UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 2020 **N°**

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Elise CROSSAY

Présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 2020

Recherche de nouveaux produits naturels pour le traitement du cancer colorectal : déréplication et isolement de daphnanes mono estérifiés du latex de *Hura crepitans* L.

Président : Muriel Duflos

Membres du jury : Olivier Grovel, Valérie Jullian

Table des matières

Liste des abréviations 5

Table des tableaux 6

Table des illustrations 6

I. Introduction 8

II. Etat de l'art 10

A. Le cancer colorectal 10

1. Anatomie et histologie 10

2. Epidémiologie 11

3. Mécanismes de la carcinogénèse colorectale 11

4. Etiologies du cancer colorectal 13

a) Facteurs de risques 14

b) Prédispositions génétiques 14

5. Rôle des PKC dans le cancer colorectal 16

6. Traitements actuels 16

B. Les *Euphorbiaceae*, source prometteuse d'activateurs de la PKC ζ 17

1. Généralités 17

a) Aspects taxonomiques et botaniques 17

b) Utilisations traditionnelles 18

c) Diversité chimique et activités biologiques 19

2. *Hura crepitans* L. 21

a) Généralités et description botanique 21

b) Utilisations traditionnelles 22

c) Diversité chimique de *Hura crepitans* L. 23

C. Les cérébrosides 25

1. Structure 25

2. Fonctions et activités biologiques 26
3. Les cérébrosides de *Hura crepitans* L. 28
D. Les diterpènes de types daphnanes orthoestérifiés (DDO) 29
1. Caractéristiques structurales 29
a) Les alkyldaphnanes 30
b) Les daphnetoxines et analogues 30
c) Les résiniféronoïdes 31
d) Les 12-hydroxydaphnetoxines 32
2. Activités biologiques 32
3. Les daphnanes du latex de *Hura crepitans* L. 35
E. Objectifs de l'étude 38
III. Matériels et méthodes 39
A. Appareillages 39
1. Isolement des composés d'intérêts 39
2. Suivi des étapes de purification par CCM 40
3. Analyse UHPLC-MS des fractions d'intérêts 40
4. Analyse RMN des produits purs 41
B. Obtention de l'extrait brut du latex de *Hura crepitans* L. 41
C. Isolement de la huratoxine à partir d'une fraction méthanolique (MT252.6) d'un extrait éthanolique du latex de *Hura crepitans* L. 42
D. Isolement de daphnanes mono-estérifiés connus à partir d'un extrait brut du latex de *Hura crepitans* L. 44
E. Isolement d'un daphnane mono estérifié original D1. D 46
IV. Résultats et discussion 48
A. Déréplication d'une fraction enrichie en D1 (EC33.C) 48
B. Isolement de daphnanes mono estérifiés de *Hura crepitans* L. 58
1. Isolement de daphnanes mono estérifiés connus 58
2. Isolement d'un daphnane mono estérifié original D1. D 60

3. Bilan de purification 62

4. Analyse par Résonnance Magnétique Nucléaire de la molécule D1. D 65

V. Conclusion et perspectives 71

Bibliographie 73

Annexe I : Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1.C 80

Annexe II : Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1. B 81

Annexe III : Arbre de purification de la huratoxine 82

Annexe IV : Arbre de purification du stelleralide J, de la prohuratoxine, de la huratoxine et de la molécule D1. 83

Annexe V : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC115.D 84

Annexe VI : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC99.C = composé D1.D 85

Annexe VII : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC47.J2 = prohuratoxine. 86

Annexe VIII : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC47.J4 = prohuratoxine. 87

Annexe IX : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC47.G4 = stelleralide J. 88

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization = Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

C_3H_8O: Isopropanol

C_6H_{12}: Cyclohexane

CAD : Charged Aerosol Detector

CCR : Cancer colorectal

CH_2Cl_2: Dichlorométhane

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CE_{50} : Concentration Efficace médiane

CID: Collision-Induced Dissociation = Fragmentation Induite par Collision

CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance

CLMP: Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression

D1: Daphnane mono estérifié

D2: Daphnane di estérifiés

DD: Diterpène de type Daphnane

H_2O: Eau

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry = Spectrométrie de Masse Haute Résolution

MeCN : Acétonitrile

MeOH : Méthanol

MS : Mass Spectrometry = Spectrométrie de Masse

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PKC : Protéine Kinase C

POS : Ionisation en mode positif

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

SPE : Solid Phase Extraction = Extraction en Phase Solide

Tr : Temps de rétention

UHPLC : Ultra High Pressure Liquid Chromatography = Chromatographie Liquide Ultra Haute Pression

Uma : Unité de masse atomique

Table des tableaux

Tableau 1: Cérébrosides identifiés dans l'extrait brut du latex de *Hura crepitans* L. (4) 28
Tableau 2: Daphnanes mono estérifiés du latex de *Hura crepitans* L. (4)..... 37
Tableau 3: Tableau récapitulatif de la déréplication d'une fraction enrichie en D1 (EC33.C) 57

Table des illustrations

Figure 1: Répartition géographique des *Euphorbiaceae* (26) 18
Figure 2 : Squellette des diterpènes; A: Jatrophanes; B: Tiglianes; C: Ingénanes; D: Daphnanes; E: Lathyranes..... 20
Figure 3: Photo de *Hura crepitans* L. 21
Figure 4 : Structure des cellules foliaires de *Hura crepitans* L. A) Epiderme inférieur. B) Epiderme supérieur (21)..... 22
Figure 5 : A: Structure de la huratoxine; B: Structure du méthylène-24 cycloartane; C: Structure du cycloarténol; D: Structure du butyrospermol 23
Figure 6 : Structure de la huratoxine 24
Figure 7 : Chromatogrammes UHPLC-APCI-MS de l'extrait éthanolique du latex de *Hura crepitans* L. (1) Daphnanes mono estérifiés. (2) Cérébrosides. (3) Daphnanes di estérifiés (4) 25
Figure 8: Structure générale des cérébrosides..... 26
Figure 9: Strucuture du cordycérébroside B 27
Figure 10 : Structure du noyau daphnane..... 29
Figure 11 : Structure de la gnidimacrine 30
Figure 12 : Structure de la daphnétoxine 31
Figure 13: Structure de résinifératoxine..... 31
Figure 14 : Structure de l'hydroxydaphnétoxine 32
Figure 15: Structure des DDO à une chaine ou mono-estérifiés (1) et des DDO à deux chaines ou di-estérifiés (2) 36
Figure 16: Test d'inhibition de croissance des fractions enrichies à 10 µg/mL sur les cellules Caco-2 (4)..... 36
Figure 17: A. Structure de la huratoxigénine. B. Structure de la 5-déoxy-6,7-déépoxy-didéhydro- huratoxigénine 37

Figure 18: Photographies de la récolte du latex de *Hura crepitans* L.(4) 42
Figure 19: Chromatogramme UHPLC-APCI-MS de la fraction EC33.C en mode positif..... 48
Figure 20: A. Proposition d'un schéma de fragmentation pour le noyau "huratoxigénine". B. Proposition d'un schéma de fragmentation pour le noyau prohuratoxine. C. Proposition d'un schéma de fragmentation pour le noyau stelleralide J..... 50
Figure 21: A. Structure du noyau Prohuratoxine. B. Structure du noyau Stelleralide J 51
Figure 22: Spectre APCI-CID MS et MS/MS de la molécule D1. A (tr = 1,55 minutes) en mode positif..... 52
Figure 23: Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1. A (tr = 1, 55 minutes)..... 53
Figure 24: Spectres APCI-CID MS et MS/MS de la molécule à m/z 617 en mode positif (tr = 3,80 minutes)..... 55
Figure 25: Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1.D (tr = 3,80 minutes) 56
Figure 26: Chromatogrammes UHPLC-APCI-MS de suivi de purification de la molécule D1.D, du stelleralide J, de la prohuratoxine et de la huratoxine en mode positif 61
Figure 27 : A: Spectre ^{1}H de la huratoxine; B: Spectre ^{1}H de la molécule D1. D 66
Figure 28: A: Spectre ^{13}C de la huratoxine (4); B: Spectre ^{13}C de la molécule D1. D 67
Figure 29 : Spectres RMN 2D de la fraction EC99.D; A: Spectre HMBC; B: Spectre HSQC; C: Spectre COSY 69
Figure 30: Structure plane de la molécule D1. D..... 70

I. Introduction

Le cancer colorectal est la troisième cause de mortalité par cancer au niveau mondial, en 2018, selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). En effet, 17 120 décès par cancer colorectal ont été estimés en 2018 en France. Malgré les différentes stratégies thérapeutiques actuelles (chimiothérapie, chirurgie, thérapie ciblée) la survie à 5 ans en France est seulement de 52 %. Il est donc nécessaire de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques avec des mécanismes d'actions originaux pour améliorer la prise en charge thérapeutique et la survie des patients atteint de CCR.

Les produits naturels représentent une source inépuisable de métabolites bioactifs originaux pour le développement de nouveaux médicaments. En effet, de nombreuses molécules actives commercialisées sont issues de la biodiversité végétale. A ce jour environ 60 % des anticancéreux utilisés sont issus de produits naturels (1). On peut citer par exemple le paclitaxel isolé de l'arbre *Taxus baccata* et la vincristine, isolée de *Catharanthus roseus*, qui sont tous deux utilisés en chimiothérapie. Les *Euphorbiaceae*, en particulier, sont une famille de plantes particulièrement variées et très répandues. En effet, cette famille regroupe plusieurs centaines de genres et plusieurs milliers d'espèces ce qui représente une grande richesse en métabolites secondaires. Parmi ces métabolites on retrouve notamment des diterpènes, l'un d'entre eux, le mébutate d'ingénol, a déjà été commercialisé sous le nom de Picato® pour le traitement des kératoses actiniques. Les diterpènes d'*Euphorbiaceae* représentent donc une source prometteuse de molécules bioactives.

Une collaboration entre l'UMR 152 et l'institut de recherche de l'Amazonie péruvienne (IIAP) basé à Iquitos, en plein cœur de la forêt primaire péruvienne, a initié l'étude de plantes utilisées traditionnellement en Amérique du sud dans l'objectif de découvrir de nouvelles molécules bioactives. Le travail réalisé ici est axé sur l'étude du latex de *Hura crepitans* L., un arbre de la famille des *Euphorbiaceae* très répandu dans la forêt amazonienne. Le choix de cette plante a été motivé par plusieurs critères : son utilisation en médecine traditionnelle au Pérou et la présence de diterpènes de type daphnane (DD). Ces molécules ont déjà été mises en avant pour leur activité cytotoxique. De plus, elles présentent une similarité structurale avec les esters de phorbols qui sont connus pour être des activateurs des protéines kinases C (PKC). Ces enzymes sont impliquées dans de nombreux mécanismes de cancérogénèse. La similarité structurale des DD avec les esters de phorbol nous permet de poser l'hypothèse que ces molécules auront un

effet sur les PKC et donc sur les voies de carcinogénèse. Ainsi, la recherche de nouveaux DD au sein du latex de *Hura crepitans* L. présente un intérêt majeur dans la recherche de nouveaux composés cytotoxiques.

Un partenariat avec l'Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD) a permis la réalisation de différents tests biologiques préliminaires sur le latex de *Hura crepitans* L. afin de valider son intérêt pour la recherche de produits naturels antitumoraux. Ainsi, dans une précédente thèse, il a été montré que ce latex est sélectivement cytostatique vis-à-vis des cellules cancéreuses colorectales Caco-2. Cette activité est portée par des molécules de la classe des daphnanes mono-estérifiés et notamment par la huratoxine. La huratoxine serait responsable d'une inhibition des voies prolifératives GSK3β et AKT. AKT est une serine thréonine kinase impliquée dans la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR. Cette voie de signalisation joue un rôle dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (2). GSK3β est aussi une protéine kinase qui est inhibée par AKT ce qui aboutit à la prolifération et à la survie des cellules cancéreuses (3). L'action de la huratoxine sur ces protéines kinases serait responsable de son activité cytostatique. Des tests ont été réalisés pour déterminer l'effet de la huratoxine sur les PKC α et δ sans résultat. Cependant, des résultats préliminaires ont montré une augmentation de l'activation de la PKC ζ par la huratoxine (4).

Le projet à l'origine des travaux présentés dans ce manuscrit consistait d'une part à isoler en quantité suffisante la huratoxine afin d'élucider son mécanisme d'action sur les cellules cancéreuses colorectales et notamment son influence sur la PKC ζ ; et d'autre part, à isoler d'autres daphnanes mono-estérifiés contenus dans le latex de cette plante afin d'évaluer leur potentiel cytostatique sur les lignées cellulaires de cancer du côlon et leur activité sur la PKC ζ. Au vu de l'incidence du cancer colorectal, ce projet s'inscrit donc dans une problématique de santé publique importante.

II. Etat de l'art

A. Le cancer colorectal

1. Anatomie et histologie

Le côlon et le rectum forment la dernière partie du tube digestif appelé le gros intestin. Le rôle du côlon est la solidification des selles via l'absorption de l'eau et des déchets alimentaires liquides, issus de l'estomac et de l'intestin grêle, afin d'obtenir des matières fécales semi-solides. Les selles formées sont ensuite évacuées par l'anus en passant par le rectum (5). Le rectum, quant à lui, constitue la dernière partie du tube digestif, son rôle principal est le stockage des selles avant leur élimination. Il mesure environ 16 cm et est situé entre le sacrum et le coccyx d'un côté et la vessie de l'autre. Il présente des valvules de Houston et des colonnes rectales sur sa paroi interne. Ce sont des replis horizontaux et verticaux qui tapissent la surface interne du rectum. Sa surface externe est recouverte du mesorectum, c'est un tissu graisseux regroupant des vaisseaux sanguins et des ganglions lymphatiques (6).

Le côlon est un organe mesurant 1,5 m constitué de quatre segments : le côlon droit, le côlon transverse, le côlon gauche ou côlon descendant et enfin le côlon sigmoïde qui relie le côlon au rectum. Dans plus de la moitié des cas de cancers colorectaux le cancer est localisé au niveau du côlon sigmoïde (5,7).

La paroi colorectale est constituée de la muqueuse qui est la couche la plus interne puis se superposent la sous muqueuse, la musculeuse et la couche séreuse. La musculeuse est constituée de deux couches musculaires tandis que la couche séreuse constitue une partie du péritoine abdominal. La carcinogénèse se développe le plus souvent à partir des cellules qui tapissent la muqueuse puis il s'étend dans les couches supérieures (5,6,8). En effet, la muqueuse colorectale présente des glandes ou cryptes de Lieberkühn à partir desquelles des polypes adénomateux ou adénomes peuvent se développer. Ces polypes sont des excroissances qui peuvent évoluer lentement en tumeurs cancéreuses. Il existe trois types d'adénomes : les adénomes villeux, les adénomes tubuleux et les adénomes tubulovilleux qui représentent respectivement 5%, 75% et 20% des polypes adénomateux (9). Les tumeurs malignes se développant à partir des cellules de la muqueuse glandulaire colorectale, appelées adénocarcinomes, représentent 95% des cancers colorectaux, parmi lesquels 80% sont des adénocarcinomes de Lieberkühn. Dans de

rares cas, un cancer colorectal peut se développer à partir des cellules nerveuses digestives (tumeurs carcinoïdes), des ganglions lymphatiques (lymphomes), des mélanocytes (mélanomes) ou des os et tissus mous (sarcomes) (10).

2. Epidémiologie

Le cancer du côlon fait partie des cancers les plus fréquents et les plus mortels. En effet, il constitue la deuxième cause de mortalité par cancer en France et la troisième au niveau mondial avec 774 000 décès en 2015 (11). Selon l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) le cancer colorectal représentait 9,7% des cancers dans le monde en 2015 soit 814 000 cas chez les hommes et 664 000 cas chez les femmes (7).

On observe une grande disparité dans la répartition géographique des CCR (7). En effet, ce cancer est plus répandu dans les pays développés tels que les Etats Unis, l'Australie, le Japon et les pays d'Europe de l'Ouest (12) que dans les autres pays.
En France, 43 350 nouveaux cas et 17 120 décès ont été estimés en 2018 (13). D'après des études récentes le nombre de cancers colorectaux (CCR) devrait augmenter durant les prochaines années pour atteindre 45 000 nouveaux cas par an en 2020 en France (12). C'est le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme (après le cancer du poumon et de la prostate) et le deuxième chez la femme (après le cancer du sein) (13). Il touche en majorité les personnes âgées de plus de 50 ans et l'âge moyen au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et 72 ans chez la femme. L'âge moyen au décès, quant à lui, est de 75 ans chez l'homme et 79 ans chez la femme. La survie nette, c'est-à-dire la survie uniquement liée au cancer, pour ce type de cancer est estimée à 63% à 5 ans et 52% à 10 ans. On peut noter que la survie est légèrement plus élevée pour les femmes que pour les hommes (54 % contre 50% à 10 ans) (14).

3. Mécanismes de la carcinogénèse colorectale

Différents mécanismes peuvent aboutir à un CCR mais dans la majorité des cas il se développe à partir de polypes adénomateux bénins présents au niveau de la muqueuse colorectale, et qui évoluent en lésions cancéreuses (7,15,16). Ce mécanisme de carcinogénèse est caractérisé par l'accumulation de mutations germinales sur des gènes jouant un rôle dans l'instabilité génétique, la prolifération cellulaire et la régulation du microenvironnement des cryptes colorectales (15). Les cellules mutées au niveaux de l'épithélium de la muqueuse

colorectale vont proliférer et former des foyers de cryptes aberrantes qui vont ensuite évoluer en adénomes puis en carcinomes (17). Les lésions cancéreuses résultantes peuvent ensuite provoquer une invasion des ganglions lymphatiques par des cellules cancéreuses ainsi que le développement de métastases notamment au niveau du foie, des poumons et du péritoine (18).

Ainsi, trois voies génétiques majoritaires impliquées dans le développement de CCR sporadiques ont été mises en avant : l'instabilité chromosomique, l'instabilité des microsatellites et les mécanismes épigénétiques tel que l'hyperméthylation des ilots CpG des promoteurs des gènes (7,17). La compréhension des mécanismes génétiques et épigénétiques responsables de la carcinogénèse colorectale permet l'amélioration des traitements et du suivi des patients (17).

La voie de l'instabilité chromosomique (CIN) est la voie majoritaire de carcinogénèse colorectale car elle cause 70 à 85% des CCR sporadiques et est retrouvée dans les CCR causés par une polypose adénomateuse familiale (PAF, voir chapitre suivant) (7,16,17). L'instabilité chromosomique consiste en une perte d'un chromosome ou d'un fragment de chromosome (17). Cette voie aboutit à des adénocarcinomes par l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (7). Les gènes les plus fréquemment mutés sont le gène de la polypose adénomateuse colique (APC), le gène p53, et le gène KRAS. Le gène suppresseur de tumeur APC est celui le plus fréquemment muté initialement dans les cas de CCR héréditaires et sporadiques. L'inactivation du gène p53, qui est lui aussi suppresseur de tumeur, favorise la progression du CCR ainsi que son caractère invasif (7,15,16). Il semblerait également qu'une mutation du gène KRAS intervienne après la mutation du gène APC (7,15). L'instabilité chromosomique est observée dès les stades précoces de la carcinogénèse colorectale, et les CCR résultants sont le plus souvent situés au niveau du colon gauche et du rectum. Ce type de cancer est plus répandu chez les hommes que chez les femmes et survient tardivement (17)

L'instabilité des microsatellites (MSI) correspond à un changement du nombre de nucléotides au niveau des séquences microsatellites (7,16). Celles-ci sont des séquences nucléotidiques courtes et répétées, répandues dans le génome et particulièrement sujettes aux erreurs d'appariement lors des étapes de réplication. En conditions physiologiques normales, ces erreurs sont réparées par le système de réparation de l'ADN. Cependant, lorsque certains gènes du système de réparation de l'ADN sont mutés ces erreurs aboutissent à une instabilité des microsatellites (17). La MSI serait en cause dans 15 à 20% des cas de CCR sporadiques

(7,16,17). Dans les cas des patients atteints d'un syndrome de Lynch, on observe une instabilité des microsatellites importante, ces patients présentant une mutation au niveau des gènes du système « miss match repair » (15). L'instabilité des microsatellites est retrouvée à un stade précoce de la carcinogénèse colorectale et on peut l'observer dès le stade polype (17). Les CCR avec MSI apparaissent précocement et sont souvent localisés au niveau du côlon droit. De plus, les patients présentent une infiltration lymphocytaire importante et un risque accru de développer des tumeurs extra-coliques (16,17).

Une autre voie épigénétique peut être impliquée dans la carcinogénèse colorectale, c'est l'hyperméthylation des îlots CpG situés au niveau des promoteurs de certains gènes (7,17). Dans le génome humain, 50% des gènes possèdent un îlot CpG au niveau de leur promoteur et en situation normale ces îlots ne sont pas méthylés. La méthylation de ces îlots au niveau du promoteur d'un gène aboutit à la non transcription de ce gène. Lorsque l'hyperméthylation a lieu au niveau des îlots CpG du promoteur de gènes suppresseurs de tumeur cela provoque donc une inactivation de ces gènes ce qui favorise les mécanismes de carcinogénèse (7,17). Ces méthylations peuvent avoir lieu lors du vieillissement des cellules de l'épithélium colorectal et aboutissent à la transformation de ces cellules normales en cellules cancéreuses. En plus de ce phénomène physiologique il existe aussi des méthylations cancer-spécifiques dont le mécanisme n'est pas encore élucidé. Ce mécanisme épigénétique est observé dès le stade précoce de CCR, et on peut l'observer dès le stade des foyers de cryptes aberrantes. Ce type de cancer survient le plus souvent chez des patients âgés au niveau du côlon droit et est plus fréquent chez les femmes (17).

4. Etiologies du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est une maladie multifactorielle, elle dépend des habitudes de vie, de facteurs environnementaux, socioéconomiques et génétiques. La majorité des CCR est causée par des mutations somatiques qui apparaissent en réponse à une exposition à des facteurs environnementaux, et seuls 5% sont d'origine héréditaire (7). En effet, la transformation des colonocytes en cellules malignes peut être le résultat d'une exposition prolongée à des carcinogènes. L'exposition à certains facteurs environnementaux et des prédispositions génétiques peuvent coopérer pour aboutir à la formation d'adénomes et de carcinomes (7).

a) Facteurs de risques

Bien qu'il n'y ait pas de causes spécifiques pour le CCR, différents facteurs peuvent être impliqués dans le développement de cette maladie (7). On peut citer, notamment, l'âge qui est corrélé avec une augmentation du risque de CCR après 50 ans. De la même manière, des antécédents de polypes du côlon et de maladies inflammatoires intestinales, telle que la maladie de Crohn, sont associés à une augmentation du risque de CCR (7).

