et la 4',5'-époxy-huratoxine, inhibitrices de la kinase GSK3, auraient pu être prometteuses pour combattre l'infection au SARS-CoV-2.

---

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---



Les travaux présentés dans ce manuscrit sont axés sur l'étude des diterpènes de type daphnanes, dont le chef de file est la huratoxine, contenus dans le latex de *Hura crepitans* L., un arbre endémique de la forêt amazonienne. Ce type de molécules est connu pour avoir un potentiel bioactif intéressant notamment *via* l'activation des sérine thréonine protéines kinases C ou PKCs. Ces enzymes sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires et sont dérégulées dans un grand nombre de pathologies, notamment les cancers. L'étude de la chimie de cet arbre revêt donc un intérêt dans la découverte de nouvelles molécules bioactives. Le choix des modèles cellulaires et pharmacologiques *in vitro* et *ex vivo* de cancer colorectal a été motivé par le fait que les activités PKC sont souvent déficitaires dans ce type de cancer. Suite aux résultats précédemment acquis au laboratoire, les objectifs de ce travail étaient d'isoler de nouveaux dérivés de la huratoxine possédant si possible une meilleure activité antiproliférative et d'avancer sur les relations structure-activité pour cette classe de composés. Il s'agissait également et surtout, d'approfondir l'étude du mécanisme d'action des daphnanes, en recherchant notamment l'isoforme de PKC impliquée dans l'activité cytostatique et son mode de régulation.

Les précédents travaux d'isolement de daphnanes du latex de *H. crepitans* ont montré la présence d'une grande quantité d'acides gras, en particulier d'acide palmitique, co-éluant avec les daphnanes au cours des différentes étapes de purification. Ce travail de thèse a permis de mettre au point un protocole d'élimination des acides gras par partage liquide-liquide, facilitant la purification et l'analyse structurale de ces diterpènes. Les différentes étapes de purification ont permis d'isoler 10 nouveaux analogues de la huratoxine ainsi que 3 daphnanes déjà décrits (huratoxine, époxy-huratoxine et oxo-huratoxine). Leur analyse structurale a révélé 6 molécules présentes en mélange. En effet, la présence de signaux dédoublés sur les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  nous a amené à mettre au point un gradient UHPLC-MS optimisé permettant de confirmer la présence de diastéréoisomères dans ces mélanges. La séparation de ces isomères, à partir de quelques milligrammes de fraction, est le frein principal pour la purification des nombreux daphnanes contenus dans le latex de *H. crepitans*. La faible résolution de séparation par UHPLC suggère que l'utilisation d'une technique CLHP en phase inverse n'est pas une bonne option. Il est toutefois possible d'envisager d'autres phases stationnaires telles que des colonnes chirales ou des phases stationnaires monolithiques comme décrit par Huang *et al.*

(147). La chromatographie en phase supercritique a aussi été mise en avant pour la séparation de mélanges de diastéréoisomères (148).

L'évaluation de l'activité antiproliférative de 10 daphnanes isolés sur les cellules humaines de cancer colorectal Caco-2, a permis de sélectionner les deux molécules les plus actives : la huratoxine et l'époxy-huratoxine, avec 20 et 30% d'inhibition de croissance sélective des cellules cancéreuses, respectivement. Grâce à ces résultats, nous avons pu mettre en avant des relations structure-activité pour les daphnanes monoestérifiés : la chaîne orthoestérifiée est essentielle à l'activité cytostatique et sa longueur (>10 atomes de carbone) ainsi que l'inclusion d'une fonction époxyde y sont favorables. La huratoxine étant abondante dans le latex de *H. crepitans*, il serait envisageable de réaliser une époxydation par hémisynthèse de la double liaison en 4',5' afin d'obtenir la 4',5'-époxy-huratoxine plus active mais présente en plus faible quantité dans le latex. Wang et Yamamoto (149) ont recensé différentes techniques d'époxydation asymétrique utilisant le peroxyde d'hydrogène comme oxydant. La méthode décrite par Jat *et al.* utilisant des catalyseurs asymétriques à base de complexes de titane de type Ti(IV)-Salan permet d'époxyder sélectivement sur un diène la double liaison ne possédant pas d'oxygènes en position allylique, ce qui permet d'envisager la fonctionnalisation sélective de la double liaison en position 4'-5' de la huratoxine (150).

La huratoxine et l'époxy-huratoxine conjuguent un effet morphologique à leur effet cytostatique sur les cellules cancéreuses. Les travaux précédents de l'équipe avaient pu montrer que des processus de migration et de différenciation sous-tendaient ces changements morphologiques. Nos travaux ont révélé l'implication de la PKC $\zeta$ , une enzyme membranaire critique dans la polarisation et l'identité cellulaires, dans les activités cytostatiques et morphologiques des daphnanes. Si la huratoxine augmente la forme phosphorylée (p-Thr410) active de la PKC $\zeta$  dépendante de la kinase PDK1, le mode d'action de l'époxy-huratoxine sur la PKC $\zeta$  semble différent et demeure indéterminé. Il est donc possible que la huratoxine et l'époxy-huratoxine agissent *via* des microdomaines ou des récepteurs membranaires différents. L'implication du récepteur aux acides époxyeicosatriénoïques (EET) a été évaluée, en raison de l'analogie structurale de ces produits avec la chaîne latérale de l'époxy-huratoxine, mais sans résultat probant. Pour la suite de ces travaux, il serait intéressant de rechercher l'implication d'autres types de récepteurs membranaires ou de microdomaines type rafts

(radeaux lipidiques) dans les activités des daphnanes. En effet, il a été démontré que des molécules possédant de longues chaînes carbonées telles que les céramides ou les sphingolipides interagissent avec ce type de domaine (151,152). Les céramides sont aussi des activateurs de aPKCs qui peuvent interagir directement avec la partie C-terminale de l'enzyme (7). Nous pourrions donc envisager une modélisation de docking-scoring afin de déterminer si les daphnanes monoestérifiés peuvent également interagir directement avec un site de la PKC $\zeta$ . D'autre part, il n'est pas exclu que l'autre PKC atypique, la PKC $\iota$ , puisse être impliquée dans les activités des daphnanes étant donné son rôle important dans les cellules épithéliales intestinales (67,77). Il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique spécifique d'une seule isoforme de PKC atypique mais l'état d'activation de la PKC $\iota$  pourrait être étudié par Western blot. L'implication de l'une ou l'autre des aPKCs pourrait être évaluée dans un modèle cellulaire après transfection de leur forme inactive.

Faisant suite aux travaux précédents menés dans l'équipe, nous confirmons que les voies de signalisation GSK3 $\beta$  et Akt, impliquées dans la cancérogénèse colorectale, sont régulées négativement par les daphnanes monoestérifiés. L'inhibition de GSK3 $\beta$  est dépendante de la PKC $\zeta$  contrairement à l'inhibition d'Akt. Ceci suggère que les étapes précoces de l'activation de PKC $\zeta$  compromettent celle d'Akt, comme par exemple une possible séquestration de PDK1. De plus, il serait intéressant d'approfondir nos résultats suggérant le rôle critique joué par MEK dans l'inhibition PKC $\zeta$  dépendante de GSK3 $\beta$ . La recherche d'un complexe réunissant les trois enzymes pourrait être réalisée par co-immunoprécipitation. Enfin, les travaux précédents réalisés par l'équipe ont montré que le traitement par la huratoxine entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (120), et une étude de la protéine régulatrice du cycle cellulaire, p27, serait intéressante pour explorer le mécanisme de ce blocage. En effet, sa phosphorylation nucléaire par les aPKCs empêche l'inhibition de la cycline Cdk2 ce qui facilite la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Ce phénomène permet de réguler la balance prolifération/différenciation dans les progéniteurs cellulaires (77). Il est possible que suite au traitement avec les daphnanes, la PKC $\zeta$  soit mobilisée dans le cytoplasme, au niveau du complexe PKC $\zeta$ -GSK3 $\beta$ -MEK, empêchant la phosphorylation de p27 ce qui pourrait expliquer l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

A notre connaissance, l'activation spécifique de la PKC $\zeta$  n'a jamais été décrite pour les daphnanes monoestérifiés. De plus, nos premiers résultats montrant une activité cytostatique significative de la huratoxine et de l'époxy-huratoxine sur un modèle *ex vivo* de cellules humaines cancéreuses colorectales, sont encourageants pour envisager l'exploration de l'utilisation antitumorale des daphnanes sur des modèles *in vivo* murins. L'évaluation de leur activité dans d'autres modèles pathologiques où la PKC $\zeta$  est déficiente, telles que la maladie d'Alzheimer (153), pourrait être également une perspective intéressante.

Enfin, il reste à comprendre l'inactivité des daphnanes de *H. crepitans* sur les modèles d'infection virale contrairement à d'autres diterpènes d'Euphorbiaceae cités dans la littérature (15,19,21). Cependant, Liu *et al.* ont émis l'hypothèse qu'une activation des PKCs était nécessaire pour l'entrée du SARS-CoV-2 dans les cellules hôtes *via* une voie d'endocytose (154). Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet antiviral de nos composés activateurs de PKCs sur les modèles de SARS-CoV-2. De plus, d'après l'étude de Zahran *et al.*(48), qui met en avant une activité antivirale intéressante du réniéroside C1 *in silico* contre le SARS-CoV-2, il serait peut-être plus intéressant de tester les cérébrosides de *H. crepitans* sur des modèles viraux de SARS-CoV-2.

---

## MATERIELS ET METHODES

---

# I. Isolement et analyse structurales des daphnanes monoestérifiés du latex de *H. crepitans*

---

## A. Appareillages

### 1. Isolement des composés d'intérêts

Le système de CLMP (Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression) utilisé pour les différentes étapes de purification est constitué d'une colonne de verre borosilicaté (BÜCHI) remplie avec de la silice non greffée d'une granulométrie 15-40  $\mu\text{m}$  (Kieselgel 60, MACHEREY-NAGEL) qui a été préalablement activée à 100°C pendant 24 h à l'étuve (Memmert) et de deux modules de pompe C-605 contrôlés par un manager de pompe C-615 (BÜCHI).

Certaines fractions ont nécessité une purification par chromatographie sur colonne ouverte. Les colonnes utilisées sont des colonnes de verre borosilicaté (BÜCHI) remplie avec de la silice non greffée d'une granulométrie 15-40  $\mu\text{m}$  (Kieselgel 60, MACHEREY-NAGEL) ou de la silice greffée de chaînes à 18 atomes de carbone, d'une granulométrie 40-63  $\mu\text{m}$  (LiChroprep RP-18, MACHEREY-NAGEL) qui a été préalablement activée à 100°C pendant 24 h à l'étuve (Memmert).

Un chromatographe flash (puriFlash XS520Plus Interchim), a aussi été utilisé, avec une colonne RS 80 C18 ou une colonne RS 15 C18 (CHROMABOND Flash, MACHEREY-NAGEL).

Le système de CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) semi préparative utilisé lors de ces travaux est composé d'une CLHP (HITACHI LaChrom MERCK), d'une interface D-7000, d'une pompe quaternaire LaChrom L-7100, d'un passeur automatique d'échantillon L-7200 ainsi que d'un détecteur à barrette de diodes LaChrom L-7455. Le système est piloté par le logiciel D-7000 HSM. La colonne utilisée est une colonne Luna C18, 5  $\mu\text{m}$ , 10 x 250 mm, 100 Å (Phenomenex).

Un évaporateur rotatif (BÜCHI Rotavapor R-114) a été utilisé pour sécher les fractions issues des différentes étapes de purification.

Tous les solvants utilisés sont des solvants de qualité CLHP (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific).

## 2. Suivi des étapes de purification par CCM

Des CCM (Chromatographie sur Couche Mince) ont été réalisées pour déterminer les fractions d'intérêts après chaque étape de purification afin de permettre le regroupement des fractions.

Une plaque de phase stationnaire de silice non greffée a été utilisée (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) ; le solvant utilisé pour la migration était un mélange de toluène/ AcOEt/ acide formique 50/50/1 (v/v/v) pour le suivi des daphnanes, et, un mélange d'hexane/ diéthyléther/ acide formique 70/30/1 pour le suivi des acides gras.

Une double révélation a été effectuée, sous UV à 254 nm dans un premier temps puis après pulvérisation d'une solution d'acide phosphomolybdique. Afin de préparer ce révélateur trois grammes d'acide phosphomolybdique ont été dissous dans 100 mL d'éthanol 96%.

## 3. Analyse UHPLC-MS des fractions d'intérêts

Après regroupement des fractions issues des différentes étapes de purification, un suivi par UHPLC-MS-HRMS a été réalisé. Quatre techniques d'analyses ont été utilisées selon l'étape de purification.

Les analyses ont été réalisées avec une UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) équipée d'une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les acquisitions ont été réalisées en mode positif. Pour les quatre types d'analyse, une colonne C18 Waters Acquity UPLC BEH 1,7 µm, 2,1 x 150 mm a été utilisée, avec une température de colonne de 40°C et un

débit de 0,4 mL/min. Les solvants utilisés étaient de l'eau milliQ (A) et de l'acétonitrile (MeCN) (B), tous les deux acidifiés avec 0,1% d'acide formique.

Le gradient de solvants a été réalisé comme suit (gradient 1) : deux minutes de plateau avec 90% de B puis de 2 à 22 minutes une augmentation jusqu'à 100% de B, suivie par un palier à 100% de B de 22 à 36 minutes, puis une diminution de B à 90% de 36 à 37,5 minutes, et enfin un palier à 90% de B de 37,5 à 40 minutes.

Pour les fractions enrichies en D1, le gradient de solvants a été réalisé comme suit (gradient 2): deux minutes de plateau avec 70% de B puis de 2 à 17 minutes une augmentation jusqu'à 100% de B, suivie par un palier à 100% de B de 17 à 28 minutes, puis une diminution de B à 70% de 28 à 28,5 minutes, et enfin un palier à 70% de B de 28,5 à 30 minutes.

Le gradient utilisé pour l'analyse des mélanges est le suivant (gradient 3) : deux minutes de plateau à 50% de B, puis une augmentation jusqu'à 70% de B de 2 à 25 minutes, suivie d'une augmentation jusqu'à 100% de B de 25 à 28 minutes, puis une diminution à 50% de B en 0,5 minutes, et enfin un palier à 50% de B de 28,5 à 30 minutes.

Le gradient utilisé pour l'analyse du mélange M616T3.96 est le suivant (gradient 4) : deux minutes de plateau à 50% de B, puis une augmentation jusqu'à 60% de B de 2 à 25 minutes, suivie d'une augmentation jusqu'à 100% de B de 25 à 28 minutes, puis une diminution à 50% de B en 0,5 minutes, et enfin un palier à 50% de B de 28,5 à 30 minutes.

Le logiciel de traitement de données utilisé pour l'analyse des spectres de masse et des chromatogrammes ioniques est Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

#### 4. Analyse par RMN des produits purs

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Institut de Chimie de Toulouse (FR 2599) sur des appareils de type Bruker Avance 300 ou Bruker Avance 500, ce dernier équipé d'une cryosonde Prodigy.



Les spectromètres sont contrôlés par le logiciel Topspin et les spectres traités avec le logiciel de RMN MNova.

Les échantillons ont été solubilisés dans du dichlorométhane ou du méthanol deutérés (Euriso-top, Cambridge Isotope Laboratories Inc). Les solvants seront précisés pour chaque spectre présenté dans la partie résultat.

## 5. Calculs de modélisation de RMN

Le calcul des blindages magnétiques a été réalisé avec le logiciel Gaussian09. Les simulations ont été effectuées dans un milieu de solvant de dichlorométhane, en utilisant le niveau de théorie : HF/6-311+G(2d,p)). Le calcul a été réalisé sur des structures simplifiées pour la molécule M674T11.18 afin de réduire le temps de calcul.

Les constantes de blindage magnétique ( $\sigma$ ) ont été calculées en utilisant la méthode *des orbitales atomiques jauge invariante* (GIAO) (155,156). Les déplacements chimiques  $\delta_{\text{calc}}$  sont finalement obtenus en soustrayant les valeurs des constantes de blindage magnétique du TMS, pris comme standard de référence. Les erreurs systématiques ont été éliminées par la mise à l'échelle par la relation :  $\delta_{\text{scaled}} = (\delta_{\text{calc}} - \text{Intercept})/\text{Slope}$ , où *Intercept* représente l'ordonnée à l'origine et *Slope*, la pente de la droite issue d'un calcul de régression linéaire entre les valeurs calculées  $\delta_{\text{calc}}$  et expérimentales  $\delta_{\text{exp}}$  (156). Les probabilités d'erreur des déplacements chimiques pour les carbones et les protons de chaque molécule ont ensuite été calculées en appliquant la méthode statistique DP4, selon la méthode comme décrite initialement par Smith et Goodman (157).

## 6. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés au laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique UMR 5623 IMRCP, sur le campus Paul Sabatier UT3, grâce à l'aide de Charles-Louis Serpentine.

L'appareil utilisé est un spectromètre JASCO J-815, contrôlé par le logiciel Spectra Manager.

Les échantillons ont été solubilisés dans du dichlorométhane ou dans un mélange dichlorométhane/méthanol à une concentration de 0,2 mg/mL. Les solvants seront précisés pour chaque spectre présenté dans la partie résultat.

Les solutions ont été placées dans une cuve de 1 mm de largeur. Suite à l'acquisition, les spectres ont été lissés.

L'ellipticité molaire notée  $[\phi]$  a été calculée à partir de la formule suivante :

$$[\phi] = \phi / (10.c.l)$$

où,  $\phi$  est la valeur de l'ellipticité mesurée,  $c$  la concentration en moles/L de la solution et  $l$  la longueur de la cuve.

## 7. Spectroscopie ultraviolet (UV)

Les spectres UV ont été réalisés en même temps que les spectres de dichroïsme circulaire. L'appareillage et les conditions de manipulation sont donc identiques.

## 8. Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres IR ont été enregistrés au laboratoire de chimie de coordination LCC UPR 8241, grâce à l'aide de Céline Deraeve.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer FRONTIER FT-IR, contrôlé par le logiciel Spectrum.

Les échantillons ont été solubilisés dans du dichlorométhane ou dans un mélange dichlorométhane/méthanol à une concentration de 10 mg/mL puis une goutte a été déposée au niveau du diamant et l'analyse a été réalisée après évaporation du solvant.

## 9. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire de nos échantillons a été enregistré au laboratoire de synthèse et de physico-chimie des molécules d'intérêt biologique SPCMIB UMR 5068, grâce à l'aide de Christiane André-Barres

L'appareil utilisé est un polarimètre JASCO P-2000, réglé sur la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589$  nm).

Les échantillons ont été solubilisés dans du dichlorométhane ou dans un mélange dichlorométhane/méthanol à une concentration maximale selon la masse de produit disponible et afin de pouvoir remplir une cuve de 1 dm. Les solvants et les concentrations seront précisés pour chaque spectre présenté dans la partie résultat.

Le pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D$ , exprimé en degrés, a été calculé avec la formule suivante :

$$[\alpha]_D = (\alpha / (l.c)) \times 1000$$

$\alpha$  : moyenne des 10 lectures mesurées par le polarimètre représentant l'angle de rotation de la molécule

l : longueur de la cuve en dm

c : concentration de la molécule en solution en g/L

## B. Obtention du latex de *Hura crepitans* L.

La collecte du latex de *H. crepitans* a été réalisée au Pérou et permise grâce à la collaboration existante entre l'UMR 152 et l'institut de recherche de l'Amazonie péruvienne (IIAP) basé à Iquitos en plein cœur de la forêt primaire amazonienne péruvienne. Les récoltes et identifications ont été effectuées par Billy Joel Cabanillas, docteur en chimie des substances naturelles et chercheur au IIAP, et Diego García Soria, ingénieur forestier. Les récoltes ont été effectuées sur un arbre localisé dans les environs de la ville de Mazán, le long du fleuve Amazone, à une heure de pirogue d'Iquitos. La localisation de la collecte est la suivante : 3°30'04.0''S/73°05'12.5W.

Afin de collecter le latex, des entailles horizontales ont été réalisées à la machette dans le tronc de l'arbre puis des bouteilles de plastiques sectionnées ont été fixées sous les entailles afin de récupérer le latex (Figure 144).



Figure 144: Photographies de la récolte du latex de *Hura crepitans* L.(118)

Le latex a ensuite été lyophilisé au Pérou avec un lyophilisateur LABCONCO FREEZONE 12.

### C. Extraction du latex de *H. crepitans* pour l'isolement

Le latex lyophilisé (650 g) a d'abord été extrait par chauffage à reflux dans 6,5 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pendant 3h30 avec agitation. Deux filtrations successives ont été réalisées pour récupérer l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  n°1 : une première sur coton puis une deuxième sur Büchner. Le marc récupéré a été séché puis extrait une deuxième fois dans 6,5 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  avec le même protocole. Les deux filtrations successives ont à nouveau été réalisées pour récupérer l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  n°2. Le marc récupéré a été séché puis extrait une dernière fois à froid dans de l'EtOH à 96% avec agitation pendant 24 h. Deux filtrations successives ont été réalisées pour récupérer l'extrait éthanolique.

Ce protocole a été répété une deuxième fois avec les 600 g de latex lyophilisé restant.

Ainsi, trois extraits ont été obtenus : extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  n°1 (42,53 g), extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  n°2 (6,15 g) et extrait éthanolique (36,35 g).

### D. Précipitation des cérébrosides présents dans l'extrait brut $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ n°1

L'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  n°1 (42,53 g) a été dissous dans 350 mL de cyclohexane puis réparti dans des tubes de 20 mL afin de les centrifuger. L'appareil utilisé est une Centrifugeuse 5804 R (Eppendorf). Les tubes ont été centrifugés à une vitesse de 3000 tr/min pendant 20 minutes. Le surnageant a été récupéré et le précipité a été lavé 3 fois avec du cyclohexane. Le précipité a été récupéré pour former la fraction EC.2.21.A et le solvant de lavage a été rassemblé avec le surnageant récupéré pour former la fraction EC.2.21.B (38,3203 g).

### E. Elimination des acides gras présents dans la fraction EC.2.21.B

La fraction EC.2.21.B (38,3203 g) a été divisée en trois afin d'être traitée par partage liquide liquide, dans le but d'éliminer les acides gras présents. Chaque fraction a été dissoute dans 1 L de cyclohexane, puis 1 L d'isopropanol et 1 L d'eau ont été ajoutés dans une ampoule à décanter. Le système de solvants biphasique a été basifié par l'ajout de 20 mM de triéthylamine. Après agitation et décantation les phases aqueuses et organiques ont été séparées pour former les fractions EC.2.23.A et EC.2.23.B, respectivement.

## F. Isolement de daphnanes monoestérifiés

### 1. Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP)

Pour les premières étapes de purification, différentes CLMP ont été réalisées afin d'isoler les D1 présents dans les différentes fractions. Pour toutes les CLMP décrites ci-dessous la colonne a été remplie avec environ 160 g de silice, de granulométrie 15-40  $\mu\text{m}$ , non greffée ; la colonne d'un diamètre de 3,6 cm et de 47 cm de longueur a été conditionnée avec le solvant de départ d'élution puis le dépôt solide a été réalisé en couche homogène. Les éluions et les conditionnements ont été réalisés avec un débit de 40 mL/min et une pression de 1,5 bars.

Trois CLMP successives ont été nécessaires pour traiter la fraction EC.2.23.B.

L'élution a été réalisée comme suit : 500 mL de cyclohexane, 750 mL d'un mélange cyclohexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  50/50 (v/v), 2 fois 250 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 3 fois 250 mL d'un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 50/50 (v/v), 3 fois 250 mL de AcOEt, 3 fois 250 mL d'un mélange AcOEt/MeOH 50/50 (v/v) et enfin 2 fois 250 mL de MeOH.

Chaque volume de solvant élué correspond à une fraction : ainsi, 16 fractions ont été obtenues pour chaque colonne (EC.2.24.A à EC.2.24.P ; EC.2.27.A à EC.2.27.P ; EC.2.29.A à EC.2.29.P). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions A à F (EC.2.30.A), fractions G et H (EC.2.30.B), fraction I seule (EC.2.30.C), fractions J à L (EC.2.30.D), fractions M à P (EC.2.30.E). Lors de la première CLMP une fraction enrichie en daphanes diestérifiés D2 (EC.2.28.B) a été mise de côté.

Une CLMP a ensuite été réalisée sur la fraction EC.2.30.B.

L'élution a été réalisée comme suit : 2 fois 500 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 3 fois 250 mL d'un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 80/20 (v/v), 3 fois 250 mL d'un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOEt 50/50 (v/v), 2 fois 250 mL d'AcOEt, et enfin 3 fois 250 mL de MeOH.

Ainsi 13 fractions ont été obtenues (EC.2.31.A à EC.2.31.M). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions A à E (EC.2.32.A), fraction G (EC.2.32.B), fractions H à J (EC.2.32.C) et fractions K à M (EC.2.32.D).

De la même manière que précédemment une CLMP a été réalisée sur la fraction EC.2.30.E. L'élution a été réalisée comme suit : 500 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 fois 250 mL d'un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  50/50 (v/v), 2 fois 250 mL d'AcOEt, 2 fois 250 mL d'un mélange AcOEt/MeOH (90/10) (v/v), 2 fois 250 mL d'un mélange AcOEt/MeOH (70/30) (v/v), 2 fois 250 mL d'un mélange AcOEt/MeOH (50/50) (v/v) et enfin 2 fois 500 mL de MeOH. Ainsi 13 fractions ont été obtenues (EC.2.33.A à EC.2.33.M). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions A à D (EC.2.34.A), fractions E à G (EC.2.34.B), fraction H seule (EC.2.34.C), fractions I à M (EC.2.34.D). La fraction EC.2.34.C et EC.2.30.D ont été regroupées pour former la fraction EC.2.42.B.

## 2. Chromatographie sur colonne ouverte en phase normale

Suite aux différentes CLMP, trois fractions ont été traitées par chromatographie sur colonne ouverte en phase normale afin de continuer l'isolement des D1.

La colonne utilisée pour la séparation des fractions EC.2.32.C et EC.2.36.B est une colonne de verre borosilicaté, de 35 cm de long et 2,5 cm de diamètre, avec un col rodé. La colonne a été remplie avec environ 60 g de silice, de granulométrie 15-40  $\mu\text{m}$ , non greffée ; la colonne a été conditionnée avec le solvant de départ d'élution puis le dépôt solide a été réalisé en couche homogène.

L'élution pour la fraction EC.2.32.C a été réalisée comme suit : 250 mL de cyclohexane, 3 fois 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 3 fois 80 mL de AcOEt et enfin 200 mL de MeOH.

Ainsi 8 fractions ont été obtenues (EC.2.35.A à EC.2.35.H). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions A à F (EC.2.36.A), fraction G (EC.2.36.B) et fraction H (EC.2.36.C).

La fraction EC.2.36.B a elle aussi été traitée par chromatographie sur colonne ouverte. L'élution a été réalisée comme suit : 6 fois 30 mL d'un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  50/50 (v/v), 4 fois 85 mL d'un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  40/60 (v/v) puis 150 mL d'AcOEt.

Ainsi 8 fractions ont été obtenues (EC.2.40.A à EC.2.40.H). Les fractions EC.2.40.G, EC.2.40.H et EC.2.30.C ont été regroupées pour former la fraction EC.2.41.C.

### 3. Chromatographie sur colonne ouverte en phase inverse

Suite aux différentes CLMP, une fraction a été traitée par chromatographie sur colonne ouverte en phase inverse.

La colonne utilisée est une colonne de verre borosilicaté, de 50 cm de long et 5,5 cm de diamètre, avec un col rodé. La colonne a été remplie avec environ 150 g de silice, de granulométrie 40-63  $\mu\text{m}$ , greffée avec des chaînes à 18 atomes de carbone ; la colonne a été conditionnée avec le solvant de départ d'élution puis le dépôt solide a été réalisé en couche homogène.

L'élution de la fraction EC.2.34.B a été réalisée comme suit : 500 mL puis 2 fois 250 mL d'un mélange MeCN/H<sub>2</sub>O 85/15 (v/v), 3 fois 250 mL d'un mélange MeCN/H<sub>2</sub>O 90/10 (v/v), 3 fois 250 mL d'un mélange MeCN/H<sub>2</sub>O 95/5 (v/v), 5 fois 100 mL de MeCN, 10 fois 50 mL de MeOH, 13 fois 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et enfin 300 mL de cyclohexane.

Ainsi 37 fractions ont été récupérées (EG.60.1 à EG.60.37). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions EG.60.1 à EG.60.8 (EG.64.A), fraction EG.60.9 seule (EG.64.B), fractions EG.60.10 à EG.60.14 (EG.64.C), fraction EG.60.15 seule (EG.64.D), fraction EG.60.16 seule (EG.64.E), fraction EG.60.17 seule (EG.64.F), fraction EG.60.18 seule (EG.64.G), fractions EG.60.19 à EG.60.21 (EG.64.H), fractions EG.60.22 et EG.60.23 (EG.64.I), fraction EG.60.24 seule (EG.64.J), fraction EG.60.25 seule (EG.64.K), fractions EG.60.26 à EG.60.29 (EG.64.L), fraction EG.60.30 seule (EG.64.M), fractions EG.60.31 à EG.60.33 (EG.64.N), et enfin fractions EG.60.34 à EG.60.37 (EG.64.O).

### 4. Chromatographie flash

Plusieurs chromatographies flashes ont été nécessaires pour isoler les D1.

L'élution et le conditionnement, pour les fractions EC.2.41.C, EC.2.42.B et EG.64.A, ont été réalisés avec un débit de 60 mL/min et une pression de 15 bars. Les solvants utilisés sont de l'eau distillée (A) et du MeCN (B) avec une colonne de 80 g RS 80 C18 (CHROMABOND Flash, MACHEREY-NAGEL).

Le gradient d'élution a été réalisé comme suit : 50% de B à 0 minutes puis une augmentation linéaire du pourcentage de B jusqu'à 100% en 60 minutes.

Ainsi, 360 tubes de 10 mL ont été collectés à la suite de chaque élution. Les tubes issus de la séparation de la fraction EC.2.41.C ont été regroupés en 12 fractions : EC.2.43.A à EC.2.43.L. De la même manière, les tubes issus de la séparation de la fraction EG.64.A ont été regroupés en pour former les fractions EC.2.83.A à EC.2.83.L.

Concernant la séparation de la fraction EC.2.42.B, quatre chromatographies flash successives ont été nécessaires pour traiter l'intégralité de la fraction. Ainsi, 360 tubes ont été obtenus pour chaque injection puis regroupés en 9 fractions (EC.2.65.A à EC.2.65.I).

Les fractions EC.2.65.C et EC.2.65.G ont ensuite subi une nouvelle chromatographie flash. L'élution et le conditionnement ont été réalisés avec un débit de 20 mL/min et une pression de 2 bars. Les solvants utilisés étaient de l'eau distillée (A) et du MeCN (B), avec une colonne de 15 g RS15 C18 (CHROMABOND Flash, MACHEREY-NAGEL).

Le gradient de solvants a été réalisé comme suit pour la fraction EC.2.65.C : 30% de B à 0 minutes puis une augmentation progressive du pourcentage de B jusqu'à 70% de B à 60 minutes. Pour la fraction EC.2.65.G, la méthode a débutée avec 40% de B et le pourcentage a augmenté jusqu'à 80% de B à 60 minutes. Des fractions de 5 mL ont été collectées.