De plus, le développement économique et l'adoption d'habitudes de vie occidentales augmentent l'exposition à certains facteurs environnementaux et donc le risque de développer un CCR (7).

Il semblerait qu'une consommation excessive d'alcool augmente le risque de développer un CCR. Le mécanisme délétère de l'alcool n'est pas encore totalement connu mais il semblerait que la métabolisation de l'alcool puisse augmenter le stress oxydatif et donc les dommages au niveau de l'ADN (7).

D'un autre côté, environ 20% des CCR sont associés à une consommation de tabac. La fumée de tabac contient un grand nombre de carcinogènes dont des hydrocarbures polycycliques aromatiques, des amines aromatiques, des nitrosamines et des amines hétérocycliques. Ces molécules affectent différents gènes tel que les oncogènes KRAS et BRAF et le gène suppresseur de tumeur p53, ce qui peut provoquer l'apparition de cellules cancéreuses au niveau de la muqueuse colorectale (7).

Enfin, plusieurs études ont montré qu'une consommation excessive de viandes rouges ou transformées augmente le risque de CCR avec une incidence variant de 10 à 37% selon la quantité consommée quotidiennement. En effet, ces aliments peuvent causer des mutations génétiques et épigénétiques au niveau du côlon. Ils sont responsables d'une dégradation de la fermentation bactérienne ce qui entraine la formation de molécules de type nitrosourées. Celles-ci forment des adduits avec l'ADN et peuvent entrainer des mutations au niveau d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (7).

b) Prédispositions génétiques

Environ 5% des CCR diagnostiqués sont dûs à un syndrome héréditaire préexistant chez les patients (7,15,19). C'est le cas du cancer colorectal héréditaire sans polypose ou syndrome de Lynch (HNPCC), des polyposes adénomateuses familiales (PAF), des polyposes MYH-

associées et des polyposes hamartomateuses ou syndrome de Peutz-Jeghers. Le syndrome de Lynch et la polypose adénomateuse familiale représentent la majorité des syndromes colorectaux héréditaires (7,19).

Le syndrome de Lynch est impliqué dans 2 à 4 % des CCR (19). Il est caractérisé par une pénétrance élevée, une apparition précoce de CCR et un risque accru de cancer extra-intestinaux (15). C'est une maladie autosomale dominante qui peut être causée par des mutations au niveau des gènes impliqués dans le système de réparation de l'ADN (système « miss match repair »). Les gènes mutés sont dans 90% des syndromes de Lynch les gènes MLH1 et MSH2. Dans 10% des cas d'autres gènes peuvent être mutés tel que les gènes MSH6 et PMS2 (7,15,16,19). Un défaut dans le système de réparation de l'ADN provoque une accumulation de mutations au niveau de courtes séquences d'ADN appelées microsatellites (16). Le risque de cancer varie en fonction du gène muté et l'âge moyen de diagnostic de CCR pour les patients atteints d'un syndrome de Lynch est de 45 ans (15).

La polypose adénomateuse familiale (PAF) est impliquée dans 1% des cas diagnostiqués de CCR. Cette maladie autosomale dominante est caractérisée par l'apparition, à l'adolescence, de centaines de polypes adénomateux au niveau de la muqueuse du côlon. Ces adénomes apparaissent sous forme de cryptes dysplasiques appelées foyers de cryptes aberrantes (ACF) qui évoluent ensuite en carcinome. Le gène muté dans cette maladie est le gène de polypose adénomateuse colique (APC). Chez les patients sains, l'APC forme un complexe avec le GSK-3β, l'axine et d'autres cofacteurs afin de dégrader la β-caténine. Dans le cas des patients atteint de PAF la mutation de la protéine APC aboutit à une accumulation de β-caténine qui va ensuite provoquer une suractivation de la voie de signalisation Wnt impliquée dans la régulation de la division cellulaire, du cycle cellulaire et l'adhésion extracellulaire et qui est essentielle pour maintenir l'homéostasie des cryptes colorectales : cette suractivation contribue donc à la formation de tumeurs (15,19). Les patients atteints de PAF présentent également un renouvellement et une survie des cellules souches plus importants que les patients sains. Ils ont donc un risque accru d'accumuler des mutations et des polypes adénomateux et donc de développer un CCR.

Les polyposes héréditaires sont donc un facteur de risque important pour le développement du cancer colorectal.

5. Rôle des PKC dans le cancer colorectal

Les cellules gastro-intestinales expriment différentes isoformes de protéines kinases C : les PKC α, β1, β2, δ, ϵ, θ, η, ζ, λ et ϯ. Ces enzymes appartenant à la famille des sérine thréonine kinases sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires : prolifération cellulaire, transduction du signal, différenciation cellulaire, apoptose, migration cellulaire, remodelage membranaire… (18). Des études ont mis en avant le rôle de la PKC ζ comme suppresseur de tumeur dans le cadre du CCR : l'expression de cette isoenzyme est diminuée dans les cellules cancéreuses colorectales ainsi que dans les métastases du CCR ce qui aboutit à un mauvais pronostic pour les patients. En effet, la perte d'activité de la PKC ζ dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines entraine une augmentation de la survie des cellules cancéreuses et de la tumorigénèse. Une activation de la PKC ζ serait donc une alternative thérapeutique intéressante pour améliorer la survie des patients atteint de CCR (20) .

6. Traitements actuels

L'implication d'un grand nombre de facteurs dans le développement du CCR rend impossible la mise en place d'un traitement uniformisé. De plus, chaque patient possède des habitudes de vies différentes qui vont influer sur le développement tumoral. Il est donc essentiel de développer des traitements personnalisés (7) .

Les traitements actuels ont recours à la chirurgie afin de réaliser l'exérèse de la partie du colon touchée ainsi qu'un curage ganglionnaire et éventuellement une exérèse des métastases (12).

Une chimiothérapie adjuvante est nécessaire en plus de la chirurgie. Les médicaments les plus utilisés sont le 5-fluoro-uracile, l'oxaliplatine, le raltitrexed et l'irinotécan. Pour les CCR à un stade avancé avec la présence de métastases, des thérapies ciblées sont utilisées en complément des chimiothérapies classiques. Ces thérapies ciblées utilisent des anticorps monoclonaux ciblant les cellules cancéreuses. Trois médicaments sont utilisés dans le cadre des CCR : le bevacizumab, le cetuximab et le panitumumab (12).

Cependant, malgré ces différentes approches thérapeutiques, la survie à 5 ans, en France, de tous les types de CCR confondus est seulement de 52% (12). La cause principale de décès chez

les patients atteint d'un CCR est le développement de métastases hépatiques que l'on observe chez 70% des patients (20).

Afin d'améliorer ces chiffres, un dépistage précoce, une surveillance accrue des patients à risques et une prise en charge personnalisée des patients doit être réalisée.

De plus, l'efficacité et le rapport bénéfice-risque des médicaments utilisés pour traiter le CCR doivent être améliorés : de nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires pour ce type de cancer. La découverte de nouvelles molécules actives avec des mécanismes d'action originaux permettrait d'améliorer cette prise en charge. Dans ce cadre, la recherche de produits naturels activateurs de la PKC ζ est une piste d'actualité.

B. Les *Euphorbiaceae*, source prometteuse d'activateurs de la PKC ζ

1. Généralités

a) Aspects taxonomiques et botaniques

La famille des *Euphorbiaceae* est l'une des plus grande famille de plantes : elle regroupe plus de 300 genres et 8000 espèces (21–23).

Sa position taxonomique selon l'Angiosperm Phylogeny Group IV est la suivante (24):

Clade : *Spermatophyta*

Clade : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies

Clade : Rosidées

Clade : Fabidées

Ordre : Malpighiales

Famille : *Euphorbiaceae*.

Cette famille de plantes est retrouvée dans des habitats très variés même si elle reste majoritaire dans les zones tropicales et subtropicales notamment en Afrique et en Amérique (21–23). On peut retrouver ces plantes sous forme d'arbres, d'arbustes, d'herbes et plus rarement de lianes. Elles sont caractérisées par la présence de lacticifères responsables de la production d'un latex. Ces plantes sont monoïques ou dioïques, et ont donc des fleurs unisexuées. Leur fruit est sous

forme de capsule le plus souvent tricoque et à déhiscence triple (25). La répartition des *Euphorbiaceae* dans de nombreuses zones géographiques (Figure 1) a permis aux plantes de cette famille de mettre en place une grande variété de systèmes d'adaptation tels que la production de métabolites spécialisés afin d'assurer leur survie et leur défense. La présence de ces métabolites confère à ces plantes des propriétés pharmacologiques qui soit en font des plantes toxiques, soit ont été mises à profit pour la santé humaine sous la forme de remèdes traditionnels.

Figure 1: Répartition géographique des *Euphorbiaceae* (26)

b) Utilisations traditionnelles

Plusieurs espèces de cette famille sont ou ont été utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement notamment de maladies cutanées, de migraines et de parasites intestinaux... Les parties des plantes utilisées sont très variées, incluant les racines, les graines, le latex, les écorces, les tiges, les feuilles… Ainsi, *Lai et al.* ont rapporté que 33 espèces d'*Euphorbiaceae* étaient utilisées en médecine chinoise (23,27). Des rapports similaires sont parus concernant l'utilisation de ces plantes par la civilisation du Yucatan : *Euphorbia ptercineura* était par exemple utilisée pour le traitement de l'asthme et de la toux. On peut aussi citer les racines d'*Euphorbia fusiformis* utilisées en médecine traditionnelle pour traiter la fièvre, des blessures infectées ainsi que des désordres intestinaux (27). Le latex d'*Euphorbia resinifera* a aussi été utilisé pour traiter les ballonnements du roi Juba II de Mauritanie. Encore aujourd'hui les euphorbiacées sont utilisées en médecine alternative : *Euphorbia maculata*, par exemple, est utilisée pour traiter le choléra, la diarrhée et la dysenterie (22). Cependant, peu de preuves d'efficacité ont été démontrées pour ces plantes (22).

En parallèle de ces utilisations traditionnelles, il faut noter que la plupart des *Euphorbiaceae* sont des plantes vénéneuses (21). En effet, cette famille abrite l'une des plantes les plus

toxiques : *Ricinus communis* qui produit la ricine. Cette protéine est toxique par ingestion, inhalation ou injection (22). On peut aussi citer les graines de *Jatropha curas* qui contiennent des lectines très toxiques par ingestion, tandis que la curcaïne, une enzyme contenue dans son latex, accélère la cicatrisation lorsque le latex est déposé sur des plaies (25). D'autres espèces, telles que *Euphorbia scheffleri* ou *Euphorbia tirucalli*, sont utilisés pour leur pouvoir venimeux en tant que poison de pêche. Il a été montré un pouvoir irritant pour certaines espèces (*Euphorbia poissonii*), ainsi que des propriétés carcinogènes par stimulation de la division cellulaire (*Euphorbia leuconeura*). Le latex de certaines espèces peut aussi provoquer des conjonctivites par contact oculaire (*E. trucalli*, *Euphorbia royleana*) (22). Le fruit d'*Hippomane mancinella* est aussi connu pour provoquer des intoxications graves lors de son ingestion. Ces intoxications sont caractérisées par des lésions oropharyngées et du tractus gastro intestinal ainsi que par une hypotensions et une bradycardie (28).

Devant cette évidence de présence de nombreux principes actifs ou toxiques dans cette famille très diverse, de très nombreux travaux de recherches ont été menés afin d'identifier les molécules responsables de l'activité de ces plantes.

c) Diversité chimique et activités biologiques

La famille des *Euphorbiaceae* regroupe une très large variété de plantes qui produisent de nombreux métabolites spécialisés parmi lesquels on trouve différents terpènes (sesquiterpènes, diterpènes, et triterpènes), des tanins, des cérébrosides, des alcaloïdes, des flavonoïdes mais aussi des stéroïdes et des peptides (23,27). Les diterpènes sont les métabolites majoritaires et sont présents sous différentes formes : les jatrophanes, les tiglianes, les ingénanes, les daphnanes, les lathyranes (Figure 2)…(27).

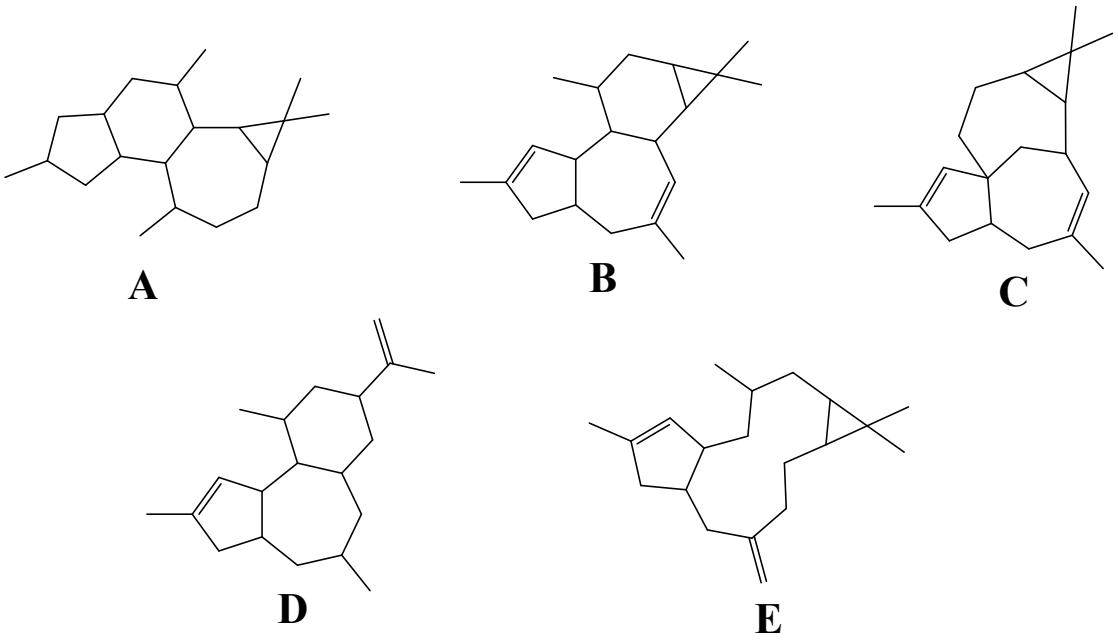


Figure 2 : Squellette des diterpènes ; A : Jatrophanes; B: Tiglianes; C: Ingénanes; D: Daphnanes; E: Lathyranes

Cette classe de molécules est particulièrement intéressante car elle représente un large groupe de composés avec des structures très différentes. En effet, on peut retrouver plus de 20 types de squelettes carbonés dont la plupart sont uniquement retrouvés chez les *Euphorbiaceae* (29). De plus, les diterpènes d'*Euphorbiaceae* présentent un potentiel bioactif remarquable. Ils sont notamment connus pour interagir avec la voie des PKC (29–31). Il semblerait que ces diterpènes modulent l'activité des PKC en interagissant avec leur domaine riche en cystéine C1 (31,32). On peut citer par exemple le mébutate d'ingénol qui a été commercialisé, sous le nom de Picato®, pour le traitement des kératoses actiniques. Cet ingénol, isolé à partir d'*Euphorbia peplus*, est un activateur de protéine kinases C (PKC) (31) induisant un relargage de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales, une augmentation de l'infiltration de neutrophiles, ainsi que l'apoptose et la nécrose cellulaire selon la dose (33–35).

D'autres types d'activités biologiques ont été investigués et démontrés chez les *Euphorbiaceae*. La fraction soluble du latex d'*Euphorbia royleana* a montré une activité anti-inflammatoire dose dépendante sur différents modèles de rats et de souris (27). Un extrait éthanolique des parties aériennes d'*Euphorbia hirta* a présenté une activité antimicrobienne sur un large panel de souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona vulgaris* et *Staphylococcus aureus*) (27). Récemment, *Angely et al*. ont développé une lotion antifongique à partir du jus des fruits d'*Alchornea cordifolia*. Cette lotion a été évaluée *in vitro* sur des cultures de différentes espèces de *Trichophyton* (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton*

interdigitale, *Trichophyton soudanense* et *Trichophyton mentagrophytes*) ainsi qu'*in vivo* sur des souris blanches infectées avec *T. mentagrophytes* sur des parties de peaux scarifiées. Les résultats ont montré une activité antifongique comparable à la griséofulvine, utilisée comme antifongique de référence dans cette étude (36).

Les *Euphorbiaceae* sont donc une famille de plantes très vaste et fournissant des métabolites secondaires bioactifs et variés. Ces plantes constituent donc un réservoir prometteur de nouveaux principes actifs naturels.

2. *Hura crepitans* L.

a) Généralités et description botanique

Hura crepitans L. est l'*Euphorbiaceae* (tribu *Huraea*) faisant l'objet de l'étude menée ici. C'est un arbre originaire d'Amérique du sud (Figure 3), et plus particulièrement du Pérou, mais on peut aussi le retrouver dans les pays humides d'Afrique, notamment au Nigéria. (21,37).

Figure 3: Photo de *Hura crepitans* L.

La classification de *Hura crepitans* est la suivante :

Tribu : *Huraea* ;

Genre : *Hura* ;

Espèce : *Hura crepitans* L.

Hura crepitans L. possède différents synonymes : *Hura brasiliensis* Willd, *Hura senegalensis* Boiss. et *Hura strepens* Müll.Arg. On le retrouve sous les noms vernaculaires d'arbre

bombardier, arbre sablier, bois diable, pet du diable, arbre dauphin et arbre paresseux en français, *sandbox tree* en anglais et *catahua* et *habilla* au Pérou (38).
Cet arbre peut atteindre jusqu'à 60 mètres de hauteur, il est donc utilisé comme arbre d'ombrage notamment en Afrique de l'ouest. De plus, son bois est peu cher : il est donc aussi utilisé en construction ce qui explique sa disparition progressive dans la nature (21,39).

H. crepitans L. présente des feuilles persistantes, des épines courtes situées sur les branches et le tronc ainsi que des fleurs pourpres et des fruits aplatis et cannelés caractéristiques (39). Les feuilles de *H. crepitans* L. possèdent des stomates sur les deux faces, elles sont donc amphistomatiques. Les cellules stomatiques sont plus nombreuses sur la face inférieure de la feuille. Des cristaux d'oxalate de calcium peuvent être présents dans les cellules foliaires notamment dans les cellules de la face inférieure de la feuille (Figure 4).

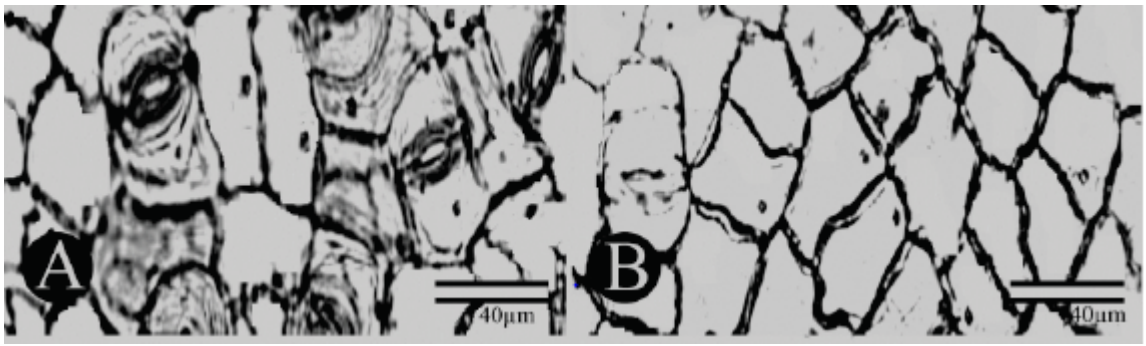


Figure 4 : Structure des cellules foliaires de *Hura crepitans* L. A) Epiderme inférieur. B) Epiderme supérieur (21)

De plus, les cellules épidermiques des feuilles présentent des striations qui sont caractéristiques du genre *Hura*. Une section du bois révèle aussi des vaisseaux scalariformes (21).

b) Utilisations traditionnelles

L'une des caractéristiques des *Euphorbiaceae* est la production d'un latex irritant contenant de nombreux métabolites spécialisés, principalement des terpènes (37). Dans le cas de *H. crepitans* L., on obtient un latex blanc par scarification du tronc (39). Celui-ci est utilisé en tant que poison de pêche ainsi qu'en médecine traditionnelle en Amérique du sud (40,41). Il est, par exemple, ingéré en petite dose pour traiter les vers intestinaux ou appliqué localement pour traiter des lésions consécutives à la leshmaniose (41). Une activité inhibitrice sur *Staphyloccocus aureus* a aussi été mise en avant avec une concentration minimale inhibitrice

de 1 mg/mL pour un extrait éthanolique. Ces recherches ont été menées car le latex est utilisé sous forme de cataplasme antibactérien dans le nord du Pérou (42). En Europe, le latex de *H. crepitans* L. est utilisé en homéopathie pour différentes indications sous le nom de *Hura brasiliensis*. Cette souche homéopathique est recommandée notamment pour plusieurs symptômes digestifs (troubles du transit, colopathie droite, ano-rectite, hémorroïdes), mais aussi pour des drainages ano-rectaux (43). Ces différentes utilisations ont mené à l'étude de ce latex afin de déterminer les molécules actives qui y sont contenues.

c) Diversité chimique de *Hura crepitans* L.

Différentes classes de molécules ont été retrouvées dans le latex de *H. crepitans* L. En 1965, *Ponsinet et al.* ont isolé trois triterpènes majoritaires à partir du latex de *H. crepitans* L. : le méthylène-24 cycloartanol, le cycloarténol et le butyrospermol (Figure 5). Ces molécules sont des triterpènes tétracycliques monohydroxylés retrouvés sous forme d'alcool dans le latex (44).