Ainsi, 240 fractions ont été obtenues pour chaque élution et ont été regroupés en 20 fractions pour la fraction EC.2.65.C (EC.2.90.A à EC.2.90.T) et en 7 fractions pour EC.2.65.G (EC.2.103.A à EC.2.103.G).

## 5. CLHP semi préparative en phase inverse

La dernière étape de purification a été réalisée par CLHP en phase inverse pour toutes les fractions obtenues précédemment présentant un profil intéressant, c'est à dire contenant des D1, présentant une masse suffisamment importante pour être traitée et un profil suffisamment simple pour pouvoir isoler les molécules d'intérêt. La colonne utilisée est une colonne Luna C18 (5 $\mu$ m, 10 x 250 mm, 100 Å (Phenomenex)) éluée avec un débit de 3 mL/min et un volume d'injection de 300  $\mu$ L. Les solvants utilisés sont de l'eau milliQ (A) et du MeCN (B). Les échantillons ont été dissous dans du MeOH et les fractions ont été collectées manuellement à la sortie de la colonne. Les différents gradients utilisés vont être détaillés ci-dessous.



Les fractions EC.2.43.C et EC.2.83.I ont été éluées en mode isocratique avec 70% de B pendant 30 minutes et une pression de départ de 61 bars. Les échantillons ont été dissous à une concentration de 10 mg/mL et 300 µL ont été injectés à chaque fois. Huit injections ont été nécessaires pour les fractions EC.2.43.C et EC.2.83.I. Ainsi, 7 fractions ont été obtenues suite à la séparation de la fraction EC.2.43.C : EC.2.58.A à EC.2.58.G. Quatre fractions ont été obtenues suite à l'éluution de la fraction EC.2.83.I (EC.2.131.A à EC.2.131.D).

Pour la fraction EC.2.43.E, le gradient de solvants a été réalisé comme suit : une augmentation de 70 à 100% de B en 30 minutes avec une pression de départ de 61 bars. Dix-huit injections à une concentration de 10 mg/mL ont été nécessaires. Ainsi, 7 fractions ont été obtenues : EC.2.61.A à EC.2.61.G.

Pour la fraction EC.2.43.F, le gradient de solvants a été réalisé comme suit : une augmentation de 80 à 100% de B en 20 minutes, suivie d'un plateau à 100% de B pendant 10 minutes. La pression de départ était de 110 bars. Seize injections à une concentration de 30 mg/mL ont été nécessaires. Ainsi, 5 fractions ont été obtenues : EC.2.75.A à EC.2.75.E.

Pour la fraction EC.2.43.I le gradient de solvants a été réalisé comme suit : un plateau à 99% de B pendant 10 minutes suivi d'une augmentation à 100% à la onzième minute et un plateau à 100% de B pendant 9 minutes. La pression de départ était de 95 bars. Vingt injections à une concentration de 15 mg/mL ont été nécessaires. Ainsi, 8 fractions ont été obtenues : EC.2.48.A à EC.2.48.H.

Pour les fractions EC.2.65.D et EC.2.65.E, le gradient de solvants a été réalisé comme suit : une augmentation de 70 à 100% de B en 30 minutes puis un plateau à 100% de B pendant 10 minutes. La pression de départ était de 110 bars. Vingt injections à une concentration de 20 mg/mL ont été nécessaires pour traiter chaque fraction. Ainsi, 12 fractions ont été obtenues suite à la séparation de la fraction EC.2.65.D (EC.2.137.A à EC.2.137.L), et 9 fractions ont été obtenues suite à la purification de la fraction EC.2.65.E : EC.2.82.A à EC.2.82.I.

Pour la fraction EC.2.90.J, le gradient de solvants a été réalisé comme suit : un plateau à 65% de B pendant 25 minutes puis une augmentation à 100% de B à 25,1 minutes et un plateau à 100% de B jusqu'à 35 minutes. La pression de départ était de 140 bars. Quatorze injections à

une concentration de 5 mg/mL ont été nécessaires. Ainsi 8 fractions ont été obtenues : EC.2.95.A à EC.2.95.H.

Les fractions EC.2.103.G et EC.2.107.C ont été éluées avec le gradient de solvants suivant : 90% de B pendant 20 minutes suivi d'une augmentation à 100% de B à 20,1 minutes et un plateau à 100% de B jusqu'à 30 minutes. La pression de départ était de 90 bars. Quinze injections à une concentration de 10 mg/mL ont été nécessaires pour la fraction EC.2.103.G. Ainsi 3 fractions ont été obtenues : EC.2.107.A à EC.2.107.C. Tandis que pour la fraction EC.2.107.C 5 injections à 3,5 mg/mL ont été suffisantes. Pour cet échantillon 3 fractions ont été obtenues : EC.2.117.A à EC.2.117.C.

Toutes les étapes de purification des D1 sont résumées dans un arbre de purification (Figure 40).

## II. Tests biologiques

---

Des tests de cytotoxicité ont été réalisés avec les daphnanes purifiés appliqués sur des cellules de cancer colorectal (CCR) ou des cellules intestinales saines. De plus, quatre daphnanes isolés ont été testés sur deux souches virales : le virus Zika et le SARS-CoV-2.

### A. Evaluation de l'activité anticancéreuse des daphnanes monoestérifiés isolés

#### 1. Lignées cellulaires

Les deux types cellulaires utilisés sont :

- Les cellules Caco-2 (ATCC HTB-37) issues d'une lignée d'adénocarcinome colorectal obtenue à partir d'un patient de 72 ans. Cette lignée présente un gène Adenomatous Polyposis Coli (APC) muté comme dans plus de 80% des cas de CCR (158). Les cellules sont cultivées en milieu Eagle modifié de Dulbecco avec 4,5 g/L de glucose, GlutaMAX et pyruvate (DMEM, Gibco), plus 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels (AANE 100X, Gibco) et 1% d'un mélange pénicilline/streptomycine (P/S, Gibco).
- Les cellules HIEC-6 (ATCC CRL-3266) issues de l'intestin grêle d'un patient sain. Ces cellules sont cultivées dans du milieu OPTIMEM avec du GlutaMAX et de l'Hepes (Gibco), plus 10 ng/mL d'Epidermal Growth Factor (EGF, PMG8041, Thermo Fisher Scientific) et 1% P/S.

Pour le maintien de la culture, les cellules colorectales ont étéensemencées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific) à une densité de 0,15x10<sup>6</sup> cellules (Caco-2) ou de 2x10<sup>6</sup> cellules (HIEC6) dans 10 mL de milieu et incubées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> (incubateur Cell 150 HERA). Le milieu de culture a été changé toutes les 48 h et les passages ont été réalisés à 90% de confluence avec un film de trypsine (0,05% Trypsin-EDTA 1X Gibco) pendant 10 min

à 37°C. Les cellules décollées et individualisées ont été comptées et réensemencées ainsi tous les 7 jours.

## 2. Organoïdes

Les cellules épithéliales primaires isolées à partir de colons de patients ont été cultivées en 3D sous forme d'organoïdes.

Les échantillons utilisés sont les suivants :

- L'échantillon n°1 provient d'une patiente ayant subi une résection laparoscopique du côlon gauche (traitement d'une fistule sigmoïdo-vaginale pour diverticulite)
- L'échantillon n°2 est issu d'une patiente ayant subi une résection laparoscopique du côlon gauche (traitement d'une diverticulite récurrente)
- L'échantillon n°3 provient d'un patient ayant subi une sigmoïdectomie par résection laparoscopique (traitement d'une sigmoïdite fistulisée jusqu'à la vessie)
- L'échantillon n°4 provient d'un patient présentant un adénocarcinome colique (cæcum) bien différencié, infiltrant la séreuse avec de nombreuses (>7) métastases ganglionnaires, stade pT4N2b (stade III avancé), phénotype somatique anormal : perte d'expression des protéines hMSH2 et hMSH6, instabilité des microsatellites (MSI) (suspicion de syndrome de Lynch)
- L'échantillon n°5 a été prélevé chez un patient âgé porteur d'un adénocarcinome colique (colon droit), ayant subi neuf cures de chimiothérapie.

Les échantillons humains ont été prélevés sous le N° d'autorisation réglementaire RC31/21/0038 du 13 avril 2021. Les échantillons 1 à 3 ont été utilisés comme tissus contrôles par rapport aux échantillons tumoraux 4 et 5.

Les cellules épithéliales coliques ont été isolées et cultivées sous forme d'organoïde au sein de la plateforme ORGANOIDES de l'IRSD à Toulouse, comme précédemment décrit (159). Brièvement, les cellules épithéliales ont été détachées de leur microenvironnement par l'incubation des tissus avec une forte concentration d'EDTA, puis cultivées en 3D dans une matrice riche en protéines adhésives (Matrigel) en présence de facteurs favorisant la survie et la prolifération des cellules souches et de leurs progéniteurs. En présence du support adhésif, ces cellules s'organisent spontanément sous forme d'une monocouche épithéliale bordant une lumière centrale (Figure 142), reflétant l'architecture normale de la crypte colique. Cependant, les cellules coliques cancéreuses forment des sphéroïdes irréguliers avec une prolifération

cellulaire anarchique et sans lumière centrale unique (Figure 142). Après amplification du nombre d'organoïdes ceux-ci ont été congelés en azote liquide.

Pour la réalisation des tests de cytotoxicité, les organoïdes coliques ont été décongelés et cultivés en 3D (Matrigel, hESC-qualified, BD Biosciences) pendant une semaine avant la dispersion cellulaire par ajout de 500  $\mu\text{L}$  de trypsine par puit après un lavage avec du Phosphate Buffer Saline (PBS). La réaction est arrêtée, après 10 minutes d'agitation à 37 °C, en ajoutant 1 mL de milieu DMEM supplémenté avec 500  $\mu\text{L}$  de SVF. Puis, les cellules sont comptabilisées etensemencées en plaques 96 puits où seront réalisés les tests. Les cellulesensemencées dans du Matrigel sont cultivées à 37°C dans un incubateur à 5% de  $\text{CO}_2$  et prolifèrent sous forme d'organoïdes ou de sphéroïdes en présence du milieu suivant : Advanced DMEM/F12 (Invitrogen, 12634-010), 1X N2 (Invitrogen, 17502-048), 1X B27 moins vitamine A (Life technologies, 12587-010), 50 ng/ml d'EGF humain (Gibco, PHG0314), 100 ng/ml de noggin humain (Tebu, 120-10C) qui permet de bloquer la différenciation des cellules, milieu conditionné Wnt3a, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de R-spondine humaine (R&D Systems, 4645RS), 10 mM de nicotinamide (Sigma Aldrich, N0636), 10 nM de gastrine (Sigma Aldrich, G9145-1MG), 10  $\mu\text{M}$  de SB202190 (Sigma Aldrich, 57067), 0,01  $\mu\text{M}$  PGE2 (Sigma Aldrich, P0409-1MG). A J0 après le passage des cellules, 10  $\mu\text{M}$  de Y27632 (Sigma Aldrich, Y0503), 0,5  $\mu\text{M}$  de LY2157299 (Axon MedChem, 1941) et 1 mM de N-acétylcystéine (Sigma Aldrich, A9165-5G) sont ajoutés.

### 3. Tests de cytotoxicité

Quarante-huit heures avant la réalisation du test de cytotoxicité, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (Thermo Fisher Scientific) à une densité de  $40 \times 10^3$  (cellules Caco-2), de  $60 \times 10^3$  (cellules HIEC-6) ou de  $2,5 \times 10^3$  (organoïdes) cellules/puits.

Les daphnanes purifiés ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Thermo Fisher Scientific) à une concentration de 10 mg/mL puis des dilutions successives ont été effectuées dans le milieu de culture afin d'obtenir les concentrations finales : 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Quarante-huit heures après l'ensemencement cellulaire, les daphnanes ont été ajoutés dans les puits de culture au moment du renouvellement de milieu. Les essais ont été réalisés en triplicat et les essais contrôles comportent l'absence de traitement ou l'addition de DMSO seul (concentration maximale 0,01%). Au bout de 48 h d'incubation, le nombre de cellules vivantes a été quantifié par un test colorimétrique mesurant leur capacité de réduction

du composé 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega), ou grâce au réactif CellTiter-Glo (Luminescent Cell Viability Assay, Promega). Les tests de cytotoxicité ont été réalisés comme indiqué par le fabricant puis une lecture à 490 nm (MTS) ou de la luminescence (CellTiter-Glo) a été effectuée (Varioskan Flash et logiciel SkanIT RE 2.4.3, Thermo Fisher Scientific).

Lors de certains essais, 30 min avant l'ajout des daphnanes, les cellules ont été incubées avec le CRT 0066854 hydrochloride (Tocris Bioscience), un inhibiteur des PKCs atypiques (Ref : 5922). Cet inhibiteur a été dissout dans du DMSO à une concentration de 50 mM puis des dilutions successives ont été réalisées dans le milieu de culture pour obtenir les concentrations finales 0,625  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M et 2,5  $\mu$ M. Les essais ayant reçu l'inhibiteur des aPKCs puis un daphnane ont une concentration finale de DMSO de 0,015%. L'un des tests présentés dans la partie résultat a nécessité l'utilisation d'un inhibiteur de MEK. Ce test a été réalisé lors des travaux précédents de l'équipe (33). Les cellules ont été pré-incubées 15 minutes avec un inhibiteur de MEK (MedChemExpress, PD-0325901) à 0,5  $\mu$ M, avant le traitement par la huratoxine à 1  $\mu$ g/mL.

Lors des tests sur organoïde la 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (Floxuridine, FUdR, Sigma-Aldrich, Ref : F0503) à 1  $\mu$ g/mL a été utilisée comme contrôle positif de cytotoxicité. Celle-ci a été dissoute dans du PBS à 50 mM puis des dilutions ont été effectuées afin d'obtenir la concentration finale désirée.

#### 4. Analyses microscopiques

L'évolution des cultures cellulaires avant et après traitement par les daphnanes a été suivie quotidiennement au microscope optique à contraste de phase (objectif 10x, microscope Nikon Eclipse Ts2) et des photographies (appareil Nikon et logiciel N/S Element) ont été prises 48 h post-traitement pour montrer les variations morphologiques.

Pour aller plus loin dans l'analyse des composants cellulaires, une analyse *cell painting* avec le kit PhenoVue (PerkinElmer) a permis de mettre en évidence par fluorescence des modifications des noyaux (marquage de l'ADN par Hoechst 33342), de la membrane plasmique (marquage

des glycoprotéines par Wheat Germ Agglutinin (WGA) fluor 555), du cytosquelette (marquage des filaments d'actine par phalloïdine fluor 568), du réticulum endoplasmique (marquage des glycoprotéines par concanavalin A fluor 488), des nucléoles (marquage des ARN par une molécule organique fluor 512) et des mitochondries (marquage de la membrane mitochondriale par une cyanine cationique fluor 641). Pour ce test, les cellules Caco-2ensemencées et incubées pendant 48 h avec les daphnanes (comme décrit ci-dessus pour le test de cytotoxicité) dans une plaque 96 puits à fond noir (PerkinElmer) ont été mises en présence, après élimination du milieu de culture, de 50 µL/puits de réactif mitochondrial (500 nM) pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées par ajout de 15 µL de paraformaldéhyde (PFA 3,7% final, Sigma Aldrich) pendant 20 min, à température ambiante et à l'obscurité. Après un lavage avec 100 µL de HBSS, les cellules ont été perméabilisées par ajout de 50 µL d'un mélange HBSS/Triton X100 à 0,1% pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Après deux lavages avec 100 µL de HBSS, 50 µL d'un mélange des autres réactifs (Hoechst 33342 5 µg/mL ; WGA fluor 555 1,5 µg/mL ; phalloïdine fluor 568 33 nM ; concanavalin A fluor 488 100 µg/mL ; PhenoVue 512 3 µM) a été ajouté dans chaque puits pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. A la suite de trois lavages avec 100 µL de HBSS, la plaque a été analysée par microscopie confocale (Opera Phenix Plus High-Content Screening, PerkinElmer) et les résultats traités avec le logiciel Harmony.

L'expression et la localisation de la PKCζ dans les cellules Caco-2 incubées avec les daphnanes a été étudiée par immunofluorescence. Pour cette analyse, les cellules ont étéensemencées et traitées pendant 48 h dans des plaques 96 puits à fond noir comme décrit ci-dessus et fixées par l'addition de 20 µL de PFA (3,7% final) dans chaque puits. Après 20 min d'incubation et trois lavages de 5 min avec du PBS (Gibco), les cellules ont été perméabilisées pendant 10 min par l'addition de 100 µL/puits de tampon de perméabilisation (PBS supplémenté avec 0,5% Triton X100 et 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Dustcher)). Puis l'anticorps primaire (anti-PKCζ SC-17781 Santa Cruz biotechnology, 1/50<sup>ème</sup>) dilué dans le tampon de perméabilisation a été ajouté pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages de 10 min avec du PBS, l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Life technologies) dilué au 1000<sup>ème</sup> dans le tampon de perméabilisation a été ajouté pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité. Puis, trois lavages de 10 min avec du PBS ont été effectués et la Rhodamine Phalloïdine (R415, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) dilué au 500<sup>ème</sup> dans du PBS a été ajoutée dans chaque

puits pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. A la suite de trois lavages de 10 min avec du PBS, une goutte de réactif ProLong avec DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a été ajoutée dans chaque puits. L'analyse microscopique a ensuite été effectuée avec un microscope confocal (LSM710 Zeiss) piloté par le logiciel Zen et le traitement des images a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

## 5. Analyse biochimique

Pour étudier l'impact des daphnanes sur la régulation des voies de prolifération et de la PKC $\zeta$  dans les cellules Caco-2, des analyses de protéines par Western Blot ont été réalisées. Pour cette étude, les cellules Caco-2 ont étéensemencées dans des plaques 12 puits (Thermo Fisher Scientific) à une densité de  $0,25 \times 10^6$  cellules/puits dans 1 mL de milieu de culture. Quarante-huit heures après le traitement par les daphnanes (comme décrit dans le test de cytotoxicité ci-dessus), le milieu de culture a été retiré et deux lavages avec 1 mL de PBS supplémenté en calcium et en magnésium ont été effectués. Les cellules ont ensuite été lysées sur glace pendant 30 min avec un tampon à pH 7,4 (50  $\mu$ L/puits) composé de Tris HCl (50 mM), NaCl (150 mM), Triton X100 (0,1 %), EDTA (1 mM) et additionné d'un inhibiteur de protéases (1/25<sup>ème</sup>, Complete mini EDTA free Roche) et d'un inhibiteur de phosphatases (1/100<sup>ème</sup>, Inhibitor cocktail 2 Sigma-Aldrich). Le matériel cellulaire a ensuite été récupéré à l'aide d'un Cell Scrapper (Sarstedt) et conservé à - 20°C.

Un dosage des protéines contenues dans les lysats cellulaires a été réalisé dans des plaques 96 puits transparentes (Thermo Fisher Scientific) grâce à une gamme d'étalonnage BSA en 8 points, de 0 à 1 mg/ml par dilutions successives dans du tampon de lyse (volume final 20  $\mu$ L). Après l'ajout de 200  $\mu$ L/puits de réactif (kit BiCinchoninic Acid Assay ou BCA, Thermo Fisher Scientific) et une incubation de 30 min à 37°C, l'absorbance à 562 nm a été lue au spectrophotomètre (Varioskan Flash) afin de déterminer la concentration en protéines des différents échantillons.

Trente microgrammes de protéines ont été mélangés avec du tampon Laemmli (Bio-Rad) contenant le mélange SodiumDodécylSulfate/glycérol/bleu de bromophénol/ $\beta$ -mercaptoéthanol pour un volume final de 15  $\mu$ L, chauffé à 95°C pendant 5 min (ThermoMixer F1.5, Eppendorf), afin de dénaturer les protéines. Chaque échantillon a été déposé dans un puits contenant un gel pré-coulé (Mini-PROTEAN, TGX, Bio-Rad) contenant une quantité



d'acrylamide allant de 4 à 15%. Un puits est réservé au dépôt de 15  $\mu$ L de marqueurs de taille (Precision Plus Protein, Bio-Rad). La migration électrophorétique des protéines a été réalisée dans un tampon Tris-Glycine SDS Buffer et une cuve Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad). Après migration, les protéines ont été transférées grâce à un courant électrique sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du kit Trans-Blot Turbo (Bio-Rad).

Après saturation des sites de fixation non spécifiques pendant 1 h avec un mélange PBS/lait 5%/BSA 1%, la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire dilué dans un mélange PBS/lait 1%/ BSA 0,2% pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

- Anti phospho-MEK1/2 Ser 217/221 (41G9; 1/1000; Cell signaling technology)
- Anti MEK1/2 (L38C12; 1/1000; Cell signaling technology)
- Anti  $\beta$ -caténine (AB32572 ; 1/5000 ; Abcam)
- Anti phospho-GSK3 $\beta$  Ser 9 (04-1075; 1/2000; Sigma-Aldrich)
- Anti GSK3 $\beta$  (610202; 1/2000; BD transduction laboratories)
- Anti phospho-PKC $\zeta$  Thr 410 (SC-271962; 1/300; Santa Cruz biotechnology)
- Anti PKC $\zeta$  (SC-17781 ; 1/100 ; Santa Cruz biotechnology)
- Anti phospho-Akt Ser 473 (4060; 1/2000; Cell signaling technology)
- Anti Akt (SC-8312 ; 1/1000 ; Santa Cruz biotechnology)

A la suite de trois lavages de 10 min dans le tampon PBS supplémenté avec 0,2% de Tween 20, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-mouse-HRP (HorseRadish Peroxydase) ou anti-rabbit-HRP dilué au 3000<sup>ème</sup> pendant 1h30 à température ambiante. Ces anticorps couplés HRP permettent la production de chemiluminescence après l'ajout d'un réactif. Un réactif Enhanced ChemiLuminescence (ECL, Clarity Max pour les protéines phosphorylées, Clarity pour les protéines totales, Bio-Rad) a été ajouté sur la membrane et la lecture a été faite avec un appareil Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad) piloté par le logiciel ImageLab.

Afin de réutiliser la membrane, les anticorps sont désorbés par deux incubations de 5 min sous agitation avec une solution aqueuse composée de 5% de SDS, 1% de Tween 20, 1,5% de glycine tamponnée à pH 2,4 avec de l'acide chlorhydrique. Puis, après trois lavages de 10 min avec du PBS-Tween, la membrane est prête pour une nouvelle saturation.

## 6. RT-qPCR

Une RT-qPCR (Reverse Transcriptase-Quantitative Polymerase Chain Reaction) a été réalisée par May Yassine durant son stage de Master 2 sous la direction de Claire Racaud-Sultan à l'Institut de Recherche en Santé Digestive (Toulouse). Le protocole est détaillé dans son rapport de Master 2 (160). Brièvement,  $0,32 \times 10^6$  cellules Caco-2 sont ensemencées en plaque 12 puits (FALCON) et sont traitées avec la huratoxine à  $1 \mu\text{g/mL}$ . A J2 post-traitement, les cellules sont lysées par ajout du réactif Trisol Reagent, après 5 minutes  $200 \mu\text{L}$  de chloroforme sont ajoutés et les lysats sont centrifugés ( $12\,000\text{g}$  pendant 15 min) permettant la séparation des ARNs, ADNs et protéines. La phase supérieure contenant les ARNs est récupérée puis une extraction est réalisée à l'aide du KIT-DIRECT-ZOL. Après dosage des ARNs au nanodrop (IMPLEN®),  $3 \mu\text{g}$  d'ARNs sont prélevés et de l'eau ultra pure est ajoutée pour atteindre un volume de  $14 \mu\text{L}$  et une étape de dénaturation est effectuée (5 min à  $65^\circ\text{C}$ ). Le tampon pour la reverse transcription (RT) ( $4 \mu\text{L}$  de tampon 5x : DNTP (Désoxyribonucléotides), du tris-KCl,  $\text{MgCl}_2$  et  $2 \mu\text{L}$  d'enzyme reverse transcriptase) est ajouté. Le programme est ensuite lancé sur l'appareil Perkin :  $10' 25^\circ\text{C} - 50' 50^\circ\text{C} - 5' 85^\circ\text{C} - 16^\circ\text{C}$ , pour obtenir les ADNc. Trois microlitres d'ADNc dilué au 1/10 et  $7 \mu\text{L}$  de tampon ( $5 \mu\text{L}$  de SybrGreen,  $1.4 \mu\text{L}$  d'eau et  $0.6 \mu\text{L}$  correspondant à  $600 \text{ nM}$  de primer Forward et Reverse ( $10 \mu\text{M}$  chacun)) sont déposés en plaque 96 puits pour un volume final de  $10 \mu\text{L}$ . Les échantillons sont déposés en duplicat.

## 7. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 7. Le test de Student a été utilisé pour chaque expérience. Une p-valeur  $<0,05$  est considérée comme significative.

### B. Tests antiviraux

Les tests antiviraux ont été réalisés à l'UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT) à l'île de la Réunion par Chaker El Kalamouni.

## 1. Lignées cellulaires et virus utilisés

Les deux types de lignées cellulaires et de virus utilisés sont :

- Les cellules A549 (Invivogen) issues de poumons humains. Cette lignée épithéliale surexprime les protéines ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) et TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté par 10 % de FBS, 1 % de P/S, 0,1 % d'amphotéricine B (PAN Biotech), 100 µg/mL d'hygromycine, 0,5 µg/mL de puromycine, 10 µg/mL de blasticidine et 100 µg/mL de zéocine.
- Les cellules Vero E6 (ATCC) issues de cellules épithéliales de rein de singe sont cultivées dans un milieu Essential Minimal Eagle (MEM, PAN Biotech) contenant 5% de FBS, 1% de P/S et 0,1% d'amphotéricine B.

Toutes les cellules ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur à 5 % de CO<sub>2</sub>.

- Le virus SARS-CoV-2 a été isolé en 2020 à partir d'un écouvillon nasopharyngé d'un patient COVID-19 positif (PCR) à l'île de la Réunion.
- Le virus Zika recombinant exprimant le gène rapporteur GFP (ZIKV<sup>GFP</sup>) a été obtenu comme décrit dans la littérature (161).

## 2. Mesure de l'activité antivirale des daphnanes monoestérifiés

Pour déterminer l'activité antivirale des composés contre le SARS-CoV-2, des cellules A549 surexprimant ACE2 et TMPRSS2 ensemencées dans des plaques 24 puits ont été incubées avec différentes concentrations de chaque composé, à partir de la concentration maximale non cytotoxique (CMNT), et infectées par le SARS-CoV-2 à une multiplicité d'infection (MOI), qui représente le ratio virus/cellules infectées, de 0,001. Vingt-quatre heures après l'infection, le surnageant a été récolté pour titrer la croissance virale *via* des tests d'unités de formation de plaques (UFP).

Pour déterminer l'activité antivirale des composés contre le virus Zika, les cellulesensemencées dans des plaques 96 puits ont été incubées avec différentes concentrations de chaque composé, à partir de 50 µg/mL, et infectées avec ZIKV<sup>GFP</sup> à une multiplicité d'infection (MOI) de 1. Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules ont été récoltées, fixées avec 3,7% de PFA dans du PBS pendant 20 minutes, lavées deux fois avec du PBS, puis soumises à une analyse cytométrique en flux avec Cytotoflex (Beckman). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Cytexpert.

### 3. Test d'unités de formation de plaques (UFP)

Le surnageant des cellules infectées pendant 24 heures a été récolté et conservé à -80°C pour le dosage des UFP. Les cellules Vero E6 ont étéensemencées à 70% de confluence dans des plaques 24 puits et ont été incubées pendant 2 heures avec 100 µL de surnageant dilué en série au dixième. Ensuite, du milieu MEM contenant 1% de carboxyméthyl cellulose (CMC) a été ajouté dans chaque puits et incubé à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Trois jours plus tard, les cellules infectées ont été soigneusement lavées deux fois avec du PBS et fixées pendant 10 minutes avec du PFA à 4%. Les cellules ont ensuite été lavées et colorées avec du cristal violet. Les plaques ont été comptées et exprimées en UFP/mL.

---

## REFERENCES

---

1. Ramalho S, Pinto M, Ferreira D, Bolzani V. Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. *Planta Med.* 2018;84(09/10):558-67.
2. Bijekar S, Gayatri M. Ethanomedicinal properties of Euphorbiaceae family- A comprehensive review. *Int J Phytomedicine.* 2014;6(2):144-56.
3. Mwine JT, Damme PV. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J Med Plant Res.* 2011;5(5):652-62.
4. Tobias LM, Cordeiro I, Demarco D. Floral development in *Hura crepitans* (Euphorbiaceae): a bat-pollinated species with multicarpellate gynoecium. *Braz J Bot.* 2019;42(3):509-19.
5. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc.* 2016;181(1):1-20.
6. Webster GL. Classification of the Euphorbiaceae. *Ann Mo Bot Gard.* 1994;81(1):3.
7. Kapil RN, Bhatnagar AK. The Contribution of Embryology to the Systematics of the Euphorbiaceae. *Ann Mo Bot Gard.* 1994;81(2):145.
8. Rahman M, Akter. Taxonomy and Medicinal Uses of Euphorbiaceae (Spurge) Family of Rajshahi, Bangladesh. *Plant Sci.* 2013;1(3):74-80.
9. Stevens, P. F. ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 14 [Internet]. ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 14. 2017 [cité 29 juill 2020]. Disponible sur: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
10. Secco R de S, Cordeiro I, Senna-Vale L de, Sales MF de, Lima LR de, Medeiros D, et al. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. *Rodriguésia.* 2012;63(1):227-42.
11. Fais A, Delogu GL, Floris S, Era B, Medda R, Pintus F. Euphorbia characias: Phytochemistry and Biological Activities. *plants.* 2021;10(1468):1-22.
12. Smeriglio A, Denaro M, Trombetta D, Ragusa S, Circosta C. New Insights on *Euphorbia dendroides* L. (Euphorbiaceae): Polyphenol Profile and Biological Properties of Hydroalcoholic Extracts from Aerial Parts. 2021;16.
13. Nothias-Scaglia LF, Dumontet V, Neyts J, Roussi F, Costa J, Leyssen P, et al. LC-MS2-Based dereplication of *Euphorbia* extracts with anti-Chikungunya virus activity. *Fitoterapia.* 2015;105:202-9.
14. Olivon F, Remy S, Grelier G, Apel C, Eydoux C, Guillemot JC, et al. Antiviral Compounds from *Codiaeum peltatum* Targeted by a Multi-informative Molecular Networks Approach. *J Nat Prod.* 2019;82(2):330-40.
15. Remy S, Litaudon M. Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbiaceae as A Source of Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *Molecules.* 2019;24(12):1-16.
16. Vasas A, Hohmann J. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis

- (2008–2012). Chem Rev. 2014;114(17):8579-612.
17. Buchanan JG, Crews P, Epe B, Evans FJ, Hanke FJ, Manes LV, et al. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer. Vol. 44. Vienna: Springer Vienna; 1983. 333 p.
  18. Nothias-Scaglia LF, Retailleau P, Paolini J, Pannecouque C, Neyts J, Dumontet V, et al. Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. J Nat Prod. 2014;77(6):1505-12.
  19. Nothias-Scaglia LF, Pannecouque C, Renucci F, Delang L, Neyts J, Roussi F, et al. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. J Nat Prod. 2015;78(6):1277-83.
  20. Crossay E. Thèse d'état de docteur en pharmacie : Recherche de nouveaux produits naturels pour le traitement du cancer colorectal : dérégulation et isolement de daphnanes mono estérifiés du latex de *Hura crepitans*. 2020.
  21. Bourjot M, Leyssen P, Neyts J, Dumontet V, Litaudon M, Trigocherrierin A, a Potent Inhibitor of Chikungunya Virus Replication. Molecules. 2014;19(3):3617-27.
  22. Rashad AA, Mahalingam S, Keller PA. Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. J Med Chem. 2014;57(4):1147-66.
  23. Liu Q, Cheng YY, Li W, Huang L, Asada Y, Hsieh MT, et al. Synthesis and Structure–Activity Relationship Correlations of Gnidimacrin Derivatives as Potent HIV-1 Inhibitors and HIV Latency Reversing Agents. J Med Chem. 2019;62(15):6958-71.
  24. Yan M, Lu Y, Chen CH, Zhao Y, Lee KH, Chen DF. Stelleralides D–J and Anti-HIV Daphnane Diterpenes from *Stellera chamaejasme*. J Nat Prod. 2015;78(11):2712-8.
  25. Lai W, Huang L, Zhu L, Ferrari G, Chan C, Li W, et al. Gnidimacrin, a Potent Anti-HIV Diterpene, Can Eliminate Latent HIV-1 Ex Vivo by Activation of Protein Kinase C  $\beta$ . J Med Chem. 2015;58(21):8638-46.
  26. Shi QW, Su XH, Kiyota H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. Chem Rev. 2008;108(10):4295-327.
  27. Owojuyigbe OS, Firempong CK, Larbie C, Komlaga G, Emikpe BO. Hepatoprotective Potential of *Hura crepitans* L.: A Review of Ethnomedical, Phytochemical and Pharmacological Studies. J Complement Altern Med Res. 2020;9(2):1-10.
  28. Kadiri AB, Adeniran S. Study of the anatomy of the genus *Hura* L. (Euphorbiaceae). Ife Journal Sci. 2016;18(2):413-26.
  29. *Hura crepitans* L., 1753 [Internet]. Inventaire national du patrimoine naturel. 2003 [cité 28 juill 2022]. Disponible sur: [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/629870](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/629870)
  30. Coulamy A. *Hura brasiliensis*, un médicament plein de ressources. Rev Homéopathie. 2012;3(3):96-9.

31. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(3):390-402.
32. Avoseh O, Ogunbajo L, Ogunwande I, Ogundajo A, Lawal O. Anti-inflammatory Activity of Hexane and Ethyl Acetate Extracts of *Hura crepitans* L. *Eur J Med Plants.* 2018;24(1):1-6.
33. Trinel M. Contribution à l'étude phytochimique et à la valorisation biologique du latex de *Hura crepitans* L. [Toulouse]: Université toulouse 3; 2018.
34. Oloyede G, Adaramoye O, Olatinwo M. Chemical Constituents of Sandbox Tree (*Hura crepitans* Linn.) and Anti-hepatotoxic Activity of the Leaves and Stem Bark Extracts. *West Indian Med J.* 2016;1-27.
35. Vassallo A, Armentano MF, Miglionico R, Caddeo C, Chirollo C, Gualtieri MJ, et al. *Hura crepitans* L. Extract: Phytochemical Characterization, Antioxidant Activity, and Nanoformulation. *Pharmaceutics.* 2020;12(6):553.
36. Abdulkadir MN, Amoo IA, Adesina AO. Chemical Composition of *Hura Crepitans* Seeds and Antimicrobial Activities of its Oil. 2013;2(3):6.
37. Aderire CO, Ajayi. Potential of sandbox, *Hura crepitans* L. seed oil for protection of cowpea seeds from *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *J Plant Dis Prot.* 2003;110(6):602-10.
38. Ibrahim AP, Omilakin RO, Betiku E. Optimization of microwave-assisted solvent extraction of non-edible sandbox (*Hura crepitans*) seed oil: A potential biodiesel feedstock. *Renew Energy.* 2019;141:349-58.
39. Ezeh IE, Umoren SA, Essien EE, Udoh AP. Studies on the utilization of *Hura crepitans* L. seed oil in the preparation of alkyd resins. *Ind Crops Prod.* 2012;36(1):94-9.
40. Owojuyigbe OS, Firemping CK, Komlaga G, Larbie C, Emikpe BO. Phytochemical, Antioxidant and Safety Evaluation of *Hura crepitans* (L.) Stem Bark Hydroethanolic Extract in Animals. *Eur J Med Plants.* 2020;1-16.
41. Trinel M, Jullian V, Le Lamer AC, Mhamdi I, Mejia K, Castillo D, et al. Profiling of *Hura crepitans* L. latex by ultra-high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 2018;29(6):627-38.
42. Barbieri L, Falasca A, Franceschi C, Licastro F, Rossi CA, Stirpe F. Purification and properties of two lectins from the latex of the euphorbiaceous plants *Hura crepitans* L. (sand-box tree) and *Euphorbia characias* L. (Mediterranean spurge). *Biochem J.* 1983;215(3):433-9.
43. Ponsinet G, Ourisson G. Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des Euphorbiacées--II Triterpène de *Hura crepitans* L. *Phytochemistry.* 4(1965):813-5.
44. Tan RX, Chen JH. The cerebrosides. *Nat Prod Rep.* 2003;20(5):509.



45. Jia Z, Cong P, Zhang H, Song Y, Li Z, Xu J, et al. Reversed-Phase Liquid Chromatography–Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry for High-Throughput Molecular Profiling of Sea Cucumber Cerebrosides. *Lipids*. 2015;50(7):667-79.
46. Sperling P, Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2003;1632(1-3):1-15.
47. Cateni F, Zilic J, Falsone G, Scialino G, Banfi E. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(24):4345-50.
48. Zahran EM, Sayed AM, Abdelwahab MF, Albohy A, Abdulrazik BS, Ibrahim AM, et al. Identifying the specific-targeted marine cerebrosides against SARS-CoV-2: an integrated computational approach. *RSC Adv*. 2021;11(57):36042-59.
49. Jia Z, Cong P, Zhang H, Song Y, Li Z, Xu J, et al. Reversed-phase liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for high-throughput molecular profiling of sea cucumber cerebrosides. *Lipids*. juill 2015;50(7):667-79.
50. Sperling P, Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 10 juin 2003;1632(1):1-15.
51. Shi QW, Su XH, Kiyota H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chem Rev*. 8 oct 2008;108(10):4295-327.
52. Cateni F, Zilic J, Falsone G, Scialino G, Banfi E. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*. déc 2003;13(24):4345-50.
53. Cateni F, Zilic J, Zacchigna M, Procida G. Cerebrosides with antiproliferative activity from *Euphorbia peplis* L. *Fitoterapia*. mars 2010;81(2):97-103.
54. Sugawara T, Zaima N, Yamamoto A, Sakai S, Noguchi R, Hirata T. Isolation of Sphingoid Bases of Sea Cucumber Cerebrosides and Their Cytotoxicity against Human Colon Cancer Cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 23 déc 2006;70(12):2906-12.
55. Jin YX, Shi LL, Zhang DP, Wei HY, Si Y, Ma GX, et al. A Review on Daphnane-Type Diterpenoids and Their Bioactive Studies. *Molecules*. 2019;24(9):1-14.
56. Wender PA, Buschmann N, Cardin NB, Jones LR, Kan C, Kee JM, et al. Gateway synthesis of daphnane congeners and their protein kinase C affinities and cell-growth activities. *Nat Chem*. 2011;3(8):615-9.
57. Yoshida, Heike, Ohno, Ikekawa, Wakasugi. INVOLVEMENT OF PKC BETAII IN ANTI-PROLIFERATING ACTION OF A NEW ANTITUMOR COMPOUND GNIDIMACRIN. *Int J Cancer*. 2003;105:601-6.
58. Bailly C. Yuanhuacin and Related Anti-Inflammatory and Anticancer Daphnane Diterpenes from Genkwa Flos—An Overview. *Biomolecules*. 2022;12(2):192.
59. Li SF, Liang X, Wu XK, Gao X, Zhang LW. Discovering the Mechanisms of Wikstroelide E as a Potential HIV-Latency-Reversing Agent by

- Transcriptome Profiling. *J Nat Prod.* 2021;84(4):1022-33.
60. Chen J, Shang X, Han F, Zhang Y, Yao G, Song S. The detailed anti-tumor mechanisms of daphnane-type diterpenoids from *Genkwa flos*. 2019;9.
  61. Pan RR, Zhang CY, Li Y, Zhang BB, Zhao L, Ye Y, et al. Daphnane Diterpenoids from *Daphne genkwa* Inhibit PI3K/Akt/mTOR Signaling and Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *J Nat Prod.* 2020;83(4):1238-48.
  62. Hou Z lin, Yao G dong, Song S jiang. Daphnane-type diterpenes from genus *Daphne* and their anti-tumor activity. *Chin Herb Med.* 2021;13(2):145-56.
  63. Hong JY, Chung HJ, Lee HJ, Park HJ, Lee SK. Growth Inhibition of Human Lung Cancer Cells via Down-regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling by Yuanhuadine, a Daphnane Diterpene from *Daphne genkwa*. *J Nat Prod.* 2011;74(10):2102-8.
  64. Kostelecky B. An Investigation of PKC Isoform Functional Specificity [Thesis]. [London]: University College London; 2009.
  65. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol.* 2018;48:36-52.
  66. Rimessi A, Patergnani S, Ioannidi E, Pinton P. Chemoresistance and Cancer-Related Inflammation: Two Hallmarks of Cancer Connected by an Atypical Link, PKC $\zeta$ . *Front Oncol.* 2013;3:1-7.
  67. Linch M, Sanz-Garcia M, Rosse C, Riou P, Peel N, Madsen CD, et al. Regulation of polarized morphogenesis by protein kinase C iota in oncogenic epithelial spheroids. *Carcinogenesis.* 2014;35(2):396-406.
  68. Hodgkinson CP, Sale GJ. Regulation of both PDK1 and the Phosphorylation of PKC- $\zeta$  and - $\delta$  by a C-Terminal PRK2 Fragment. *Biochemistry.* 2002;41(2):561-9.
  69. Colón-González F, Kazanietz MG. C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761:11.
  70. St Johnston D, Sanson B. Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(5):540-6.
  71. Reina-Campos M. The Dual Roles of the Atypical Protein Kinase Cs in Cancer. *Cancer Cell.* 2019;36:218-35.
  72. Farhadi A, Keshavarzian A, Ranjbaran Z, Fields JZ, Banan A. The Role of Protein Kinase C Isoforms in Modulating Injury and Repair of the Intestinal Barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(1):1-7.
  73. Mukherjee A, Roy S, Saha B, Mukherjee D. Spatio-Temporal Regulation of PKC Isoforms Imparts Signaling Specificity. *Front Immunol.* 2016;7:1-7.
  74. Überall F, Hellbert K, Kampfer S, Maly K, Villunger A, Spitaler M, et al. Evidence That Atypical Protein Kinase C- $\eta$  and Atypical Protein Kinase C- $\theta$  Participate in Ras-mediated Reorganization of the F-actin Cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1999;144(3):413-25.

75. Keenan C, Kelleher D. Protein Kinase C and the Cytoskeleton. *Cell Signal*. 1998;10(4):225-32.
76. Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N. Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4):1-27.
77. Drummond ML, Prehoda KE. Molecular Control of Atypical Protein Kinase C: Tipping the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *J Mol Biol*. 2016;428(7):1455-64.
78. Demaude J. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut*. 2006;55(5):655-61.
79. Gwak J, Jung S, Kang D, Kim E, Kim D, Chung Y, et al. Stimulation of protein kinase C- $\alpha$  suppresses colon cancer cell proliferation by down-regulation of  $\beta$ -catenin. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8b):2171-80.
80. Wu B, Zhou H, Hu L, Mu Y, Wu Y. Involvement of PKC $\alpha$  activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. *Tumor Biol*. 2013;34(2):837-46.
81. Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M. Ceramide-induced Inhibition of Akt Is Mediated through Protein Kinase C $\zeta$ . *J Biol Chem*. 2002;277(5):3286-92.
82. Kawano T, Inokuchi J, Eto M, Murata M, Kang JH. Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials. *Pharmaceutics*. 2021;13(11):1-27.
83. Müller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J*. 1995;14(9):1961-9.
84. Kjær S, Linch M, Purkiss A, Kostecky B, Knowles PP, Rosse C, et al. Adenosine-binding motif mimicry and cellular effects of a thieno[2,3-*d*]pyrimidine-based chemical inhibitor of atypical protein kinase C isoenzymes. *Biochem J*. 2013;451(2):329-42.
85. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. 2021;14(10):1-7.
86. Juanes MA. Cytoskeletal Control and Wnt Signaling—APC's Dual Contributions in Stem Cell Division and Colorectal Cancer. *Cancers*. 2020;12(12):1-21.
87. The Global cancer observatory. International Agency for Research in Cancer.
88. Cancer colorectal : modalités de dépistage et de prévention chez les sujets à risque élevé et très élevé [Internet]. Haute autorité de santé (HAS). 2017. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2772744/fr/cancer-colorectal-modalites-de-depistage-et-de-prevention-chez-les-sujets-a-risque-eleve-et-tres-eleve](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2772744/fr/cancer-colorectal-modalites-de-depistage-et-de-prevention-chez-les-sujets-a-risque-eleve-et-tres-eleve)
89. Hankey W. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37:159-72.

90. Zhou G, Yang J, Song P. Correlation of ERK/MAPK signaling pathway with proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Oncol Lett.* 2018;17:2266-70.
91. Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clin Colorectal Cancer.* 2016;15(3):195-203.
92. Markowitz SD. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2009;12.
93. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6(5):322-7.
94. Vidri RJ, Fitzgerald TL. GSK-3: An important kinase in colon and pancreatic cancers. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2020;1867(4):1-4.
95. Shakoory A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, et al. Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1365-73.
96. Duda P, Akula SM, Abrams SL, Steelman LS, Martelli AM, Cocco L, et al. Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. *Cells.* 2020;9(5):1-28.
97. Ma L, Tao Y, Duran A, Llado V, Galvez A, Barger JF, et al. Control of Nutrient Stress-Induced Metabolic Reprogramming by PKC $\zeta$  in Tumorigenesis. *Cell.* 2013;152(3):599-611.
98. Tejada-Muñoz N, González-Aguilar H, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Is Positively Regulated by Protein Kinase C $\zeta$ -Mediated Phosphorylation Induced by Wnt Agonists. *Mol Cell Biol.* 2016;36(5):731-41.
99. Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB. Convergence of Multiple Signaling Cascades at Glycogen Synthase Kinase 3: Edg Receptor-Mediated Phosphorylation and Inactivation by Lysophosphatidic Acid through a Protein Kinase C-Dependent Intracellular Pathway. *Mol Cell Biol.* 2002;22(7):2099-110.
100. Ballou LM, Tian PY, Lin HY, Jiang YP, Lin RZ. Dual Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  by the  $\alpha$ 1A-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(44):40910-6.
101. Colosimo PF, Liu X, Kaplan NA, Tolwinski NS. GSK3 $\beta$  affects apical-basal polarity and cell-cell adhesion by regulating aPKC levels. *Dev Dyn.* 2009;239:115-25.
102. Llado V, Nakanishi Y, Duran A, Reina-Campos M, Shelton PM, Linares JF, et al. Repression of Intestinal Stem Cell Function and Tumorigenesis through Direct Phosphorylation of  $\beta$ -Catenin and Yap by PKC $\zeta$ . *Cell Rep.* 2015;10(5):740-54.
103. Dupasquier S, Blache P, Picque Lasorsa L, Zhao H, Abraham JD, Haigh JJ, et al. Modulating PKC $\alpha$  Activity to Target Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Colon Cancer. *Cancers.* 2019;11(693):1-19.
104. Gwak J, Cho M, Gong SJ, Won J, Kim DE, Kim EY, et al. Protein-kinase-C-mediated  $\beta$ -catenin phosphorylation

- negatively regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *J Cell Sci.* 2006;119(22):4702-9.
105. Lee JM, Kim IS, Kim H, Lee JS, Kim K, Yim HY, et al. ROR $\alpha$  Attenuates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling by PKC $\alpha$ -Dependent Phosphorylation in Colon Cancer. *Mol Cell.* 2010;37(2):183-95.
  106. Ormanns S, Neumann J, Horst D, Kirchner T. WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear  $\beta$ -Catenin depend on active. *Oncotarget.* 2014;5(10):13.
  107. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst.* 2015;11(7):1946-54.
  108. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):22.
  109. Oster H, Leitges M. Protein Kinase C  $\alpha$  but not PKC $\zeta$  Suppresses Intestinal Tumor Formation in *ApcMin/+* Mice. *Cancer Res.* 2006;66(14):6955-63.
  110. Monick MM, Carter AB, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW. Protein Kinase C  $\zeta$  Plays a Central Role in Activation of the p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase by Endotoxin in Alveolar Macrophages. *J Immunol.* 2000;165(8):4632-9.
  111. de Souza LS, Puziol LC, Tosta CL, Bittencourt MLF, Ardisson JS, Kitagawa RR, et al. Analytical methods to access the chemical composition of an *Euphorbia tirucalli* anticancer latex from traditional Brazilian medicine. *J Ethnopharmacol.* juin 2019;237:255-65.
  112. Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(3):367-412.
  113. Zehethofer et al. Plasma free fatty acid profiling in a fish oil human intervention study using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Commun MASS Spectrom.* 2008;(22):2125-33.
  114. Trufelli H, Famigliani G, Termopoli V, Cappiello A. Profiling of non-esterified fatty acids in human plasma using liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(9):2933-41.
  115. Valianpour F, Selhorst JJM, van Lint LEM, van Gennip AH, Wanders RJA, Kemp S. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Mol Genet Metab.* 2003;79(3):189-96.
  116. Identification des huiles grasses par CCM. In: *Pharmacopée européenne* 100. 2019.
  117. Kishimoto K, Urade R, Ogawa T, Moriyama T. Nondestructive Quantification of Neutral Lipids by Thin-Layer Chromatography and Laser-Fluorescent Scanning: Suitable Methods for "Lipidome" Analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(3):657-62.
  118. Trinel M. Contribution à l'étude phytochimique et à la valorisation biologique du latex de *Hura crepitans*

- L. [Thèse de doctorat]. [Toulouse]: Université Paul sabatier; 2018.
119. Sakata K, Kawazu K, Mitsui T. Studies on a Piscicidal Constituent of *Hura crepitans*: Part II. Chemical Structure of Huratoxin. *Agric Biol Chem.* 1971;35(13):2113-26.
  120. Trinel M, Le Lamer AC, Jullian V, Jacquemin D, Graton J, Cristofoli V, et al. Daphnanes diterpenes from the latex of *Hura crepitans* L. And activity against human colorectal cancer cells Caco-2. *Bioorganic Chem.* 2020;103:1-13.
  121. Otsuki K, Li W, Miura K, Asada Y, Huang L, Chen CH, et al. Isolation, Structural Elucidation, and Anti-HIV Activity of Daphnane Diterpenoids from *Daphne odora*. *J Nat Prod.* 2020;83(11):3270-7.
  122. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res.* 2011;317(19):2702-10.
  123. Xiong X, Li X, Wen YA, Gao T. Pleckstrin Homology (PH) Domain Leucine-rich Repeat Protein Phosphatase Controls Cell Polarity by Negatively Regulating the Activity of Atypical Protein Kinase C. *J Biol Chem.* 2016;291(48):25167-78.
  124. Smith L, Smith JB. Lack of Constitutive Activity of the Free Kinase Domain of Protein Kinase C  $\zeta$ . *J Biol Chem.* 2002;277(48):45866-73.
  125. Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Farese RV. Insulin and PIP<sub>3</sub> Activate PKC- $\zeta$  by Mechanisms That Are Both Dependent and Independent of Phosphorylation of Activation Loop (T410) and Autophosphorylation (T560) Sites. *Biochemistry.* 2001;40(1):249-55.
  126. Ranganathan S, Wang Y, Kern FG, Zhican Q, Rongbao L. Activation loop phosphorylation-independent kinase activity of human protein kinase C zeta. *Poteins Struct Funct Bioinforma.* 2007;67:709-19.
  127. Zhang N, Tian YN, Zhou LN, Li MZ, Chen HD, Song SS, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition synergizes with PARP inhibitors through the induction of homologous recombination deficiency in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2021;12(2):1-18.
  128. Liu K, Li J, Wu X, Chen M, Luo F, Li J. GSK-3 $\beta$  inhibitor 6-bromo-indirubin-3'-oxime promotes both adhesive activity and drug resistance in colorectal cancer cells. *Int J Oncol.* 2017;51(6):1821-30.
  129. Umar S, Wang Y, Morris AP, Sellin JH. Dual alterations in casein kinase I- $\epsilon$  and GSK-3 $\beta$  modulate  $\beta$ -catenin stability in hyperproliferating colonic epithelia. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(2):G599-607.
  130. Deng BQ, Luo Y, Kang X, Li CB, Morisseau C, Yang J, et al. Epoxide metabolites of arachidonate and docosahexaenoate function conversely in acute kidney injury involved in GSK3 $\beta$  signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(47):12608-13.
  131. Song S, Kim J, Park K, Lee J, Park S, Lee S, et al. GSK-3 $\beta$  activation is required for ZIP-induced disruption of learned fear. *Sci Rep.* 2020;10(1):18227.

132. Park YS, Huh JW, Lee JH, Kim HR. shRNA against CD44 inhibits cell proliferation, invasion and migration, and promotes apoptosis of colon carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2011;27:339-46.
133. Tobias IS, Kaulich M, Kim PK, Simon N, Jacinto E, Dowdy SF, et al. Protein kinase C $\zeta$  exhibits constitutive phosphorylation and phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate-independent regulation. *Biochem J.* 2016;473(4):509-23.
134. Carragher LAS, Snell KR, Giblett SM, Aldridge VSS, Patel B, Cook SJ, et al. V600E Braf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of *p16<sup>INK4a</sup>*. *EMBO Mol Med.* 2010;2(11):458-71.
135. Hong JY, Chung HJ, Lee HJ, Park HJ, Lee SK. Growth Inhibition of Human Lung Cancer Cells via Down-regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling by Yuanhuadine, a Daphnane Diterpene from *Daphne genkwa*. *J Nat Prod.* 2011;74(10):2102-8.
136. Tostivint V, Racaud-Sultan C, Roumiguié M, Soulié M, Gamé X, Beauval J baptiste. Progrès dans l'étude du cancer de la prostate : la culture cellulaire en trois dimensions reproduit ex vivo les caractéristiques des tumeurs prostatiques. *Presse Médicale.* 2017;46(10):954-65.
137. Van Laar JAM, Rustum YM, Ackland SP, van Groeningen CJ, Peters GJ. Comparison of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine with 5-Fluorouracil and their Role in the Treatment of Colorectal Cancer. *Eur J Cancer.* 1998;34(3):296-306.
138. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):139-50.
139. Kim JH, Kim JH, Ohba M, Suh PG, Ryu SH. Novel Functions of the Phospholipase D2-Phox Homology Domain in Protein Kinase C $\zeta$  Activation. *MOL CELL BIOL.* 2005;25:15.
140. Wang G, Krishnamurthy K, Umapathy NS, Verin AD, Bieberich E. The Carboxyl-terminal Domain of Atypical Protein Kinase C $\zeta$  Binds to Ceramide and Regulates Junction Formation in Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 2009;284(21):14469-75.
141. Park GB, Chung YH, Gong JH, Jin DH, Kim D. GSK-3 $\beta$ -mediated fatty acid synthesis enhances epithelial to mesenchymal transition of TLR4-activated colorectal cancer cells through regulation of TAp63. *Int J Oncol.* 2016;49(5):2163-72.
142. Racaud-Sultan C, Vergnolle N. GSK3 $\beta$ , a Master Kinase in the Regulation of Adult Stem Cell Behavior. *Cells.* 2021;10(2):225.
143. Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, Saddoughi SA, Sentelle D, Selvam SP, et al. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* 2010;6(10):1603-24.
144. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(2):799-804.
145. Rana AK, Rahmatkar SN, Kumar A, Singh D. Glycogen synthase kinase-3:

- A putative target to combat severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021;58:92-101.
146. Liu X, Verma A, Garcia G, Ramage H, Lucas A, Myers RL, et al. Targeting the coronavirus nucleocapsid protein through GSK-3 inhibition. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(42):1-9.
147. Huang X, Zou H, Chen X, Luo Q, Kong L. Molecularly imprinted monolithic stationary phases for liquid chromatographic separation of enantiomers and diastereomers. *J Chromatogr A.* 2003;984(2):273-82.
148. Ebinger K, Weller HN. Comparison of chromatographic techniques for diastereomer separation of a diverse set of drug-like compounds. *J Chromatogr A.* 2013;1272:150-4.
149. Wang C, Yamamoto H. Asymmetric Epoxidation Using Hydrogen Peroxide as Oxidant. *Chem - Asian J.* 2015;10(10):2056-68.
150. Jat JL, De SR, Kumar G, Adebessin AM, Gandham SK, Falck JR. Regio- and Enantioselective Catalytic Monoepoxidation of Conjugated Dienes: Synthesis of Chiral Allylic *cis* - Epoxides. *Org Lett.* 2015;17(4):1058-61.
151. Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, et al. Ceramide Recruits and Activates Protein Kinase C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) within Structured Membrane Microdomains. *J Biol Chem.* 2007;282(17):12450-7.
152. Garmy N, Taïeb N, Yahi N, Fantini J. Interaction of cholesterol with sphingosine. *J Lipid Res.* 2005;46(1):36-45.
153. Zou D, Li Q, Pan W, Chen P, Sun M. A novel non-selective atypical PKC agonist could protect neuronal cell line from A $\beta$ -oligomer induced toxicity by suppressing A $\beta$  generation. *Mol Med Rep.* 2022;25(153).
154. Liu S, Zhu L, Xie G, Mok BWY, Yang Z, Deng S, et al. Potential Antiviral Target for SARS-CoV-2: A Key Early Responsive Kinase during Viral Entry. *CCS Chem.* 2022;4(1):112-21.
155. Schreckenbach G, Ziegler T. Calculation of NMR Shielding Tensors Using Gauge-Including Atomic Orbitals and Modern Density Functional Theory. *J Phys Chem.* 1995;99(2):606-11.
156. Barone, G., Gomez-Paloma, L., Duca, D., Silvestri, A., Riccio, R., Bifulco, G. Structure validation of natural products by quantum-mechanical GIAO calculations of <sup>13</sup>C NMR chemical shifts. *Chem Eur J.* 2002;8:3233-9.
157. Smith SG, Goodman JM. Assigning Stereochemistry to Single Diastereoisomers by GIAO NMR Calculation: The DP4 Probability. *J Am Chem Soc.* 2010;132(37):12946-59.
158. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(8).
159. d'Aldebert E, Quaranta M, Sébert M, Bonnet D, Kirzin S, Portier G, et al. Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:1-13.



160. Yassine M. Mémoire de master 2 : ciblage thérapeutique de la PKC zeta par l'huratoxine dans le cancer colorectal. 2019.
161. Gadea G, Bos S, Krejbich-Trotot P, Clain E, Viranaicken W, El-Kalamouni C, et al. A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology*. 2016;497:157-62.