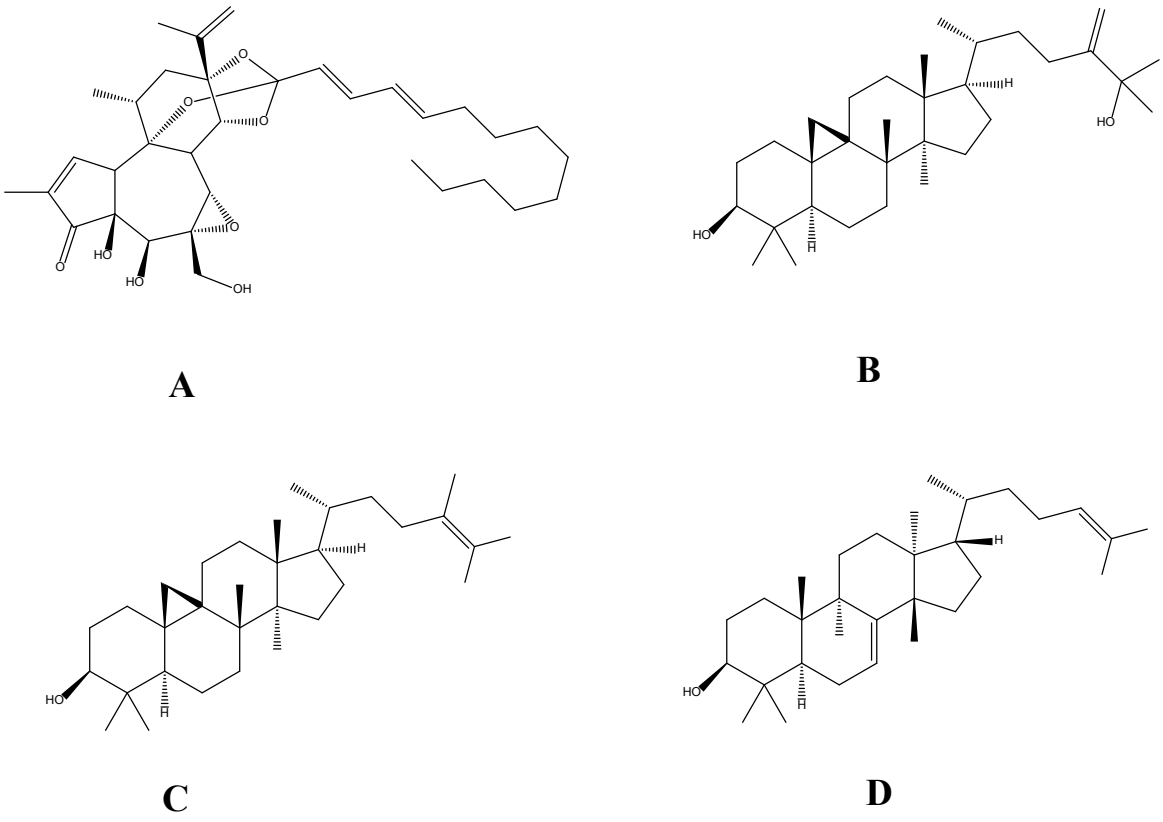


Figure 5 : A: Structure de la huratoxine; B: Structure du méthylène-24 cycloartane; C: Structure du cycloarténol; D: Structure du butyrospermol

En 1971, *Sakata et al*. ont isolé la huratoxine. Cette molécule hautement toxique serait responsable de l'activité piscicide du latex de *H. crepitans* L. C'est un diterpène tétracyclique de type 6-époxy daphnane présentant un groupement orthoester relié à une longue chaine alkyle (Figure 6) (40,45,46).

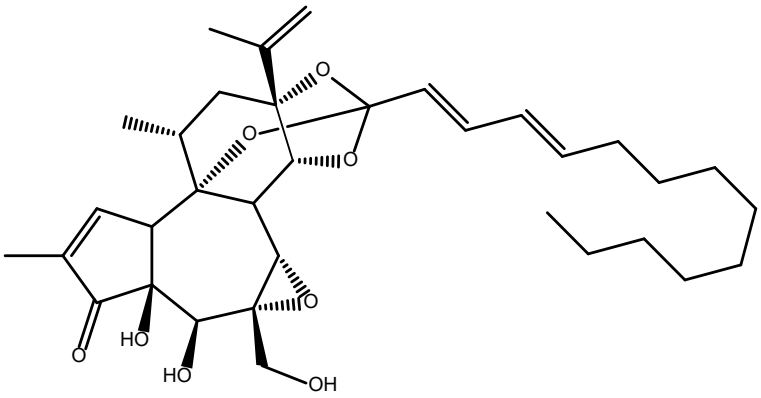


Figure 6 : Structure de la huratoxine

Des lectines ont aussi été isolées à partir du latex de *H. crepitans* L. Ces molécules sont des protéines se liant spécifiquement à certains sucres au niveau de la membrane cellulaire (47,48). La lectine mise en avant par *Barbieri et al.* possède une affinité préférentielle pour le galactose et ces dérivés. De plus, elle possède des propriétés mitogènes sur les lymphocytes B humains ainsi que des propriétés hémagglutinantes sans spécificité pour un groupe sanguin particulier (47).

Des molécules actives ont aussi été retrouvées dans d'autres parties de la plante. Différentes lectines ont notamment été isolées à partir des graines de *H. crepitans* L. (48–50). Cependant, l'étude menée ici est réalisée sur le latex ; nous nous sommes donc concentrés sur la description de ce latex.

Dans une précédente thèse effectuée au laboratoire PHARMADEV, une déréplication de l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L. par HPLC-APCI-HRMS (Ultra High Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometry - Atmospheric Pressure Chemical Ionization - High Resolution Mass Spectrometry) a été réalisée récemment. Deux classes chimiques majoritaires ont été mises en évidence dans l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L. : des diterpènes à noyaux daphnanes (DD) et des cérébrosides (Figure 7) (37).

Une analyse quantitative des différentes classes de molécules contenues dans l'extrait éthanolique du latex de *H. crepitans* L. a été réalisée grâce à un détecteur CAD (Charged Aerosol Detector). Les daphnanes mono-estérifiés représentent 24,3% de l'extrait, les daphnanes di-estérifiés 42,3%, les cérébrosides 28,8% et les autres molécules seulement 4,6% (4).

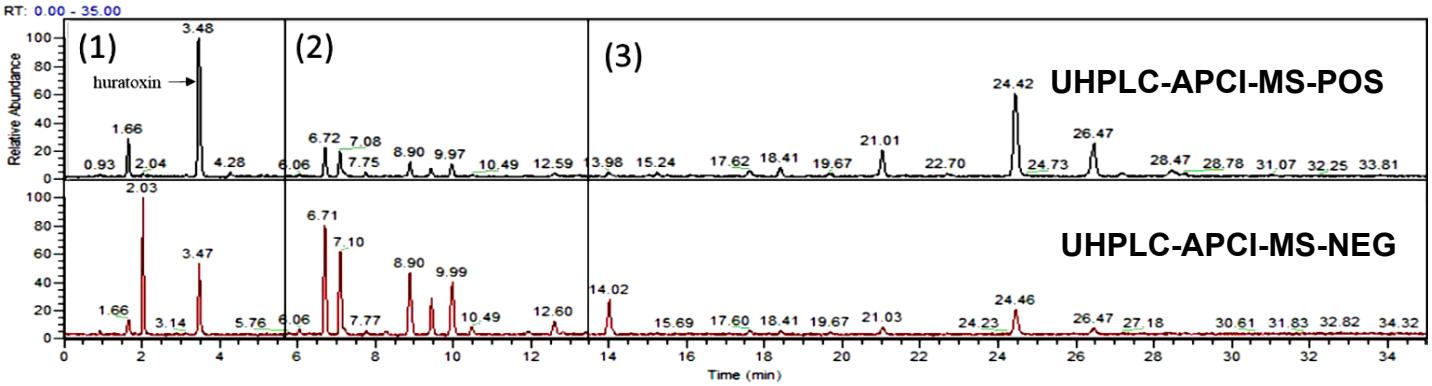


Figure 7 : Chromatogrammes UHPLC-APCI-MS de l'extrait éthanolique du latex de *Hura crepitans* L. (1) Daphnanes mono estérifiés. (2) Cérébrosides. (3) Daphnanes di estérifiés (4)

L'utilisation traditionnelle ainsi que la grande diversité en métabolites dont daphnanes fait de *H. crepitans* L. une plante prometteuse pour la recherche de nouveaux principes actifs.

C. Les cérébrosides

1. Structure

Les cérébrosides sont des molécules présentes chez différents organismes terrestres et marins : plantes, mammifères, champignons, invertébrés marins… Ce sont des molécules amphiphiles de la classe des glycosphingolipides. Elles sont constituées d'un monosaccharide, généralement un glucose ou un galactose, liés par une liaison bêta-osidique à un céramide (Figure 8). Le céramide est un sphingolipide qui regroupe une longue chaine d'acide gras liée à une longue chaine aminé par une liaison amide (51–53).

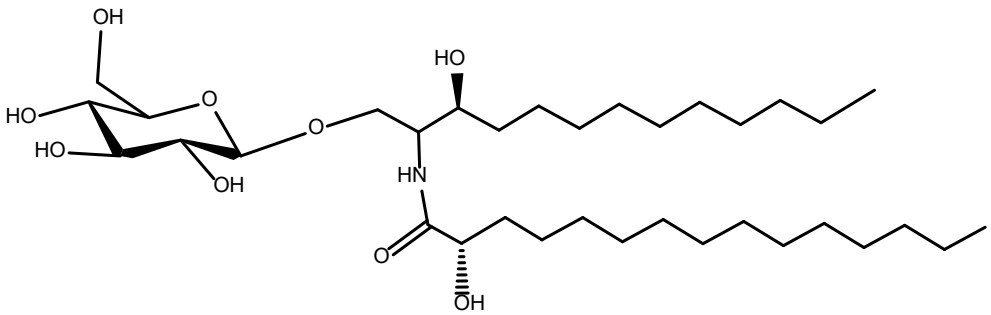


Figure 8: Structure générale des cérébrosides

Les modifications structurales entre les différents cérébrosides ont lieu principalement au niveau de la longueur, du degré d'insaturation et des substituants des chaines du céramide (51,52).

Il a été noté que les chaines aminées présentaient des différences structurales entre les cérébrosides issus d'invertébrés marins et ceux issus de plantes ou de mammifères. En effet, chez les invertébrés marins les céramides présentent une chaine aminée possédant des diènes conjugués. On peut citer par exemple le 2-amino-1,3-dihydroxy-4, 8,10-octadecatriene (d18 :3) et le 2-amino-1,3-dihydroxy-9-methyl-4,8,10-octadecatriene (d19 :3). A l'inverse, les cérébrosides de plantes et mammifères possèdent le plus souvent des chaines aminées contenant une seule double liaison, telle que la 4-shingenine (d18 :1) (51,52).

Les cérébrosides sont donc des molécules avec une distribution très large dans le vivant malgré leur diversité structurale restreinte.

2. Fonctions et activités biologiques

Les cérébrosides sont retrouvés dans les membranes de toutes les cellules eucaryotes ainsi que chez quelques bactéries procaryotes (52). Chez les plantes ces molécules ont un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire, dans l'apoptose, dans la défense contre certains pathogènes et dans l'adaptation à certains stress. En effet, les cérébrosides peuvent jouer un rôle dans la résistance de certaines plantes au froid. De plus, certaines plantes sont capables de reconnaitre les cérébrosides des champignons et d'activer des mécanismes de défense adaptés (52).

Hormis leurs rôles physiologiques, les cérébrosides présentent aussi des activités biologiques variées. On peut citer par exemple une activité antifongique sur des souches de *Candida spp.* notamment ; mais aussi une activité d'inhibition sur des souches humaines de *Mycobacterium tuberculosis* (27,53). On peut aussi citer *Sun et al.* qui ont montré une inhibition de la protéine PTP1B (Protéine Tyrosine Phosphatase 1B) par des cérébrosides isolés d'un ascomycète, *Cordyceps militaris*. Cette protéine est un élément de signalisation clé impliqué dans le contrôle négatif de la production d'insuline. Son inhibition est donc une voie prometteuse pour le traitement du diabète de type 2. Dans ces travaux les auteurs ont montré une inhibition de la protéine PTP1B avec une CI_{50} de 4,68 µM pour le cordycérébroside B (Figure 9) contre une CI_{50} de 5,15 µM pour l'acide ursolique utilisé comme contrôle positif. Les trois autres cérébrosides isolés montraient quant à eux une activité inhibitrice plus modérée (avec des CI_{50} comprises en 10 et 19 µM) (54).

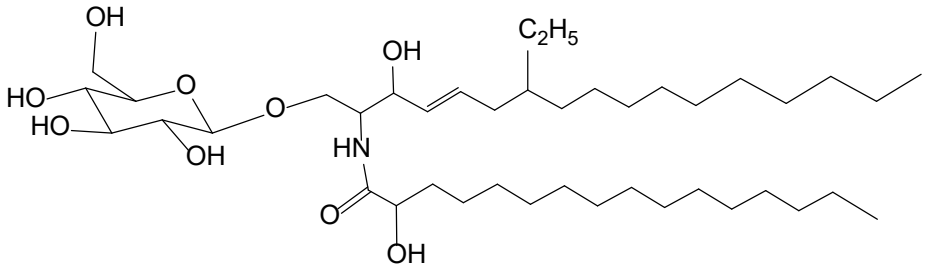


Figure 9: Strucuture du cordycérébroside B

De plus, les chercheurs ont mis en avant une activité cytotoxique pour ces molécules. En effet, *Cateni et al.* ont montré une activité antiproliférative sur des lignées cellulaires tumorales pour deux cérébrosides isolés d'*Euphorbia peplis*. Ces deux molécules ont été testées *in vitro* sur deux lignées cellulaires cancéreuses : les cellules humaines KB qui sont des cellules de carcinomes épidermoïdes et les cellules IMR-32 qui sont des cellules d'adénocarcinomes humains. Le cisplatine a été choisi comme molécule cytotoxique de référence. Les CI_{50} de ces molécules après 72 heures d'exposition étaient comprises entre 5 et 10 µM pour les deux lignées cellulaires contre une CI_{50} de l'ordre de 0,5 µM pour le cisplatine. L'activité cytotoxique reste donc modeste par rapport aux cytotoxiques existants. De plus, la sélectivité de ces molécules pour les cellules cancéreuses n'a pas été testée dans ces travaux (55).

Une corrélation entre la prise de cérébrosides alimentaires (contenus notamment dans le riz, le maïs, le soja…) et la prévention du cancer du côlon a aussi été mise en avant dans différents travaux. Un possible mécanisme expliquant ce phénomène serait l'hydrolyse dans le corps

humain des cérébrosides en composés bioactifs (céramide, chaine aminée). *Sugawara et al*. ont donc mis en contact les chaines aminées de cérébrosides de concombres de mer avec des cellules Caco-2. Ces cellules possèdent la capacité à se différencier spontanément en cellules colorectales, elles ont donc été utilisées comme modèle de cellules de cancer colorectal dans cette étude. Ils ont observé l'apoptose des cellules cancéreuses après une exposition à 20 µM de chaines aminées pendant 24h. Cette activité serait due à une augmentation de l'activité de la caspase-3. La différence structurale des cérébrosides des invertébrés marins avec leurs doubles liaisons conjuguées sur la chaine aminée pourrait expliquer cette activité anti tumorale (56).

Les activités biologiques des cérébrosides et de ses sous-produits sont donc diverses et présentent un intérêt notamment pour les thérapies anticancéreuses.

3. Les cérébrosides de *Hura crepitans* L.

Les précédents travaux de déréplication par HPLC-APCI-HRMS HRMS réalisés au laboratoire PHARMADEV sur l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L. ont permis de mettre en avant 10 cérébrosides connus. Ceux-ci ont été identifiés grâce à leur masse haute résolution et leurs fragments caractéristiques par comparaison avec la littérature (4). Ces cérébrosides ainsi que leurs fragments connus sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Cérébrosides identifiés dans l'extrait brut du latex de *Hura crepitans* L. (4)

N°	$[M - H]^-$	Formule brute	HCD-NEG-MS/MS
1	730,5459	$C_{40}H_{77}O_{10}N$	568.4945 ; 326.2701 ; 296.2596 ; 271.2281 ; 253.2170 ; 225.2224
2	730,5458	$C_{40}H_{77}O_{10}N$	568.4911 ; 326.2701 ; 296.2602 ; 271.2279 ; 253.2174 ; 225.2224
3	700,5339	$C_{39}H_{75}O_9N$	538.4763 ; 520.4663 ; 280.2606 ; 211.2039
4	732,5610	$C_{40}H_{79}O_{10}N$	570.5098 ; 326.2699 ; 296.2588 ; 271.2276 ; 253.2175 ; 225.2225
5	714,5510	$C_{40}H_{77}O_9N$	552.5000 ; 534.4886 ; 296.2588 ; 280.2653 ; 225.2223

6	714,5509	$C_{40}H_{77}O_9N$	552.4998 ; 534.4891 ; 296.2592 ; 280.2637 ; 225.2225
7	758,5776	$C_{42}H_{81}O_{10}N$	596.5279 ; 354.3011 ; 324.2907 ; 299.2593 ; 253.2541
8	758,5764	$C_{42}H_{81}O_{10}N$	596.5266 ; 354.3014 ; 324.2915 ; 299.2585 ; 253.2541
9	716,5659	$C_{40}H_{79}O_9N$	554.5158 ; 536.5042 ; 296.2607 ; 282.2810 ; 225.2220
10	742,5831	$C_{42}H_{81}O_9N$	580.5383 ; 562.5199 ; 253.2541

L'activité cytotoxique du latex de *H. crepitans* L. sur les cellules de cancer colorectal Caco-2 étant portée par les daphnanes (voir la Figure 16), l'isolement et l'évaluation de l'activité biologique des cérébrosides n'a pas été entreprise (4).

D. Les diterpènes de types daphnanes orthoestérifiés (DDO)

1. Caractéristiques structurales

Les daphnanes sont des diterpènes tricycliques composés d'un cycle à cinq chainons (A) lié à un cycle à sept chainons (B), lui-même relié à un cycle à 6 chainons (C) portant une chaine isoprényle (Figure 10).

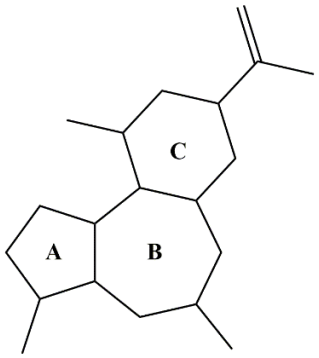


Figure 10 : Structure du noyau daphnane

Ces molécules sont présentes dans des plantes de la famille des *Euphorbiaceae* et des *Thymelaeaceae*. Elles sont retrouvées sous forme d'orthoesters le plus souvent mais peuvent aussi être présentes sous forme d'esters (57). On peut classer les DDO selon leurs caractéristiques structurales : la présence d'un groupement alkyle sur le cycle A ; la présence

d'un époxyde ou d'une double liaison sur le cycle B ainsi que la présence d'un hydroxyle sur le cycle C. On peut ainsi classer ces molécules en quatre catégories : les alkyldaphnanes ; les daphnetoxines et leurs analogues ; les resiniferonoïdes et les 12-hydroxydaphnetoxines et leurs analogues (58).

a) Les alkyldaphnanes

Les alkyldaphnanes sont isolés à partir de plantes de la famille des *Thymelaeaceae*. Ces molécules possèdent un cycle A saturé car relié au groupement orthoester ce qui crée un macrocycle. La gnidimacrine, isolée à partir des feuilles de *Gnidia subcordata*, a été l'un des premier alkyldaphnanes décrit dans la littérature (Figure 11) (58,59).

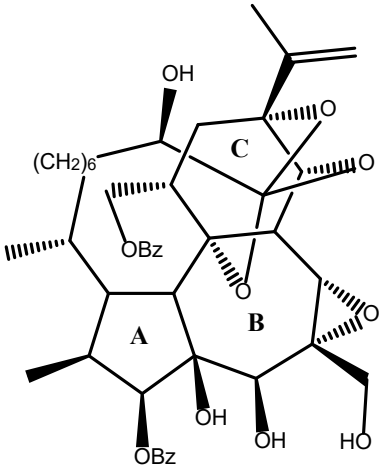


Figure 11 : Structure de la gnidimacrine

b) Les daphnetoxines et analogues

La daphnétoxine est la première molécule pour laquelle un noyau daphnane a été décrit. Elle a été isolée à partir d'un mélange commercial d'écorces de *Daphne mezereon*, *Daphne laureola* et *Daphne gnidium* (22). Les daphnétoxines possèdent des caractéristiques structurales communes : une cétone α-β insaturée sur le cycle A, un hydroxyle en 5 et un époxyde en 6,7 sur le cycle B. De plus, la majorité de ces molécules possède un hydroxyle libre en 20 (Figure 12) (58,59).

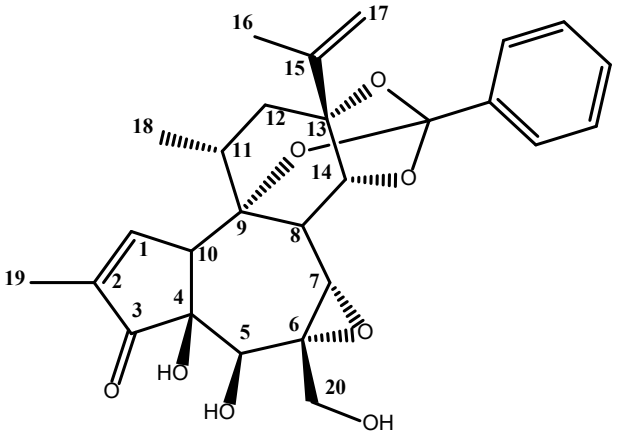


Figure 12 : Structure de la daphnétoxine

c) Les résiniféronoïdes

Les résiniféronoïdes sont des dérivés des daphnétoxines présentant une double liaison en 6,7 et un hydroxyle en moins en 5. Peu de résiniféronoïdes ont été décrits dans la nature. Ils possèdent tous le même noyau avec seulement des variations au niveau de l'hydroxyle en 20 qui est soit libre, soit lié à un groupement acyl. La résinifératoxine, isolée à partir du latex d'*Euphorbia resinifera* et *Euphorbia unispina*, est la molécule la plus importante de cette classe (Figure 13) (58,59).