---

## ANNEXES

---

## Annexe I : Gamme de solvants pour la chromatographie de partage centrifuge : gamme Arizona

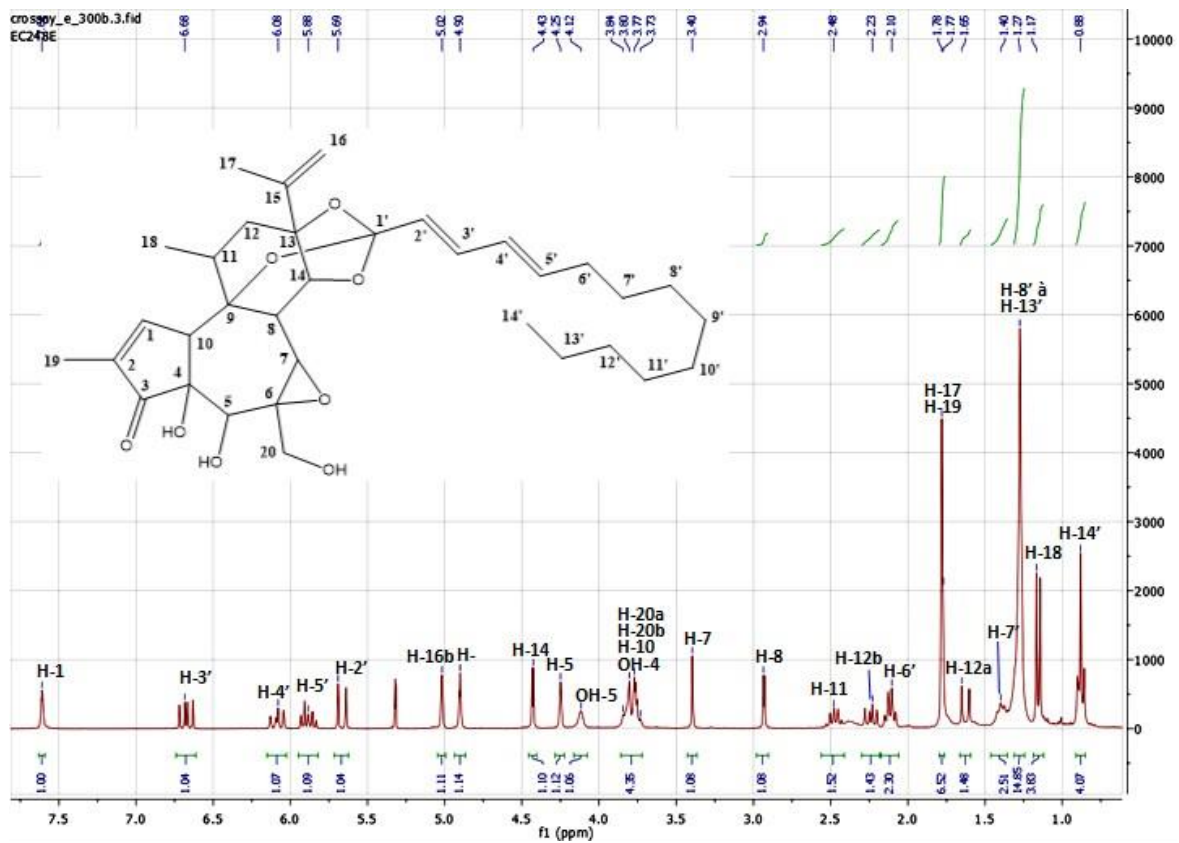
Letter	v/v/v/v				Initial % v/v				Upper/lower phase ratio	Settling time (s)
	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water		
A	0	1	0	1	0.0	50.0	0.0	50.0	0.88	36
B	1	19	1	19	2.5	47.5	2.5	47.5	0.92	31
C	1	9	1	9	5.0	45.0	5.0	45.0	0.965	28
D	1	6	1	6	7.1	42.9	7.1	42.9	0.96	29
F	1	5	1	5	8.3	41.7	8.3	41.7	0.95	30
G	1	4	1	4	10.0	40.0	10.0	40.0	0.95	25
H	1	3	1	3	12.5	37.5	12.5	37.5	0.945	25
J	2	5	2	5	14.3	35.7	14.3	35.7	0.91	20
K	1	2	1	2	16.7	33.3	16.7	33.3	0.88	21
L	2	3	2	3	20.0	30.0	20.0	30.0	0.84	18
M	5	6	5	6	22.7	27.3	22.7	27.3	0.80	17
N	1	1	1	1	25.0	25.0	25.0	25.0	0.70	22
P	6	5	6	5	27.3	22.7	27.3	22.7	0.69	21
Q	3	2	3	2	30.0	20.0	30.0	20.0	0.68	20
R	2	1	2	1	33.3	16.7	33.3	16.7	0.68	18
S	5	2	5	2	35.7	14.3	35.7	14.3	0.70	15
T	3	1	3	1	37.5	12.5	37.5	12.5	0.735	14
U	4	1	4	1	40.0	10.0	40.0	10.0	0.76	14
V	5	1	5	1	41.7	8.3	41.7	8.3	0.78	14
W	6	1	6	1	42.9	7.1	42.9	7.1	0.775	13
X	9	1	9	1	45.0	5.0	45.0	5.0	0.77	11
Y	19	1	19	1	47.5	2.5	47.5	2.5	0.71	10
Z	1	0	1	0	50.0	0.0	50.0	0.0	0.45	10

Annexe II : Gamme de solvants pour la chromatographie de partage centrifuge : gamme OKA

N°	<i>n-hexane</i>	<i>AcOEt</i>	<i>Butan-1-ol</i>	<i>Méthanol</i>	<i>Eau</i>
1	10	0	0	5	5
2	9	1	0	5	5
3	8	2	0	5	5
4	7	3	0	5	5
5	6	4	0	5	5
6	5	5	0	5	5
7	4	5	0	4	5
8	3	5	0	3	5
9	2	5	0	2	5
10	1	5	0	1	5
11	0	5	0	0	5
12	0	4	1	0	5
13	0	3	2	0	5
14	0	2	3	0	5
15	0	1	4	0	5
16	0	0	5	0	5

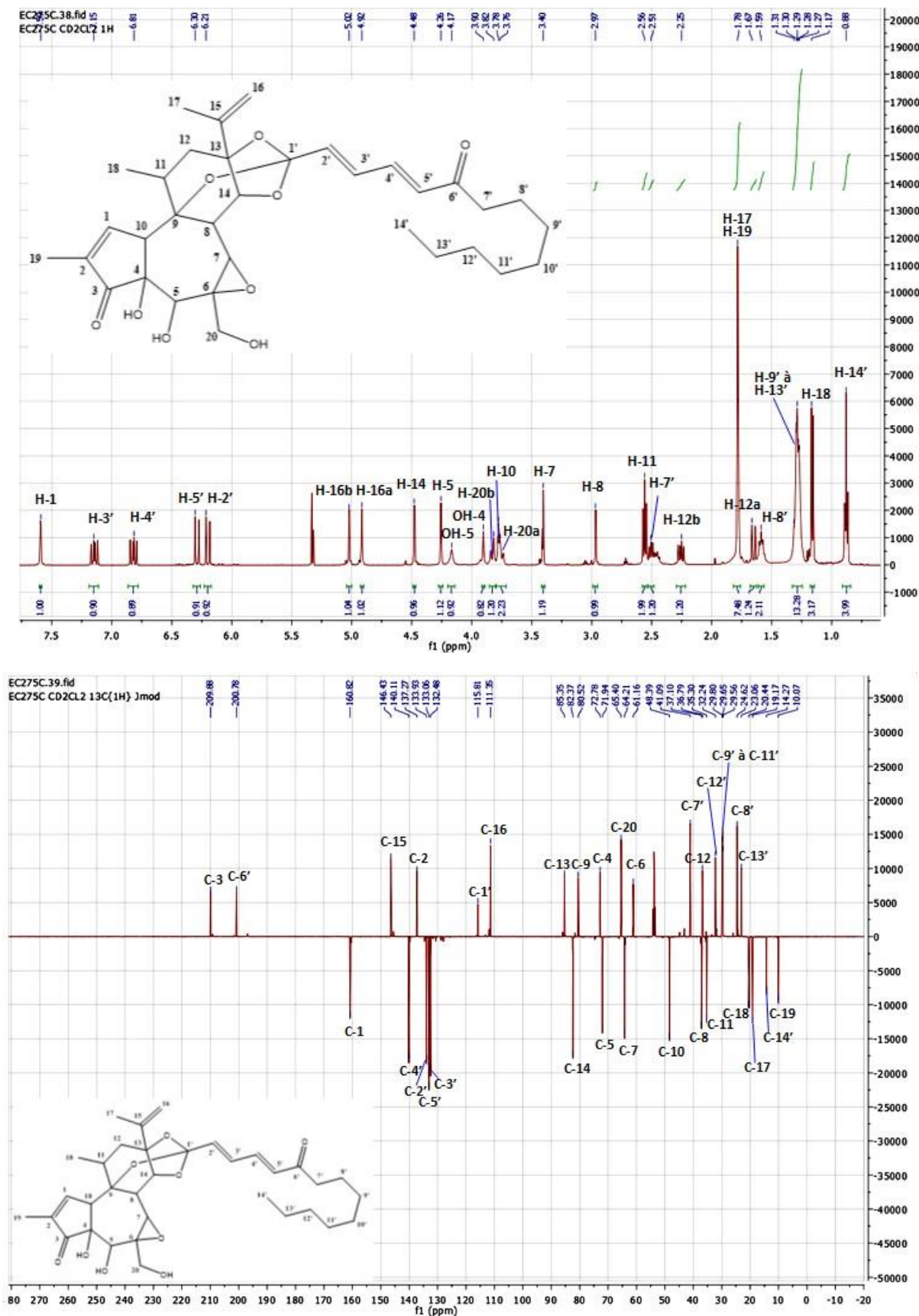
Annexe III : Gamme de solvants pour la chromatographie de partage centrifuge : gamme HBAE

<i>Système</i>	<i>n-heptane</i>	<i>Butan-1-ol</i>	<i>Acétonitrile</i>	<i>Eau</i>
-3	5	0	5	0
-2	5	2	3	0
-1	4	2,6	2,4	1
0	4	3,2	1,8	2
1	2	3,8	1,2	4
2	1	4,4	0,6	4
3	0	5	0	5

Annexe IV : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la huratoxine dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ 

Annexe V : Tableau récapitulatif des déplacements chimiques des protons de la huratoxine dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  par comparaison avec les données déjà collectées au laboratoire ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ )

N° des protons	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz) dans le $\text{CDCl}_3$ (1)	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1	7,63 ; m ; 1H	7,61 ; m ; 1H
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	4,25 ; s ; 1H	4,25 ; se ; 1H
6	-	-
7	3,45 ; s ; 1H	3,40 ; s ; 1H
8	2,94 ; d (2,4) ; 1H	2,94 ; d (2,6) ; 1H
9	-	-
10	3,79 ; s ; 1H	3,80 ; m ; 1H
11	2,48 ; m ; 1H	2,48 ; m ; 1H
12a	1,68 ; d (14,4) ; 1H	1,65 ; d (14, 3) ; 1H
12b	2,23 ; dd (14,4; 8,6) ; 1H	2,23 ; dd (14,3 ; 8,7) ; 1H
13	-	-
14	4,42 ; d (2,5) ; 1H	4,43 ; d (2,6) ; 1H
15	-	-
16a	4,90 ; m ; 1H	4,90 ; m ; 1H
16b	5,02 ; se ; 1H	5,02 ; se ; 1H
17	1,80 ; m ; 3H	1,77 ; se ; 3H
18	1,18 ; d (7,2) ; 3H	1,17 ; d (7,1) ; 3H
19	1,81 ; d (1,4) ; 3H	1,78 ; se ; 3H
20a	3,78 ; d (12,4) ; 1H	3,77 ; m ; 1H
20b	3,86 ; d (12,4) ; 1H	3,84 ; m ; 1H
1'	-	-
2'	5,70 ; d (15,5) ; 1H	5,69 ; d (15,5) ; 1H
3'	6,70 ; dd (15,5 ; 10,7) ; 1H	6,68 ; dd (15,5 ; 10,6) ; 1H
4'	6,05 ; dd (15,2 ; 10,7) ; 1H	6,08 ; dd (14,6 ; 10,6) ; 1H
5'	5,84 ; m ; 1H	5,88 ; m ; 1H
6'	2,08 ; m ; 2H	2,10 ; q (6,9) ; 2H
7'	1,37 ; m ; 2H	1,40 ; m ; 2H
8'	1,25 ; m ; 8H	1,27 ; se ; 8H
9'		
10'		
11'		
12'	1,25 ; m ; 2H	1,27 ; se ; 2H
13'	1,25 ; m ; 2H	1,27 ; se ; 2H
14'	0,88 ; t (7,0) ; 3H	0,88 ; t (7,0) ; 3H
OH-4	3,73 ; s ; 1H	3,73 ; m ; 1H
OH-5	4,09 ; s ; 1H	4,12 ; se ; 1H

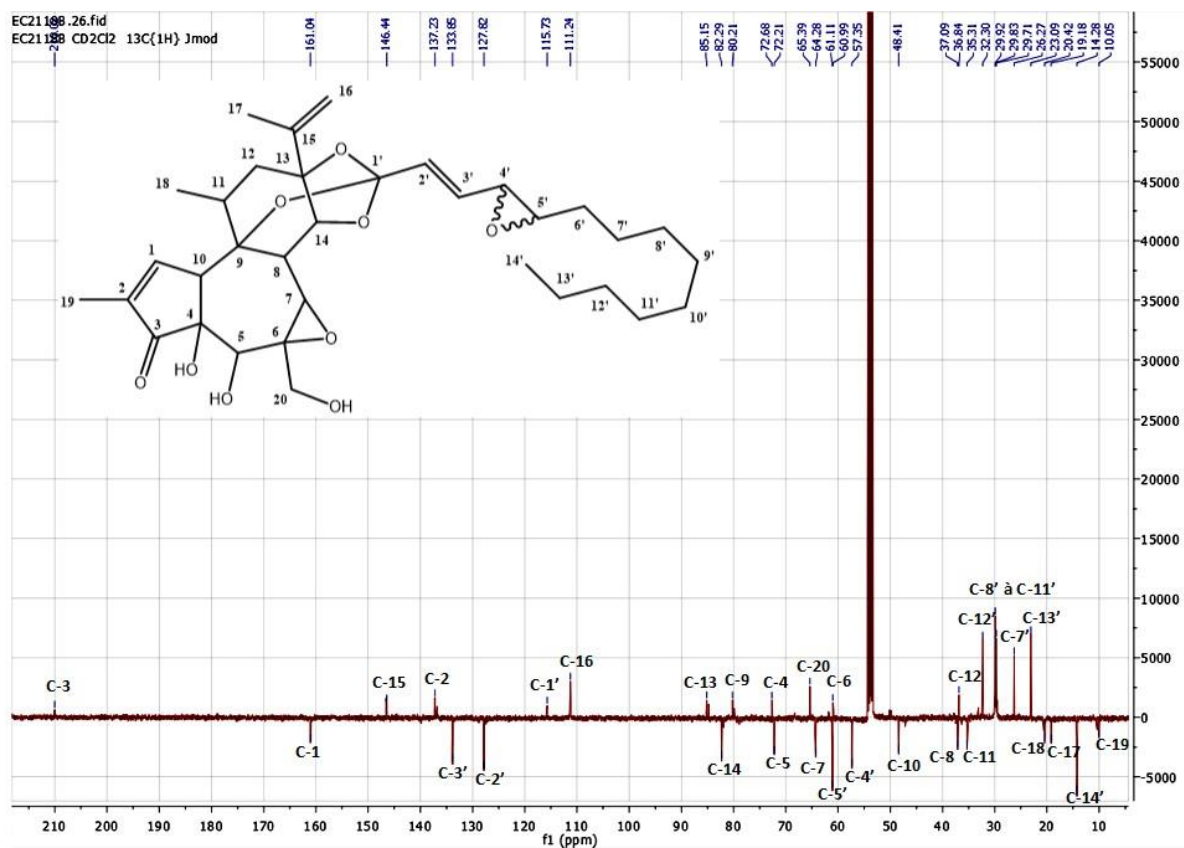
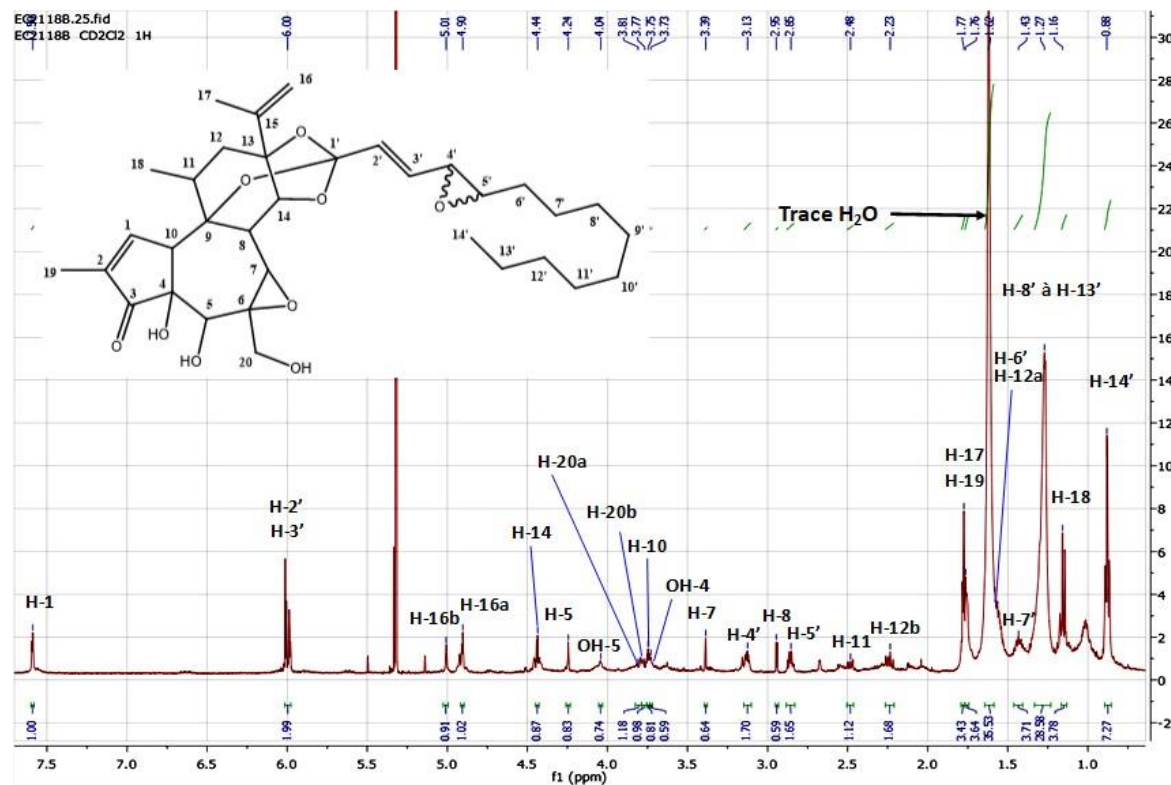
Annexe VI : Spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la 6'-oxo-huratotoxine dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ 



Annexe VII : Tableau récapitulatif des déplacements chimiques des protons et des carbones de la 6'-oxo-huratoxine dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> par comparaison avec les données déjà collectées au laboratoire (CD<sub>3</sub>Cl)

N° des protons et carbones	$\delta_H$ (J en Hz) dans le CDCl <sub>3</sub> (1)	$\delta_C$ dans le CDCl <sub>3</sub> (1)	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	7,62 ; m ; 1H	160,8	7,59 ; m ; 1H	160,8
2	-	137,0	-	137,3
3	-	209,7	-	209,9
4	-	72,2	-	72,8
5	4,27 ; se ; 1H	72,0	4,26 ; s ; 1H	72,0
6	-	60,5	-	61,2
7	3,46 ; s ; 1H	64,1	3,40 ; s ; 1H	64,2
8	2,98 ; d (2,6) ; 1H	36,8	2,97 ; d (2,5) ; 1H	37,1
9	-	80,1	-	80,5
10	3,81 ; m ; 1H	48,1	3,78 ; m ; 1H	48,4
11	2,51 ; m ; 1H	34,9	2,51 ; m ; 1H	35,3
12a	1,71 ; dd (14,4; 8,5) ; 1H	34,9	1,67 ; d (14, 4) ; 1H	36,8
12b	2,26 ; m ; 1H		2,25 ; dd (14,4 ; 8,7) ; 1H	
13	-	84,9	-	85,4
14	4,46 ; d (2,6) ; 1H	82,1	4,48 ; d (2,6) ; 1H	82,4
15	-	145,7	-	146,4
16a	4,93 ; m ; 1H	111,7	4,92 ; m ; 1H	111,3
16b	5,02 ; se ; 1H		5,02 ; se ; 1H	
17	1,81 ; m ; 3H	19,0	1,78 ; es ; 3H	19,2
18	1,19 ; d (7,1) ; 3H	20,4	1,17 ; d (7,1) ; 3H	20,4
19	1,81 ; m ; 3H	10,0	1,78 ; se ; 3H	10,1
20a	3,78 ; d (12,6) ; 1H	65,1	3,76 ; d (12,9) ; 1H	65,4
20b	3,90 ; d (12,6) ; 1H		3,82 ; d (12,9) ; 1H	
1'	-	115,6	-	115,8
2'	6,21 ; d (15,4) ; 1H	133,5	6,21 ; d (15,4) ; 1H	133,9
3'	6,82 ; dd (15,4 ; 11,1) ; 1H	132,2	6,81 ; dd (15,4 ; 11,1) ; 1H	132,5
4'	7,15 ; dd (15,5 ; 11,1) ; 1H	140,1	7,15 ; dd (15,6 ; 11,1) ; 1H	140,1
5'	6,28 ; d (15,5) ; 1H	132,6	6,30 ; d (15,6) ; 1H	133,1
6'	-	200,7	-	200,8
7'	2,55 ; t (7,3) ; 2H	40,9	2,56 ; t (7,5) ; 2H	41,1
8'	1,63 ; m ; 2H	24,4	1,59 ; m ; 2H	24,6
9'	1,28 ; m ; 2H	29,0	1,27 – 1,31 ; m ; 6H	29,8
10'	1,24 – 1,29 ; m ; 4H	29,2 – 29,5		29,6
11'				29,7
12'				32,2
13'	23,1			
14'	0,88 ; te (7,0) ; 3H	14,1	0,88 ; t (6,9) ; 3H	14,3
OH-4	-	-	3,90 ; se ; 1H	-
OH-5	-	-	4,17 ; se ; 1H	-

## Annexe VIII : Spectres de RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ de la 4',5'-époxy-huratotoxine dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$



Annexe VI : Tableau récapitulatif des déplacements chimiques des protons et des carbones de la 4',5'-époxy-huratoxine dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> par comparaison avec les données déjà collectées au laboratoire (CD<sub>3</sub>Cl)

N° des protons et carbones	δ <sub>H</sub> (J en Hz) dans le CDCl <sub>3</sub> (1)	δ <sub>C</sub> dans le CDCl <sub>3</sub> (1)	δ <sub>H</sub> (J en Hz)	δ <sub>C</sub>
1	7,61 ; m ; 1H	161,0	7,59 ; m ; 1H	161,0
2	-	136,8	-	137,2
3	-	209,8	-	210,0
4	-	72,2	-	72,7
5	4,25 ; s ; 1H	72,0	4,24 ; se ; 1H	72,2
6	-	60,4	-	61,0
7	3,44 ; se ; 1H	64,1	3,39 ; s ; 1H	64,3
8	2,95 ; d (2,4) ; 1H	36,7	2,95 ; d (2,6) ; 1H	37,1
9	-	79,8	-	80,2
10	3,79 ; m ; 1H	48,1	3,75 ; m ; 1H	48,4
11	2,49 ; m ; 1H	34,9	2,48 ; m ; 1H	35,3
12a	1,68 ; m ; 1H	36,4	1,62 ; s ; 1H	36,8
12b	2,23 ; dd (14,3 ; 8,6) ; 1H		2,23 ; m ; 1H	
13	-	84,6	-	85,2
14	4,43 ; m ; 1H	82,1	4,44 ; d (2,6) ; 1H	82,3
15	-	145,8	-	146,4
16a	4,91 ; m ; 1H	111,5	4,90 ; m ; 1H	111,2
16b	5,01 ; m ; 1H		5,01 ; m ; 1H	
17	1,78 ; m ; 3H	19,0	1,77 ; m ; 3H	19,2
18	1,17 et 1,18 ; d (7,2) ; 3H	20,4	1,16 ; d (7,1) ; 3H	20,4
19	1,80 ; m ; 3H	10,0	1,76 ; m ; 3H	10,1
20a	3,77 ; m ; 1H	65,1	3,77 ; d (12,5) ; 1H	65,4
20b	3,88 ; d (12,3) ; 1H		3,81 ; d (12,5) ; 1H	
1'	-	115,6	-	115,7
2'	6,05 ; m ; 1H	127,3	6,00 ; m ; 1H	127,8
3'	6,05 ; m ; 1H	133,8	6,00 ; m ; 1H	133,9
4'	3,14 ; m ; 1H	57,2	3,13 ; m ; 1H	57,4
5'	2,87 ; m ; 1H	60,8	2,85 ; m ; 1H	61,1
6'	1,56 ; m ; 2H	32,0	1,62 ; s ; 2H	32,4
7'	1,44 ; m ; 2H	25,9	1,43 ; m ; 2H	26,3
8'	1,22 – 1,30 ; m ; 8H	29,3 – 29,6	1,27 ; se ; 8H	29,7 – 29,9
9'				
10'				
11'				
12'	1,26 ; m ; 2H	31,9	1,27 ; se ; 2H	32,3
13'	1,26 ; m ; 2H	22,7	1,27 ; se ; 2H	23,1
14'	0,88 ; t (7,1) ; 3H	14,2	0,88 ; t (7,0) ; 3H	14,3
OH-4	-	-	3,73 ; se ; 1H	-
OH-5	-	-	4,04 ; se ; 1H	-



**Daphnanes diterpenes from the latex of *Hura crepitans* L.  
and their PKC $\zeta$ -dependent anti-proliferative activity on colorectal cancer cells**

Elise Crossay<sup>a</sup>, Valérie Jullian<sup>a</sup>, Manon Trinel<sup>a</sup>, David Sagnat<sup>b,c</sup>, Dimitri Hamel<sup>b,d</sup>, Emie Groppi<sup>a</sup>, Corinne Rolland<sup>b</sup>, Jean-Luc Stigliani<sup>e</sup>, Kember Mejia<sup>f</sup>, Billy Joel Cabanillas<sup>g</sup>, Laurent Alric<sup>h</sup>, Etienne Buscail<sup>b,i</sup>, Chaker El Kalamouni<sup>j</sup>, Patrick Mavingui<sup>j</sup>, Céline Deraison<sup>b</sup>, Claire Racaud-Sultan<sup>b\*1</sup>, Nicolas Fabre<sup>a\*1</sup>

<sup>a</sup>UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France

<sup>b</sup>IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, France

<sup>c</sup>Toulouse Organoids Platform, Institut de Recherche en Santé Digestive, INSERM, Toulouse, France

<sup>d</sup>LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

<sup>e</sup>UPR 8241 LCC, Université de Toulouse, CNRS, France

<sup>f</sup>Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), Iquitos, Peru

<sup>g</sup>Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 15102, Peru

<sup>h</sup>Pole Digestif, Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France

<sup>i</sup>Département de Chirurgie Digestive, Unité de Chirurgie Colorectale, Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France

<sup>j</sup>UMR PIMIT, Université de La Réunion, INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, La Réunion, France

*Keywords:* Euphorbiaceae, *Hura crepitans*, Daphnane diterpenes, Colorectal cancer, Caco-2 cells, Protein Kinase C

\* Corresponding authors at: UMR 152 PharmaDev, Université Paul Sabatier, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des maraichers, 31062 Toulouse, France (N. Fabre). INSERM Unité 1220, Institut de Recherche en Santé Digestive IRSD, CHU Purpan, Place du Dr Baylac, 31024 Toulouse cedex 3, France (C. Racaud-Sultan).

*E-mail addresses:* [nicolas-fabre@univ-tlse3.fr](mailto:nicolas-fabre@univ-tlse3.fr) (N. Fabre), [claire.racaud@inserm.fr](mailto:claire.racaud@inserm.fr) (C. Racaud-Sultan).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.

## Abstract

*Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae) is a thorn-covered tree widespread in South America, Africa and Asia which produces an irritating milky latex containing numerous secondary metabolites, notably daphnane-type diterpenes known as Protein Kinase C activators. Fractionation of a dichloromethane extract of the latex led to the isolation of five new daphnane diterpenes (**1-5**), along with two known analogs (**6-7**) including huratoxin. Huratoxin (**6**) and 4',5'-epoxyhuratoxin (**4**) were found to exhibit significant and selective cell growth inhibition against colorectal cancer cell line Caco-2 and primary colorectal cancer cells cultured as colonoids. The underlying mechanism of **4** and **6** was further investigated revealing the involvement of PKC $\zeta$  in the cytostatic activity.

## 1. Introduction

*Hura crepitans* L. is a tree of the Euphorbiaceae, a large family with more than 3000 genus and 8000 species<sup>1-4</sup>. This thorn-covered tree is widespread in South America, Africa and Asia and produces an irritating milky latex containing numerous secondary metabolites, notably diterpenes<sup>5-8</sup>. Diterpenes found in Euphorbiaceae include more than 20 types of structures (daphnanes, ingenanes, tiglanes...) <sup>9-11</sup> known to possess many biological activities<sup>3,10,12</sup>, and particularly antiviral<sup>9,11,13-19</sup> and antitumor properties<sup>10</sup>. More specifically, these diterpenes are described in the literature as activators of serine threonine protein kinases C (PKCs)<sup>9,15,20</sup>.

PKCs are essential regulators of many cellular functions and signaling pathways, including cell proliferation, adhesion, differentiation, migration and survival<sup>21-23</sup>. These kinases are classified into 3 subfamilies according to their structure and mode of activation. It can be distinguished conventional diacylglycerol (DAG)- and calcium-dependent PKCs (cPKCs  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), novel calcium-independent PKCs (nPKCs  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  and  $\delta$ ) and atypical DAG- and calcium-independent PKCs (aPKCs  $\lambda/\iota$  and  $\zeta$ )<sup>21,22,24</sup>. Atypical PKCs mainly differ from the others by the fact that they can interact with phosphatidylinositol triphosphate (PIP<sub>3</sub>) or ceramides<sup>22</sup>, and are particularly involved in epithelial cell polarity, cytoskeleton reorganization and tissue identity<sup>25-31</sup>. PKCs isozymes are deregulated in many pathologies<sup>21,22,32,33</sup>, including cancer<sup>21,22</sup>. More specifically, they are involved in cell transformation, tumor progression and

metastasis in different types of cancer, and are particularly downregulated in colorectal cancer <sup>21,22</sup>.

Colorectal cancer (CRC) is a global health problem. It is the third most diagnosed cancer and the second most deadly worldwide with more than 900,000 deaths in 2020 <sup>34,35</sup>. At an advanced stage, the 5-year survival of patients is only 40-50% and at the metastatic stage, the 5-year survival decreases to 5-15% <sup>36</sup> due to the proliferative and invasive capabilities of malignant cells <sup>37</sup>. These abilities strongly depend on PKCs and their signaling partners including  $\beta$ -catenin, Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), Akt and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase MEK <sup>24,38-49</sup>. To date, there is a growing interest in the development of innovative therapies targeting such signaling pathways. Notably, restoration of PKCs functions that are downregulated in CRC would be a relevant strategy to control normal adhesion, proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells <sup>22</sup>.

In a previous phytochemical analysis, our group identified daphnane-type diterpenes and cerebrosides as the main components of an ethanolic extract of the latex of *H. crepitans* <sup>8</sup>. Bio-guided fractionation revealed an interesting selective cytostatic activity of huratoxin, a mono-esterified daphnane, on human colorectal cancer cells Caco-2 with 25% of growth inhibition <sup>50</sup>. This antiproliferative activity was accompanied by morphological changes in Caco-2 cells. At 1.0  $\mu$ g/mL, we found that huratoxin induced cytoskeleton reorganization in Caco-2 cells and the formation of structures mimicking the intestinal crypt architecture, suggesting a recovery of normal tissue differentiation <sup>50</sup>. Interestingly, in contrast with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), a DAG-mimetic agent known to be cytotoxic for Caco-2 cells, huratoxin inhibited GSK3 $\beta$  and Akt <sup>50</sup>, suggesting that huratoxin could display a specific activity on PKCs isozymes.

In this paper, we describe the isolation and structural elucidation of five new analogs of huratoxin (6'*R*-hydroxy-huratoxin (**1**), 4'*S*,5'*S*-dihydroxy-huratoxin (**2**), 4'(Z)-6'-oxo-huratoxin (**3**), 4'*S*,5'*S*-epoxy-huratoxin (**4**), and huratoxigenin-20-(11'-methyloctadec-12'-enoate) (**5**)) along with two known daphane-type diterpenes (huratoxin (**6**) and 6'-oxo-huratoxin (**7**)) from the latex of *H. crepitans* (Fig. 1). The cytostatic activity of compounds **1-7** on Caco-2 cells was assessed leading to structure-activity relationships. In an attempt to further investigate the mechanism of action of isolated compounds, we examined the involvement of PKC $\alpha$  (conventional PKC), PKC $\delta$  (novel PKC) and PKC $\zeta$  (atypical PKC) previously shown to regulate Caco-2 cell proliferation <sup>44,51-53</sup>, on morphological and cytostatic properties of mono-esterified

daphnanes. Finally, we evaluated the cytotoxic activity of the two most active daphnanes in the preclinical model of human primary colorectal cancer cells cultured as colonoids.

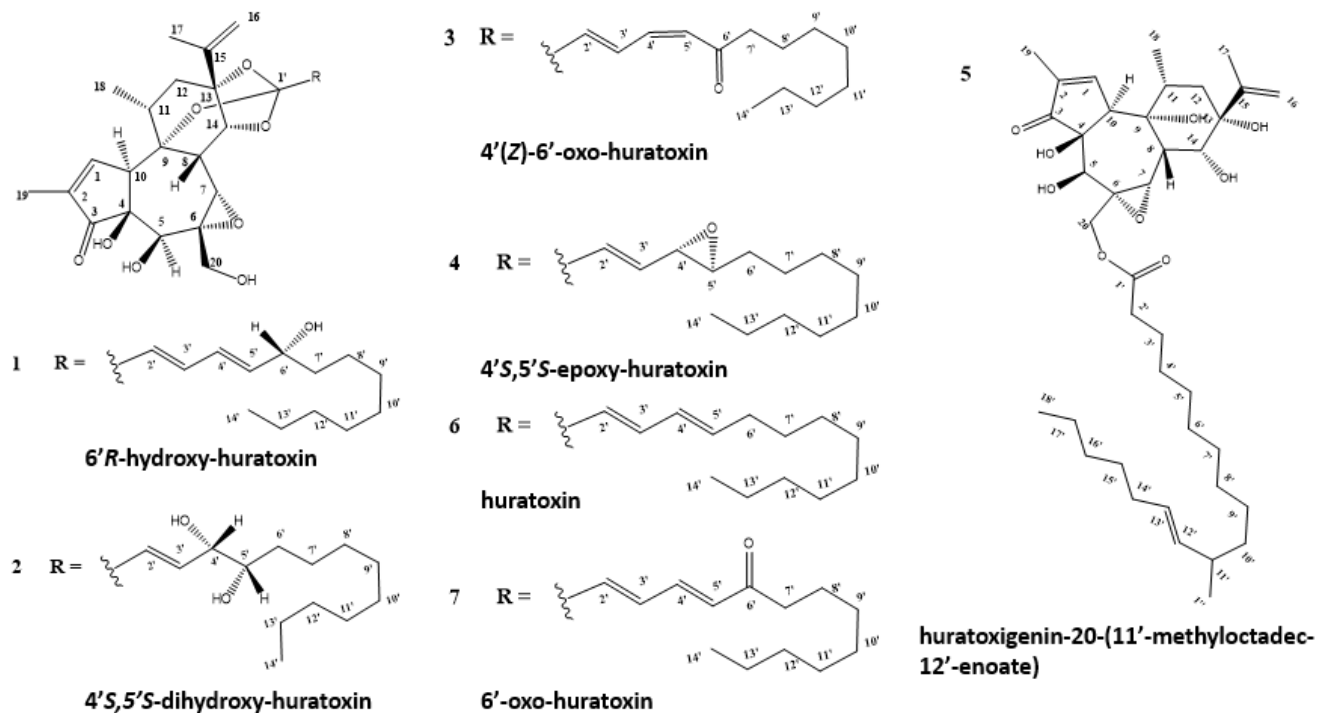


Figure 145: Structure of isolated mono-esterified daphnanes

## 2. Results and discussion

### 2.1 Isolation and structure elucidation of mono-esterified daphnanes from the latex of *Hura crepitans*.

A semi-quantitative analysis of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $n^\circ 1$  crude extract of the latex by UHPLC-DAD-HRMS revealed that huratoxin and its isomer represented 20.5% of the mono-esterified daphnanes against 60.0% in our previous investigation<sup>50</sup>. This can be explained by the presence of more polar (oxygenated) daphnane-type diterpenoids detected between 1.46 and 2.45 min by reversed-phase separation as depicted in Fig. S1 (supporting informations, SI). The qualitative analysis of the detected polar peaks, and particularly MS/MS profiles revealing diagnostic ions at  $m/z$  361 et  $m/z$  253 (base peak), confirm their daphnane-type structure<sup>8</sup> (Fig. S2).