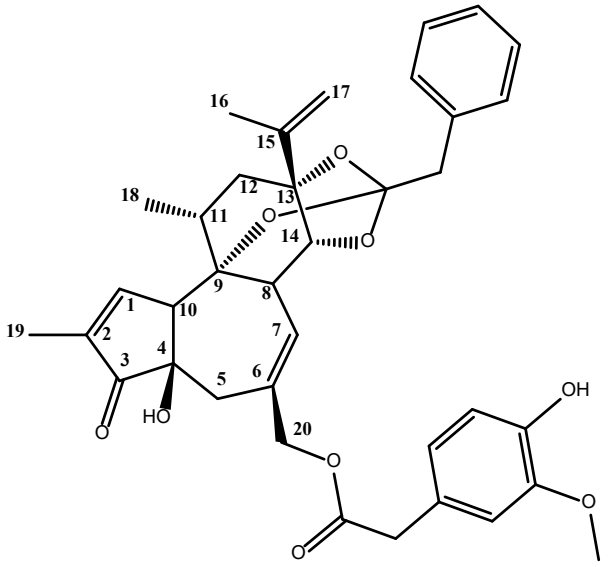


Figure 13: Structure de résinifératoxine

d) Les 12-hydroxydaphnetoxines

Les 12-hydroxydaphnetoxines ont une structure similaire aux daphnétoxines mais possèdent un hydroxyle supplémentaire en 12. Ces molécules sont plus souvent retrouvées chez des plantes de la famille des *Thymelaeaceae* que chez des plantes de la famille des *Euphorbiaceae*. La première molécule de cette classe à avoir été isolée à partir de l'écorce et des graines de *Daphne mezereum* est la mezeréine. Cependant c'est l'hydroxydaphnétoxine, isolée de l'écorce et des racines de *Daphne giraldii*, qui a donné son nom à cette famille (Figure 14) (58,59).

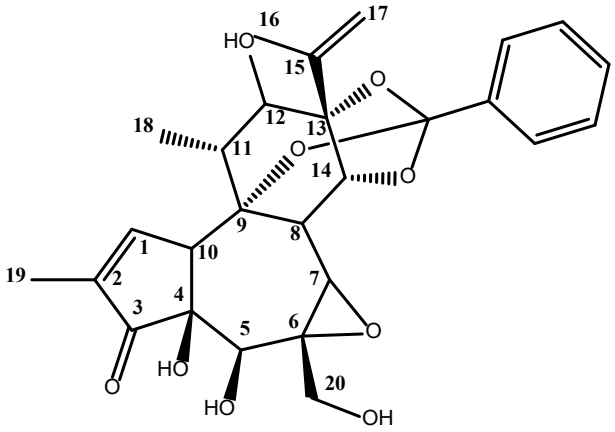


Figure 14 : Structure de l'hydroxydaphnétoxine

2. Activités biologiques

Du fait de leurs variations structurales importantes, les molécules de cette classe chimique présentent de nombreuses activités biologiques. Ces molécules ont notamment été étudiées pour leurs activités antivirales, anti tumorales, neuroprotectrices … (60).

La huratoxine, par exemple, montre une forte activité piscicide ce qui explique l'utilisation traditionnelle du latex *H. crepitans* L. pour la pêche (58). D'autres DD ont montré des activités thérapeutiques. La mézéréine, isolée à partir d'écorces de *Daphne mezereum*, a été utilisée en médecine traditionnelle pour son activité laxative. Cependant, son utilisation a causé plusieurs décès et est donc maintenant abandonnée (58). La kirkinine, une 12-hydroxydaphnetoxine, isolée à partir de racines de *Synaptolepsis kirkii*, présente une activité neuroprotectrice se traduisant par une augmentation de la survie neuronale à une concentration efficace médiane (EC_{50}) de l'ordre du nanomolaire, comparable à l'activité du NGF (Nerve Growth Factor) (58).

Depuis les années 1990, les diterpènes d'*Euphorbiaceae* ont été largement étudiés pour leur activité antivirale, anti-VIH notamment, qui serait médiée par l'activation des PKC (29). En effet, malgré les antirétroviraux (ART) existants, le SIDA demeure un problème de santé publique important dans de nombreux pays. Les ART permettent de contrôler la réplication du VIH-1 mais il y toujours des réservoirs viraux latents, notamment dans les cellules T, dont l'éradication représente un challenge en thérapeutique (61–63). Cependant, une nouvelle stratégie thérapeutique appelée « shock and kill » a récemment émergé. Cette stratégie se base sur l'hypothèse que l'on peut éliminer les cellules latentes infectées par le VIH-1 en activant la réplication du VIH-1. Cela permet d'augmenter le taux d'antigènes et permet donc une réponse des lymphocytes T cytotoxiques plus efficace (61,62). Dans cette optique les activateurs de PKC seraient des candidats médicament prometteurs. En effet, de nombreuses isoformes de PKC sont exprimées dans les lymphocytes T. Cependant, l'activation de certaines isoformes de PKC provoque des effets indésirables, notamment les isoformes α et θ. Le challenge est donc d'activer la réplication du VIH-1 latent via les PKC mais sans activer les isoformes α et θ (61).

Récemment, l'activité anti-CHIKV (virus chikungunya) de diterpènes d'*Euphorbiaceae* a été mise en évidence. Le virus chikungunya (CHIKV) est un *Alphavirus* appartenant à la famille des *Togaviridae* (64,65). Il cause une maladie caractérisée par de la fièvre, des rashs cutanés et des douleurs articulaires (30,30,32,64,66). Ce virus est transmis par différentes espèces de moustiques tels que *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* (32,64). Ces vecteurs sont des espèces invasives dans le monde et durant la dernière décennie le CHIKV est réapparu en Afrique, en Asie, dans les iles de l'océan indien et plus récemment dans les Caraïbes et en Amérique centrale et du sud. Cette ré-émergence est due notamment à l'augmentation des voyages intercontinentaux, ainsi qu'au changement climatique qui permet aux vecteurs de survivre dans des zones plus étendues (32,64,65). 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 la prévention de cette maladie (29–31,64). 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 (32,64). 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 de nouveau agent anti-CHIKV (29).

Dans le cas des daphnanes orthoestérifiés (DDO) les chercheurs ont montré une activité anti-CHIKV avec des EC_{50} allant de 0,6 à 18 µM (29). Par exemple, les codiapeltines A et B, isolées à partir de l'écorce de *Codiaeum peltatum*, présentent une activité anti-CHIKV comparable à la chloroquine avec une EC_{50} de 10 et 4,4 µM respectivement (66). On peut aussi citer la trigocherrierine A et le trigocherriolide E, 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 µM respectivement (64). Du point de vue des relations structure-activité, il semblerait que la présence d'une chaine latérale 2-méthyl-decanoyl en position 12 soit favorable à l'activité anti-CHIKV, et que le 9,13,14-orthoester permette d'augmenter l'activité et la sélectivité (29,64). Contrairement à l'activité anti-CHIVK qui est comparable pour la trigocherrierin A et la trigocherriolide E, l'activité anti-VIH est 100 voire 1000 fois plus importante pour le trigocherriolide E suggérant un mécanisme d'action différent pour les deux molécules (29).

De nombreux daphnanes sont des régulateurs puissants du VIH-1 à des concentrations de l'ordre du nM. Il semblerait qu'ils activent la réplication du virus de manière chronique dans les cellules infectées ce qui permet l'élimination *de novo* du virus dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) chez des patients suivant une thérapie ATR (61). C'est la stratégie de « shock and kill » évoquée précedemment. Les stelleralides A, F, G et H, isolés à partir de *Stellera chamaejasme* présentent une activité anti-VIH prometteuse avec des EC_{50} comprises entre 0,06 et 1,1 nM (62,63). Les stelleralides 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 (63). La gnidamicrine (GM), isolée à partir *Stellera chamaejasme*, présente une activité anti-VIH1 *ex vivo* importante sur des PBMC de patients sous ATR, avec des concentrations actives de l'ordre du picoM. En effet, la GM permet de diminuer le nombre de cellules latentes infectées (de 4,4 à 5,6 fois), ainsi que les niveaux d'ADN VIH1 dans ces cellules (7,7 fois), ex *vivo,* à des concentrations n'augmentant pas la prolifération des cellules T ni la production de cytokines pro inflammatoires. L'élimination des cellules latentes infectées par la GM 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 de la PKC βI et de la PKC βII. Cette molécule présente donc un fort intérêt pour le développement de nouvelles thérapeutiques anti-VIH1 (61,62). Il est également intéressant de noter que les 1α-alkyldaphnanes (GM, stelleralides F-H) semblent présenter une activité anti-VIH plus importante que les daphnétoxines (stelleralides I-J, huratoxine). La structure du cycle A semble donc être importante pour l'activité anti-VIH avec le classement

suivant : cyclopentane > cyclopentenone = cyclopentanone (63). La présence d'une fonction hydroxyle libre en position 5 et 20 semble aussi essentielle à l'activité anti-VIH. De plus, la présence d'un ester de benzoyle en position 3 est favorable à l'activité antivirale. Certaines modifications mineures n'affectent pas l'activité, telles que la réduction de la double liaison en position 15,16, et l'oxydation ou l'acétylation du carbone en position 2' (62).

De plus, de nombreux DD ont montré une activité cytotoxique. La mézéréine, par exemple, présente une cytotoxicité sur des lignées cellulaires leucémiques avec des dosages de l'ordre du µg/kg. La gnicidine, isolée à partir de *Gnidia lamprantha*, elle aussi, présente une activité cytotoxique médiée par l'activation des PKC α, β et γ. La résinifératoxine (RTX), isolée du latex de *Euphorbia resinifera*, est une molécule cytotoxique qui active sélectivement la PKC α (58). D'autres mécanismes d'action cytotoxique ont été mis en avant pour les daphnanes. En effet, la yuanhuline, la yuanhuagine et la yuanhuahine, isolées à partir de *Daphne genkwa*, présentent une activité antiproliférative via notamment l'inhibition d'Akt, de STAT3 et de Src dans des lignées cellulaires humaines de cancer du poumon. De plus, ces daphnanes ont montré une activité anti proliférative sur des lignées cancéreuses résistantes aux chimiothérapies classiques (gemcitabine, gefitinib, erlotinib) (67).

Les daphnanes sont donc des molécules variées sur le plan structural ce qui leur permet de présenter des mécanismes d'action originaux. Ce sont donc des candidats intéressants en thérapeutique, notamment en tant qu'agent cytotoxique et en tant qu'activateur de PKC. En effet, les chimiothérapies anticancéreuses actuelles provoquent de nombreuses résistances il est donc nécessaire de découvrir de nouvelles molécules avec des mécanismes d'action originaux.

3. Les daphnanes du latex de *Hura crepitans* L.

Dans le cadre de la thèse de Manon Trinel, la précédente doctorante travaillant sur ce sujet au laboratoire, une déréplication de l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L. par HPLC-APCI-HRMS a permis de détecter plusieurs daphnanes dont un majoritaire : la huratoxine. Deux séries de daphnanes ont été identifiées : les mono-estérifiés (D1) et les di-estérifiés (D2) (Figure 15) (37).

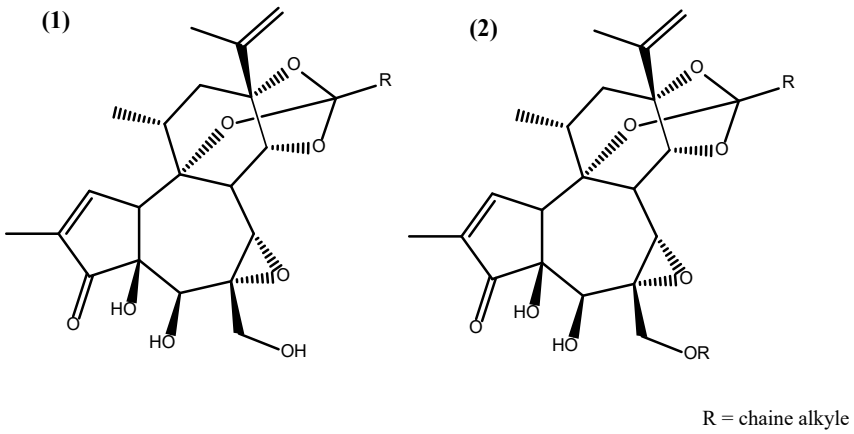


Figure 15: Structure des DDO à une chaine ou mono-estérifiés (1) et des DDO à deux chaines ou di-estérifiés (2)

Des tests biologiques réalisés sur différentes lignées cellulaires ont montré une activité cytostatique de l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L., notamment sur les lignées cancéreuses Caco-2 qui sont des cellules d'adénocarcinome issues d'un patient atteint d'un cancer colique. Un premier fractionnement a ensuite permis de déterminer que cette activité est portée par les daphnanes mono-estérifiés (Figure 16). De plus, cette inhibition de croissance était spécifique des cellules Caco-2 (4). Ces daphnanes ont donc fait l'objet d'un travail de déréplication par UHPLC-MS.

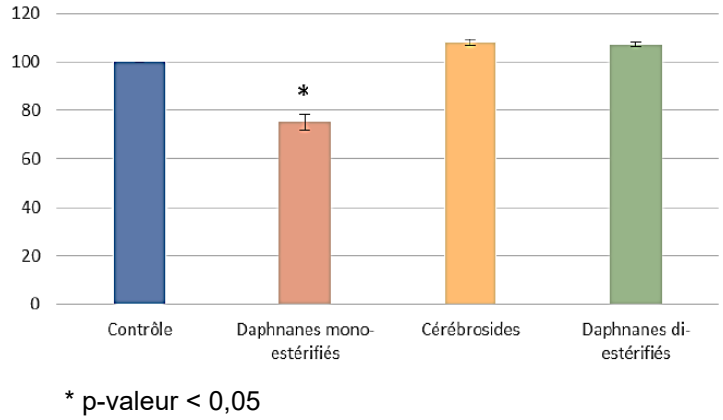
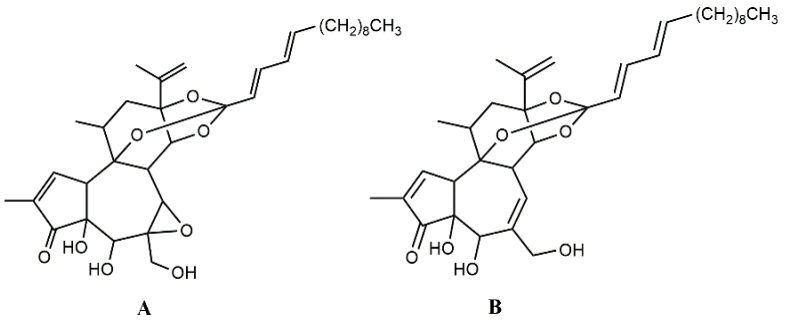


Figure 16: Test d'inhibition de croissance des fractions enrichies à 10 µg/mL sur les cellules Caco-2 (4)

L'analyse des fragmentations des daphnanes mono-estérifiés de *H. crepitans* L. a mis en avant des ions diagnostiques caractéristiques de deux types de noyaux daphnane permettant une identification rapide de la nature de ces composés. La majorité des D1 possède un noyau de type « huratoxigénine » avec les ions diagnostiques suivants : *m/z* 361 ; 343 ; 325 ; 297 et 253. Cependant, un noyau « 5-déoxy-6,7-déépoxy-didéhydro-huratoxigénine » est présent chez

certains D1 avec les ions diagnostiques suivants : *m/z* 311 ; 293 et 265 (Figure 17). La structure de sept D1 possédant un noyau « huratoxigénine » a pu être confirmée après isolement. Ainsi, trois D1 connus (huratoxine, prohuratoxine, stelleralide J) et quatre nouveaux D1 (isoprohuratoxine, 2',3'-dihydro-huratoxine, 6'-oxo-huratoxine, 4',5'-époxyhuratoxine) ont été identifiés (4).



Huratoxigénine . Ions diagnostiques : *m/z* 361, 343 ; 325, 297 et 253

5-déoxy-6,7-déépoxy-didéhydro-huratoxigénine. Ions diagnostiques : *m/z* 311, 293 et 265

Figure 17: A. Structure de la huratoxigénine. B. Structure de la 5-déoxy-6,7-déépoxy-didéhydro- huratoxigénine

La configuration absolue de cinq d'entre eux a pu être résolue (huratoxine, prohuratoxine, stelleralide J, 2',3'-dihydro-huratoxine, et 6'-oxo-huratoxine). Pour les deux autres nouveaux D1 seule la configuration relative a été élucidée (isoprohuratoxine et 4',5'-époxy-huratoxine) (4). Les différents D1 identifiés au cours de ces travaux sont regroupés dans le Tableau 2.

Tableau 2: Daphnanes mono estérifiés du latex de *Hura crepitans* L. (4)

Nom	**[M + H] $^+$**	**Formule brute**
Déoxyhuratoxine	569,3520	$C_{34}H_{48}O_7$
Pohuratoxine ou isomère	603,3580	$C_{34}H_{50}O_9$
6'-oxo-huratoxine	599,3204	$C_{34}H_{46}O_9$
5-déoxy-6,7-déépoxy-6,7-didéhydro-huratoxine	553,3571	$C_{34}H_{48}O_6$
Stelleralide J	621,3243	$C_{34}H_{52}O_{10}$
Huratoxine ou isomères	585,3487	$C_{34}H_{48}O_8$
2',3'- dihydrohuratoxine	587,3629	$C_{34}H_{50}O_8$
4',5'-époxy-huratoxine	601,3356	$C_{34}H_{48}O_9$

Des tests biologiques approfondis ont montré que la huratoxine aurait un effet inhibiteur des voies de prolifération AKT et GSK3. De plus des tests ont été réalisés afin de déterminer l'influence de la huratoxine sur les différentes isoformes de PKC. Les résultats préliminaires obtenus sur les lignées Caco-2 de CCR ont montré une activation de la PKC ζ lors de la mise en contact des cellules avec la huratoxine (4).

E. Objectifs de l'étude

Ces résultats nous ont donc encouragés à poursuivre les investigations sur le mécanisme d'action de la huratoxine, ainsi que sur celui des autres D1 présentant une structure similaire à la huratoxine.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont pour objectif d'élucider le mécanisme d'action de la huratoxine sur les lignées cellulaires cancéreuses de cancer colorectal, en particulier l'effet de cette molécule sur la protéine kinase C ζ. Puis, dans un deuxième temps, d'isoler d'autres daphnanes mono estérifiés connus et originaux afin de tester leur activité cytostatique.

III. Matériels et méthodes

A. Appareillages

1. Isolement des composés d'intérêts

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

Le système de CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) semi préparative utilisé lors de ses travaux était composé d'une CLHP (HITACHI LaChrom MERCK®, Saint Quentin Fallavier France), 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 diode LaChrom L-7455. Le système était piloté par le logiciel D-7000 HSM. Les colonnes utilisées étaient soit une colonne Luna C18, 5µm, 10 x 250 mm, 100Å (Phenomenex®, Le Pecq, France), soit une colonne Kinetex C18, 5µm, 10 x 250 mm, 100Å (Phenomenex®, Le Pecq, France).
Des étapes de purification avaient nécessité l'utilisation d'un chromatographe flash (Spot flash system, Armen Instrument®, Saint-Avé France) avec une colonne RS 80 C18 (CHROMABOND® Flash, MACHEREY-NAGEL, Hoerdt France).

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

Tous les solvants utilisés étaient des solvants de qualité CLHP (Fisher Chemical™, Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific™, Illkirch France).

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_{254}, Merck®, Darmstadt Allemagne) ; le solvant utilisé pour la migration était un mélange de toluène/ AcOEt/ acide formique 50/50/1 (v/v/v) de qualité CLHP (Fisher Chemical™, Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific™, Illkirch France).

Une double révélation a été effectuée, sous UV à 254 nm dans un premier temps puis après pulvérisation de vanilline sulfurique.

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. Trois techniques d'analyses ont été réalisées selon l'étape de purification.

Les analyses ont été réalisées avec une UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific™, Illkirch France) et un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific™, Illkirch France) équipé d'une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les acquisitions ont été réalisées en mode positif. Pour les deux 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.

Pour les fractions EC47.J et EC47.J1 à EC47.J7 le gradient de solvants a été réalisé comme suit (gradient 3) : une augmentation de 60 à 70 % de B de 0 à 25 minutes, puis une augmentation jusqu'à 100% de B de 25 à 27 minutes, et enfin un plateau à 100% de B jusqu'à 30 minutes.

Le logiciel de traitement de données utilisé pour l'analyse des spectres de masse et des chromatogrammes ioniques était LCQ Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific™, Illkirch France).

4. Analyse RMN des produits purs

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse sur des appareils de type Bruker Avance 300® ou Bruker Avance 500® équipé d'une cryosonde Prodigy.

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

Les échantillons ont été solubilisés dans du chloroforme ou du méthanol deutéré (Eurisotop®, Cambridge Isotope Laboratories Inc, Saint-Aubin France).

B. Obtention de l'extrait brut du latex de *Hura crepitans* L.

La collecte de latex de *H. crepitans* L. 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 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. 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 18).

Figure 18: Photographies de la récolte du latex de *Hura crepitans* L.(4)

Le latex a ensuite été lyophilisé au Pérou avec un lyophilisateur LABCONCO FREEZONE 12®. Le lyophilisat obtenu a ensuite été extrait à froid dans de l'éthanol pour obtenir un extrait brut.

C. Isolement de la huratoxine à partir d'une fraction méthanolique (MT252.6) d'un extrait éthanolique du latex de *Hura crepitans* L.

La fraction éthanolique MT252.6 (8 g), obtenue par un précédent fractionnement de l'extrait brut réalisé par Manon Trinel, a tout d'abord été dissoute dans du cyclohexane. Le surnageant a été récupéré et séché à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Une CLMP a ensuite été réalisée sur le surnageant obtenu précédemment. La colonne a été remplie avec 80 g de silice non greffée puis conditionnée avec du cyclohexane (C_6H_{12}). Le dépôt solide a ensuite été réalisé en couche homogène. Le conditionnement et l'élution ont été réalisés avec un débit de 90 mL/min et une pression de 1,9 bar.
L'élution at été réalisée comme suit : 2 fois 250 mL de C_6H_{12}, 2 fois 250 mL d'un mélange cyclohexane (C_6H_{12}) /dichlorométhane (CH_2Cl_2) 90/10 (v/v), 2 fois 250 mL d'un mélange C_6H_{12} / CH_2Cl_2 80/20 (v/v), 2 fois 250 mL d'un mélange C_6H_{12} /CH_2Cl_2 50/50 (v/v), 2 fois 250 mL de CH_2Cl_2, 2 fois 250 mL d'un mélange dichlorométhane (CH_2Cl_2)/méthanol (MeOH) 99/1 (v/v), 3 fois 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/MeOH 97/3 (v/v), 2 fois 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/MeOH 95/5 (v/v), 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/MeOH 90/10 (v/v), 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/MeOH 50/50 (v/v), puis 250 mL de MeOH.

Ainsi 20 fractions ont été recueillies (ECF1 à ECF20). Les fractions ECF14 à ECF16 ontbété regroupées pour former la fraction ECFA.