Separations using a combination of MPLC, normal- and reversed-phase silica column chromatographies and semi-preparative HPLC afforded seven daphnane type diterpenes (**1–7**), among them five new derivatives (**1–5**) (Fig. 1). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data in Table 1 indicated



that compounds **1-4** are orthoesterified daphnanes as ascertained by chemical shift for C-1' near  $\delta_C$  116, while **5** is an esterified daphnane as indicated by the characteristic resonance at  $\delta_C$  175.7 for C-1'.

Compound **1** was isolated as a colorless oil. Its molecular formula was established as  $C_{34}H_{48}O_9$  by positive HRAPCIMS ( $m/z$  601.3361  $[M+H]^+$ ). The IR absorptions revealed the presence of hydroxy groups ( $3446\text{ cm}^{-1}$ ),  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone ( $1697\text{ cm}^{-1}$ ) and double bonds ( $1631\text{ cm}^{-1}$ ) (Fig. S9). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data showed the presence of characteristic resonances for an isopropenyl moiety at  $\delta_H$  4.91 (H-16a),  $\delta_H$  5.0 (H-16b),  $\delta_H$  1.78 (H<sub>3</sub>-17) and at  $\delta_C$  146.7 (C-15) and two methyl groups at  $\delta_H$  1.15 (H<sub>3</sub>-18) and  $\delta_H$  1.78 (H<sub>3</sub>-19), consistent with a daphnane-type structure. The signals of the typical orthoester carbon at  $\delta_C$  116.4 (C-1') and an oxygenated methylene at  $\delta_H$  3.77 (H-20a) and  $\delta_H$  3.81 (H-20b) suggested that **1** is an orthoesterified daphnane-type diterpenoid. Other resonances due to polyoxygenated functionalities in the daphnane skeleton were observed for an epoxy group at  $\delta_H$  3.40 (H-7),  $\delta_C$  61.1 (C-6),  $\delta_C$  64.3 (C-7), one oxygenated methine at  $\delta_C$  72.1 (C-5) and one oxygenated tertiary carbon at  $\delta_C$  72.7 (C-4). The positions of these functionalities were deduced by analyses of 2D-NMR HSQC, COSY and HMBC spectra where key correlations are shown in Fig. 2A. The HMBC cross peak observed between H-14 ( $\delta_H$  4.44) and C-1' confirms the position of the orthoesterified side chain. The  $^{13}\text{C}$  signals of four ethylenic carbons at  $\delta_C$  125.9 (C-2'),  $\delta_C$  134.0 (C-3'),  $\delta_C$  128.5 (C-4') and  $\delta_C$  140.7 (C-5'), combined with COSY correlations, show the presence of two conjugated double bonds on the side chain and their *E*-configurations were deduced from the  $^1\text{H}$  NMR coupling constants  $J_{2',3'}=15.5\text{ Hz}$  and  $J_{4',5'}=15.3\text{ Hz}$ .  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY cross-peak between H-5' at  $\delta_H$  5.89 and the low-field H-6' at  $\delta_H$  4.16 revealed the presence of an oxygenated methine for C-6'. The rest of the alkyl chain consists of seven methylene groups at  $\delta_C$  37.7 (C-7'),  $\delta_C$  27.7 (C-8'),  $\delta_C$  29.7-30.0 (C-9' to C-11'),  $\delta_C$  32.3 (C-12'),  $\delta_C$  23.1 (C-13') and one methyl group at  $\delta_C$  14.3 (C-14') that have been assigned according to their HMBC correlations (Fig. 2A) and by comparison with literature<sup>50</sup>. Furthermore, NOESY correlations observed in the daphnane core (Fig. 2B) and ECD spectrum (Fig. S10) of compound **1** were similar to those of huratoxin (**6**) allowing us to determine the absolute configuration of the diterpene skeleton. In order to determine the configuration of the C-6', Gauge-Independent Atomic Orbital (GIAO) NMR chemical shifts calculations supported by the advanced statistical method DP4+<sup>54</sup> was performed on the structure of **1** with the two possible configurations at C-6'. In this approach, the differences between *ab initio*

computed  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR scaled chemical shifts and experimental data are considered (Figs. S11 and S12). Then, the probability of the error in each chemical shift of each configuration is computed using Student *t*-test. The product of these probabilities divided by the sum of the probabilities gives the DP4+ probability for each configuration (Fig. S13). DP4+ calculations give a probability of 99.1% for the *6'R* configuration. Thus, **1** was named *6'R*-hydroxy-huratoxin (Fig. 1).

Compound **2** was isolated as a colorless oil. Its molecular formula was established as  $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_{10}$  by positive HRAPCIMS ( $m/z$  619.3475  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) and differed by 18 u when compared to **1**. The IR absorptions revealed the presence of hydroxy groups ( $3384\text{ cm}^{-1}$ ),  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone ( $1701\text{ cm}^{-1}$ ) and double bonds ( $1634\text{ cm}^{-1}$ ) (Fig. S21). All of the characteristic chemical shifts of the daphnane skeleton were present on  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **2**. As for **1**, the key HMBC correlation detected between H-14 at  $\delta_{\text{H}}$  4.40 and C-1' at  $\delta_{\text{C}}$  116.6 confirmed the same position of the orthoesterified side chain. The difference with compound **1** is therefore located on the alkyl chain where the resonance of only two ethylenic carbons at  $\delta_{\text{C}}$  125.9 (C-2') and  $\delta_{\text{C}}$  135.3 (C-3') revealed the presence of one double bond in *E*-configuration deduced from the coupling constant  $J_{2',3'}=15.7\text{ Hz}$ .  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY cross peaks observed between H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  6.29)/H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  4.00) and H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  4.00)/H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  3.50) allowed us to assign two oxygenated methine groups at positions C-4' and C-5' (Fig. 2A). Thus, the planar structure of **2** was determined. The relative configuration of the daphnane skeleton of **2** was deduced to be the same than as **1** since it presented the same key NOESY correlations (Fig. 2B). Although the ECD spectrum of **2** was different than these of huratoxin (Fig. S22), we assumed that the absolute configuration of the daphnane core was the same in the two molecules. Indeed, in previous studies<sup>50,55</sup> the absolute configuration of the daphnane core has always been described to be identical to that of huratoxin. Free rotation of the side chain makes difficult the determination of the configuration of the C-4' and C-5' stereocenters. However, GIAO NMR chemical shifts calculations were performed on the structure of the compound **2** (Figs. S23 and S24) for the four diastereoisomers (*4'S*-*5'S*, *4'R*-*5'R*, *4'S*-*5'R* and *4'R*-*5'S*). The comparison with experimental NMR shifts of **2** was in favor of the *4'S*-*5'S* configuration with a DP4+ calculation showing a probability of 99.6% (Fig. S25). Thus, **2** was named *4'S,5'S*-dihydroxy-huratoxin (Fig.1).

Compound **3** was isolated as a colorless oil. Its molecular formula was established as  $C_{34}H_{46}O_9$  by positive HRAPCIMS ( $m/z$  599.3205  $[M+H]^+$ ) which corresponded to the molecular formula of a previously isolated daphnane orthoester identified to 6'-oxo-huratoin<sup>50</sup> and also isolated in this work (compound **7**). The comparison of  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data of these two isomers displayed differences only located on the orthoester side chain and notably on the C-3' double bond. The major difference concerned the  $J_{3',4'}$  coupling constant measured to be 11.4 Hz for compound **3** instead of 15.6 Hz for **7**, thus indicating a Z-configuration for the C-3'/C-4' double bond. The absolute configuration of **3** was drawn as depicted in Fig. 1 according to NOESY correlations that were superimposable to those of compounds **1-2** (Fig. 2B) and similar ECD spectrum to 6'-oxo-huratoin (Fig. S34)<sup>50</sup>. Therefore, **3** was named 4'(Z)-6'-oxo-huratoin.

Compound **4** was isolated as a colorless oil. Its molecular formula was established as  $C_{34}H_{48}O_9$  by positive HRAPCIMS ( $m/z$  601.3367  $[M+H]^+$ ). The IR absorptions revealed the presence of hydroxy groups ( $3421\text{ cm}^{-1}$ ),  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone ( $1701\text{ cm}^{-1}$ ) and double bonds ( $1632\text{ cm}^{-1}$ ) (Fig. S47). The analysis of NMR spectra confirmed the presence of a daphnane skeleton. Moreover, we noticed characteristic chemical shifts of another epoxy group at  $\delta_C$  57.4 and 61.1. HMBC correlations between C-1' ( $\delta_C$  115.7) and a multiplet at  $\delta_H$  6.00 (H-2' and H-3') allowed us to assign a double bond between C-2' and C-3' (Fig. 2A). Additionally,  $^1H$ - $^1H$  COSY cross peaks among H-3' ( $\delta_H$  6.00)/H-4' ( $\delta_H$  3.13) and H-4'/H-5' ( $\delta_H$  2.85) helped to locate the epoxy group at C-4', C-5' (Fig. 2A). Thus, compound **4** was identified as 4',5'-epoxy-huratoin (Fig. 1).  $^1H$ -NMR multiplicities of H-2' ( $\delta_H$  6.00) and H-3' ( $\delta_H$  6.00) appearing as multiplets, a  $^1H$ -NMR spectrum of **4** was recorded in benzene  $d_6$  and permitted to separate these protons and to measure their coupling constant ( $J_{2',3'} = 15.7\text{ Hz}$  (Fig. S46)), thus indicating E-configuration. The relative configuration of the daphnane core of **4** was determined to be the same than precedent compounds **1-3** according to the analysis of NOESY correlations (Fig. 2B). Due to similarity of ECD spectra of **4** and **2**, it was also assumed that daphnane skeleton of **4** has the same absolute configuration than previous isolated compounds (Fig. 1). Thanks to GIAO NMR chemical shifts calculation on the structure of compound **2** (Figs. S47 and S48), 4'S,5'S was deduced to be the most likely configuration of the side chain of **4**. Indeed, DP4+ calculation showed a probability of 99.9% in favor of this hypothesis when compared to the 4'R-5'R, 4'R-5'S and 4'S-5'R candidates. (Fig. S51). Thus, **4** was identified as 4'S,5'S-epoxy-huratoin (Fig. 1).

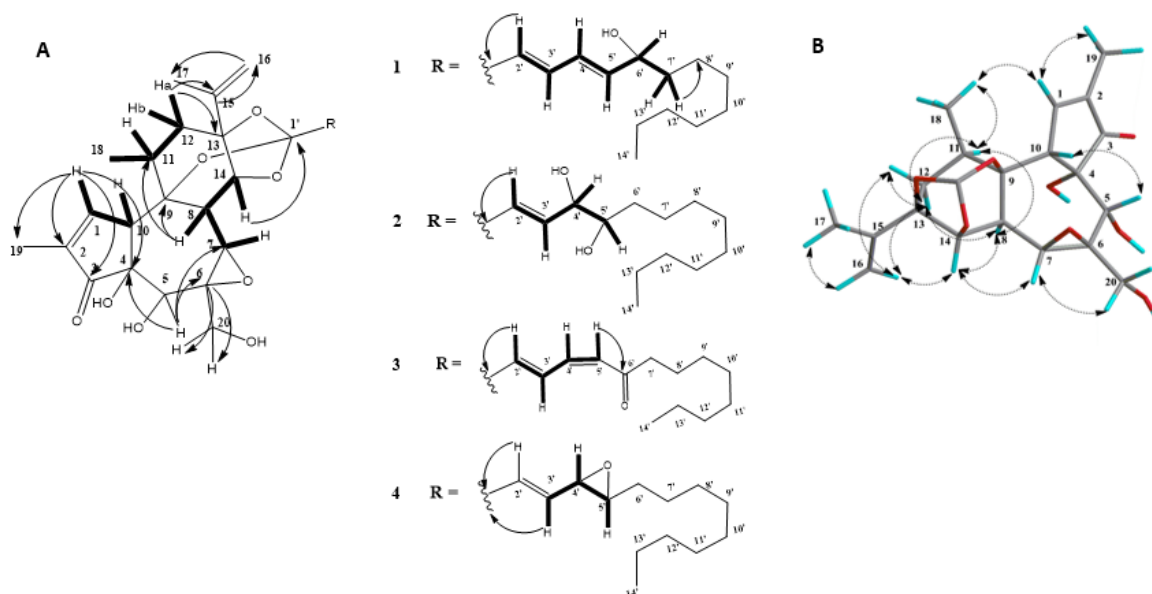


Figure 146: A) Key COSY (bold) and HMBC (arrow) correlations of compounds **1-4**. B) Key NOESY correlations (arrow) of the daphnane core of compounds **1-4**

Compound **5** was isolated as a colorless oil. Its molecular formula was established as  $C_{39}H_{62}O_9$  by positive HRAPCIMS ( $m/z$  675.4455  $[M+H]^+$ ). The IR absorptions were the same as for the precedent compounds described in this work (Fig. S59). The assignment of carbons and protons constituting the daphnane core was performed through the analysis of 1D and 2D NMR spectra. However, when compared to NMR spectra of compounds **1-4**, some small differences can be noted in the chemical shifts of certain atoms of the daphnane core and particularly C-6 ( $\delta_C$  78.3) and C-7 ( $\delta_C$  80.8) that were deshielded, whereas H-5 ( $\delta_H$  3.64) resonated at higher field. So, the electronic environment around these atoms is modified when compared to compounds **1-4**. The HMBC cross peak observed between H<sub>2</sub>-20 ( $\delta_H$  4.34 and 4.44) and C-1' ( $\delta_C$  175.7) explained this observation since it revealed that **5** was esterified at C-20 ( $\delta_C$  66.2) (Fig. 3A), in contrast to other mono-esterified daphnanes previously isolated from *H. crepitans*. It is worth mentioning that the resonances of C-13 at  $\delta_C$  74.7 and C-14 at  $\delta_C$  77.8 were also shielded. This finding is consistent with the literature in which Otsuki *et al.*, in 2020, reported the isolation and structural elucidation of non-(ortho)esterified daphnane-type diterpenes showing similar chemical shifts for carbons 9, 13, and 14<sup>56</sup>. Furthermore, none of the signals in the  $^{13}C$  NMR spectrum could be assigned as an orthoester quaternary carbon. Concerning the structure of the C-20 ester chain, a neutral loss of 296 u observed in the MS<sup>2</sup> spectrum (Fig. S2) of **5** obtained from the  $[M+H]^+$  ion at  $m/z$  675 permitted to deduce a 19 carbons alkyl chain with 1 index of

hydrogen deficiency. HMBC cross peak between a triplet at  $\delta_{\text{H}}$  2.39 (H-2') and C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  175.7) and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY correlation between H-2' and H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  1.59) allowed to assign the signals of C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  34.7) and C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  25.4). H-3' correlates, in the HMBC spectrum, with a cluster of 6 carbons located between  $\delta_{\text{C}}$  29.5 and 30.1 and assigned to carbons C-4' to C-9'. The methyl signal [ $\delta_{\text{H}}$  0.88 (t,  $J = 6.7$ ),  $\delta_{\text{C}}$  14.3] is characteristic of a terminal methyl (C-18'). H<sub>3</sub>-18' correlates in the COSY spectrum with a large signal at  $\delta_{\text{H}}$  1.26, itself correlating, in the HSQC spectrum, with several methylene  $^{13}\text{C}$  signals, whose signals at  $\delta_{\text{C}}$  23.1, 27.7, and 32.3. According to the literature, these  $^{13}\text{C}$  chemical shifts are characteristic of methylenes located at the end of an alkyl chain<sup>50</sup> and were therefore positioned at  $\delta_{\text{C}}$  23.1 for C-17',  $\delta_{\text{C}}$  32.3 for C-16' and  $\delta_{\text{C}}$  27.7 for C-15'. The resonances of two ethylenic carbons at  $\delta_{\text{C}}$  129.9 and  $\delta_{\text{C}}$  136.8, bearing protons at  $\delta_{\text{H}}$  5.36 (dd,  $J = 15.6, 6.8$ ) and  $\delta_{\text{H}}$  5.25 (dd,  $J = 15.6, 7.5$ ) respectively, confirmed the presence of a double bond in *E*-configuration on the side chain. The HMBC correlation of the two ethylenic protons with a methyne signal at  $\delta_{\text{C}}$  33.0 and a methylene at  $\delta_{\text{C}}$  37.1, bearing protons at  $\delta_{\text{H}}$  1.97 (q,  $J = 6.8$ ) and  $\delta_{\text{H}}$  2.02 (m), respectively, allowed to characterize the two allylic positions. Furthermore, a doublet [ $\delta_{\text{H}}$  0.94 (d,  $J = 6.7$ )], borne by a methyl carbon ( $\delta_{\text{C}}$  21.1) indicates the presence of a branched methyl group on the chain (CH<sub>3</sub>-1''). This doublet correlates, in the COSY spectrum, with the signal at  $\delta_{\text{H}}$  2.02 corresponding to an allylic proton. So, all the 19 carbons of the chain have been assigned and a CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH=CH-CH<sub>2</sub> moiety can be positioned between C-9' and C-15' but remains to be located. Unfortunately, the superposition of the NMR signals did not allow us to discriminate between the two possible structures for this molecule as drawn in Fig. 4. However, GIAO NMR chemical shifts calculations have been made for the two fatty methyl esters mimicking the two candidates of C-20 esterified side chains of compound **5** (Fig. S61). The comparison between calculated and experimental NMR shifts of **5** was in favor of a 11' methyl branching and 12',13' unsaturation. Indeed, the DP4+ calculation (Figs. S62 to S64) showed an unambiguous probability of 100% for the structure n°1 of **5** depicted in Fig. 1. As drawn (Fig. 1), the basic daphnane diterpene core of **5** is the same that of huratoxin (*i.e.* 1,3- $\alpha,\beta$ -unsaturated-ketone-4,5,9,13,14,20-hexahydroxy-6,7-epoxy-daphnane) which we propose to call "huratoxigenin" as in one of our earlier articles<sup>8</sup>. Consequently, the trivial name huratoxigenin-20-(11'-methyloctadec-12'-enoate) was chosen for compound **5**. The NOESY correlations observed for **5** in the daphnane core were similar to the above compounds, allowing the determination of its relative configuration (Fig. 3B). Thus, the structure of **5** was determined as shown in Fig. 1.

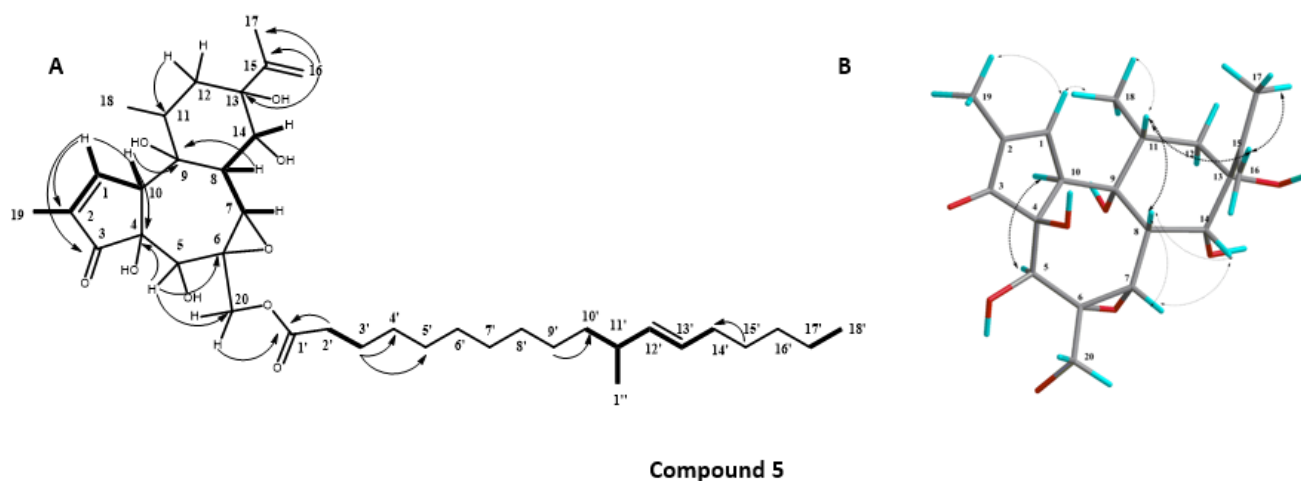


Figure 147: A) Key COSY (bold) and HMBC (arrow) correlations of the compound **5**. B) Key NOESY correlations (arrow) of the esterified daphnane core of compound **5**.

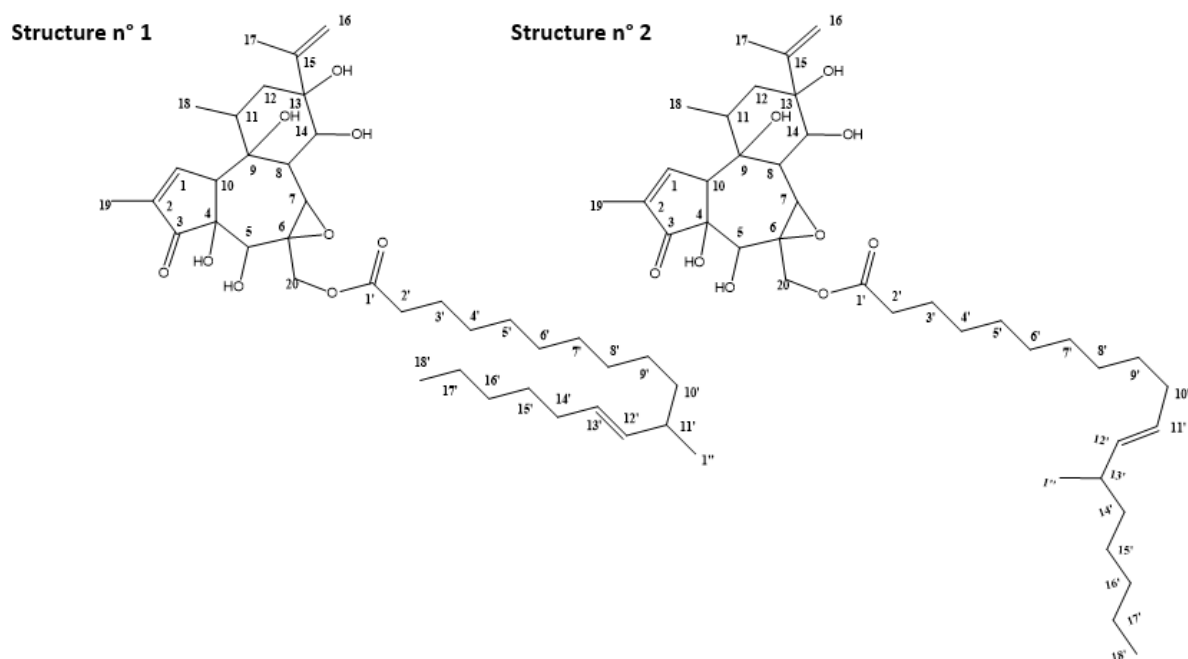


Figure 148: Proposal of structures for compound **5**.

Huratoxin (**6**) and 6'-oxo-huratoxin (**7**) (Fig. 1) were identified by comparison of their spectroscopic data with previous work<sup>50</sup>. Their NMR data are presented in Figs. S65 to S67 and Table S1 in supporting information.

N°	1		2		3		4		5	
	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$
1	7.61 ; m	161.1	7.48 ; s	160.3	7.60 ; m	161.0	7.59 ; m	161.0	7.67 ; m	162.1
2	-	137.3	-	137.4	-	137.3	-	137.2	-	135.1
3	-	210.0	-	209.7	-	210.0	-	210.0	-	209.8
4	-	72.7	-	73.6	-	72.7	-	72.7	-	75.0
5	4.25 ; s	72.1	4.08 ; s	71.0	4.26 ; s	72.2	4.24 ; bs	72.2	3.64 ; s	72.6
6	-	61.1	-	62.3	-	61.0	-	61.0	-	78.3
7	3.40 ; s	64.3	3.31 ; s	64.3	3.42 ; s	64.2	3.39 ; s	64.3	3.94 ; m	80.8
8	2.95 ; d (2.5)	37.1	2.91 ; d (2.4)	37.1	2.97 ; d (2.5)	37.1	2.95 ; d (2.6)	37.1	2.91 ; m	38.8
9	-	80.1	-	80.6	-	80.4	-	80.2	-	79.0
10	3.77 ; m	48.5	3.73 ; m	48.8	3.77 ; m	48.4	3.75 ; m	48.4	3.64 ; m	53.5
11	2.49 ; m	35.3	2.48 ; m	35.4	2.48 ; m	35.4	2.48 ; m	35.3	2.20 ; m	37.3
12a	1.65 ; d (14.4)	36.8	1.54 ; d (14.4)	36.9	1.65 ; d (14.4)	36.8	1.62 ; s	36.8	1.83 ; m	38.1
12b	2.24 ; dd (14.4 ; 8.6)		2.20 ; dd (14.4 ; 8.6)		2.25 ; dd (14.4 ; 8.6)		2.23 ; m		2.20 ; dd (14.4 ; 8.6)	
13	-	85.0	-	85.3	-	85.3	-	85.3	-	74.7
14	4.44 ; d (2.5)	82.3	4.40 ; d (2.3)	82.7	4.47 ; d (2.5)	82.4	4.44 ; d (2.6)	82.3	4.15 ; d (3.7)	77.8
15	-	146.7	-	147.1	-	146.5	-	146.4	-	145.7
16a	4.91 ; m	111.2	4.83 ; s	111.1	4.92 ; m	111.3	4.90 ; m	111.2	5.02 ; s	114.3
16b	5.02 ; bs		4.96 ; s		5.04 ; m		5.01 ; m		5.08 ; s	
17	1.78 ; m	19.2	1.72 ; bs	19.0	1.79 ; m	19.2	1.77 ; m	19.2	1.78 ; s	19.1
18	1.15 ; d (7.1)	20.5	1.09 ; d (7.0)	20.4	1.17 ; d (7.1)	20.5	1.16 ; d (7.1)	20.4	0.99 ; d (6.7)	17.6
19	1.78 ; m	10.1	1.70 ; bs	9.90	1.79 ; m	10.1	1.76 ; m	10.1	1.78 ; s	9.97
20a	3.77 ; m	65.4	3.58 ; d (12.4)	65.1	3.77 ; m	65.3	3.77 ; d (12.5)	65.4	4.34 ; d (11.9)	66.2
20b	3.81 ; d (12.1)		3.87 ; d (12.4)				3.81 ; d (12.5)		4.44 ; d (11.9)	
1'	-	116.4	-	116.6	-	116.1	-	115.7	-	175.7
2'	5.80 ; d (15.5)	125.9	5.84 ; d (15.7)	125.9	6.10 ; d (15.6)	134.6	6.00 ; m	127.8	2.39 ; t (7.5)	34.7
3'	6.71 ; dd (15.5 ; 10.8)	134.0	6.29 ; dd (15.7 ; 6.0)	135.3	7.86 ; ddd (15.6 ; 12.6 ; 1.1)	130.7	6.00 ; m	133.9	1.59 ; m	25.4
4'	6.25 ; dd (15.3 ; 10.8)	128.5	4.00 ; m	75.0	6.43 ; ddd (12.6 ; 11.4 ; 0.7)	139.7	3.13 ; m	57.4	1.26 ; m	29.5 - 30.1
5'	5.89 ; dd (15.3 ; 6.5)	140.7	3.50 ; m	74.8	6.18 ; d (11.4)	128.0	2.85 ; m	61.1		
6'a	4.16 ; q (6.5)	72.6	1.33 ; m	32.8	-	201.6	1.62 ; s	32.4		
6'b			1.45 ; m							
7'a	1.52 ; m	37.7	1.26 ; m	26.4	2.48 ; m	44.8	1.43 ; m	26.3		
7'b			1.45 ; m							
8'	1.28 ; m	25.7	1.21 ; m	32.8	1.60 ; m	24.4	1.27 ; m	29.7		
9'		29.7	1.21 ; m	29.9 - 30.2	1.27 - 1.29 ; m	29.6				
10'								29.9	1.26 ; m	37.6
11'		30.0				29.8			2.02 ; m	37.1
12'	1.28 ; m	32.3	1.21 ; m	32.5	1.29 ; m	32.3	1.27 ; m	32.3	5.25 ; dd (15.6 ; 6 ; 7.5)	136.8
13'	1.28 ; m	23.1	1.21 ; m	23.2	1.29 ; m	23.1	1.27 ; m	23.1	5.36 ; dd (15.6 ; 6.8)	129.9
14'	0.88 ; t (6.9)	14.3	0.81 ; t (6.8)	14.1	0.88 ; t (7.0)	14.3	0.88 ; t (7.0)	14.3	1.97 ; q (6.8)	33.0
15'	-	-	-	-	-	-			1.26 ; m	27.7
16'	-	-	-	-	-	-			1.26 ; m	32.3
17'	-	-	-	-	-	-			1.26 ; m	23.1
18'	-	-	-	-	-	-			0.88 ; t (6.7)	14.3
1''	-	-	-	-	-	-			0.94 ; d (6.7)	21.1

Table 14:  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$  NMR data ( $\delta$  in ppm) for the daphnane-type orthoesters (**1**) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ), (**2**) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{MeOD}$  50/50 v/v), (**3**) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) and (**4**) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) and daphnane-type ester (**5**) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ).