Cette fraction ECFA a été purifiée à l'aide d'une colonne ouverte. Une colonne en verre borosilicaté de 30 cm long et de 1,5 cm large avec un col rodé a été utilisée. Celle-ci a été remplis avec de la silice non greffée. La colonne a été conditionnée avec un mélange C_6H_{12}/ CH_2Cl_2 90/10 (v/v), puis un dépôt de la fraction ECFA dissoute dans le même mélange de solvant a été effectué sous forme liquide.
L'élution a été réalisée comme suit : C_6H_{12}/CH_2Cl_2 90/10 (v/v), C_6H_{12}/CH_2Cl_2 80/20 (v/v), C_6H_{12}/CH_2Cl_2 50/50 (v/v), CH_2Cl_2, CH_2Cl_2/MeOH 99,5/0,5 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 99/1 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 98,5/1,5 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 98/2 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 97,5/2,5 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 97/3 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 95/5 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 90/10 (v/v), CH_2Cl_2/MeOH 80/20 (v/v) et enfin CH_2Cl_2/MeOH 50/50 (v/v). Le volume de solvants utilisé à chaque étape d'élution était de 50 mL.
Les fractions ont été récupérées dans des tubes à hémolyse de 5 mL. Ainsi 108 fractions ont été obtenues (ECFA.1 à ECFA.108). Les fractions ECFA.60 à ECFA.62 ont été regroupées pour former la fraction ECFB.

Puis, une SPE a été réalisée sur la fraction ECFB avec une colonne Strata C18-E de 1 g (Phenomenex®, Le Pecq, France), conditionnée avec un mélange eau (H_2O) /acétonitrile (MeCN) 90/10 (v/v) puis un dépôt solide a été réalisé.
L'élution a été réalisée comme suit : H_2O/MeCN 90/10 (v/v), puis une augmentation de 5% de MeCN jusqu'à 100% de MeCN. Le volume de solvants utilisé à chaque étape d'élution était de 5 mL.
Ainsi 19 fractions ont été recueillies (ECFB.1 à ECFB.19). Les fractions ECFB.14 à ECFB.18 ont été regroupées pour former la fraction ECFG.

La purification de la fraction ECFG a été réalisée par CLHP semi-préparative. La colonne utilisée était une colonne Luna C18 éluée avec un débit de 3 mL/min et une pression de 60 bar. Les solvants utilisés étaient de l'H_2O milliQ (A) et du MeCN (B).
Le gradient de solvants a été réalisé comme suit : 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 33 minutes, puis une diminution de B à 70 % de 33 à 33,5 minutes. Et enfin un palier à 70% de B de 33,5 à 35 minutes.
10 injections de 300 µL ont été réalisées afin de traiter la totalité de la fraction ECFG dissoute dans un mélange MeCN/isopropanol (C_3H_8O) à une concentration de 2,5 mg/mL.
Les fractions ont été collectées manuellement pour obtenir 4 fractions : ECFG.1 à ECFG.4.

D. Isolement de daphnanes mono-estérifiés connus à partir d'un extrait brut du latex de *Hura crepitans* L.

Quatre CLMP successives ont été réalisées afin de traiter les 28 g d'extrait brut éthanolique du latex de *H. crepitans* L.
La colonne a été remplie avec 180 g de silice non greffée, conditionnée avec du C_6H_{12}, puis le dépôt solide a été réalisé en couche homogène. L'élution et le conditionnement ont été réalisés avec un débit de 30 mL/min et une pression de 1,2 bar.
L'élution a été réalisé comme suit : 2 fois 250 mL de C_6H_{12}, 3 fois 250 mL d'un mélange C_6H_{12}/CH_2Cl_2 50/50 (v/v), 3 fois 250 mL de CH_2Cl_2, 3 fois 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/acétate d'éthyle (AcOEt) 50/50 (v/v), 3 fois 250 mL de AcOEt, 2 fois 250 mL d'un mélange AcOEt/MeOH 50/50 (v/v) et enfin 2 fois 250 mL de MeOH.
Ainsi 18 fractions ont été récupérées à chaque fois (EC33.1 à EC33.18 ; EC35.1 à EC35.18 ; EC38.1 à EC38.18 ; EC39.1 à EC39.18). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions 1 à 9 (EC33.A), fractions 10 (EC33.B), fractions 11 à 15 (EC33.C), fractions 16 et 17 (EC33.D), fractions 18 (EC33.E).

Une CLMP a ensuite été réalisée sur la fraction EC33.B afin d'isoler les D1 présents.
La colonne a été remplie avec 180 g de silice non greffée puis conditionnée avec du CH_2Cl_2.
Le dépôt solide a ensuite été réalisé en couche homogène. L'élution et le conditionnement ont été réalisés avec un débit de 30 mL/min et une pression de 1,2 bar.
L'élution a été réalisé comme suit : 3 fois 250 mL de CH_2Cl_2, 3 fois 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/AcOEt 80/20 (v/v), 3 fois 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/AcOEt 50/50 (v/v), 2 fois 250 mL de AcOEt et enfin 2 fois 250 mL de MeOH.
Ainsi 13 fractions ont été récupérées (EC33.B1 à EC33.B13). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions 1 à 4 (EC42.A), fractions 5 et 6 (EC42.B), fractions 7 et 8 (EC42.C), fractions 9 à 13 (EC42.D).

De la même manière que précédemment deux CLMP successives ont été réalisées sur la fraction EC33.D afin d'isoler les D1 présents.
La colonne a été remplie avec 180 g de silice non greffée puis conditionnée avec du CH_2Cl_2. Le dépôt solide a ensuite été réalisé en couche homogène. L'élution et le conditionnement ont été réalisés avec un débit de 30 mL/min et une pression de 1,2 bar.
L'élution a été réalisée comme suit : 2 fois 250 mL de CH_2Cl_2, 2 fois 250 mL d'un mélange CH_2Cl_2/AcOEt 50/50 (v/v), 2 fois 250 mL de 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 250 mL de MeOH.
Ainsi 14 fractions ont été récupérées à chaque fois (EC33.D1 à EC33.D14). Les fractions ont été regroupées comme suit : fractions 1 à 4 (EC41.A), fractions 5 à 8 (EC41.B), fractions 9 à 12 (EC41.C), fractions 13 et 14 (EC41.D).

Les fractions EC33.C, EC41.B et EC42.D ont été regroupées pour former la fraction EC33.C finale. Puis, trois séparations successives ont été réalisées sur cette fraction à l'aide d'un chromatographe flash.
L'élution et le conditionnement ont été réalisés avec un débit de 60 mL/min et une pression de 14 bar. Les solvants utilisés étaient de l'eau distillée (A) et du MeCN (B).
Le gradient de solvants a été réalisé comme suit : 50% de B à 0 minutes puis une augmentation progressive du pourcentage de B jusqu'à 100% de B à 60 minutes. La collecte a été réalisée dans des tubes avec 10 mL dans chaque tube.
Ainsi 360 tubes ont été collectés et ensuite regroupés en 12 fractions (EC47.A à EC47.L).

La purification de la fraction EC47.G a été réalisée par CLHP semi préparative. La colonne utilisée était une colonne Luna C18 éluée avec un débit de 3 mL/min et une pression de 69 bar. Les solvants utilisés étaient de l'eau milliQ (A) et du MeCN (B).
Le gradient de solvants a été réalisé comme suit : trente-cinq minutes de plateau avec 70% de B puis de 35 à 37 minutes une augmentation jusqu'à 100% de B. Et enfin un plateau à 100% de B de 37 à 40 minutes.
75 injections de 300 µL ont été réalisées afin de traiter la fraction EC47.G dissoute dans du MeCN à une concentration de 5 mg/mL.
Les fractions ont été collectées manuellement pour obtenir 4 fractions : EC47.G1 à EC47.G4.

La purification de la fraction EC47.J a aussi été réalisée par CLHP semi préparative. La colonne utilisée était une colonne Luna C18 éluée avec un débit de 3 mL/min et une pression de 53 bar. Les solvants utilisés étaient de l'eau milliQ (A) et du MeCN (B).
Le gradient de solvants a été réalisé comme suit : quinze minutes de plateau avec 80% de B puis de 15 à 25 minutes une augmentation jusqu'à 100% de B. Et enfin un plateau à 100% de B de 25 à 40 minutes.
58 injections de 300 µL ont été réalisées afin de traiter une partie de la fraction EC47.J dissoute dans du MeCN à une concentration de 10 mg/mL.
Les fractions ont été collectées manuellement pour obtenir 7 fractions : EC47.J1 à EC47.J7.

La fraction EC47.J6 a ensuite été purifiée à l'aide d'une colonne ouverte. Une colonne en verre borosilicaté de 30 cm long et de 1.5 cm large avec un col rodé a été utilisée. Celle-ci a été remplie avec de la silice non greffée de porosité 15-40 µm. La colonne a été conditionnée avec du toluène, puis un dépôt solide de la fraction EC47.J6 a été effectué.
L'élution a été réalisée comme suit : 50 mL de Toluène (C_7H_8), 100 mL de C_7H_8/MeCN 90/10 (v/v), 50 mL de C_7H_8/MeCN 85/15 (v/v), 50 mL de C_7H_8/MeCN 80/20 (v/v), 100 mL de C_7H_8/MeCN 70/30 (v/v), 150 mL de C_7H_8/MeCN 65/35 (v/v), 50 mL de C_7H_8/MeCN 60/40 (v/v), 50 mL de C_7H_8/MeCN 55/45 (v/v), 50 mL de C_7H_8/MeCN 50/50 (v/v) et enfin 50 mL de MeOH.
Les fractions ont été récupérées dans des tubes à hémolyse de 10 mL. Ainsi 66 tubes ont été obtenus puis regroupés en 7 fractions en fonction de leur profil en CCM (EC115.A à EC115.G).

E. Isolement d'un daphnane mono estérifié original D1. D

La fraction EC47.E a été obtenue comme expliqué dans le paragraphe précédent.
Celle-ci a ensuite été purifiée par CLHP semi-préparative. La colonne utilisée était une colonne Kinetex C18 éluée avec un débit de 3 mL/min. Les solvants utilisés étaient de l'eau milliQ (A) et du MeCN (B).
Le gradient de solvants a été réalisé comme suit : deux minutes de plateau avec 60% de B puis de 2 à 25 minutes une augmentation jusqu'à 70% de B.
33 injections de 300 µL ont été réalisées afin de traiter la fraction EC47.E dissoute dans un mélange MeCN/C_3H_8O à une concentration de 10 mg/mL.
Les fractions ont été collectées manuellement pour obtenir 4 fractions : EC47.E1 à EC47.E4.
La fraction EC47.E3 a ensuite subi une autre étape de purification par CLHP préparative à la

plateforme de chromatographie de l'Institut de Chimie de Toulouse (PCRIT) de l'Université Paul Sabatier avec un système CLHP préparative composée d'une CLHP (Water™, Guyancourt France), d'un passeur automatique d'échantillon 2767, d'un module de pompe 2545, et d'un détecteur UV-Visible 2489. Le système était piloté par le logiciel Mass Lynx. La colonne utilisée était une colonne CHIRALPAK® IB 5µm, 20 x 250 mm avec un débit de 18 mL/min. L'élution a été réalisée en mode isocratique pendant 30 minutes avec 60 % d'eau acidifiée avec 0,1% d'acide formique et 40% de MeCN modifié avec 0,1% d'acide formique.

IV. Résultats et discussion

Afin d'isoler des daphnanes monoestérifié de *H. crepitans* L., une première étape de fractionnement a été réalisée sur l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L. afin d'obtenir une fraction enrichie en D1. Plusieurs CLMP (Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression) successives en phase normale ont été réalisées afin de traiter les 28 g d'extrait éthanolique du latex de *H. crepitans* L. L'analyse par UHPLC-MS des cinq fractions obtenues a révélé que plusieurs fractions contenaient des D1. En effet, la fraction EC33.C était enrichie en D1, tandis que les fractions EC33.B et EC33.D contenaient respectivement un mélange de D1 et de D2 ou un mélange de D1 et de cérébrosides. Ces dernières fractions ont donc subi une CLMP supplémentaire en phase normale et toutes les fractions contenant des D1 ont été regroupées pour donner 4,4 g d'une fraction enrichie en D1 (EC33.C).

A. Déréplication d'une fraction enrichie en D1 (EC33.C)

Une analyse déréplicative par UHPLC-MS-HRMS de cette fraction a été réalisée avec une source d'ionisation de type APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) en mode positif. Le gradient utilisé est décrit dans le paragraphe A.3 de la partie « Matériels et Méthodes » (Gradient 2). L'analyse générale du chromatogramme en Full MS APCI POS (Figure 19) a permis de dénombrer une quarantaine de composés.

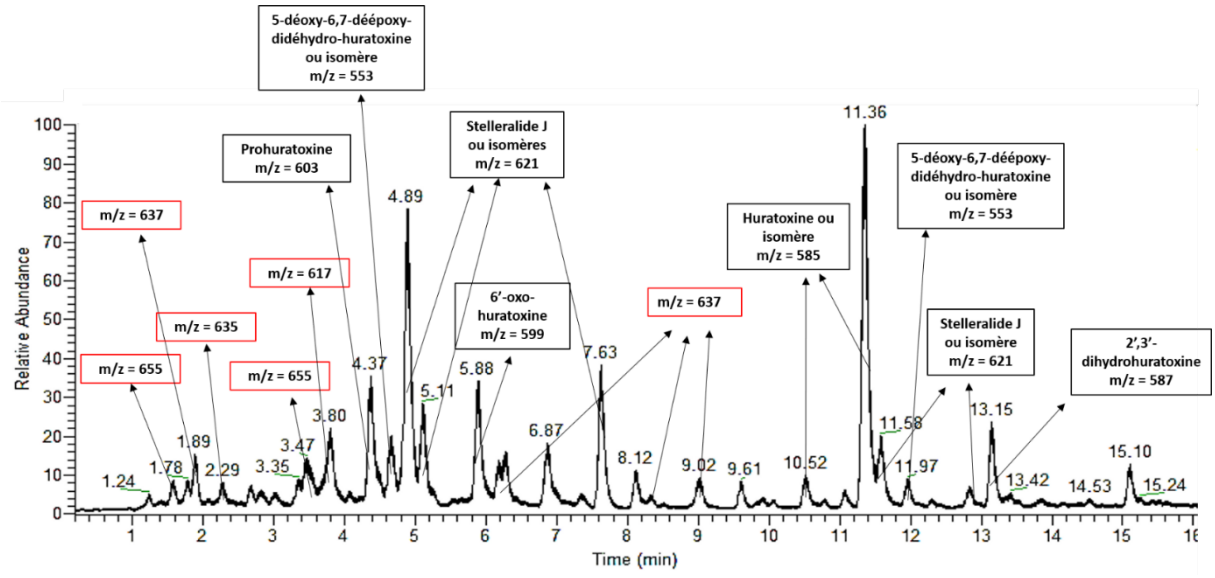


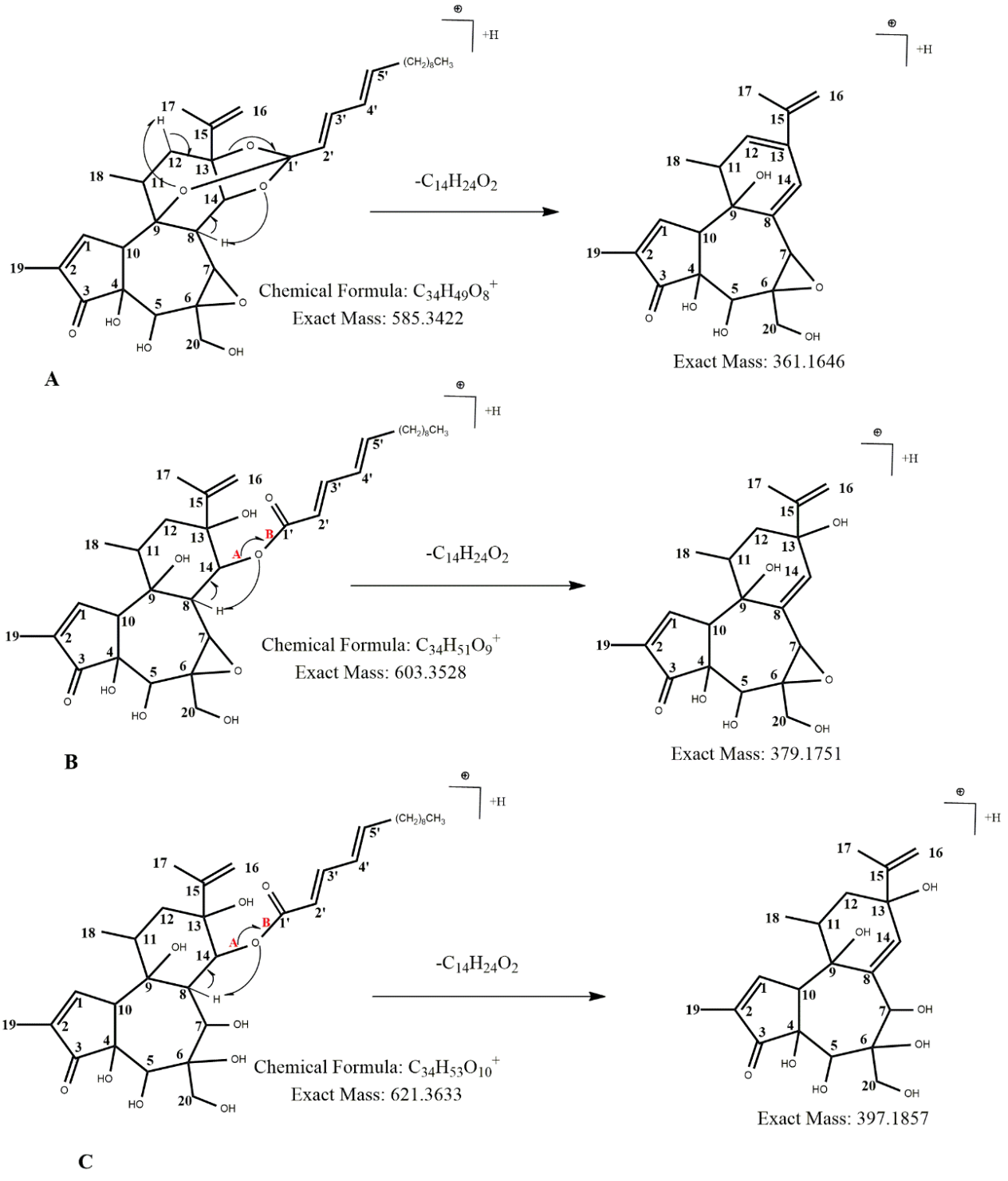
Figure 19: Chromatogramme UHPLC-APCI-MS de la fraction EC33.C en mode positif

Sur la base des $[M+H]^+$ et des ions diagnostiques identifiés précédemment (Figure 17) une vingtaine de daphnanes a été mise en évidence dans cette fraction. L'identification de douze de ces D1 a pu être proposée grâce aux travaux de déréplication et d'isolement effectués précédemment (prohuratoxine, 5-déoxy-6,7déépoxy-didéhydro-huratoxine et isomère, stelleralide J et isomères, 6'-oxo-huratoxine, huratoxine et isomère, 2'-3'dihydrohuratoxine) (4) (Tableau 3).

L'analyse détaillée des spectres MS/MS obtenus avec un mode de fragmentation CID (Collision Induced Dissociation) a mis en évidence des ions diagnostiques complémentaires caractéristiques de deux autres types de génine (Tableau 3).

En observant les spectres de fragmentations des daphnanes connus, nous pouvons formuler des hypothèses structurales. On remarque, en effet, la présence d'un fragment à *m/z* 379 pour les daphnanes contenant un ester tels que la prohuratoxine, contrairement à ceux contenant un orthoester tels que la huratoxine. La coupure de la chaine latérale orthoestérifiée se fait via un double réarrangement de Mc Lafferty et aboutit à un fragment à *m/z* 361 comportant quatre hydroxyles (4). En effet, dans ce cas les atomes d'oxygène en 13 et 14 sont impliqués dans la formation de l'orthoester et partent avec la chaine latérale. Dans le cas d'une molécule contenant un ester en position 14, l'hydroxyle en 13 est libre : la coupure de la chaine latérale au niveau de la liaison A (Figure 20) conduit donc à un fragment à cinq hydroxyles, dont l'hydroxyle en 13, expliquant la présence de l'ion à *m/z* 379.

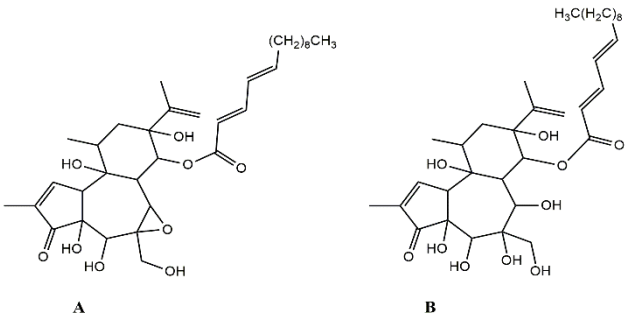
De la même manière on note un fragment supplémentaire à *m/z* 397 pour les molécules avec un diol à la place de l'époxyde sur le cycle B, tel que le stelleralide J. En effet, dans ce cas la chaine latérale est également coupée au niveau de la liaison A et la présence de deux hydroxyles à la place de l'époxyde sur le cycle B aboutit à ce fragment avec 18 uma (unité de masse atomique) supplémentaires (Figure 20).



*Les masses exactes indiquées sont obtenues par le logiciel Chem Draw

Figure 20: A. Proposition d'un schéma de fragmentation pour le noyau "huratoxigénine". B. Proposition d'un schéma de fragmentation pour le noyau prohuratoxine. C. Proposition d'un schéma de fragmentation pour le noyau stelleralide J

Les fragments caractéristiques de ces types de noyaux sont donc ceux de la « huratoxigénine » avec un ion supplémentaire à *m/z* 379 pour le noyau prohuratoxine et avec deux ions supplémentaires pour le noyau stelleralide J à *m/z* 379 et 397 (Figure 21).



Noyau Prohuratoxine. Ions diagnostiques : *m/z* 379, 361, 343, 325, 297 et 253

Noyau Stelleralide J . Ions diagnostiques : *m/z* 397, 379, 361, 343, 325, 297 et 253

Figure 21: A. Structure du noyau Prohuratoxine. B. Structure du noyau Stelleralide J

Grace à ces ions diagnostiques ainsi qu'à l'analyse de l'ensemble des fragmentations, des structures ont pu être proposées pour quatre nouveaux daphnanes (D1.A, D1.B, D1.C, D1.D) (Figure 23, Figure 25, Annexe I, Annexe II).

Pour l'ensemble de ces D1, on remarque tout d'abord des déshydratations séquentielles à partir de l'ion parent directement dans la source (Figure 22, Figure 24). Ce phénomène a déjà été décrit pour la huratoxine (4). Ces déshydratations sont caractéristiques de la génine poly-hydroxylée. Elles ont lieu préférentiellement lorsque la formation de la double liaison résultante est conjuguée. L'ordre des déshydratations successives a donc été proposé en suivant cette hypothèse.

Le spectre de masse de la molécule D1. A présente un ion $[M+H]^+$ de *m/z* 655,3243 suggérant une formule brute de $C_{34}H_{55}O_{12}^+$.
Sur le spectre MS/MS de cet ion, on repère les fragments caractéristiques du noyau stelleralide J à *m/z* 397 et 379 (Figure 22). On suppose donc que ce D1 est sous forme d'ester et présente un diol à la place de l'époxyde sur le cycle B, et que la différence structurale est portée par la chaine latérale.

De plus, on note un autre fragment issu de l'ion moléculaire à *m/z* 415 (Figure 22) qui pourrait être issu de la perte de la chaine aliphatique avec une coupure de la liaison ester B (Figure 23) confirmant l'hypothèse d'un noyau stelleralide J.

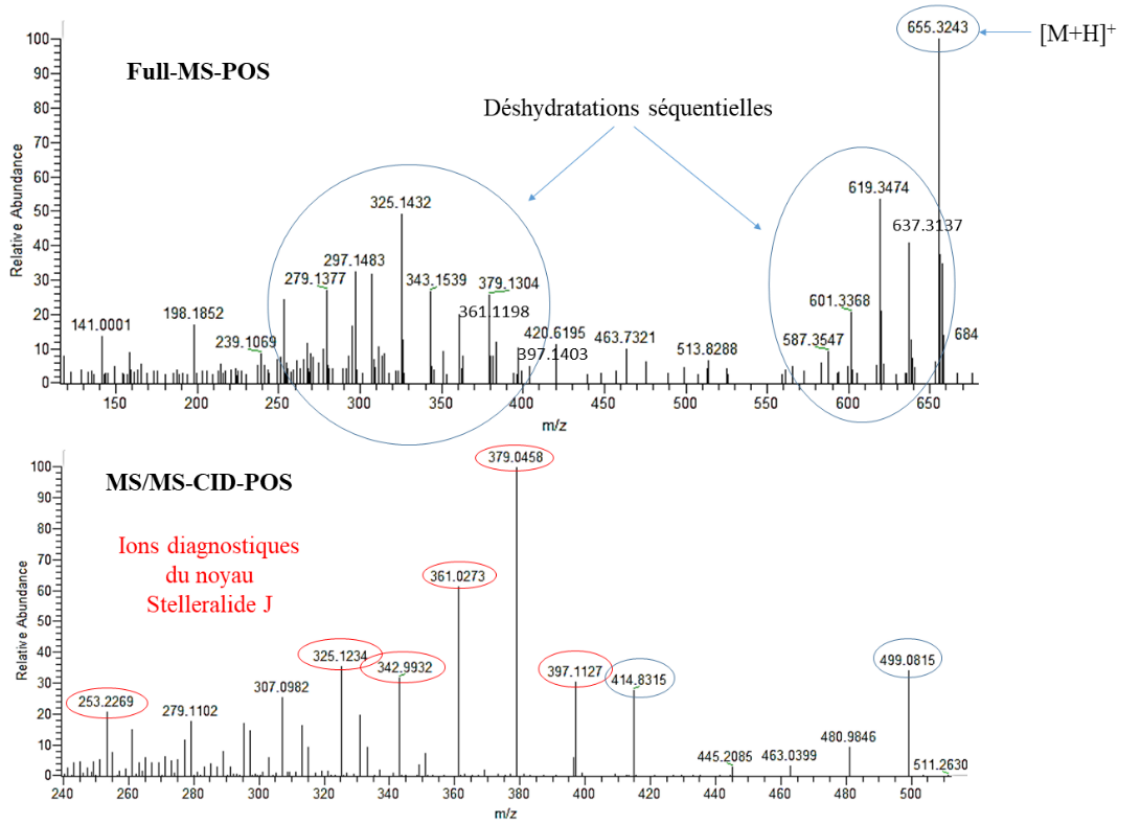
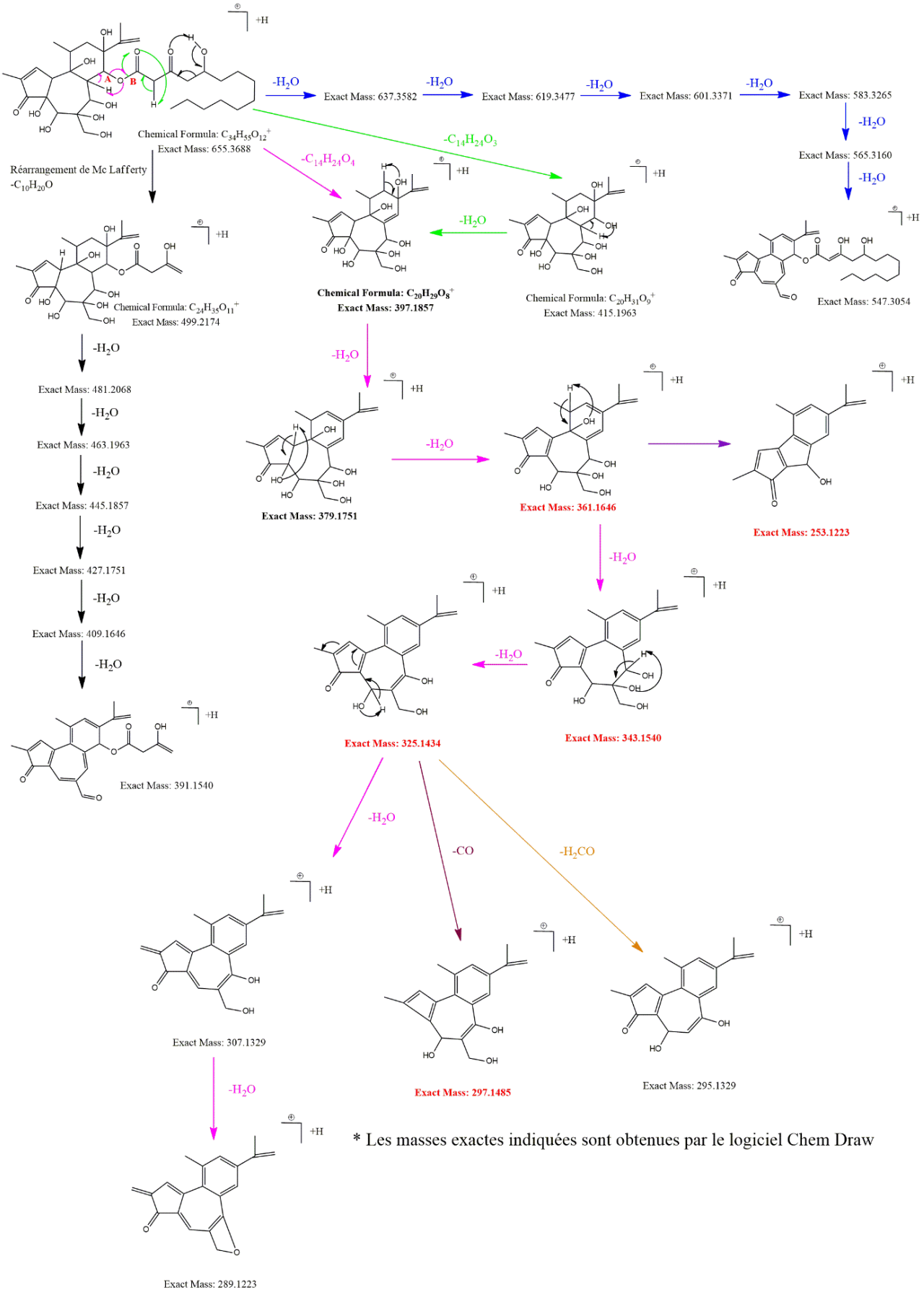


Figure 22: Spectre APCI-CID MS et MS/MS de la molécule D1. A (tr = 1,55 minutes) en mode positif

La molécule D1. A présente une différence de 34 uma par rapport au stelleralide J qui présente un $[M+H]^+$ de *m/z* à 621 avec la formule brute suivante : $C_{34}H_{53}O_{10}^+$ (Tableau 3). Il semblerait donc que cette molécule possède deux oxygènes et deux hydrogènes supplémentaires sur sa chaine latérale.

On remarque également un ion intense à *m/z* 499, issu du $[M+H]^+$, qui subit une série de déshydratations (Figure 22). Nous supposons que ce fragment provient de la perte d'une partie de la chaine latérale. Nous proposons qu'il soit le résultat d'un réarrangement de Mc Lafferty impliquant une cétone ainsi que l'hydrogène mobile d'un hydroxyle présent sur la chaine aliphatique en gamma du carbonyle. La perte de neutre correspondant à ce fragment est de 156 uma compatible avec une formule brute de $C_{10}H_{20}O$. Sur la base de ces informations nous proposons un enchainement en 3' et 5' d'une cétone et d'un hydroxyle sur la chaine permettant un réarrangement de Mc Lafferty et la perte de neutre de 156 uma (Figure 23).



* Les masses exactes indiquées sont obtenues par le logiciel Chem Draw

Figure 23: Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1. A (tr = 1, 55 minutes)

De la même manière que pour la huratoxine on remarque des pertes correspondant à des contractions de cycles pour former les ions à *m/z* 253 et 297 (37). On observe aussi une perte de H_2CO aboutissant à l'ion à *m/z* 295.
L'ensemble de ces fragmentations nous a donc permis de proposer une structure grâce à un schéma de fragmentation pour la molécule D1. A (Figure 23).

Pour les D1 originaux possédant un $[M+H]^+$ de *m/z* de 635,2970 (D1.C) et 637,3140 (D1. B), suggérant une formule brute de $C_{34}H_{53}O_{11}^+$ et $C_{34}H_{53}O_{11}^+$ respectivement, on observe la présence des ions diagnostiques du noyau stelleralide J. On peut donc supposer que ces molécules sont aussi sous forme d'ester et qu'elles présentent un diol à la place de l'époxyde sur le cycle B. La différence structurale pour ces D1 est donc également située sur la chaine latérale.
On remarque que la différence de masse entre les molécules présentant un *m/z* de 655 (D1. A) et de 637 (D1. B) est égale à 18 uma suggérant l'absence d'un oxygène et de deux hydrogènes sur la chaine.
De plus, nous ne remarquons pas de fragment intense intermédiaire entre l'ion moléculaire et la génine. Il n'y a donc pas de réarrangement de Mc Lafferty. Cette observation est cohérente avec la proposition d'une chaine latérale « mono-oxydée » qui ne permet pas d'avoir la structure nécessaire au réarrangement de Mc Lafferty.
Nous proposons donc une chaine avec une cétone en 3' et une double liaison conjuguée (Tableau 3).
La molécule D1.C présente une différence de 2 uma par rapport à la D1. B et tous les ions diagnostiques du noyau stelleralide sont présents. Nous supposons donc que cette molécule présente une double liaison supplémentaire sur sa chaine.
Les propositions de schémas de fragmentation pour ces deux D1 sont présentées en Annexe I et II.

Le spectre de masse de la molécule D1. D montre un $[M+H]^+$ avec un *m/z* de 617,3314 suggérant une formule brute de $C_{34}H_{49}O_{10}^+$.
Le spectre MS/MS de cet ion présente les ions diagnostiques du noyau prohuratoxine, en effet le fragment à *m/z* 397 est absent contrairement à celui à *m/z* 379 (Figure 24). Nous supposons donc que ce daphnane est sous forme d'ester et qu'il présente un époxyde sur le cycle B, la différence structurale avec la prohuratoxine se situant sur sa chaine latérale comme pour les autres D1 étudiés.

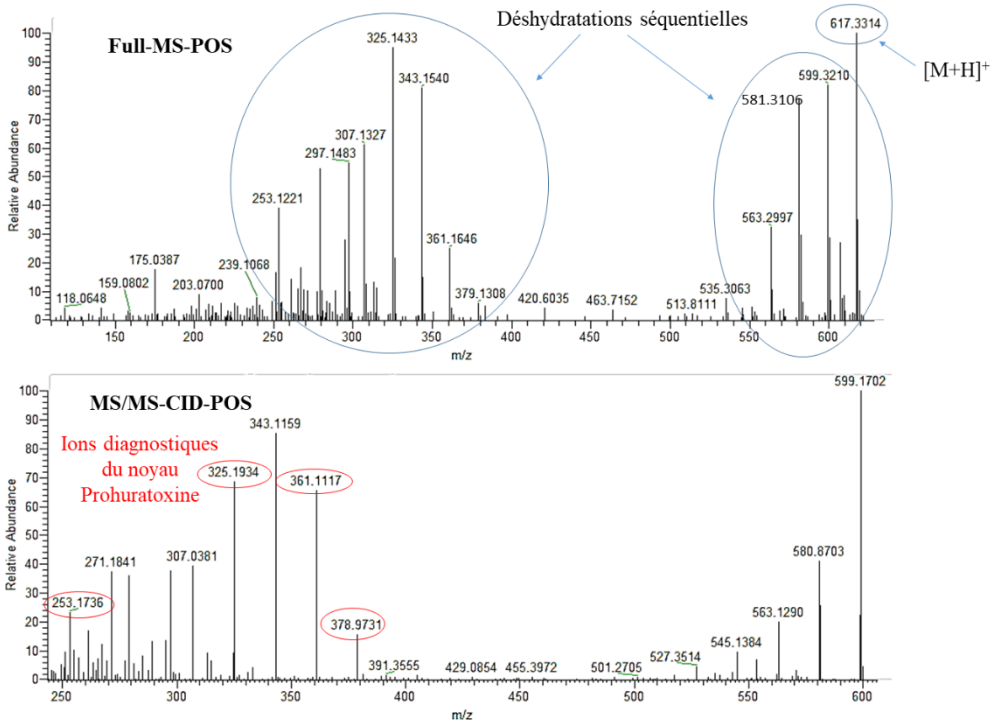
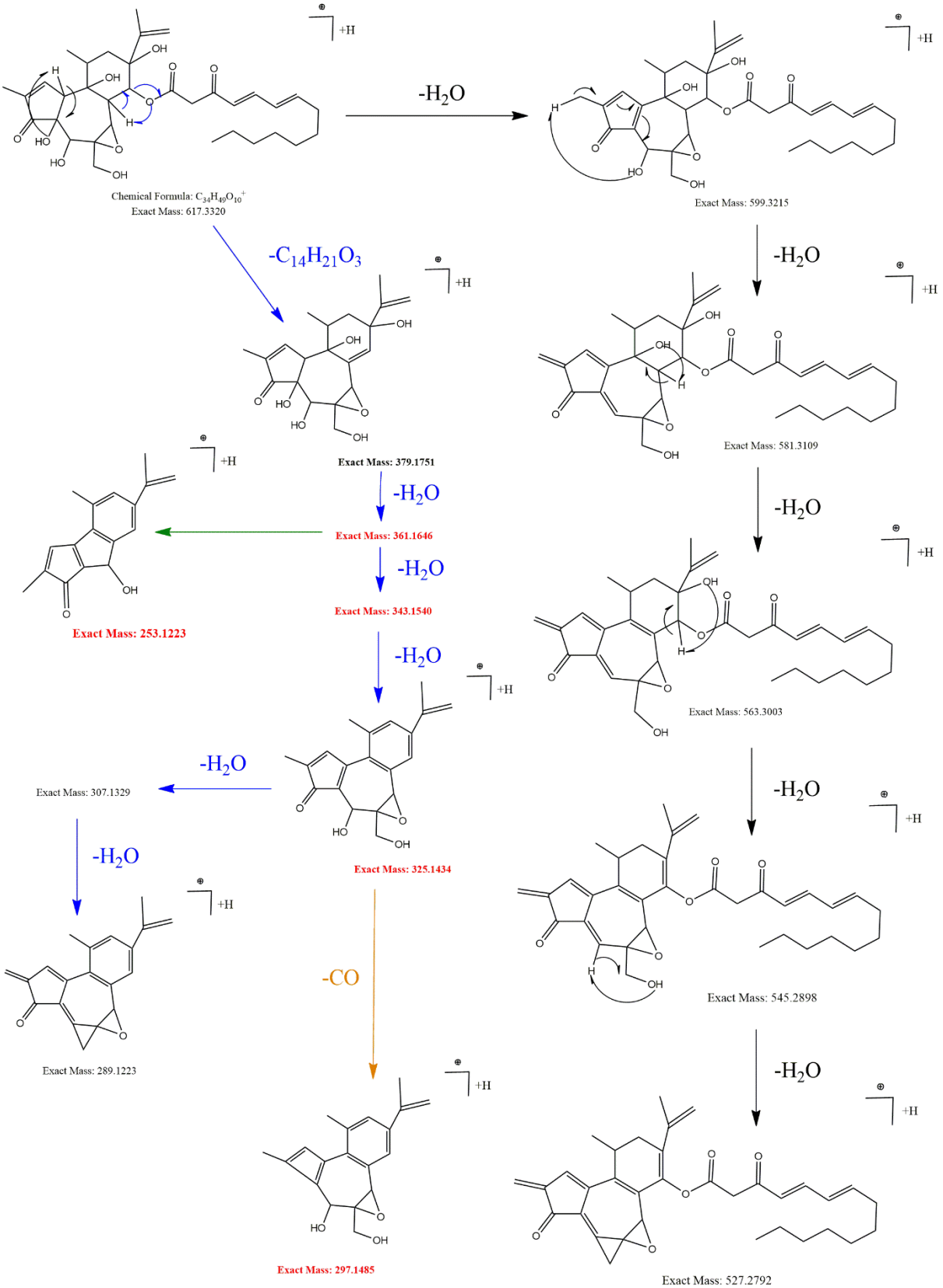


Figure 24: Spectres APCI-CID MS et MS/MS de la molécule à m/z 617 en mode positif (tr = 3,80 minutes)

Ce D1 à *m/z* 617 présente une différence de 14 uma par rapport à la prohuratoxine qui possède un $[M+H]^+$ de *m/z* 603 avec la formule brute suivante : $C_{34}H_{51}O_9^+$ (Tableau 3). Il semblerait donc que cette molécule possède un oxygène supplémentaire mais deux hydrogènes en moins sur sa chaine latérale.

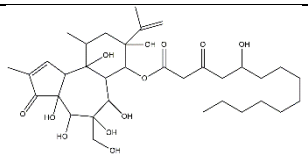
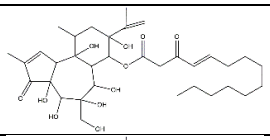
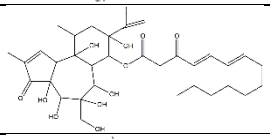
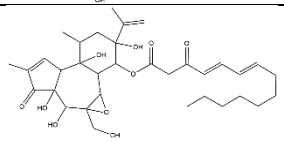
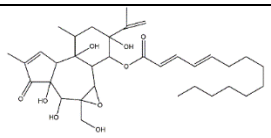
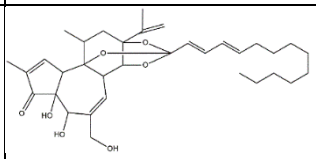
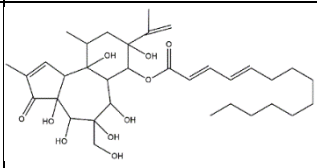
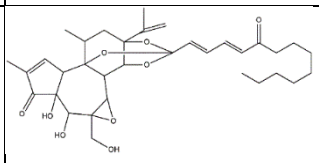
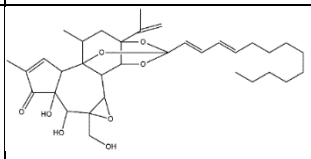
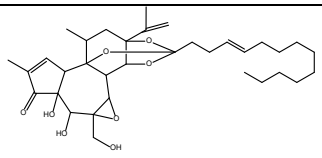
De plus, nous ne remarquons pas de fragment intense intermédiaire entre le pic correspondant l'ion moléculaire et les fragments correspondant à la génine (Figure 24) ; il n'y a donc pas de réarrangement de Mc Lafferty. Cette observation est cohérente avec la proposition d'une chaine latérale mono oxydée avec une cétone en 3' et une double liaison comme pour la molécule D1. C. (Tableau 3, Figure 25).



* Les masses exactes indiquées sont obtenues par le logiciel Chem Draw

Figure 25: Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1.D (tr = 3,80 minutes)

Tableau 3: Tableau récapitulatif de la déréplication d'une fraction enrichie en D1 (EC33.C)

Temps de rétention (minutes)	$[M+H]^+$	Fragments	Formule brute	Structure proposée	Identification
1,55 3,47	655,3243	637 ; 619 ; 601 ; 583 ; 565 ; 547 ; 499 ; 481 ; 463 ; 445 ; 427 ; 415 ; 409 ; **397** ; 391 ; **379** ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 295 ; 289 ; **253**	$C_{34}H_{54}O_{12}$		D1. A
1,89 6,27 8,33 9,02	637,3140	619 ; 601 ; 583 ; 565 ; 547 ; **397** ; **379** ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 289 ; **253**	$C_{34}H_{52}O_{11}$		D1. B
2,28	635,2970	617 ; 599 ; 581 ; 563 ; 545 ; **397** ; **379** ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 289 ; **253**	$C_{34}H_{50}O_{11}$		D1.C
3,80	617,3314	599 ; 581 ; 563 ; 545 ; 527 ; **379** ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 289 ; **253**	$C_{34}H_{48}O_{10}$		D1. D
4,37	603,3528	567 ; 549 ; 531 ; **379** ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 279 ; 267 ; **253** ; 207	$C_{34}H_{50}O_9$		Prohuratoxine
4,65 11,95	553,3514	535 ; 329 ; **311** ; **293** ; 283 ; 267 ; **265** ; 251 ; 223 ; 207	$C_{34}H_{48}O_6$		5-déoxy-6,7-déépoxy-didéhydro-huratoxine
4,90 5,11 7,62 11,58 12,85	621,3191	603 ; 585 ; 567 ; **397** ; **379** ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 295 ; 277 ; **253** ; 207	$C_{34}H_{52}O_{10}$		Stelleralide J ou isomères
5,89	599,3207	581 ; 563 ; 545 ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 279 ; 267 ; **253** ; 207	$C_{34}H_{46}O_9$		6'-oxo-huratoxine
10,51 11,35	585,3420	567 ; 549 ; 531 ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 279 ; 267 ; **253**	$C_{34}H_{48}O_8$		Huratoxine ou isomères
13,16	587,3571	569 ; 551 ; 533 ; **361** ; **343** ; **325** ; 307 ; **297** ; 279 ; 267 ; **253**	$C_{34}H_{50}O_8$		2',3'-dihydrohuratoxine

Ce travail de déréplication a permis de confirmer l'identification de D1 dérépliqués précédemment mais aussi de mettre en évidence des D1 originaux pour lesquels nous avons pu proposer des structures sur la base des spectres MS et MS/MS.