## 2.2. *In vitro* selective cytostatic activity of isolated mono-esterified daphnanes

As shown in our previous work<sup>50</sup>, huratoxin exhibits cytostatic activity on Caco-2 colorectal cancer cells. To further investigate the structure activity relationships, isolated daphnanes **1-7** were evaluated for their cytotoxicity on Caco-2 cells. As previously shown for huratoxin<sup>50</sup>, these daphnanes did not induce death of Caco-2 cells (not shown). In Fig. 5, showing the cytostatic activity of tested compounds normalized to the antiproliferative effect of huratoxin (**6**), daphnane derivatives **1-4** and **7** show cytostatic activity on Caco-2 cells while **5** was inactive. Compounds **1**, **3** and **7** have similar antiproliferative effect than huratoxin (**6**) with around 25% of growth inhibition of Caco-2 cells and confirms the results obtained for huratoxin in our previous work<sup>50</sup>. It is interesting to note that compounds **1**, **3** and **7** and huratoxin (**6**) are orthoesterified daphnanes with two conjugated double bonds on their alkyl chain and that the C3'/C4' double bond *Z* configuration for oxo-huratoxin (**3**) does not change the activity compared to its *E* analog (**7**). The most active derivative 4',5'-epoxy-huratoxin (**4**) is also an orthoesterified daphnane but with one of the side chain double bonds oxidized by an epoxide group. Compound **2**, which is about 25% less antiproliferative than huratoxin, has, as for **4**, an oxidized side chain double bond but by two hydroxyl groups instead of an epoxide. Finally, the not active daphnane **5** is the only non orthoesterified compound but presenting a single ester alkyl chain located at C-20. These results suggest that orthoesterified chain is necessary for the activity, as previously assumed by Trinel *et al.*<sup>50</sup>. Similarly, the structure of the orthoester side chain participates to the activity since conjugated double bonds and/or epoxy substitutions are necessary to the antiproliferative effect or even exalt it as shown for epoxy-huratoxin, as summarized in Fig. 6. Huratoxin (**6**) being active and the most abundant daphnane in the latex and epoxy-huratoxin (**4**) being the most active on Caco-2 cells, only those two compounds were used for further investigations. The Fig. 7 shows the dose-response effect of **4** and **6** on the proliferation of Caco-2 cells. At 0.5 µg/mL, huratoxin (**6**) reaches a plateau at 20% growth inhibition while epoxy-huratoxin (**4**) reaches 30% growth inhibition at 1.0 µg/mL, that is in good agreement with the results described for Fig. 5. The assessment of active caspase 3 under treatment of Caco-2 cells by both compounds showed no statistically significant difference compared to basal conditions (not shown), thus indicating that huratoxin and epoxy-huratoxin do not trigger an apoptotic pathway and have a cytostatic effect. In order to confirm the selectivity of huratoxin against cancer cell line<sup>50</sup> and evaluate that of epoxy derivatives, the two compounds were incubated with the non-cancerous human intestinal epithelial cell (hIEC6)



line. As shown in Fig. 8, the non-statistical difference observed between solvent (DMSO) and tested molecules validates the selectivity of cytostatic effects of **4** and **6** against the colorectal cancerous cell.

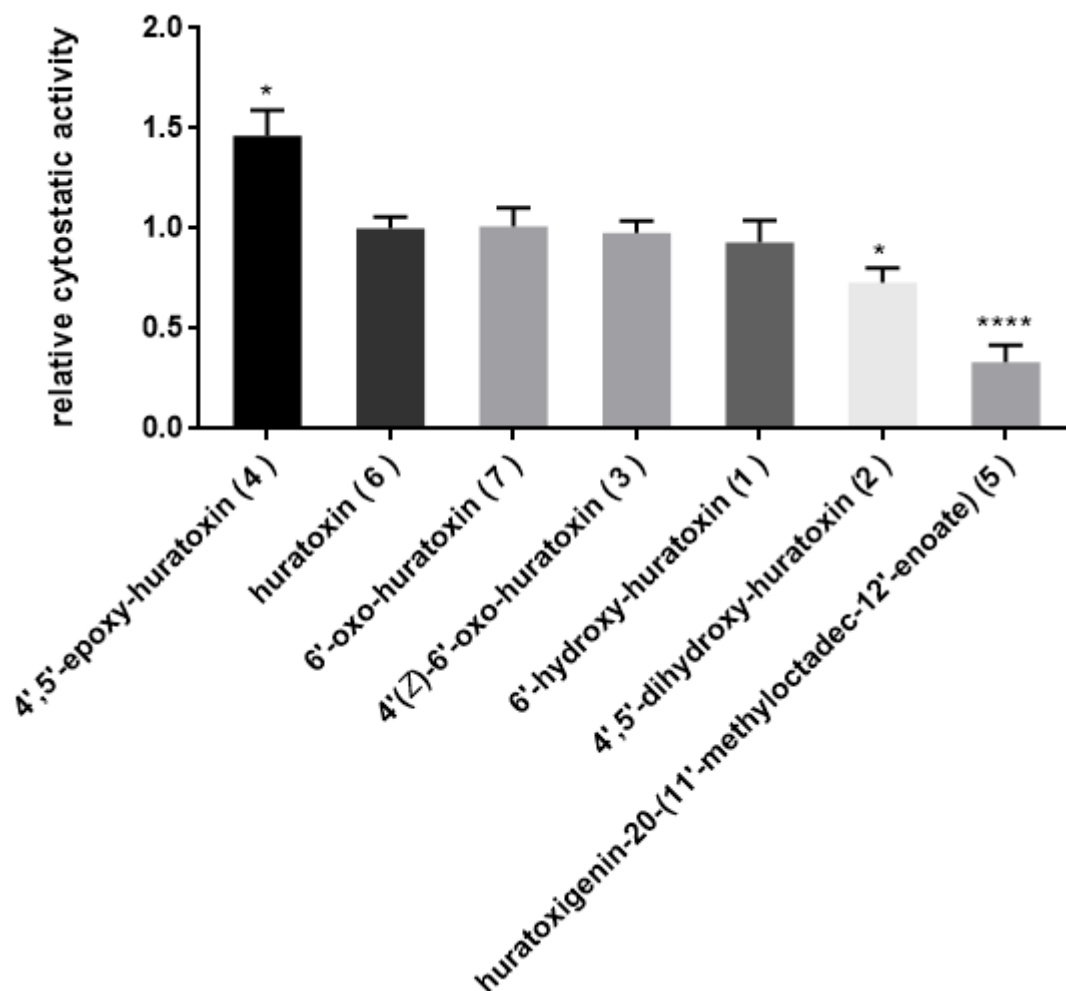


Figure 149: Cytostatic activity of compounds **1-7** on Caco-2 cells. Cells were incubated during 48 h with mono-esterified daphnanes at 1 µg/mL, then cell viability was measured by colorimetry. The cytostatic activity of the compounds has been normalized to that of huratoxin. Mean ± S.E.M., t-test from triplicates of 1 to 6 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

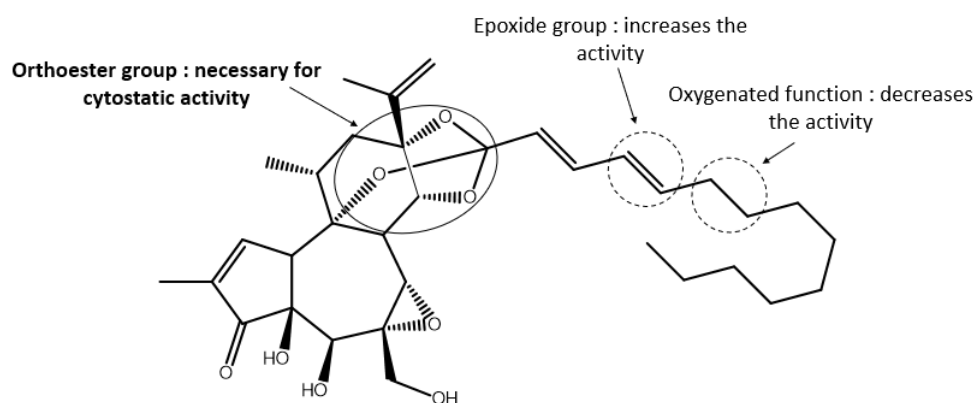


Figure 150: Structure activity relationships of mono-esterified daphnanes

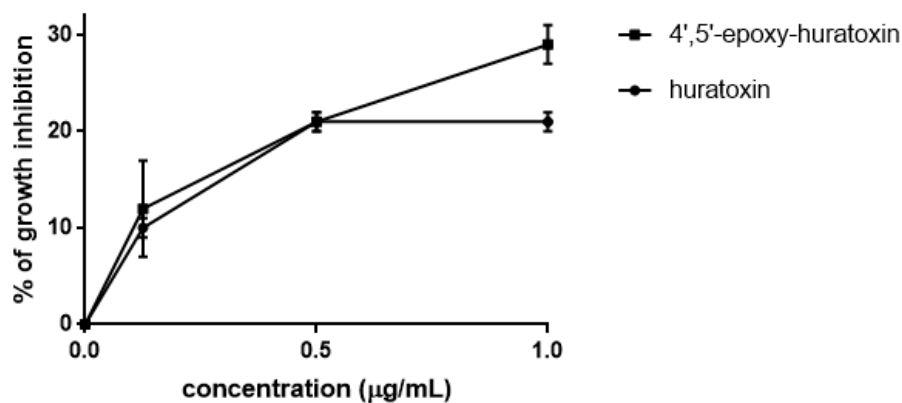


Figure 151: Cytostatic activity of huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin at different concentrations. Cells were incubated with different concentrations (0.125, 0.5 and 1 µg/mL) for 48 h and cell viability was measured by colorimetry and compared to the control (DMSO). Mean  $\pm$  S.E.M. from 2 independent experiments.

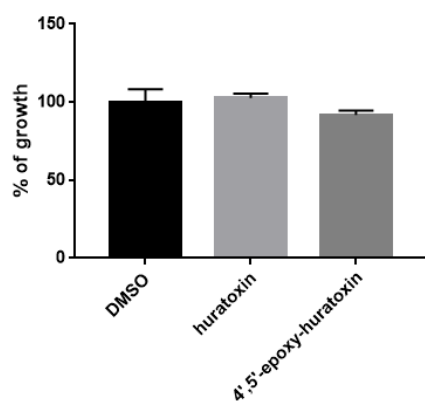


Figure 152: Impact of huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin on the growth of hIEC6 cells. Cells were incubated with mono-esterified daphnanes at 1 µg/mL for 48 h then cell viability was measured by colorimetry and compared to control (DMSO). Mean  $\pm$  S.E.M. t-test from 3 independent experiments: no significant differences compared to DMSO.

### 2.3. Morphological effects of huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin on Caco-2 cells

Besides the antiproliferative activity and as shown in previous work<sup>50</sup> for huratoxin, the treatment of Caco-2 cells by huratoxin and its epoxy derivative caused cellular aggregates as depicted in the confocal images of nuclei and cytoskeleton labeling in Fig. 9, and this, from the dose of 0.125 µg/mL (not shown). Interestingly, the two daphnanes influence both the proliferative and adhesive capacities of intestinal epithelial cells. These abilities are particularly important to maintain homeostasis through the maturation of intestinal epithelial cells in the crypt, the regenerative unit of the intestine and colon<sup>57</sup>. To further analyze the changes in cellular functions induced by huratoxin and epoxy-huratoxin, fluorescent labeling of nuclei and cytoskeleton were carried out. As shown in Fig. 9 (fluorescent images observed by confocal microscopy), morphological changes are accompanied by densification of cytoskeleton in

agreement with a reorganization of the architecture of the epithelial tissue. Our previous work showed that treatment with huratoxin even caused the formation of neo-crypt<sup>50</sup>. The present observations are probably the first step of this process and suggest that huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin could be excellent candidates for cancer therapy to restore normal tissue functions, *i.e.* controlled proliferation and differentiation that are lost during tumor transformation<sup>58</sup>.

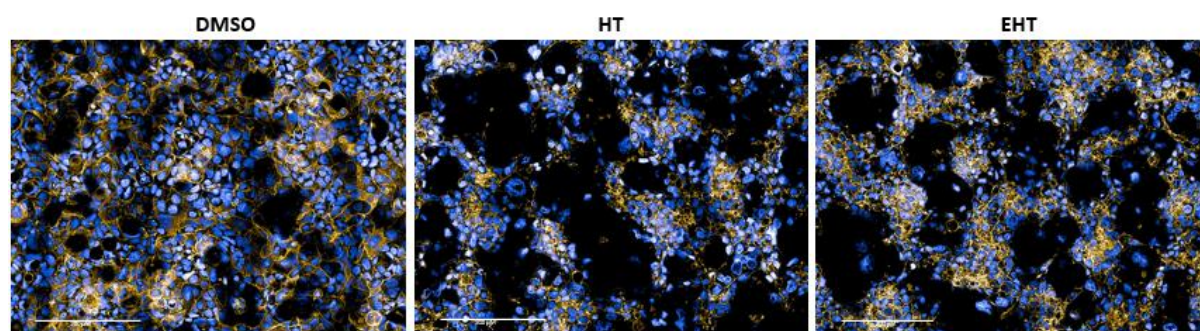


Figure 153: Morphological changes induced by the treatment of Caco-2 cells with huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin. 48 h after treatment with daphnanes (huratoxin, HT; 4',5'-epoxy-huratoxin, EHT; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or their solvent DMSO (0.01%), fluorescent labeling of nuclei (hoechst, blue) and cytoskeleton (phalloidin, yellow) was performed and the results were observed by confocal microscopy (OPERA Phenix<sup>®</sup>, objective 63X, size scale= 200  $\mu\text{m}$ ). Photographs are representative of duplicates from one experiment.

#### 2.4. Involvement of PKC $\zeta$ in the effects of huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin

Diterpenes encountered in Euphorbiaeace, including daphnane-type diterpenes, are known for their ability to activate the serine-threonine kinases PKCs. All PKC families (classic, novel, atypical) are represented<sup>51</sup> in Caco-2 cells. However, in our experimental conditions (confluent monolayer of Caco-2 cells), Abraham and colleagues detected the expression of only PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II (classics), PKC $\delta$  (novel) and PKC $\zeta$  (atypical)<sup>56</sup>. They noted that PKC $\gamma$  and PKC $\epsilon$  were not or very poorly expressed in this cell line. Also, we did not find in literature articles demonstrating the expression of PKC $\eta$  in Caco-2 cells. Concerning PKC $\theta$  (novel) and PKC $\iota$  (atypical), these two isoforms are expressed in Caco-2 cells and play important roles in cytoskeleton organization<sup>59,60</sup> but, to our knowledge, their potential role in the control of cell proliferation has not yet been described. Given that, we focused our investigations on PKC $\alpha$ <sup>51</sup>, PKC $\delta$ <sup>52</sup>, and PKC $\zeta$ <sup>44,53</sup> that are expressed in Caco-2 cells and capable of modulating cell proliferation.

We have first investigated the potential implication of PKC $\alpha$  in cytostatic and morphologic effects of huratoxin and epoxy-huratoxin using its pharmacological inhibitor Gö6976 (Fig. 10).

As shown in Figs. 10A and 10B, the inhibition of PKC $\alpha$  did not change the growth inhibition and the cell aggregation induced by both compounds. Even though not significant, in basal conditions a Caco-2 cell growth increase was repeatedly measured upon PKC $\alpha$  inhibitor incubation (Fig. 10A). This suggests that PKC $\alpha$  could play a cytostatic role in basal conditions as previously reported<sup>51</sup>. Moreover, the expression of PKC $\alpha$  was strongly decreased after huratoxin and epoxy-huratoxin treatment (Fig. 10B). This strong decrease of PKC $\alpha$  expression could be related to the previous work of Rickard and coll.<sup>61</sup> showing that short-chain fatty acids incubated with Caco-2 cells induce a specific down-regulation of PKC $\alpha$ . Rickard *et al.* demonstrate that this reduced expression of PKC $\alpha$  is not secondary to its enzymatic activation or to cell differentiation. Their data suggest that a degradation of the enzyme occurs independently from metabolic changes but under the control of gene transcription. Interestingly, the authors propose that the downregulation of PKC $\alpha$  should be a mechanism supporting the antitumorigenic action of specific short-chain fatty acids such as butyrate. Thus, this mechanism could reinforce the recovery of normal tissue functions induced by mono-esterified daphnanes. On the other hand, even though the treatment by the PKC $\alpha$  inhibitor has increased the expression of PKC $\delta$ , its active form (pSer664 PKC $\delta$ ) is absent upon treatment with huratoxin with or without PKC $\alpha$  inhibitor (Fig. 10C). Altogether, these data show that conventional and novel PKCs seem not to be implicated in the activity of huratoxin and its epoxide derivative.

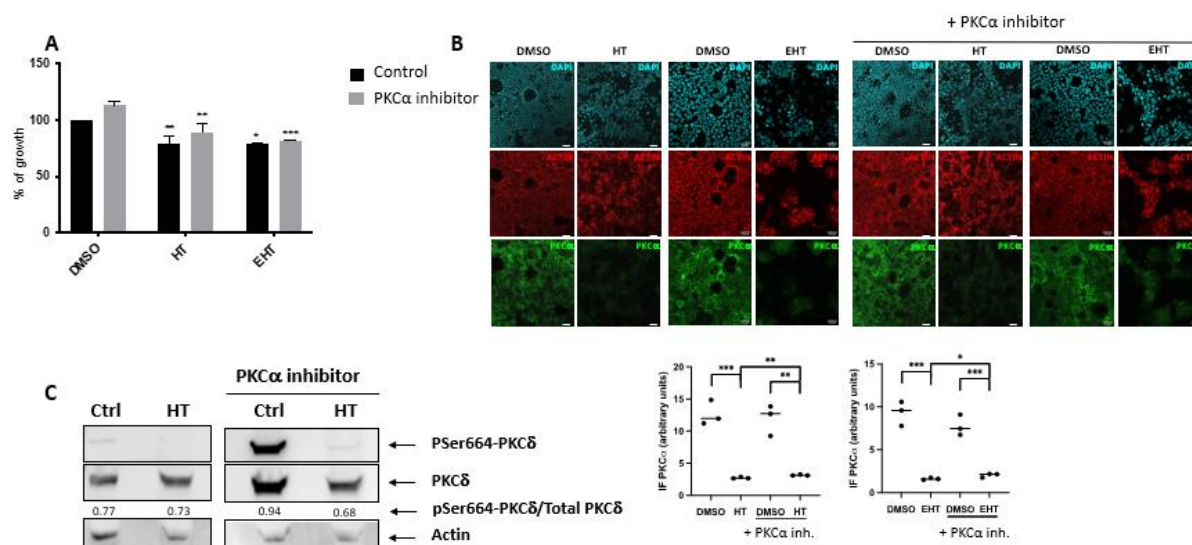


Figure 154: Regulation of PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  under treatment of Caco-2 cells by huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin. Caco-2 cells were pretreated for 15 min with 0.2  $\mu$ M PKC $\alpha$  inhibitor (Gö6976) and then incubated with huratoxin (HT) and epoxy-huratoxin (EHT) at 1  $\mu$ g/mL. A) After 48 h of incubation, cell viability was measured by colorimetry and the activity of huratoxin and epoxy-huratoxin was calculated relative to the DMSO control (Caco-2 cells treated with DMSO solvent only). Mean  $\pm$  S.E.M. from 1 to 3 (n) independent experiments in triplicates and statistical 2 ways ANOVA test compared to DMSO controls in the presence or

absence of PKC inhibitor: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . B) Morphological impact of huratoxin and epoxy-huratoxin treatment in the presence or not of PKC $\alpha$  inhibitor. After 48 h of incubation, PKC $\alpha$  immunostaining was performed (green) and quantified by immunofluorescence (graphs, statistical t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Labeling of nuclei (cyan) and cytoskeleton (red) is shown. Confocal views, 20X objective, size scale= 50  $\mu\text{m}$ , representative of duplicate from one experiment. C) After 48 h of incubation, cells were lysed for Western blot analysis. The results obtained from the revelation of the phosphorylated form (pSer664) and the total form of PKC $\delta$  are shown as well as quantification of pSer664-PKC $\delta$ /Total PKC $\delta$ . Actin shows the equivalence of protein deposition. Ctrl=Control DMSO. Data are from one experiment.

Then we decided to investigate the involvement of atypical PKCs (aPKCs  $\zeta$  and  $\iota$ ) in the cytostatic and morphological activities of daphnanes. Caco-2 cells were incubated with an aPKCs inhibitor (CRT0066854 hydrochloride) for 30 minutes before treatment with huratoxin or epoxy-huratoxin at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . This aPKCs inhibitor binds to the ATP-binding site of the enzyme and to a nearby residue to induce the inactive conformation of the kinase<sup>62</sup>. As shown in Fig. 11A, the presence of the aPKCs inhibitor dramatically reduced the inhibition of cell growth induced by the two daphnanes whose difference in effect with the control has become statistically non-significant. Similarly, the presence of this aPKCs inhibitor implied a lack of morphological changes on Caco-2 cells induced by epoxy-huratoxin and huratoxin as illustrated in Fig. 11B. Indeed, through labeling of the Caco-2 cytoskeleton and nuclei (Fig. 11B), we show that actin is more compacted and cells more aggregated upon huratoxin treatment compared to 4',5'-epoxy-huratoxin. Furthermore, the inhibition of PKC $\zeta$  decreased actin density and cell aggregation in huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin assays, respectively. These observations suggest that the targets of activated PKC $\zeta$  upon treatments with huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin could be primarily actin reorganization and cell-cell adhesive contacts, respectively. Moreover, we were able to establish that the impact of CRT0066854 hydrochloride on the inhibition of cytostatic effects of the two daphnanes was dose-dependent (data not shown), and to determine the dose 1.25  $\mu\text{M}$  for which 50% of the effect of the daphnanes is inhibited. It has been shown by Xiong and colleagues that, compared with the  $\iota$ -isoform, the  $\zeta$ -isoform of aPKCs played a prominent role in the morphogenesis of Caco-2 cells<sup>63</sup>. Consequently, our results strongly suggest the involvement of PKC $\zeta$  in the cytostatic and adhesive effects of the tested orthoesterified daphnanes. Thus, we studied the effect of huratoxin and epoxy-huratoxin on the activation state of PKC $\zeta$ . As shown in Fig. 11C, the phosphorylation of Threonine 410 of PKC $\zeta$  is increased only upon treatment with huratoxin. This threonine is localized to the kinase activation loop and its phosphorylation raises the activity of the kinase but is not absolutely essential to it<sup>64,65</sup>.

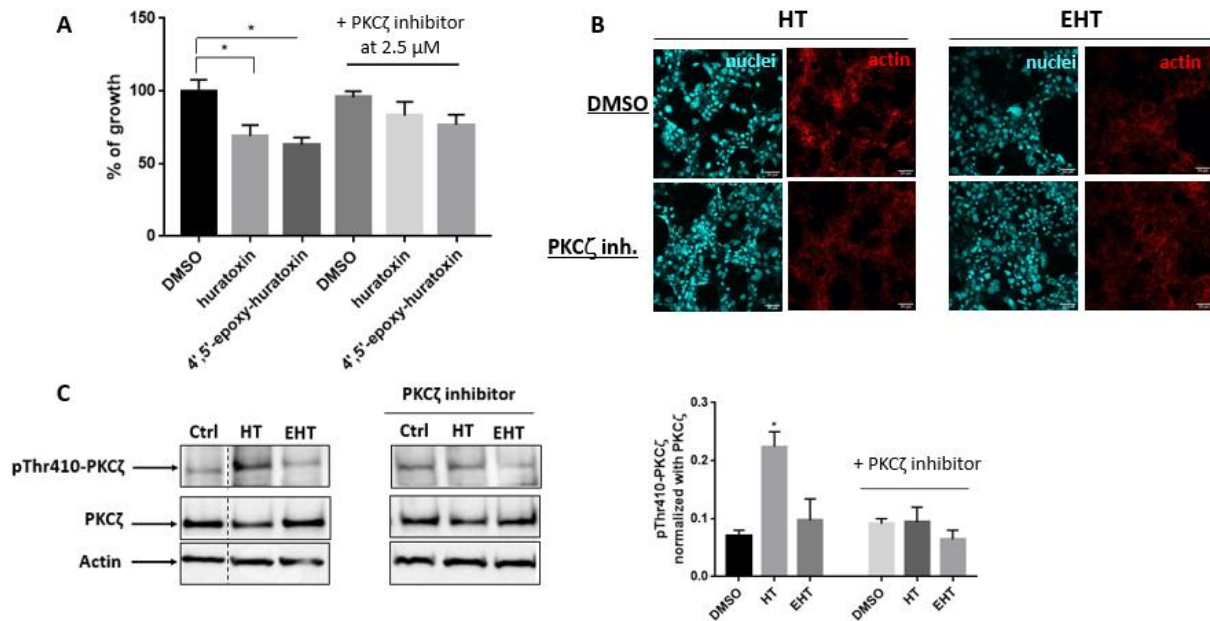


Figure 155: Involvement of PKC $\zeta$  in the cytostatic and morphological activities of huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin. Caco-2 cells were pretreated for 30 min with 2.5  $\mu$ M PKC $\zeta$  inhibitor (CRT0066854 hydrochloride) and then incubated with daphnanes at 1  $\mu$ g/mL. A) After 48 h of incubation, cell viability was measured by colorimetry and the activity of daphnanes was calculated relative to the DMSO control (Caco-2 cells treated with DMSO solvent only). Mean  $\pm$  S.E.M. from 3 (n) independent experiments and t-test compared to DMSO controls in the presence or absence of PKC $\zeta$  inhibitor: \* $p$ <0.05. B) Morphological impact of Caco-2 cells pre-treatment with the PKC $\zeta$  inhibitor before addition of huratoxin (HT) or 4',5'-epoxy-huratoxin (EHT). Nuclei (cyan) and cytoskeleton (red) labeling (confocal views taken at the OPERA Phenix<sup>®</sup>, 20X objective, size scale = 50  $\mu$ m). Photographs are representative of duplicates from one experiment. C) After 48 h of incubation cells were lysed for Western blot analysis. The results obtained from the revelation of the phosphorylated form (pThr410) and the total form of PKC $\zeta$  are shown. Actin shows the equivalence of protein deposition. The modulation of the phosphorylated active form of PKC $\zeta$  (pThr410) after addition of the PKC $\zeta$  inhibitor is shown. Quantification of n=2 experiments and statistical t-test compared to DMSO are shown: Mean  $\pm$  S.E.M., \* $p$ <0.05.

To further understand the mechanism of action of daphnanes, we examined the localization of PKC $\zeta$  after treatment with huratoxin and epoxy-huratoxin at 1  $\mu$ g/mL. As depicted in Fig. 12A, upon treatment with both daphnanes, the co-localization of PKC $\zeta$  and actin is increased compared to the control. Moreover, upon treatment with huratoxin, PKC $\zeta$  was found co-localized with actin in dense cell aggregates whereas this co-localization was found more peripheral to cell aggregates upon treatment with 4',5'-epoxy-huratoxin (Fig. 12B and 12C). Of note, PKC $\zeta$  was rarely found in the nucleus of Caco-2 cells treated with both daphnanes. Involvement of PKC $\zeta$  in the polarity complex PKC $\zeta$ -Par3-Par6-cdc42 (PKC $\zeta$ -Partitioning defective protein 3- Partitioning defective protein 6- Cell division control protein 42)<sup>21,25,27</sup> may explain the reorganization of Caco-2 cells interactions after PKC $\zeta$  activation. Thus, both huratoxin and epoxy-huratoxin would be able to activate PKC $\zeta$  and induce its relocalization but by different mechanisms. The underlying action of epoxy-huratoxin on PKC $\zeta$  needs to be investigated.

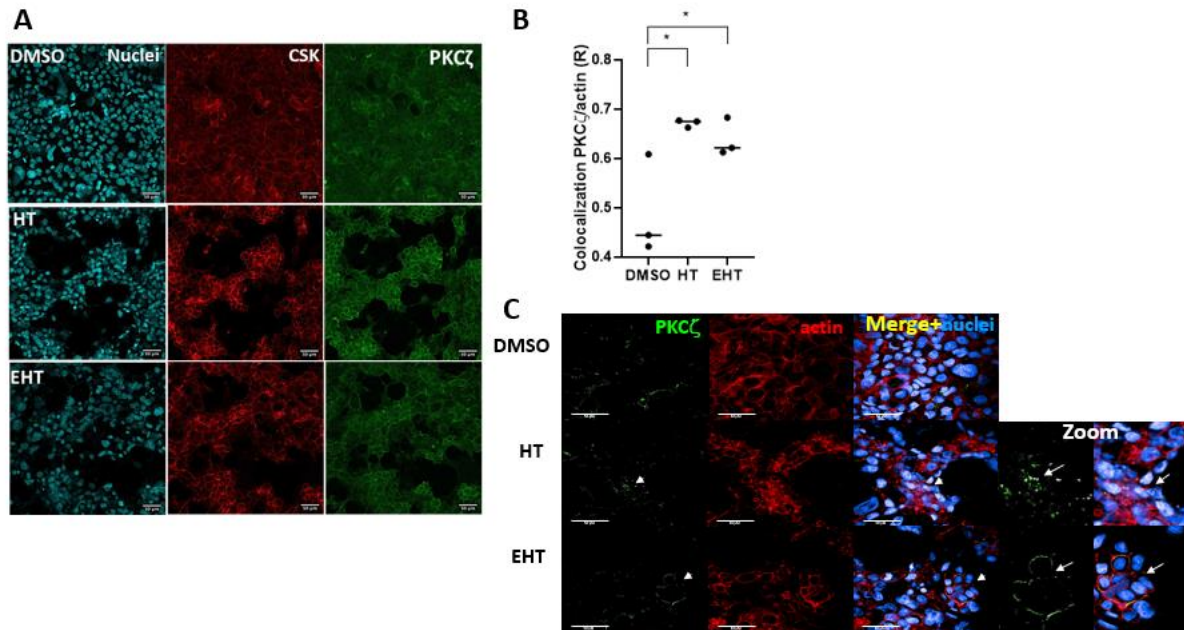


Figure 156: Effects of huratoxin and epoxy-huratoxin on PKC $\zeta$  localization. Caco-2 cells were incubated with huratoxin (HT) and epoxy-huratoxin (EHT) at 1  $\mu$ g/mL for 48 h and PKC $\zeta$  immunostaining was performed (green). Labeling of nuclei (cyan in A, blue in B) and actin (CSK, red) is shown. Confocal views were taken at the OPERA Phenix® (A, 20X objective; B, 63X objective; size scale = 50  $\mu$ m; representative of duplicates from one experiment. Zoom of critical zones are shown on the right in B. In A, a quantification of the colocalization of actin and PKC $\zeta$  is shown (statistical t-test, \* $p$ <0.05).

## 2.5. Impact of huratoxin and epoxy-huratoxin on adhesive and proliferative signaling pathways

As previously shown by our team<sup>50</sup>, huratoxin induces inhibition of GSK3 $\beta$  and Akt kinases (Fig. 13), which are major signals controlling cancer cell proliferation and adhesion<sup>66,67</sup>. This is not surprising, considering that in response to a hyperproliferative stimulus in the colonic epithelium, a strong association between PKC $\zeta$  and GSK3 $\beta$  occurs and is associated with phosphorylation on serine 9 of GSK3 $\beta$ , signaling its inactivation<sup>68</sup>. As shown in Fig.13, treatment with epoxy-huratoxin increases the inactive form of GSK3 $\beta$  (pSer9-GSK3 $\beta$ ) and abolishes the active form of Akt (pSer473-Akt), thus both daphnanes have the same mechanism of action on these signaling pathways. Nevertheless, it can be observed an important increase of Akt expression after treatment by both compounds suggesting changes in the proteasomal degradation of Akt<sup>69</sup>. Of note, expression of the potential target of GSK3 $\beta$  and Akt,  $\beta$  catenin, playing a critical role in both adhesion and proliferation of epithelial progenitors, is not modified after treatment by daphnanes (Fig. 13). Additionally, Fig.13 shows that prior incubation of cells with PKC $\zeta$  inhibitor abrogates the increase in pSer9 GSK3 $\beta$  upon treatment

with orthoesterified daphnanes, suggesting that activation of PKC $\zeta$  by these compounds is required for GSK3 $\beta$  inhibition.