Cependant, le mode de fragmentation CID utilisé ici ne permet pas d'avoir de la haute résolution pour les spectres MS/MS. Ce mode de fragmentation a été choisi car il permet l'obtention d'un plus grand nombre de fragments (4), contrairement au mode de fragmentation tel que l'HCD (High Energy Collisional Dissociation) qui permet l'obtention de spectres en haute résolution. Une approche combinée avec les deux types de fragmentation serait optimale afin d'avoir toutes les informations nécessaires à la déréplication. De plus, l'acquisition de spectres de fragmentation MS^3 et MS^4 serait nécessaire afin de confirmer la filiation des différents fragments.

Cependant, les structures proposées ne sont que des hypothèses. Il était donc nécessaire d'isoler ces différentes molécules afin d'en élucider la structure, ce qui a été engagé dans la suite de cette étude.

B. Isolement de daphnanes mono estérifiés de *Hura crepitans* L.

1. Isolement de daphnanes mono estérifiés connus

Un des objectifs de ce travail de recherche étant la confirmation de l'activité de la huratoxine sur la PKC ζ, nous avons cherché à l'isoler. Pour cela, nous disposions de la fraction MT252.6, issue d'un fractionnement préalable de l'extrait brut au laboratoire, fraction qui était enrichie en huratoxine mais contenait aussi des cérébrosides en grande quantité. Elle a donc subi différentes étapes de purification afin d'isoler la huratoxine.

Tout d'abord, des essais de dissolution ont été réalisés afin d'éliminer les cérébrosides de cette fraction. En effet, les cérébrosides sont des molécules beaucoup plus polaires que la huratoxine. L'hypothèse était d'utiliser un solvant très apolaire afin de solubiliser sélectivement les daphnanes. Une dissolution au cyclohexane a permis de récupérer un surnageant dans lequel une partie des cérébrosides a été éliminé.

Le surnageant a ensuite subi quatre étapes de purification : une CLMP en phase inverse, une séparation sur colonne ouverte, une SPE (Solid Phase Extraction) et une CLHP semi préparative

permettant d'obtenir 4,7 mg de huratoxine purifiée. Le résumé de ces étapes de purification est présenté en Annexe III.
La comparaison des données de RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) du proton entre cet échantillon et la huratoxine précédemment isolée au laboratoire a confirmé l'identification de la huratoxine (4).

De la même manière, trois daphnanes mono-estérifiés connus, le stelleralide J, la huratoxine et la prohuratoxine, ont été isolés à partir d'un extrait brut du latex de *H. crepitans* L. L'annexe IV présente l'arbre de purification de ces trois composés.
Dans un premier temps une fraction EC33.C enrichie en D1 a été obtenue (cf p.45). Cette fraction a été traitée par chromatographie flash en phase inverse. Douze fractions ont été obtenues.

Le suivi du fractionnement par UHPLC-MS a permis de sélectionner une fraction contenant majoritairement le stelleralide J (EC47.G) (Figure 26). Cette fraction a ensuite été purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse ce qui a permis d'obtenir 18,15 mg de stelleralide J purifié (fraction EC47.G4).

Suite au suivi UHPLC-MS des fractions EC47.A à EC47.L une partie de la fraction EC47.J a été fractionnée par CLHP semi préparative en phase inverse afin d'isoler la prohuratoxine (Figure 26). Ainsi 21,53 mg de prohuratoxine ont pu être obtenus dans deux fractions (EC47.J2 et EC47.J4).

Le suivi UHPLC-MS des fractions EC47.J1 à EC47.J6 a permis de mettre en avant une fraction contenant de la huratoxine (EC47.J6) qui semblait pure. Cependant, des cristaux étaient observables dans cette fraction ; suite à une analyse cristallographique par diffraction des rayons X ils ont pu être identifiés comme étant de l'acide palmitique. La fraction EC47.J6 a donc subi une dernière étape de purification par colonne ouverte en phase normale afin de récupérer 2,73 mg de huratoxine (EC115.D).

La comparaison des données de RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) du proton entre ces échantillons et le stelleralide J, la huratoxine et la prohuratoxine précédemment isolées au laboratoire a confirmé l'identification de ces trois molécules (4). Les spectres RMN ^{1}H de ces trois composés sont présentés en annexes V, VII, VIII et IX.

2. Isolement d'un daphnane mono estérifié original D1. D

Ensuite, nous nous sommes focalisés sur l'isolement des autres D1 présents dans le latex de *H. crepitans* L.

Tout d'abord une fraction enrichie en D1 a été obtenue (cf p.45). Cette fraction (EC33.C) a été traitée par chromatographie flash en phase inverse. Douze fractions ont été obtenues. Le suivi du fractionnement par UHPLC-MS a permis de sélectionner une fraction peu complexe (EC47.E) (Figure 26) contenant la molécule originale D1. D dérépliquée précédemment.

Cette fraction a donc été purifiée par CLHP semi préparative en phase inverse afin d'isoler ce daphnane original, permettant d'obtenir 20,7 mg de la fraction EC47.E3 *a priori* pure. L'analyse des spectres RMN ^{13}C de cette fraction nous a laissé penser que le produit obtenu était un mélange d'isomères car certains pics étaient dédoublés. Cette fraction a donc subi ensuite une CLHP préparative avec une colonne chirale afin de séparer les deux isomères. Ainsi deux fractions ont été obtenues EC99.C et EC99.D possédant une masse de 3,65 mg et 6,03 mg respectivement (Annexe IV). Leur analyse structurale est présentée dans le chapitre 4.

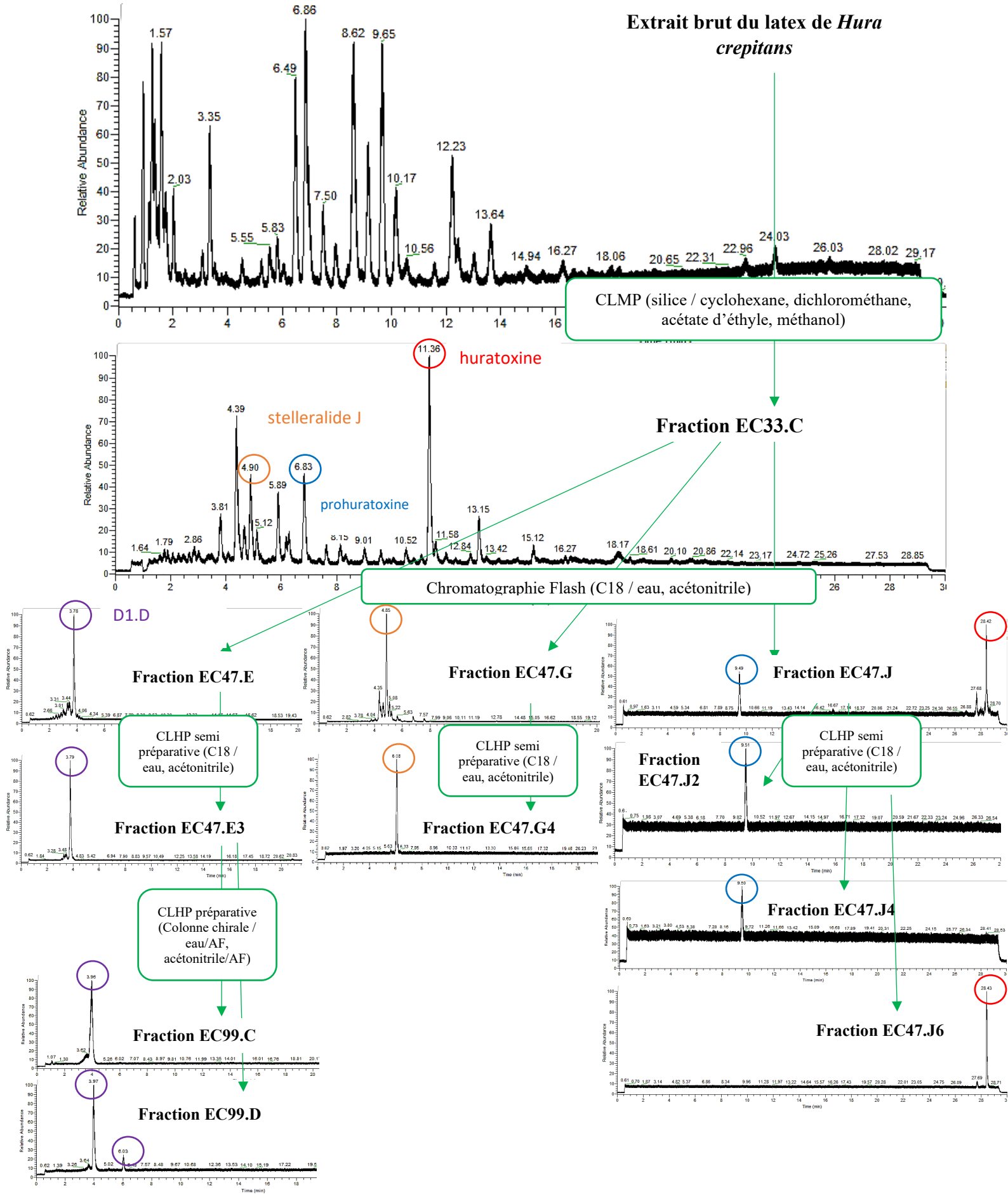


Figure 26: Chromatogrammes UHPLC-APCI-MS de suivi de purification de la molécule D1.D, du stelleralide J, de la prohuratoxine et de la huratoxine en mode positif

3. Bilan de purification

La figure 26 résume les différentes étapes de purification pour obtenir trois daphnanes monoestérifiés connus (huratoxine, prohuratoxine et stelleralide J) ainsi qu'un daphnane monoestérifié original (D1. D). On peut observer les différents chromatogrammes obtenus par UHPLC-MS au cours des étapes de purification.

L'extraction du latex lyophilisé a été réalisé ici avec de l'éthanol 96% et a abouti à un extrait brut très complexe dans lequel on a dénombré plus de quarante composés majoritaires. A partir de cet extrait il a été possible d'isoler quatre daphnanes mono estérifiés, dont un original. Cependant de nombreuses molécules sont encore présentes. En plus de celles détectées, plusieurs molécules minoritaires n'ont pas été explorées. Afin de pouvoir purifier ces molécules il serait nécessaire d'optimiser les premières étapes d'extraction et de purification. Dans cette optique il aurait été intéressant d'essayer différents solvants successifs tel que l'heptane, suivi par du dichlorométhane puis de l'éthanol à 96%. Cet enchainement de solvants pourrait permettre de séparer dès l'extraction les différentes classes de molécules contenues dans le latex grâce à leurs polarités différentes. Une autre technique envisageable serait une extraction par du CO_2 supercritique qui est très apolaire et donc adapté à nos molécules, notamment aux daphnanes di estérifiés. En faisant varier le pourcentage de méthanol mélangé au CO_2 supercritique une séparation des trois classes de molécules pourrait être possible.

Lors de l'isolement de la huratoxine à partir de l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L., l'observation de cristaux dans la fraction EC47.J6 nous a permis d'identifier de l'acide palmitique. Cette observation est cohérente avec la littérature. En effet, en 2019, des chercheurs 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 (68). 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* L. Cette découverte pose néanmoins des questions sur notre protocole de purification et de suivi par CCM et UHPLC-MS. En effet, si l'on observe les spectres RMN ^{1}H des différents daphnanes isolés (Figure 27, Figure 28, Figure 29, Annexes V, VI, VII, VIII et IX) on remarque que les intégrations des pics les plus blindés sont supérieures au nombre d'hydrogènes de la molécule isolée. Nous supposons que ce phénomène est dû à la présence d'acide gras dans nos échantillons.

Jusqu'à maintenant les suivis 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. Ces techniques ne permettent pas de détecter l'acide palmitique et donc des échantillons qui peuvent apparaitre 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 acide carboxylique en bout de chaine explique que cette molécule ne s'ionise qu'en mode négatif. Un protocole robuste de détection et d'élimination de ces acides gras doit être mis en place pour faciliter la suite des travaux sur le latex de cette plante. Les recherches effectuées dans la littérature ont permis de mettre en avant différentes techniques de détection réalisables au laboratoire. La détection par UHPLC-MS, par exemple, en mode négatif et avec une source d'ionisation de type ESI et des phases mobiles alcalinisées est possible pour détecter les acides gras saturés. Une autre possibilité pour détecter ce type de molécule est d'injecter un contre ion (sodium, lithium…) en post colonne du système UHPLC-MS afin de pouvoir détecter les adduits formés en mode d'ionisation positif (68–71). Pour une détection de routine des CCM peuvent être envisagées en utilisant de la rhodamine 6G en tant que révélateur (72). Une fois en mesure de détecter ces acides gras il pourrait être envisagé d'éliminer ces molécules dès les premières étapes de purification. Il semblerait qu'un lavage basique à pH = 9 soit la solution la plus aisée. En effet, l'acide palmitique possède un pKa de 5 et donc à ce pH toutes les molécules acides seront ionisées et donc facilement éliminables dans l'eau par partage liquide liquide. Cette étape de lavage devrait donc être envisagée dès l'obtention de l'extrait brut afin d'éliminer tous les acides gras et ainsi faciliter les futures étapes de purification.

La séparation de l'extrait brut du latex de *H. crepitans* L. en trois fractions contenant respectivement les D1, les D2 et les cérébrosides a nécessité trois étapes de CLMP. Dans la littérature, la première étape de purification se fait le plus souvent par partage liquide-liquide (73,74). Il serait donc intéressant d'utiliser une chromatographie à contre-courant afin de transposer cette technique tout en diminuant les pertes et le nombre d'étapes nécessaires. En effet, la chromatographie à contrecourant (CCC) est une technique de plus en plus utilisée pour la purification de produits naturels bioactifs (75–77). C'est une technique chromatographique sans support solide. La présence d'une phase stationnaire liquide permet de nombreux avantages par rapport à la chromatographie solide/liquide. En effet, cette technique permet d'injecter des quantités plus importantes d'échantillon car celui-ci est en contact avec la totalité de la phase stationnaire liquide tandis que dans une chromatographie solide/liquide

l'échantillon n'est en contact qu'avec la surface de la phase stationnaire. La CCC combine ainsi la sélectivité d'une chromatographie solide/liquide avec une capacité de chargement supérieure. Autre avantage, l'échantillon ne subit pas de phénomènes de sorption ce qui permet le plus souvent de préserver les propriétés des molécules telle que leur bio activité, et lors du vidage de la colonne la totalité de l'échantillon est récupéré, les pertes sont donc limitées. De plus, la CCC permet d'avoir une bonne répétabilité et une faible consommation de solvants s'il n'y a pas de fuite de phase stationnaire pendant la séparation. Une large gamme de solvants est possible pour cette technique (76–78). Les échantillons peuvent être injectés sous forme de fractions pré-purifiées ou d'extraits bruts. De plus, cette technique est assez facilement transposable à l'échelle industrielle (77,78). Parmi les chromatographies à contrecourant les deux techniques les plus utilisées sont la chromatographie à contrecourant à haute pression (HSCCC) et la chromatographie de partage centrifuge (CPC) (76,79).

Une autre méthode telle que la chromatographie en phase supercritique, avec utilisation du CO_2 comme solvant, couplée à une nanofiltration pourrait être envisagée. En effet, cette technique a déjà montré un intérêt pour la purification de produits naturels en permettant de séparer des molécules avec des masses molaires différentes (80). Dans le cas de notre extrait brut du latex de *H. crepitans* L. nous sommes dans ce cas de figure : les daphnanes mono estérifiés possèdent des masses molaires comprises entre 550 et 660 g/mol, les daphnanes di estérifiés entre 800 et 900 g/mol et les cérébrosides entre 700 et 750 g/mol (4). Cette technique pourrait donc être intéressante en première étape de purification afin de minimiser les pertes et de diminuer l'utilisation de solvants organiques.

La huratoxine est le D1 majoritaire du latex de *H. crepitans* L. En effet elle représente environ 40% des D1 ce qui rend son isolement aisé (4). On voit bien un pic majoritaire sur le chromatogramme de la fraction EC33.C à tr = 11,36 minutes qui correspond probablement à la huratoxine (Figure 26). En revanche, les autres D1 sont présents en faible proportion. De plus, sur le chromatogramme de la fraction EC33.C on observe un grand nombre de pics en début d'élution (Figure 26). On a donc beaucoup de D1 de polarités proches et de nombreux isomères ce qui rend leur isolement d'autant plus difficile. De ce fait, les rendements d'extraction pour les différents daphnanes isolés sont très faibles, et une optimisation du protocole de purification sera nécessaire pour la poursuite des recherches sur cette plante.

Un phénomène inattendu est apparu lors de l'analyse de la prohuratoxine et de la molécule D1. D. En effet, lors de la purification par CLHP semi préparative de la fraction EC47.J deux pics avec des temps de rétention significativement différents ont été collectés dans deux fractions : EC47.J2 et EC47.J4. L'analyse UHPLC-MS a permis d'identifier les deux fractions comme de la prohuratoxine avec un *m/z* de 603. Nous avons supposé que nous étions en présence de deux isomères de la prohuratoxine. Cependant, lors de l'analyse RMN de ces deux molécules nous nous sommes aperçus que les spectres RMN ^{1}H de ces deux molécules étaient exactement superposables. L'hypothèse de deux isomères est donc écartée. Ce phénomène s'est aussi produit pour la molécule D1. D, avec des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C superposables pour les fractions EC99.C et EC99.D malgré une séparation par CLHP préparative sur colonne chirale. Il semblerait que ces molécules subissent un réarrangement lorsqu'elles sont en solution ou en présence d'une phase stationnaire ce qui expliquerait les spectres RMN identiques malgré la séparation aisée sur colonne. L'injection de ces échantillons dans une chaine CLHP avec un détecteur RMN permettrait de vérifier notre hypothèse et de localiser ce réarrangement.

4. Analyse par Résonnance Magnétique Nucléaire de la molécule D1. D

Dans la littérature aucune molécule de type daphnane possédant une formule brute de $C_{34}H_{48}O_{10}$ n'a été décrite, indiquant l'originalité de ce composé. Cependant, l'analyse des spectres RMN de la fraction EC99.D et la comparaison avec les données de la littérature a permis d'observer que tous les signaux caractéristiques de la huratoxigénine sont présents dans les spectres RMN de la molécule D1. D, et il a été possible d'identifier en particulier le noyau tricyclique de la huratoxine (4,40,45,46) (Figure 27). De plus, on remarque le carbone quaternaire à 117,3 ppm caractéristique du C-1' de la forme orthoester. Cette molécule semble donc présenter un noyau huratoxigénine.

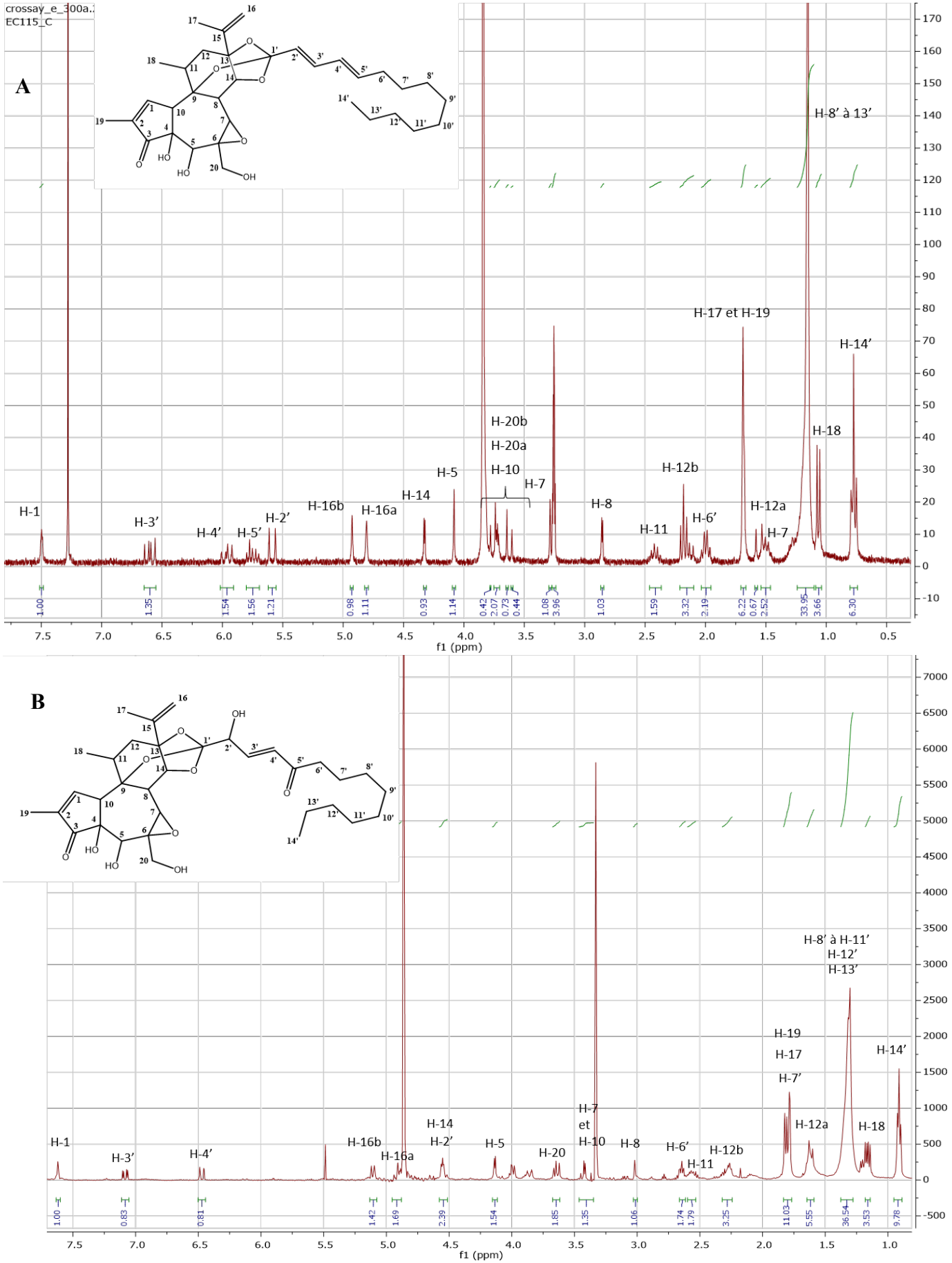


Figure 27 : A: Spectre ^{1}H de la huratoxine; B: Spectre ^{1}H de la molécule D1. D

En revanche, on remarque plusieurs différences au niveau des signaux des carbones de la chaine latérale (Figure 28) :

- Un carbone quaternaire supplémentaire à 200,8 ppm pouvant correspondre à un carbonyle
- Deux carbones à 141,5 et 130,9 ppm correspondant à des carbones éthyléniques
- Un carbone ternaire à 72,0 ppm correspondant à un carbone lié à un hydroxyle.