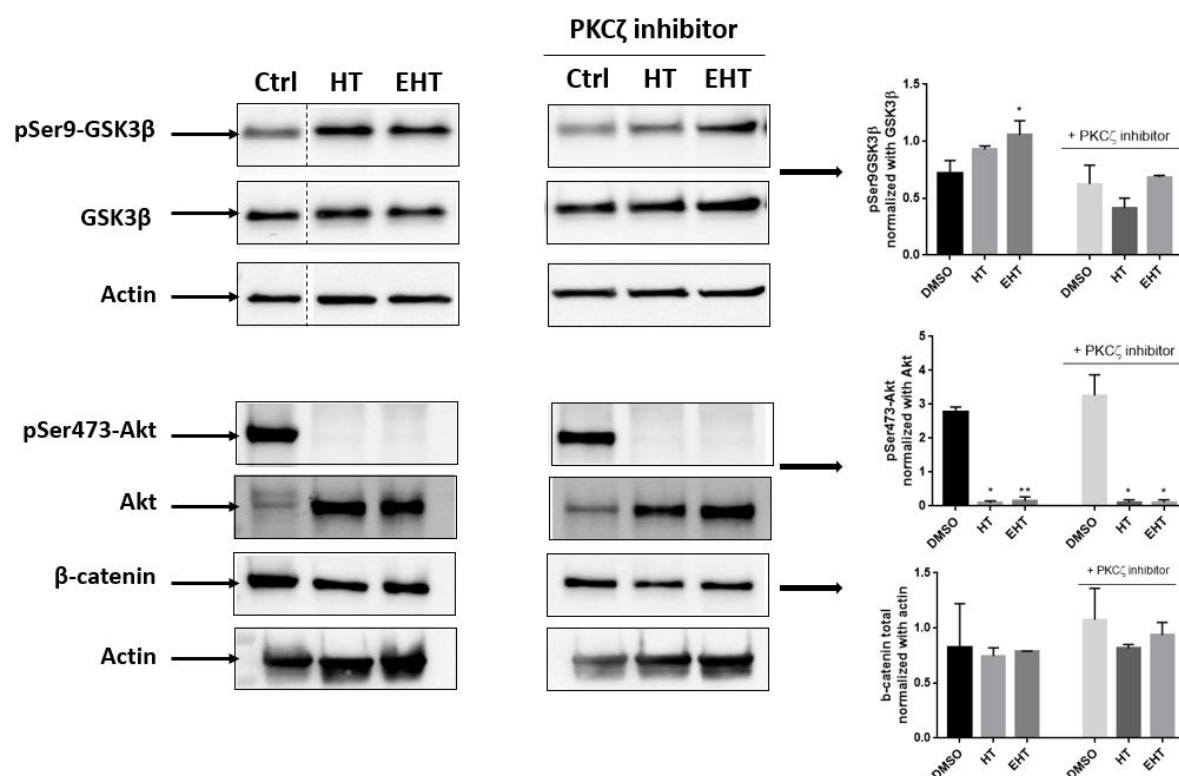


Figure 157: Regulation of GSK3 $\beta$ , Akt and  $\beta$ -catenin by huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin. Caco-2 cells were pretreated or not for 30 min with 2.5  $\mu$ M PKC $\zeta$  inhibitor (CRT0066854 hydrochloride) prior to huratoxin (HT) or 4',5'-epoxy-huratoxin (EHT) treatment (1  $\mu$ g/mL). After 48 h of incubation, cells were lysed for Western blot analysis. The results obtained from the revelation of the phosphorylated forms (pSer9-GSK3 $\beta$ ; p-Ser473-Akt) and the total forms of GSK3 $\beta$ , Akt and  $\beta$ -catenin are shown. Actin shows the equivalence of protein deposition. Quantification of n=2 experiments and statistical t-test compared to DMSO (Ctrl) are shown: Mean  $\pm$  S.E.M., \*p<0.05, \*\*p<0.01.

A direct phosphorylation of GSK3 $\beta$  on serine 9 by PKC $\zeta$  has not been documented so far. To further characterize the underlying mechanism of GSK3 $\beta$  inhibition by the tested daphnanes, we studied other GSK3 $\beta$  partner signaling pathways such as MEK which may be involved in PKC $\zeta$ -dependent regulation of GSK3 $\beta$ . Indeed, MEK can phosphorylate serine 9 of GSK3 $\beta$  and can be activated by PKC $\zeta$ <sup>70,71</sup>. As depicted in Fig.14A, pharmacological inhibition of MEK abolishes the cytostatic effect of huratoxin, confirming its implication. However, its status of activation (pSer217/221-MEK) is unchanged upon treatment with daphnanes, whereas it is increased when Caco-2 cells are pre-treated with the PKC $\zeta$  inhibitor (Fig. 14B). Given our previous work<sup>50</sup> showing that huratoxin does not activate the kinase Erk which is downstream of MEK in the signaling pathway triggered by activated membrane receptors, these results suggest that MEK may play a specific role in a tripartite PKC $\zeta$ /MEK/GSK3 $\beta$  complex, proximal to



the plasma membrane and responsible for the phosphorylation of GSK3 $\beta$  under treatment by huratoxin or epoxy-huratoxin.

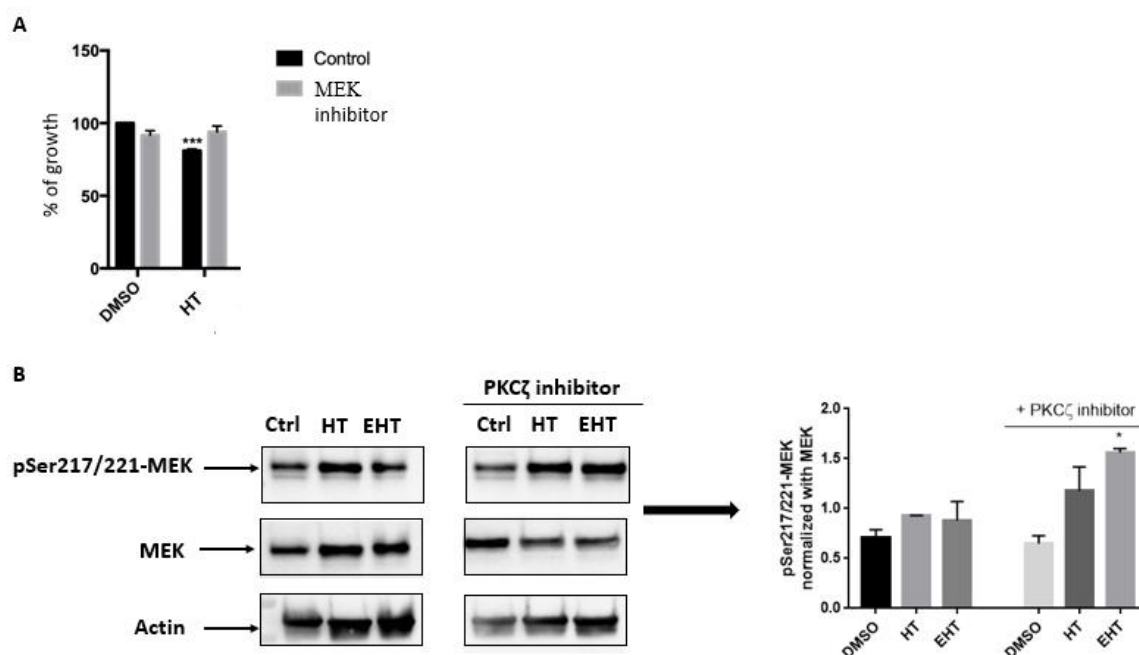


Figure 14: Implication of MEK in the cytostatic effects of mono-esterified daphnanes. A) Huratoxin (1  $\mu$ g/mL) was incubated with Caco-2 cells for 48 h before cell viability test. Prior addition of huratoxin, a MEK inhibitor (PD0325901) was added or not for 15 min at the concentration of 0.5  $\mu$ M. Data are from n=3 experiments, Mean  $\pm$  S.E.M., statistical t-test compared to DMSO (Ctrl) are shown: \*\*\*p<0.001. B) Huratoxin (HT) and 4',5'-epoxy-huratoxin (EHT) at 1  $\mu$ g/mL were incubated with Caco-2 cells which have been pretreated or not for 30 min with 2.5  $\mu$ M PKC $\zeta$  inhibitor (CRT0066854 hydrochloride). After 48 h of incubation, cells were lysed for Western blot analysis. The results obtained from the revelation of the phosphorylated form (pSer217/221-MEK) and the total form of MEK are shown. Actin shows the equivalence of protein deposition. Quantification of n=2 experiments and statistical t-test compared to DMSO(Ctrl) are shown: Mean  $\pm$  S.E.M., \*p<0.05.

Besides, it has been reported that various diterpenes possess antiviral properties<sup>9,10,13-18,20,72</sup> and that the activation of PKCs in host cells is implied in the mechanism of action of those diterpenes<sup>19,32</sup>. In other hand, it has also been described that phosphorylation of the SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein by the GSK3 kinase is required for viral interaction with host cells, as well as for viral transcription and replication<sup>73,74</sup>. In this study, we show that huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin induce the inhibition of GSK3 kinase, thus we speculate that the present daphnane diterpenes may be of interest in fighting SARS-CoV-2 and/or Zika viruses. A sampling of isolated diterpenes (compounds **5**, **6** and **7**) has therefore been assessed against SARS-CoV-2 and ZIKV. Unfortunately, the three derivatives were inactive against ZIKV (IC<sub>50</sub> > 50  $\mu$ M) and were not able to reduce SARS-CoV-2 progeny production at non-cytotoxic concentrations (IC<sub>50</sub> 34.2, 64.2 and 50.2  $\mu$ M for **5**, **6** and **7**, respectively).

## 2.6. Cytostatic tests on human primary cells

To evaluate the cytostatic activity of orthoesterified daphnanes *ex vivo*, huratoxin and epoxy-huratoxin were tested on human primary cells cultured as colonoids. Indeed, it is considered that colonoids derived from patients' primary cells have the same characteristics as *in vivo* tumor, allowing a pre-clinical evaluation<sup>75</sup>. As shown in Fig. 15A, at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , huratoxin and epoxy-huratoxin present a cytostatic effect on all organoids (control (1,2,3) and CRC (4,5)) but overall, more pronounced on cancerous organoids. Interestingly, at the same concentration, the antimetabolite cytostatic agent 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5FdU), used in the treatment of metastatic colorectal cancer in USA<sup>76</sup>, has no effect on all organoids as depicted in Fig. 15A. Thus, the present patient samples seem to be resistant to 5FdU while huratoxin and epoxy-huratoxin keep their cytostatic activity. The dose dependent effects illustrated in Fig. 15B, revealed that, at 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , huratoxin and epoxy-huratoxin have a selective cytostatic activity on CRC organoids with 40% of growth inhibition. These results suggest that huratoxin and 4'-5'-epoxy-huratoxin may be good candidates for *in vivo* antitumor evaluations.

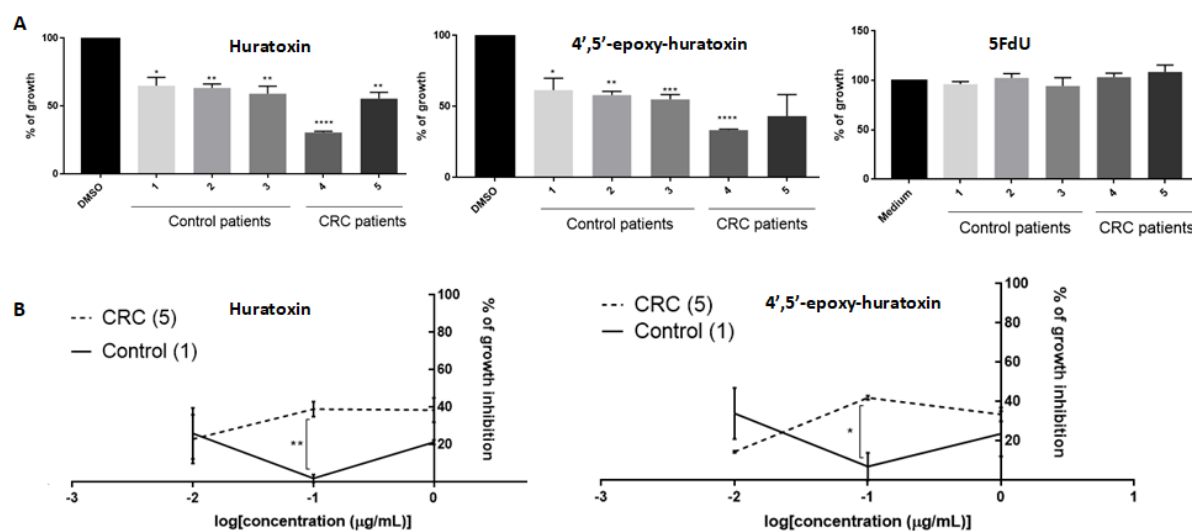


Figure 15: Cytostatic activity of huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin on 3D cultures of human primary colorectal cells. Colorectal epithelial cells were isolated from control (1, 2, 3) and CRC patients (4,5) and cultured as organoids *ex vivo*. After 48 h of organoid formation from individual cells, incubation with huratoxin, epoxy-huratoxin, 5FdU or DMSO (Control) for 48 h was performed. Then cell viability was measured by luminescence and cytostatic activity was calculated compared to the control (DMSO or medium). A) Compounds were incubated at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Mean  $\pm$  S.E.M. from triplicates (patients 1-4) or duplicates (patient 5) of 1 (patients 2, 4) or 2 (patients 1, 3, 5) independent experiments and statistical t-test compared to control (DMSO, medium) are shown: \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . B) Organoids from patient 1 (Control) and patient 5 (CRC) were incubated with huratoxin or 4',5'-epoxy-huratoxin at 0.01, 0.1 or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or DMSO and cell viability was measured as in A. Cytostatic activities were calculated compared to control DMSO. Mean  $\pm$  S.E.M. from 1 (n) experiment and statistical t-test compared to control are shown: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 2.8. Conclusions

Five new daphnane-type diterpenes named 6'*R*-hydroxy-huratoxin, 4',5',5'-dihydroxy-huratoxin, 4'(Z)-6'-oxo-huratoxin, 4',5',5'-epoxy-huratoxin and huratoxigenin-20-(11'-methyloctadec-12'-enoate), along with two known daphnanes (huratoxin and 6'-oxo-huratoxin) were isolated with several separative techniques from the latex of *H. crepitans* and their structures were elucidated by different spectroscopic methods. Their biological assessment on Caco-2 cells highlighted huratoxin and 4',5'-epoxy-huratoxin as the most interesting compounds while C-20 ester **5** was inactive. This pointed that orthoesterified side chain is required for anti-proliferative activity and epoxy substitution can exalt this activity. The anti-proliferative effect of huratoxin and epoxy-huratoxin appeared to be dependent on the atypical PKC $\zeta$ . Furthermore, both compounds can induce relocation of the kinase at the plasma membrane, whereas only huratoxin leads to an increase of one of the active forms of PKC $\zeta$ . Thus, these two derivatives activate PKC $\zeta$  but by two different ways and the mechanism by which epoxy-huratoxin stimulates PKC $\zeta$  is yet unresolved. More precisely, both orthoesterified daphnanes were able to inhibit Akt and GSK3 $\beta$ , that are two major signaling pathways implicated in tumoral cell proliferation and survival. Our results suggest that inhibition of PKC $\zeta$  abolishes GSK3 $\beta$  inhibition whereas Akt inhibition is unchanged, and induces an increase in MEK activation after treatment with huratoxin and epoxy-huratoxin. It also can be added that a tripartite PKC $\zeta$ /MEK/GSK3 $\beta$  complex could be formed at a proximal site of the plasma membrane at the expense of other membrane receptors, which could trigger GSK3 $\beta$  inhibition. Finally, evaluation of the cytostatic activity of the two orthoesterified daphnanes on *ex vivo* primary human cells cultured as colonoids revealed that they selectively inhibited cancer cells growth from 0.1  $\mu$ g/mL making them good candidates for *in vivo* antitumor evaluations.

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Chemistry

##### 3.1.1. Plant material

The latex of *H. crepitans* L. was collected in the area of Mazan, Peru (3°30'04.0''S/73°05'12.5W), in June 2019 by Dr Billy Joel Cabanillas. A herbarium board (N° Hc2019-1) was deposited in the herbal collection of the faculty of pharmaceutical sciences of Toulouse (France).

### 3.1.2. Analytical chemistry material

Circular dichroism spectra were measured on a JASCO J-815 spectrometer, controlled by Spectra Manager software. uv spectra were acquired on a Jasco J-815 UV–visible spectrophotometer and IR spectra were measured on a Fourier transform spectrophotometer FRONTIER FT-IR (PerkinElmer) controlled by Spectrum software. Optical rotation was measured on a JASCO P-2000 polarimeter.

Compounds were isolated using a BUCHI MPLC system equipped with two pumps C-0605 and controlled by a C-615 pump manager (BUCHI). Borosilicated glass columns were conditioned by silica gel Kieselgel 60 (MACHEREY-NAGEL) previously activated at 100°C for 24 h. Column chromatographies were performed using borosilicated glass columns conditioned by silica gel Kieselgel 60 (MACHEREY-NAGEL) previously activated at 100°C for 24 h or silica LiChroprep RP-18 gel (MACHEREY-NAGEL). PuriFlash system (XS520Plus, Interchim) was used with RS 80 C18 column or RS 15 C18 column (CHROMABOND Flash, MACHERY-NAGEL). Semi preparative HPLC was performed with a HITACHI LaChrom system (MERCK) consisting in a quaternary LaChrom L-7100 pump and a LaChrom L-7455 photodiode array detector, using a Luna column C18 100 Å (10 X 250 mm, 5 µm) (Phenomenex). UHPLC/DAD/HRMS analyzes were performed using an UHPLC Ultimate 3000 system (Dionex) equipped with LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific), a Diode Array Detector system (Dionex) and a Waters Acquity C18 UPLC BEH 100 Å column (2,1 x 150 mm, 1,7 µm). Chromeleon Xpress 6.8 (Dionex) and Xcalibur 3.0 (Thermo Fischer Scientific) software were used for data acquisition and analysis. Samples were centrifugated with a centrifuge 5804 R (Eppendorf). NMR spectra were acquired on a Bruker AVANCE 300 and a Bruker AVANCE 500 spectrometer equipped with a 5 mm TCI Prodigy CryoProbe using TMS as reference. Spectrometers were controlled with Topspin software and spectra were analyzed with NMR MNova software.

### 3.1.3. Extraction and isolation of daphnane diterpenes

#### 3.1.3.1. Extraction of the latex of *H. crepitans*

Notches in the trunk of several trees were made to collect the latex of *H. crepitans*. Then, the lyophilised latex (1250 g) was extracted twice with 2 x 12.5 L of boiling CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> during 3 h 30 with stirring. After two successive paper filtrations, the residue was extracted with 12.5

L of EtOH 96% during 24 h with stirring. Therefore, 3 extracts were obtained: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> n°1 (42.53 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> n°2 (6.15 g) and ethanolic extract (36.35 g).

#### 3.1.3.2. *Precipitation of cerebrosides*

The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> n°1 crude extract was dissolved in 350 mL of cyclohexane and centrifuged at 3000 rpm for 20 min. The supernatant was recovered and the precipitate was washed 3 times with cyclohexane. The precipitate labeled as fraction EC.2.21.A (4.1529 g). The washing solvent was combined with the supernatant to obtain the fraction EC.2.21.B (38.3203 g).

#### 3.1.3.3. *Fatty acids elimination*

The first daphnanes fractionation and isolation assays were affected by the high content of fatty acids in the latex, particularly palmitic acid (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>). It was therefore decided to discard them by liquid/liquid extraction. The fraction EC.2.21.B was dissolved in a biphasic system consisting in a mixture of cyclohexane (4 L)/isopropanol (4 L)/distilled water containing 20 mM of triethylamine (4 L). After agitation and cooling, aqueous and organic phases were dried to give fractions EC.2.23.A (12.30 g) and EC.2.23.B (25.99 g), respectively. Thanks to triethylamine, the fatty acids are in ionized form and soluble into the aqueous phase (mixture of water and isopropanol), whereas the daphnanes remain in the organic phase (mixture of cyclohexane and isopropanol).

#### 3.1.3.4. *Fractionation of the defatted extract by Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)*

MPLC separations were performed on silica gel at a flow of 40 mL/min and fractions were controlled for their content by UHPLC-(+)APCI-MS according to the method described by Trinel *et al.*<sup>8</sup>. The fraction EC.2.23.B was chromatographed using cyclohexane (500 mL), cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50/50 (v/v) (750 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 50/50 (v/v) (750 mL), EtOAc (750 mL), EtOAc/MeOH 50/50 (v/v) (750 mL) and MeOH (500 mL). This fractionation was repeated 3 times with 8.7 g of EC.2.23.B. Fractions were pooled to give five subfractions (EC.2.30.A to EC.2.30.E). Fractions EC.2.30.C (0.9555 g) and EC.2.30.D (4.2135 g) were found to be enriched in mono-esterified daphnanes. Fraction EC.2.30.B consisted in a mixture of mono- and diesterified daphnanes, whereas fraction EC.2.30.E was composed of mono-esterified daphnanes and cerebrosides. Fraction EC.2.30.B (2.9904 g) was chromatographed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

(1 L), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 80/20 (v/v) (750 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 50/50 (v/v) (750 mL), EtOAc (500 mL) and MeOH (750 mL). Fractions were pooled according to their UHPLC-MS profiles to give 4 subfractions (EC.2.32.A to EC.2.32.D), all containing mono-esterified daphnanes. Fraction EC.2.30.E (8.7650 g) was chromatographed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 50/50 (v/v) (500 mL), EtOAc (500 mL), EtOAc/MeOH 90/10 (v/v) (500 mL), EtOAc/MeOH 70/30 (v/v) (500 mL), EtOAc/MeOH 50/50 (v/v) (500 mL) and MeOH (500 mL) leading to 4 subfractions (EC.2.34.A to EC.2.34.D). Fractions EC.2.34.B (1.5982 g) and EC.2.34.C (2.1476 g) contained mono-esterified daphnanes. Finally, fractions EC.2.34.C and EC.2.30.D were pooled in fraction EC.2.42.B (6.3611 g).

### 3.1.3.5. Isolation of mono-esterified daphnanes

Fraction EC.2.32.C (0.5987 g) was fractionated on silica gel column with cyclohexane (250 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL), EtOAc (240 mL) and MeOH (200 mL) to give 3 subfractions (EC.2.36.A to EC.2.36.C). Fraction EC.2.36.B (0.4805 g) was separated on the same column with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 50/50 (v/v) (180 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 40/60 (v/v) (340 mL) and EtOAc (150 mL), leading to 8 fractions (EC.2.40.A to EC.2.40.H). Fractions EC.2.40.G and EC.2.40.H (0.0187 g) were grouped with fraction EC.2.30.C to form fraction EC.2.41.C (0.9381 g). Fraction EC.2.41.C was partitioned by MPLC on a 80 g (RS 80) C18 column using a H<sub>2</sub>O (A)/MeCN (B) gradient at a flow rate of 60 mL/min. Twelve fractions were collected (EC.2.43.A to EC.2.43.L) using a linear gradient (from 50 to 100% of B in 60 min). Fraction EC.2.43.I (0.0748 g) was chromatographed by semi preparative HPLC using a distilled water (A)/MeCN (B) gradient consisting in 99% B from 0 to 10 min, 99-100% B from 10 to 11 min and 100% B from 11 to 20 min and leading to huratoxin (compound **6**, 30.17 mg) and huratoxigenin-20-(11'-methyloctadec-12'-enoate) (compound **5**, 4.37 mg).

Fraction EC.2.43.F (0.0796 g) was treated by semi preparative HPLC (80 to 100% B from 0 to 20 min and 100% B from 20 to 30 min) and gave pure 6'-oxo-huratoxin (compound **7**, 37.47 mg) and 4'(Z)-6'-oxo-huratoxin (compound **3**, 6.02 mg). Fraction EC.2.42.B (6.3611 g) was partitioned by 4 successive MPLC following the same gradient than for fraction EC.2.41.C to give 7 fractions (EC.2.65.A to EC.2.65.G). Fraction EC.2.65.E (0.1115 g) was treated by semi preparative HPLC (0-30 min: 70 to 100% B, 30-40 min: 100% B) to give 6'-hydroxy-huratoxin (compound **1**, 8.33 mg). Fraction EC.2.65.C (0.0802 mg) was partitioned by MPLC with linear gradient (from 30 to 70% B in 60 min) at a flow rate of 20 mL/min and gave 10 fractions

(EC.2.90.A to EC.2.90.J). Fraction EC.2.90.J (0.0121 g) was treated by semi preparative HPLC (0-25 min: 65% of B, 25-25.1 min 65-100% B, 25.1-35 min: 100% B) leading to 4',5'-dihydroxy-huratoxin (compound **2**, 1.32 mg). Fraction EC.2.65.G (0.2652 g) was separated by MPLC (from 40 to 80% B in 60 min) at a flow rate of 20 mL/min to give 7 fractions (EC.2.103.A to EC.2.103.G). Fraction EC.2.103.G (0.0575 g) was treated by semi preparative HPLC (0-20 min: 90%, 20-20.1 min: 100% B, 20,1-30 min: 100% B) leading to 3 fractions (EC.2.107.A to EC.2.107.C). EC.107.C (0.0037 g) was purified by semi preparative HPLC following the same gradient and gave 4',5'-epoxy-huratoxin (compound **4**, 2.32 mg).

6'*R*-hydroxy-huratoxin **1**: colorless oil,  $[\alpha]_{25}^D +28.49$  (c 0.463; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR  $\nu_{\max}$  3446, 2924, 2855, 1697, 1038, 997 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz), see Table 1; HRAPCIMS  $m/z$  601.3362 [M+H]<sup>+</sup>  $\Delta$ ppm = -1.546 (calcd for C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>, 601.3377).

4'*S*,5'*S*-dihydroxy-huratoxin **2**: colorless oil,  $[\alpha]_{25}^D +26.71$  (c 0.073; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR  $\nu_{\max}$  3384, 2924, 2855, 1701, 1073, 1034, 974 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz), see Table 1; HRAPCIMS  $m/z$  619.3476 [M+H]<sup>+</sup>  $\Delta$ ppm = -0.120 (calcd for C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>, 619.3482).

4'(Z)-6'-oxo-huratoxin **3**: colorless oil,  $[\alpha]_{25}^D +30.12$  (c 0.334; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR  $\nu_{\max}$  3462, 2925, 2856, 1694, 1034, 995 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz), see Table 1; HRAPCIMS  $m/z$  599.3206 [M+H]<sup>+</sup>  $\Delta$ ppm = -1.501 (calcd for C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>, 599.3220).

4'*S*,5'*S*-epoxy-huratoxin **4**: colorless oil;  $[\alpha]_{25}^D + 19.38$  (c 0.129; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR  $\nu_{\max}$  3421, 2924, 2855, 1701, 1074, 1034, 966 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz), see supporting information; HRAPCIMS  $m/z$  601.3367 [M+H]<sup>+</sup>  $\Delta$ ppm = -0.731 (calcd for C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>, 601.3377).

Huratoxigenin-20-(11'-methyloctadec-12'-enoate) **5**: colorless oil,  $[\alpha]_{25}^D -21.98$  (c 0.243; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); IR  $\nu_{\max}$  3420, 2924, 2855, 1707, 1054 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz), see Table 1; HRAPCIMS  $m/z$  675.4459 [M+H]<sup>+</sup>  $\Delta$ ppm = -1.184 (calcd for C<sub>39</sub>H<sub>63</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>, 675.4472).

Huratoxin **6**: colorless oil; <sup>1</sup>H NMR data (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 300 MHz), see supporting information; HRAPCIMS  $m/z$  585.3422 [M+H]<sup>+</sup>  $\Delta$ ppm = 0.043 (calcd for C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>, 585.3427).

6'-oxo-huratoxin **7**: colorless oil; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 500 MHz), see supporting information; HRAPCIMS  $m/z$  599.3204 [M+H]<sup>+</sup>  $\Delta$ ppm = -1.718 (calcd for C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>, 599.3220).

### 3.1.4. Computational details for GIAO NMR chemical shifts calculations

All *ab initio* calculations were performed using the Gaussian 09.D01 program<sup>77</sup>. The different stereoisomers of each compound studied were first subjected to a conformational search using the MMFF94 force-field implemented in TINKER software tools, resulting in 25 to 30 conformers for each stereoisomer<sup>78</sup>. The resulting conformations were then subjected to further optimization at the B3LYP/6-31G\* level of theory. The bulk solvent effects were described with the integral equation formalism polarizable continuum Model (IEFPCM) with dichloromethane as solvent<sup>79</sup>. The vibrational frequencies were computed in order to access the free energies and to confirm the absence of imaginary frequencies. The magnetic shielding constants ( $\sigma$ ) were computed using the gauge-including atomic orbitals (GIAO)<sup>80,81</sup> method at the MPW1PW91/6-31+G\*\* level of theory. The resulting shielding tensors of the set of conformers were averaged by computing the Boltzmann-weighted population<sup>82</sup>. The chemical shifts were calculated from TMS as reference standard. The systematic errors were removed by scaling according to  $\delta_{\text{scaled}} = (\delta_{\text{calc}} - \text{Intercept})/\text{Slope}$ , where Intercept and Slope, result from a linear regression calculation on a plot of  $\delta_{\text{calc}}$  against  $\delta_{\text{exp}}$ <sup>80</sup>. The DP4+ probabilities were then computed as originally described by Smith and Goodman<sup>54</sup> and Grimblat *et al*<sup>83</sup>.

## 3.2. Biological

### 3.2.1. Evaluation of the antiproliferative activity of isolated mono-esterified daphnanes

#### 3.2.1.1. Cell cultures

The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 (HTB-37<sup>TM</sup>) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). This cell line has the *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) gene mutated like in 80% of CRC. Caco-2 cells were cultured in DMEM medium with 4.5 g/L of glucose, 1% GlutaMAX and 1% pyruvate (GIBCO, 31966) supplemented with 10% SVF (GIBCO), 1% non-essential amino acids (GIBCO) and 1% penicillin and streptomycin mixture (P/S, GIBCO). The human small intestine cell line HIEC6 was purchased from ATCC (CRL-3266<sup>TM</sup>). HIEC6 cells were cultured in OPTIMEM medium with 1% GlutaMAX and 1% HEPES (GIBCO) supplemented with 10 ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF, PMG8041, Thermo Fisher Scientific) and 1% P/S. All cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator and media were changed every 48 h and passages were done at 90% of confluence.



### 3.2.1.2. Organoids

Epithelial primary cells, isolated from colons of patients, were cultured as colonoids. Sample 1 was obtained from a woman (born in 1956) left colon laparoscopic resection (treatment of a sigmoido-vaginal fistula for diverticulitis); sample 2 was collected from a woman (born in 1955) left colon laparoscopic resection (treatment for recurrent diverticulitis); sample 3 was taken from a man (born in 1938) sigmoid laparoscopic resection (treatment for fistulized sigmoiditis); sample 4 has been taken from a man (born in 1965) well-differentiated colonic (caecum) adenocarcinoma, infiltrating the serosa with numerous (>7) lymph node metastases, stage pT4N2b (advanced stage III), abnormal somatic phenotype: loss of expression of hMSH2 and hMSH6 proteins, microsatellite instability (MSI) (suspicion of Lynch syndrome) and sample 5 was collected from a man (born in 1959) with colonic adenocarcinoma (right colon) who had undergone nine courses of chemotherapy. Human colonic tissues were obtained from individuals treated at the Centre Hospitalier de Toulouse (France). The written and verbal informed consent was obtained before enrolment in the study, and the Ethics Committee approved the human research protocol (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT01990716 and RC31/21/0038).

Colonic epithelial cells were isolated and cultured as organoids in the ORGANOID platform of the IRSD (Institute of digestive health research) in Toulouse, as previously described<sup>84</sup>. Samples 1 to 3 are used as controls compared to tumor samples 4 and 5. 50 colonic crypts seeded in 25  $\mu$ l Matrigel® (hESC-qualified, BD Biosciences) by well of 48 wells plate were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and proliferate as organoids (normal tissue) or spheroids (tumor tissue) in the presence of the following medium: Advanced DMEM/F12 (Invitrogen, 12634-010), 2 mM Glutamax (Invitrogen, A1286001), 10 mM hepes (Gibco, 15630-056), 1X N2 (Invitrogen, 17502-048), 1X B27 minus vitamin A (Life technologies, 12587-010), 50 ng/ml human EGF (Gibco, PHG0314), 100 ng/ml human noggin (Tebu, 120-10C), 48% Wnt3a conditioned medium, 1  $\mu$ g/ml human R-spondin (R&D Systems, 4645RS), 10 mM nicotinamide (Sigma Aldrich, N0636), 10 nM gastrin (Sigma Aldrich, G9145-1MG), 10  $\mu$ M SB202190 (Sigma Aldrich, 57067), 0.01  $\mu$ M PGE2 (Sigma Aldrich, P0409-1MG). At day 0 only, 10  $\mu$ M Y27632 (Sigma Aldrich, Y0503), 0.5  $\mu$ M LY2157299 (Axon MedChem, 1941), and 1 mM N-acetylcysteine (Sigma Aldrich, A9165-5G) were added.

To amplify the cellular material, around 3 passages in new Matrigel® were realized after 8 days of primo-culture. 250 µl Cell recovery solution (Corning) was added in culture wells and plates were maintained on ice during 20 min to dissociate 3D cellular structures from Matrigel®. After, wells from the same sample were collected in 14 ml of Advanced DMEM/F12 *plus* Glutamax and hepes, and centrifuged (1000 rpm, 3 min, 4°C). Supernatant was discarded and 5 ml of TrypLE express (Invitrogen) was added and incubated for 5 min at 37°C to obtain individual cells by repetitive pipetting. After addition of 25 ml of Advanced DMEM/F12 *plus* Glutamax/hepes and 2.5% fetal calf serum (Gibco), and centrifugation (1500 rpm, 3 min, 4°C), Matrigel® was added on the pellet. Cells resuspended in Matrigel® were seeded in new wells of 48 wells plate and cultured as above during 8 days. After 3 passages, organoids and spheroids were frozen. For freezing, 3D structures were dissociated from Matrigel® by Cell recovery solution as described above and directly frozen in 500 µl Synth-a-Freeze medium (Thermo Fisher Scientific). Then, organoids and spheroids conserved in liquid N<sub>2</sub> were unfrozen and cultured in Matrigel® as described above for 1 week before their use in cytotoxicity tests. For cytotoxicity test, organoids and spheroids were dissociated from Matrigel® with 500 µL/well of trypsin and individual cells were seeded in Matrigel® on 96-wells plates (Thermo Fisher Scientific) and allowed to proliferate as colonoids.

### 3.2.1.3. Cytotoxicity tests

Forty-eight hours before cytotoxicity test, 2500 (organoid assay) or 40 000 (Caco-2 assay) or 60 000 (HIEC6 assay) cells/well were seeded in 96-wells plates (Thermo Fisher Scientific). Compounds **1-7** were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Thermo Fisher Scientific) at 10 mg/mL, followed by successive dilutions with medium to obtain final concentrations. At 48 h after cells seeding, daphnanes were added in triplicates with DMSO as a control (maximum concentration 0.01%). After 48 h, MTS (Cell line assay, CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) or CellTiter-Glo (Organoid assay, Luminescent Cell Viability Assay, Promega) were added on each well and cytotoxicity tests were performed according to the manufacturer's instructions. Then, cell viability was measured by colorimetry at 490 nm for MTS or by luminescent measure for CellTiter-Glo (Varioskan Flash and logiciel SkanIT RE 2.4.3, Thermo Fisher Scientific). For some tests, atypical PKCs inhibitor CRT0066854 hydrochloride (0.625, 1.25 or 2.5 µM, Tocris Bioscience), PKCα inhibitor Gö6976 (0.2 µM, Calbiochem) and MEK inhibitor PD-0325901 (0.5 µM, MedChemExpress) were added

30 minutes (atypical PKCs inhibitor) or 15 minutes (PKC $\alpha$  and MEK inhibitors) before daphnanes (maximum concentration of DMSO 0,015%). For the tests on organoids, 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (Floxuridin, FUdR, Sigma-Aldrich, Ref F0503) at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was used as positive control. It was dissolved in 50 mM Phosphate Buffer Saline (PBS, GIBCO) and diluted to obtain the final concentration.

#### 3.2.1.4. Immunofluorescence and confocal analysis

40 000 Caco-2 cells were seeded in a 96-well plate and treated as for cytotoxicity tests. After 48 h of treatment, medium was removed and cells were fixed with 15  $\mu\text{L}$  of paraformaldehyde (PFA 3.7%, Sigma Aldrich) during 20 min at room temperature. After washing with 100  $\mu\text{L}$  HBSS (GIBCO), cells were permeabilized with 50  $\mu\text{L}$  HBSS/Triton X100 0.5% *plus* Bovine Serum Albumin (BSA, Dutscher) 1% for 15 min at room temperature. To study the expression and localization of PKC $\zeta$  and PKC $\alpha$ , Caco-2 cells were then incubated primary antibodies (anti-PKC $\zeta$  SC-17781 Santa Cruz Biotechnology, 1/50 or anti-PKC $\alpha$  Ab32376 Abcam, 1/200) diluted in permeation buffer, overnight at 4°C. After 3 washes for 10 min, secondary antibodies (Alexa fluor 488 goat anti-mouse, Life Technologies, 1/1000 or Alexa fluor 488 goat anti-rabbit, Invitrogen, 1/1000) diluted in permeation buffer, were added during 45 min at room temperature in dark. After 3 washes, 50  $\mu\text{L}$  of phalloidin fluor 568 (33 nM) *plus* Hoechst 3342 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or Rhodamine Phalloidin reagent (R415, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 1/500), diluted in permeation buffer was added in each well during 30 min at room temperature in dark. After 3 washes, in some assays Prolong reagent with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) was added. Analysis by confocal microscopy was performed with Opera Phenix Plus High-Content Screening PerkinElmer (Harmony software) or LSM710 Zeiss (Zen software). Pictures were analyzed and quantified by ImageJ software (Image Processing and Analysis in Java).

#### 3.2.1.5. Western blot

To investigate the impact of daphnanes on signaling pathways, PKC $\zeta$  and PKC $\delta$  in Caco-2 cells, Western blot protein analyses were performed. Caco-2 cells ( $0.25 \times 10^6$  cells/well) were seeded in 12-well plate (Thermo Fisher Scientific) in 1 mL of medium and treated as for cytotoxicity tests. After 48 h of treatment, medium was removed and cells were washed twice with 1 mL PBS supplemented with calcium and magnesium. Cells were lysed on ice with 50  $\mu\text{L}$

of pH 7.4 lysis buffer (containing: Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X100 0,1%, EDTA 1 mM) supplemented with proteases inhibitor (1/25, Complete mini EDTA free Roche) and phosphatases inhibitor (1/100, Inhibitor cocktail 2, Sigma Aldrich). Lysates were collected with a Cell Scrapper (Sarstedt) and stored at 4°C.

Thirty micrograms of protein were mixed with Laemmli buffer (Bio-Rad) containing Sodium Dodecyl Sulfate/glycerol/bromophenol blue/ $\beta$ -mercaptoethanol to a final volume of 15  $\mu$ L heated at 95°C for 5 min (ThermoMixer F1.5, Eppendorf) to denature the proteins. Each sample was resolved on 4 to 15% precast acrylamide gel (Mini-PROTEAN, TGX, Bio-Rad) and transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After saturation with PBS/milk 5%/BSA 1% for 1 h, membrane was probed overnight at 4°C with the appropriate primary antibody diluted in PBS/milk 1%/BSA 0.2%. Primary antibodies were obtained from Cell signaling technology (phospho MEK1/2 (Ser217/221) #41G9, MEK1/2 #L38C12, phospho Akt (Ser473) #4060); Abcam ( $\beta$ -catenin #AB32572, phospho-PKC $\delta$  #AB5658); Santa Cruz biotechnology (phospho PKC $\zeta$  (Thr410) #SC-271962, PKC $\zeta$  #SC-17781, Akt #SC-8312, PKC $\delta$  #SC937), Sigma Aldrich (phospho GSK3 $\beta$  (Ser9) #04-1075) and BD transduction laboratories (GSK3 $\beta$  #610202). After 3 washes with PBS/0.2% Tween 20 for 10 min, membrane was incubated with appropriate secondary antibody (anti-mouse HRP or anti-rabbit HRP) for 90 min at room temperature. Detection was achieved using Enhanced ChemiLuminescence (ECL, Clarity Max or Clarity, Bio-Rad) reagent and visualized on Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad) with ImageLab software.

#### 3.2.1.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7. Student's *t*-test and 2way ANOVA test were used for experiments analysis. P values < 0.05 were considered to be significant.

### 3.2.2. Evaluation of the antiviral activity of isolated mono-esterified daphnanes

#### 3.2.2.1. Cell and virus cultures

Human lung epithelial A549 cell line overexpressing human ACE2 and TMPRSS2 proteins was purchased from Invivogen (Toulouse, France) and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 0.1% amphotericin B (PAN Biotech), 100  $\mu$ g/mL

hygromycin, 0.5 µg/mL puromycin, 10 µg/mL blasticidin and 100 µg/mL zeocin. Vero cells were purchased from ATCC and cultured in Essential Minimal Eagle's Medium (MEM, PAN Biotech) containing 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 0.1% amphotericin B. All cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator. SARS-CoV-2 virus was isolated in 2020 from a nasopharyngeal swab from a COVID-19 PCR-positive patient in Reunion Island. The recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene (ZIKV<sup>GFP</sup>) was obtained as previously described<sup>85</sup>.

### 3.2.2.2. Antiviral assays

To determine the antiviral activity of compounds against SARS-CoV-2, A549<sup>ACE2</sup> and TMPRSS2 overexpressing cells seeded in 24-well plates were incubated with different concentrations of each compound, starting from its maximal non-cytotoxic concentration (MNTC), and infected with SARS-CoV-2 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001. Twenty-four hours after infection, supernatant was harvested to titrate viral growth *via* plaque forming units assays (PFU). To determine the antiviral activity of compounds against Zika virus, cells seeded in 96-well plates were incubated with different concentrations of each compound, starting from 50 µg/mL, and infected with ZIKV<sup>GFP</sup> at a multiplicity of infection (MOI) of 1. Twenty-four hours post-infection, cells were harvested, fixed with 3.7% PFA in PBS for 20 min, washed twice with PBS and then subjected to flow cytometric analysis using Cytotoflex (Beckman). Results were analyzed using Cytexpert software.

### 3.2.2.3. Viral titration

Supernatants obtained from 24 h SARS-CoV-2 infected cells were harvested and stored at -80°C for PFU assay. A 70% confluent monolayer of VeroE6 cells in 24-wells plate was incubated during 2 h with 100 µL of a ten-fold serial dilution of the supernatants. Then, MEM containing 1% carboxymethyl cellulose (CMC) was added to each well and incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Three days later, infected cells were carefully washed twice with PBS and fixed for 10 min with 4% PFA. Then, cells were washed and stained with crystal violet. Plaques were counted and expressed as PFU/mL.

## 4. Funding information

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (three years PhD grant) and by the financial support from the region Occitanie.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgements

We would like to thank Celine Deraeve (LCC) for access to the IR spectrometer, Charles-Louis Serpentine (IMRCP) for access to the ECD spectrometer, and Pierre Lavedan, Marc Vedrenne and Caroline Toppan from the NMR platform of the Institut de Chimie de Toulouse (ICT) for NMR analyses. We thank the Organoid Platform at the Institut de Recherche en Santé Digestive (INSERM, Toulouse, France) for help with confocal microscopy and/or image analysis (<https://www.irsd.fr/organoides.html>), the department of digestive surgery (Toulouse University Hospital) for samples from patients, Pr Elmostafa Barahoui (INFINITY, Toulouse) for discussion along PKC investigations and gift of PKC $\delta$  antibodies, and Dr Mireille Sebbag (IRSD, Toulouse) for advices in human organoids cell viability assays.

### Appendix A. Supplementary material

#### References

1. Ramalho S, Pinto M, Ferreira D, Bolzani V. Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. *Planta Med.* 2018;84:558-67. <https://doi.org/10.1055/s-0043-122604>.
2. Bijekar S, Gayatri M. Ethanomedicinal properties of Euphorbiaceae family- A comprehensive review. *Int J Phytomedicine.* 2014;6:144-56.
3. Mwine JT, Damme PV. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J Med Plant Res.* 2011;5:652-62.
4. Tobias LM, Cordeiro I, Demarco D. Floral development in *Hura crepitans* (Euphorbiaceae): a bat-pollinated species with multicarpellate gynoecium. *Braz J Bot.* 2019;42:509-19. <https://doi.org/10.1007/s40415-019-00543-0>.

5. Owojuyigbe OS, Firempong CK, Larbie C, Komlaga G, Emikpe BO. Hepatoprotective Potential of *Hura crepitans* L.: A Review of Ethnomedical, Phytochemical and Pharmacological Studies. *J Complement Altern Med Res.* 2020;9:1-10. <https://doi.org/10.9734/jocamr/2020/v9i230136>.
6. Kadiri AB, Adeniran S. Study of the anatomy of the genus *Hura* L. (Euphorbiaceae). *Ife Journal Sci.* 2016;18:413-26.
7. *Hura crepitans* L., 1753 [Internet]. Inventaire national du patrimoine naturel. 2003 [cited on 28 July 2022]. Available on: [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/629870](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/629870).
8. Trinel M, Jullian V, Le Lamer AC, Mhamdi I, Mejia K, Castillo D, et al. Profiling of *Hura crepitans* L. latex by ultra-high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 2018;29:627-38. <https://doi.org/10.1002/pca.2776>.
9. Remy S, Litaudon M. Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbiaceae as A Source of Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *Molecules.* 2019;24:1-16. <https://doi.org/10.3390/molecules24122336>.
10. Vasas A, Hohmann J. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chem Rev.* 2014;114:8579-612. <https://doi.org/10.1021/cr400541j>.
11. Buchanan JG, Crews P, Epe B, Evans FJ, Hanke FJ, Manes LV, et al. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer. Vol. 44. Vienna: Springer Vienna; 1983. 333 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8714-2>.
12. Shi QW, Su XH, Kiyota H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chem Rev.* 2008;108:4295-327. <https://doi.org/10.1021/cr078350s>.
13. Olivon F, Remy S, Grelier G, Apel C, Eydoux C, Guillemot JC, et al. Antiviral Compounds from *Codiaeum peltatum* Targeted by a Multi-informative Molecular Networks Approach. *J Nat Prod.* 2019;82:330-40. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00800>.
14. Nothias-Scaglia LF, Pannecouque C, Renucci F, Delang L, Neyts J, Roussi F, et al. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *J Nat Prod.* 2015;78:1277-83. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00073>.
15. Nothias-Scaglia LF, Dumontet V, Neyts J, Roussi F, Costa J, Leyssen P, et al. LC-MS2-Based dereplication of *Euphorbia* extracts with anti-Chikungunya virus activity. *Fitoterapia.* 2015;105:202-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.06.021>.
16. Bourjot M, Leyssen P, Neyts J, Dumontet V, Litaudon M, Trigocherrierin A, a Potent Inhibitor of Chikungunya Virus Replication. *Molecules.* 2014;19:3617-27. <https://doi.org/10.3390/molecules19033617>.

17. Rashad AA, Mahalingam S, Keller PA. Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. *J Med Chem.* 2014;57:1147-66. <http://dx.doi.org/10.1021/jm400460d>.
18. Yan M, Lu Y, Chen CH, Zhao Y, Lee KH, Chen DF. Stelleralides D–J and Anti-HIV Daphnane Diterpenes from *Stellera chamaejasme*. *J Nat Prod.* 2015;78:2712-8. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00660>.
19. Lai W, Huang L, Zhu L, Ferrari G, Chan C, Li W, et al. Gnidimacrin, a Potent Anti-HIV Diterpene, Can Eliminate Latent HIV-1 Ex Vivo by Activation of Protein Kinase C  $\beta$ . *J Med Chem.* 2015;58:8638-46. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01233>.
20. Nothias-Scaglia LF, Retailleau P, Paolini J, Pannecouque C, Neyts J, Dumontet V, et al. Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. *J Nat Prod.* 2014;77:1505-12. <https://dx.doi.org/10.1021/np500271u>.
21. Kostecky B. An Investigation of PKC Isoform Functional Specificity [Thesis]. [London]: University College London; 2009.
22. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol.* 2018;48:36-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.012>.
23. Farhadi A, Keshavarzian A, Ranjbaran Z, Fields JZ, Banan A. The Role of Protein Kinase C Isoforms in Modulating Injury and Repair of the Intestinal Barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316:1-7. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.085449>.
24. Rimessi A, Patergnani S, Ioannidi E, Pinton P. Chemoresistance and Cancer-Related Inflammation: Two Hallmarks of Cancer Connected by an Atypical Link, PKC $\zeta$ . *Front Oncol.* 2013;3:1-7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00232>.
25. Linch M, Sanz-Garcia M, Rosse C, Riou P, Peel N, Madsen CD, et al. Regulation of polarized morphogenesis by protein kinase C  $\iota$  in oncogenic epithelial spheroids. *Carcinogenesis.* 2014;35:396-406. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt313>.
26. St Johnston D, Sanson B. Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23:540-6. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.07.005>.
27. Reina-Campos M. The Dual Roles of the Atypical Protein Kinase Cs in Cancer. *Cancer Cell.* 2019;36:218-35. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.010>.
28. Überall F, Hellbert K, Kampfer S, Maly K, Villunger A, Spitaler M, et al. Evidence That Atypical Protein Kinase C- $\lambda$  and Atypical Protein Kinase C- $\zeta$  Participate in Ras-mediated Reorganization of the F-actin Cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1999;144:413-25.
29. Keenan C, Kelleher D. Protein Kinase C and the Cytoskeleton. *Cell Signal.* 1998;10:225-32. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(97\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(97)00121-6).



30. Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N. Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10:1-27. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181>.
31. Drummond ML, Prehoda KE. Molecular Control of Atypical Protein Kinase C: Tipping the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *J Mol Biol.* 2016;428:1455-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.003>.
32. Mukherjee A, Roy S, Saha B, Mukherjee D. Spatio-Temporal Regulation of PKC Isoforms Imparts Signaling Specificity. *Front Immunol.* 2016;7:1-7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00045>.
33. Kawano T, Inokuchi J, Eto M, Murata M, Kang JH. Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials. *Pharmaceutics.* 2021;13:1-27. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111748>.
34. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol.* 2021;14:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>.
35. Juanes MA. Cytoskeletal Control and Wnt Signaling—APC's Dual Contributions in Stem Cell Division and Colorectal Cancer. *Cancers.* 2020;12:1-21. <https://doi.org/10.3390/cancers12123811>.
36. Hankey W. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37:159-72. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9725-6>.
37. Zhou G, Yang J, Song P. Correlation of ERK/MAPK signaling pathway with proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Oncol Lett.* 2018;17:2266-70. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9857>.
38. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6:322-7. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70168-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70168-6).
39. Vidri RJ, Fitzgerald TL. GSK-3: An important kinase in colon and pancreatic cancers. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2020;1867:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118626>.
40. Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, et al. Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:1365-73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.041>.
41. Duda P, Akula SM, Abrams SL, Steelman LS, Martelli AM, Cocco L, et al. Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. *Cells.* 2020;9:1-28. <https://doi.org/10.3390/cells9051110>.

42. Ma L, Tao Y, Duran A, Llado V, Galvez A, Barger JF, et al. Control of Nutrient Stress-Induced Metabolic Reprogramming by PKC $\zeta$  in Tumorigenesis. *Cell*. 2013;152:599-611. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.028>.
43. Tejada-Muñoz N, González-Aguilar H, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Is Positively Regulated by Protein Kinase C $\zeta$ -Mediated Phosphorylation Induced by Wnt Agonists. *Mol Cell Biol*. 2016;36:731-41. <https://doi.org/10.1128/MCB.00828-15>.
44. Llado V, Nakanishi Y, Duran A, Reina-Campos M, Shelton PM, Linares JF, et al. Repression of Intestinal Stem Cell Function and Tumorigenesis through Direct Phosphorylation of  $\beta$ -Catenin and Yap by PKC $\zeta$ . *Cell Rep*. 2015;10:740-54. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.007>.
45. Dupasquier S, Blache P, Picque Lasorsa L, Zhao H, Abraham JD, Haigh JJ, et al. Modulating PKC $\alpha$  Activity to Target Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Colon Cancer. *Cancers*. 2019;11:1-19. <https://doi.org/10.3390/cancers11050693>.
46. Gwak J, Cho M, Gong SJ, Won J, Kim DE, Kim EY, et al. Protein-kinase-C-mediated  $\beta$ -catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *J Cell Sci*. 2006;119:4702-9. <https://doi.org/10.1242/jcs.03256>.
47. Lee JM, Kim IS, Kim H, Lee JS, Kim K, Yim HY, et al. ROR $\alpha$  Attenuates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling by PKC $\alpha$ -Dependent Phosphorylation in Colon Cancer. *Mol Cell*. 2010;37:183-95. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.022>.
48. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst*. 2015;11:1946-54. <https://doi.org/10.1039/C5MB00101C>.
49. Oster H, Leitges M. Protein Kinase C  $\alpha$  but not PKC $\zeta$  Suppresses Intestinal Tumor Formation in *ApcMin/+* Mice. *Cancer Res*. 2006;66:6955-63. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0268>.
50. Trinel M, Le Lamer AC, Jullian V, Jacquemin D, Graton J, Cristofoli V, et al. Daphnanes diterpenes from the latex of *Hura crepitans* L. And activity against human colorectal cancer cells Caco-2. *Bioorganic Chem*. 2020;103:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104132>.
51. Abraham C, Scaglione-Sewell B, Skarosi S.F, Qin W, Bissonnette M, Brasitus T.A. Protein Kinase C  $\alpha$  Modulates Growth and Differentiation in Caco-2 Cells. *Gastroenterology*. 1998;114:503-9. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70533-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70533-5).
52. Cerda SR, Mustafi R, Little H, Cohen G, Khare S, Moore C, et al. Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene*. 2006;25(22):3123-38. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209360>.
53. Umar S, Sellin JH, Morris AP. Increased nuclear translocation of catalytically active PKC- $\zeta$  during mouse colonocyte hyperproliferation. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(1):223-37. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.1.G223>.

54. Smith SG, Goodman JM. Assigning Stereochemistry to Single Diastereoisomers by GIAO NMR Calculation: The DP4 Probability. *J Am Chem Soc.* 2010;132:12946-59. <https://doi.org/10.1021/ja105035r>.
55. Jin YX, Shi LL, Zhang DP, Wei HY, Si Y, Ma GX, et al. A Review on Daphnane-Type Diterpenoids and Their Bioactive Studies. *Molecules.* 2019;24:1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules24091842>.
56. Otsuki K, Li W, Miura K, Asada Y, Huang L, Chen CH, et al. Isolation, Structural Elucidation, and Anti-HIV Activity of Daphnane Diterpenoids from *Daphne odora*. *J Nat Prod.* 2020;83:3270-7. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00540>.
57. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res.* 2011;317:2702-10. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.006>.
58. Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clin Colorectal Cancer.* 2016;15:195-203. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.008>.
59. Wald FA, Oriolo AS, Mashukova A, Fregien NL, Langshaw AH, Salas PJI. Atypical protein kinase C (iota) activates ezrin in the apical domain of intestinal epithelial cells. *J Cell Sci.* 1 mars 2008;121(5):644-54. <https://doi.org/10.1242/jcs.016246>.
60. Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Farhadi A, Keshavarzian A.  $\theta$ -Isoform of PKC is required for alterations in cytoskeletal dynamics and barrier permeability in intestinal epithelium: a novel function for PKC- $\theta$ . *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2004;287(1):218-34. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00575.2003>.
61. Rickard K.L, Gibson P.R, Wilson N.J, Mariadason J.M, Phillips W.A. Short-Chain Fatty Acids Reduce Expression of Specific Protein Kinase C Isoforms in Human Colonic Epithelial Cells. *J Cell Physiol.* 2000;182:222-31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200002\)182:2<222::AID-JCP11>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<222::AID-JCP11>3.0.CO;2-B).
62. Kjær S, Linch M, Purkiss A, Kostelecky B, Knowles PP, Rosse C, et al. Adenosine-binding motif mimicry and cellular effects of a thieno[2,3-*d*]pyrimidine-based chemical inhibitor of atypical protein kinase C isoenzymes. *Biochem J.* 2013;451:329-42. <https://doi.org/10.1042/BJ20121871>.
63. Xiong X, Li X, Wen YA, Gao T. Pleckstrin Homology (PH) Domain Leucine-rich Repeat Protein Phosphatase Controls Cell Polarity by Negatively Regulating the Activity of Atypical Protein Kinase C. *J Biol Chem.* 2016;291:25167-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740639>.
64. Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Farese RV. Insulin and PIP<sub>3</sub> Activate PKC- $\zeta$  by Mechanisms That Are Both Dependent and Independent of Phosphorylation of Activation Loop (T410) and Autophosphorylation (T560) Sites. *Biochemistry.* 2001;40:249-55. <https://doi.org/10.1021/bi0018234>.

65. Ranganathan S, Wang Y, Kern FG, Zhican Q, Rongbao L. Activation loop phosphorylation-independent kinase activity of human protein kinase C zeta. *Poteins Struct Funct Bioinforma*. 2007;67:709-19. <https://doi.org/10.1002/prot.21348>.
66. Zhang N, Tian YN, Zhou LN, Li MZ, Chen HD, Song SS, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition synergizes with PARP inhibitors through the induction of homologous recombination deficiency in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2021;12:1-18. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03475-4>.
67. Liu K, Li J, Wu X, Chen M, Luo F, Li J. GSK-3 $\beta$  inhibitor 6-bromo-indirubin-3'-oxime promotes both adhesive activity and drug resistance in colorectal cancer cells. *Int J Oncol*. 2017;51:1821-30. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4163>.
68. Umar S, Wang Y, Morris AP, Sellin JH. Dual alterations in casein kinase I- $\epsilon$  and GSK-3 $\beta$  modulate  $\beta$ -catenin stability in hyperproliferating colonic epithelia. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:599-607. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00343.2006>.
69. Wakatsuki S, Saitoh F, Araki T. ZNRF1 promotes Wallerian degeneration by degrading AKT to induce GSK3B-dependent CRMP2 phosphorylation. *Nat Cell Biol*. déc 2011;13(12):1415-23. <https://doi.org/10.1038/ncb2373>.
70. Monick MM, Carter AB, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW. Protein Kinase C  $\zeta$  Plays a Central Role in Activation of the p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase by Endotoxin in Alveolar Macrophages. *J Immunol*. 2000;165:4632-9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4632>.
71. Carragher LAS, Snell KR, Giblett SM, Aldridge VSS, Patel B, Cook SJ, et al. <sup>V600E</sup> Braf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of *p16<sup>INK4a</sup>*. *EMBO Mol Med*. 2010;2:458-71. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000099>.
72. Wardana AP, Aminah NS, Rosyda M, Abdjan MI, Kristanti AN, Tun KNW, et al. Potential of diterpene compounds as antivirals, a review. *Heliyon*. 2021;7:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07777>.
73. Liu X, Verma A, Garcia G, Ramage H, Lucas A, Myers RL, et al. Targeting the coronavirus nucleocapsid protein through GSK-3 inhibition. *Proc Natl Acad Sci*. 2021;118:1-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113401118>.
74. Rana AK, Rahmatkar SN, Kumar A, Singh D. Glycogen synthase kinase-3: A putative target to combat severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2021;58:92-101. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.08.002>.
75. Tostivint V, Racaud-Sultan C, Roumiguié M, Soulié M, Gamé X, Beauval J baptiste. Progrès dans l'étude du cancer de la prostate : la culture cellulaire en trois dimensions reproduit ex vivo les caractéristiques des tumeurs prostatiques. *Presse Médicale*. 2017;46:954-65. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.06.014>.

76. Multum C. Floxuridine [Internet]. Drugs.com. 2022. [cited on 12 Dec. 2022] Available on : <https://www.drugs.com/mtm/floxuridine.html>
77. Frisch M.J, Trucks G.W, Schlegel H.B, Scuseria G.E, Robb M.A, Cheeseman J.R, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson G.A, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian H.P, Izmaylov A.F, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg J.L, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery J.A, Peralta Jr.,J.E, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd J.J, Brothers E, Kudin K.N, Staroverov V.N, Keith T, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant J.C, Iyengar S.S, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam J.M, Klene M, Knox J.E, Cross J.B, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts J.R, Stratmann R.E, Yazyev O, Austin A.J, Cammi R, Pomelli C, Ochterski J.W, Martin R.L, Morokuma K, Zakrzewski V.G, Voth G.A, Salvador P, Dannenberg J.J, Dapprich S, Daniels A.D, Farkas O, Foresman J.B, Ortiz J.V, Cioslowski J, and Fox D.J. Gaussian, Inc. Wallingford CT. 2013.
78. Rackers JA, Wang Z, Lu C, Laury ML, Lagardère L, Schnieders MJ, et al. Tinker 8: Software Tools for Molecular Design. *J Chem Theory Comput.* 2018;14(10):5273-89. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00529>.
79. Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem Rev.* 2005;105(8):2999-3094. <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
80. Barone, G., Gomez-Paloma, L., Duca, D., Silvestri, A., Riccio, R., Bifulco, G. Structure validation of natural products by quantum-mechanical GIAO calculations of <sup>13</sup>C NMR chemical shifts. *Chem Eur J.* 2002;8:3233-9. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020715\)8:14<3233::AID-CHEM3233>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020715)8:14<3233::AID-CHEM3233>3.0.CO;2-0).
81. Schreckenbach G, Ziegler T. Calculation of NMR Shielding Tensors Using Gauge-Including Atomic Orbitals and Modern Density Functional Theory. *J Phys Chem.* 1995;99:606-11. <https://doi.org/10.1021/j100002a024>.
82. Smith SG, Goodman JM. Assigning the Stereochemistry of Pairs of Diastereoisomers Using GIAO NMR Shift Calculation. *J Org Chem.* 2009;74(12):4597-607. <https://doi.org/10.1021/jo900408d>.
83. Grimblat N, Zanardi MM, Sarotti AM. Beyond DP4: an Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. *J Org Chem.* 18 déc 2015;80(24):12526-34. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02396>.
84. d'Aldebert E, Quaranta M, Sébert M, Bonnet D, Kirzin S, Portier G, et al. Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:1-13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00363>.
85. Gadea G, Bos S, Krejbich-Trotot P, Clain E, Viranaicken W, El-Kalamouni C, et al. A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology.* 2016;497:157-62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.015>.