Il semble donc que cette molécule possède un carbonyle, un hydroxyle et une double liaison sur sa chaine latérale.

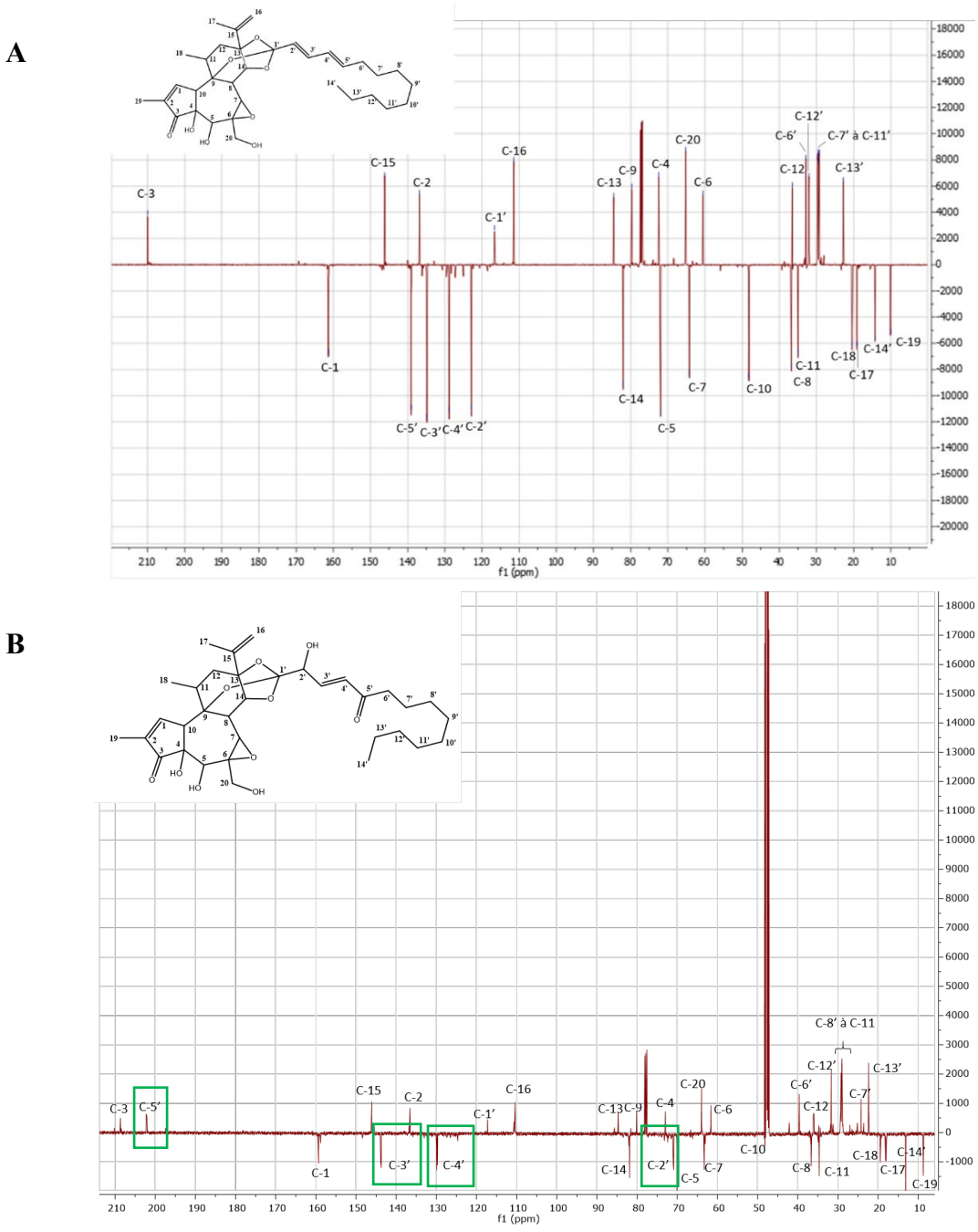


Figure 28: A: Spectre ^{13}C de la huratoxine (4); B: Spectre ^{13}C de la molécule D1. D

Grace aux corrélations observées sur les spectres HSQC, HMBC, COSY et NOESY la position des différents carbones sur la chaine a pu être déterminée (Figure 29).

- L'analyse du spectre HMBC montre que C-1' corrèle avec le H-14 à 4,47 ppm ainsi qu'avec un H à 4,58 ppm suggérant un CH en C-2'. L'analyse du spectre HSQC montre que le proton à 4,58 ppm est porté par un C à 72,0 ppm. Ces informations suggèrent la présence d'un CH portant un hydroxyle en C-2'.
- Sur le spectre HMBC on voit que le C à 72,0 ppm corrèle avec un proton à 6,96 ppm porté par un carbone à 141,5 ppm suggérant un CH impliqué dans une double liaison en C-3'.
- Ce carbone à 141,5 ppm corrèle avec le H-2' à 4,58 ppm qui lui-même est corrélé avec un proton à 6,96 ppm porté par un C à 130,9 ppm ce qui confirme la présence d'une double liaison entre le C-3' et le C-4'.
- Les protons H-3' et H-4' présentent une corrélation en HMBC avec le carbonyle vicinal C5' à 200,8 ppm. Nous proposons que le C-5' soit un carbone à 200,8 ppm impliqué dans une liaison carbonylée.

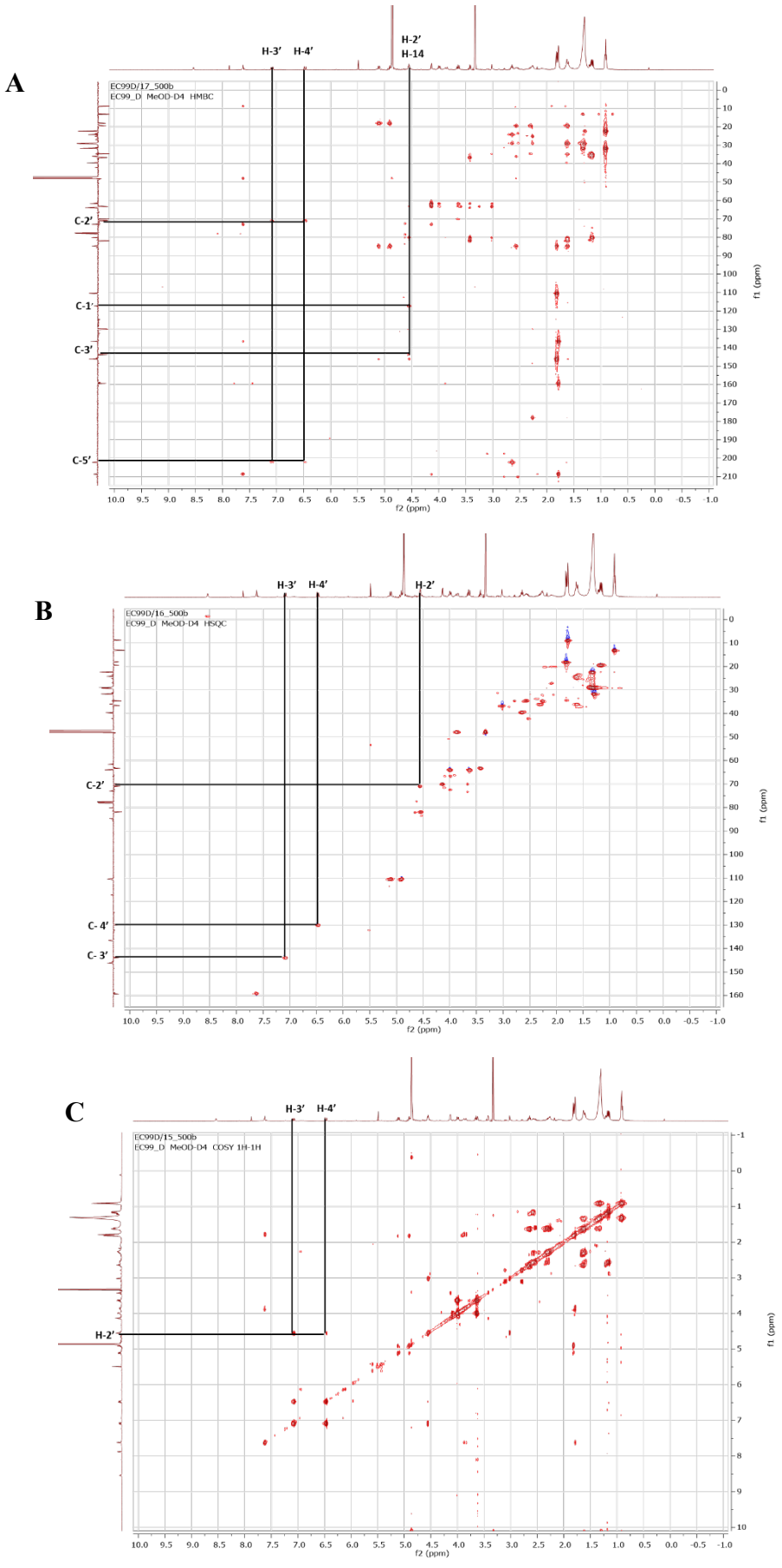


Figure 29 : Spectres RMN 2D de la fraction EC99.D; A: Spectre HMBC; B: Spectre HSQC; C: Spectre COSY

Ainsi l'ensemble des données spectrales nous permet d'identifier cette molécule comme un nouveau dérivé de la huratoxine possédant un hydroxyle en 2', une insaturation entre les C-3' et C-4' ainsi qu'une cétone en 5' (Figure 30).

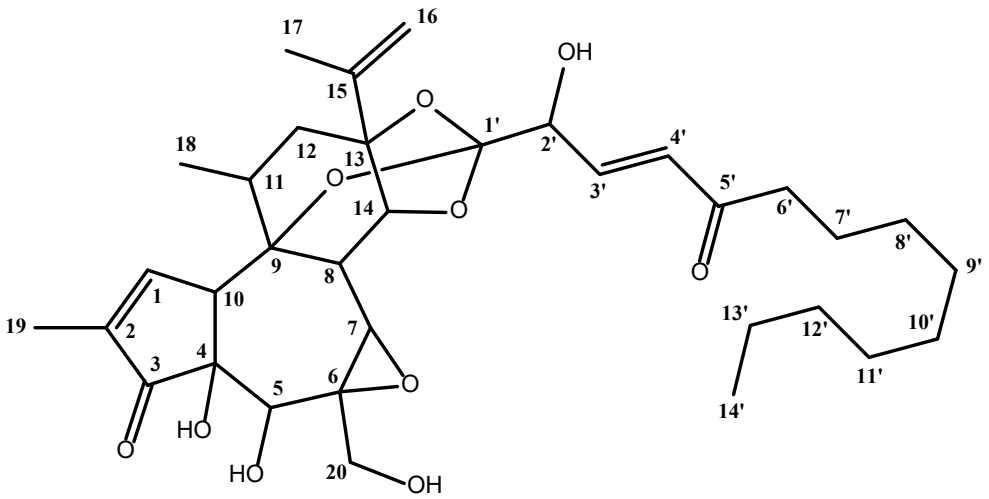


Figure 30: Structure plane de la molécule D1. D

Notre interprétation des ions diagnostiques obtenus en fragmentation MS/MS était donc erronée. En effet, la molécule D1. D possède une chaine orthoestérifiée et un époxyde sur le cycle B comme la huratoxine, contrairement à notre hypothèse d'une chaine estérifiée comme la prohuratoxine.

Il semblerait donc que l'ion à *m/z* 379 puisse aussi provenir d'une coupure partielle du dioxolane de l'orthoester. La chaine latérale serait ainsi coupée mais l'un des oxygènes impliqués dans l'orthoester resterait sur le noyau daphnane pour ce fragment, qui ne peut donc pas être considéré comme diagnostique des D1 esters.

V. Conclusion et perspectives

Ce travail avait donc pour objectif de réaliser une investigation phytochimique des daphnanes contenus dans le latex de *H. crepitans* L. dans le but de découvrir de nouvelles molécules activatrices de PKC pour le traitement du cancer colorectal.

La déréplication d'une fraction enrichie en daphnanes mono estérifiés nous a permis de confirmer la présence de daphnanes déjà identifiés précédemment par Manon Trinel, mais aussi de mettre en évidence des nouveaux daphnanes mono estérifiés. Des propositions structurales ont pu être proposées, cependant des données complémentaires de fragmentation seront nécessaires afin de confirmer ces hypothèses. Lors de ces travaux trois daphnanes mono estérifiés connus et un daphnane mono estérifié original ont pu être isolés. *H. crepitans* L. est donc une plante possédant un fort potentiel d'originalité au niveau de sa composition chimique. De plus, des résultats biologiques préliminaires obtenus par Manon Trinel nous laissent penser que ces molécules possèdent des activités biologiques intéressantes dans le cadre des thérapies anticancéreuses. En effet, des mécanismes d'actions anti prolifératifs originaux sur des lignées cellulaires de cancer colorectal ont été mis en avant pour la huratoxine. L'isolement d'analogues structuraux de la huratoxine afin de déterminer leurs activités biologiques et d'établir les relations structure-activité de cette série de molécules complexes semble donc très intéressant sur le plan du développement thérapeutique. En effet, le cancer colorectal est responsable d'un grand nombre de décès au niveau mondial et les thérapies actuelles ne permettent pas une diminution de son incidence. L'étude du latex de *H. crepitans* L., et plus particulièrement des daphnanes mono estérifiés, est donc un axe prometteur dans la découverte de nouveaux candidats médicaments anticancéreux. Cependant, l'isolement des composés minoritaires du latex de *H. crepitans* L. reste un challenge du fait de la complexité de la composition du latex, de leur similarité structurale et de la présence de nombreux isomères. De plus, la mise en avant d'un possible phénomène de réarrangement de certains DDO en solution pose des questions sur la stabilité de ces molécules. La mise en place d'un protocole de purification a été une étape importante de ces travaux afin de faciliter le futur isolement des daphnanes minoritaires, mais il devra être optimisé par la suite. Ainsi, une extraction au CO_2 supercritique suivi d'un lavage basique des extraits bruts devrait permettre d'obtenir un meilleur rendement d'extraction et d'éliminer les acides gras du latex dès le début du protocole de purification. Une séparation par CPC des différentes classes de molécules contenues dans l'extrait pourrait ensuite être

envisagée afin d'obtenir des fractions enrichies en daphnanes mono-estérifies, di-estérifiés ou en cérébrosides en seulement deux étapes.

La mise en place d'un tel protocole est essentielle afin de faciliter la découverte de nouveaux candidats médicaments issus de produits naturels.

Bibliographie

1. Pasquet V. Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. [Thèse de doctorat]. [La Rochelle]: Université de la Rochelle; 2011.

2. Brotelle T, Bay J-O. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. Bulletin du Cancer. 2016;103(1):18-29.

3. Feve M. Utilisation d'une approche de chimie biologie intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses.[Thèse de doctorat]. [Strasbourg]: Université de Strasbourg; 2012.

4. 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.

5. Cancer du colon - Le côlon [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Le-colon

6. Cancer du rectum - Le rectum [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-rectum/Le-rectum

7. Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. Clinical Colorectal Cancer. 2016;15(3):195-203.

8. Cancer du colon - Points clés [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Points-cles

9. Cancer du colon - Les tumeurs du côlon - Tumeurs bénignes [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Les-tumeurs-du-colon/Tumeurs-benignes

10. Cancer du colon - Les tumeurs du colon - Cancers colorectaux [Internet]. Institut National du Cancer. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Les-tumeurs-du-colon/Cancers-colorectaux

11. Organisation mondiale de la santé.Cancer.Disponible sur https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer [Internet]. Organisation mondiale de la santé. 2018. Disponible sur: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer

12. Institut national du cancer. Le cancer du colon : les points clés. Disponible sur https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Points-cles [Internet]. Institut National du Cancer. 2017. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Points-cles

13. Institut national du cancer. Le cancer colorectal. Disponible sur https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-

cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-colorectal [Internet]. Institut National du Cancer. 2018. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-colorectal

14. INCa. Les cancers en France en 2016 - L'essentiel des faits et des chiffres [Internet]. 2016 [cité 8 août 2020]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/content/download/183576/2424633/file/Les_cancers_en_France_en_2016_L_essentiel_des_faits_et_chiffres_mel_20170203.pdf

15. Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM, de Leng WWJ, Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. Pathology. 2018;50(1):49-59.

16. Buckowitz A, Knaebel H-P, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. British Journal of Cancer. 2005;92(9):1746-1753.

17. Karoui M, Tresallet C, Brouquet A, Radvanyi H, Penna C. Carcinogenèse colorectale. Mise au point. 2007:1-8.

18. Farhadi A. The role of Protein Kinase C isoforms in modulating injury and repair of the intestinal barrier. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2005;316(1):1-7.

19. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. Gastroenterology. 2010;138(6):2044-2058.

20. Shelton PM, Duran A, Nakanishi Y, Reina-Campos M, Kasashima H, Llado V, et al. The Secretion of miR-200s by a PKCζ/ADAR2 Signaling Axis Promotes Liver Metastasis in Colorectal Cancer. Cell Reports. 2018;23(4):1178-1191.

21. Kadiri AB, Adeniran S. Study of anatomy of the genus *Hura* (Euphorbiaceae). Ife Journal of Science. 2016;18(2):413–426.

22. Mwine JT, Damme PV. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. 2011:1-12.

23. Ramalho S, Pinto M, Ferreira D, Bolzani V. Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. Planta Medica. 2018;84(09/10):558-567.

24. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society. 2016;181(1):1-20.

25. Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier; 2010.

26. 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/.

27. Shi Q-W, Su X-H, Kiyota H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. Chemical Reviews. 2008;108(10):4295-4327.

28. Boucaud-Maitre D, Cachet X, Bouzidi C, Riffault-Valois L, Dupuy C, Garnier R, et al. Severity of manchineel fruit (Hippomane mancinella) poisoning: A retrospective case series of 97 patients from French Poison Control Centers. Toxicon. 2019;161:28-32.

29. Remy S, Litaudon M. Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbiaceae as A Source of Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. Molecules. 2019;24(12):2336:1-16.

30. Nothias-Scaglia L-F, 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;105:202-209.

31. Nothias-Scaglia L-F, Retailleau P, Paolini J, Pannecouque C, Neyts J, Dumontet V, et al. Jatrophane Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. Journal of Natural Products. 2014;77(6):1505-1512.

32. Nothias-Scaglia L-F, Pannecouque C, Renucci F, Delang L, Neyts J, Roussi F, et al. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. Journal of Natural Product. 2015;78(6):1277-1283.

33. Emmert S, Haenssle HA, Zibert JR, Schön M, Hald A, Hansen MH, et al. Tumor-Preferential Induction of Immune Responses and Epidermal Cell Death in Actinic Keratoses by Ingenol Mebutate. Oiso N, éditeur. PLoS ONE. 2016;11(9):e0160096.

34. Rosen RH, Gupta AK, Tyring SK. Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses: Rapid lesion necrosis followed by lesion-specific immune response. Journal of the American Academy of Dermatology. 2012;66(3):486-493.

35. Braun SA, Baran J, Schrumpf H, Buhren BA, Bölke E, Homey B, et al. Ingenol mebutate induces a tumor cell-directed inflammatory response and antimicrobial peptides thereby promoting rapid tumor destruction and wound healing. European Journal of Medical Research. 2018;23(1):45:1-11.

36. Angely K, Awa T, Armelle A, Alain Y, Clemence N, Alain N, et al. Development of dermopharmaceutical forms based on the fruit of *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) for the treatment of dermatophytes. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research. 2019;10(4):143-148.

37. Trinel M, Jullian V, Le Lamer A-C, 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. Phytochemical Analysis [Internet]. 17 juill 2018 [cité 27 sept 2018]; Disponible sur: http://doi.wiley.com/10.1002/pca.2776

38. Kew science. Medicinal plant names services [Internet]. [cité 30 juill 2020]. Disponible sur: https://mpns.science.kew.org/mpns-portal

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. Industrial Crops and Products. 2012;36(1):94-99.

40. Sakata K, Kawazu K, Mitsui T. Structure and stereochemistry of huratoxin, a piscicidal constituent of *Hura crepitans*. Tetrahedron Letters. 1971;12(16):1141–1144.

41. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. Journal of Ethnopharmacology. 2006;106(3):390-402.

42. Bussmann RW, Malca-Garcia G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Diaz D, et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. Journal of Ethnopharmacology. 2010;132(1):101-108.

43. Coulamy A. Hura brasiliensis, un médicament plein de ressources. La Revue d'Homéopathie. 2012;3(3):96-99.

44. Ponsinet G, Ourisson G. Études chimio-taxonomiques dans la famille des Euphorbiacées - II: Triterpènes de *Hura crepitans* L. Phytochemistry. 1965;4(6):813–815.

45. Sakata K, Kawazu K, Mitsui T. Studies on a piscicidal constituent of *Hura crepitans*. Agricultural and Biological Chemistry. 1971;35(7):1084–1091.

46. Sakata K, Kawazu K. Studies on a piscicidal constituent of *Hura crepitans* . Part II. Chemical structure of huratoxin. Agricultural and biological chemistry. 1971;35(13):2113-2126.

47. 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). Biochemical Journal. 1983;215(3):433-439.

48. McPherson A, Hoover S. Purification of mitogenic proteins from *Hura crepitans* and *Robinia pseudaccacia*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1979;89(2):713-720.

49. Pere M, Pere D, Rouge P. Isolement et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des lectines d'*Hura crepitans*. Planta Medica. 1981;41(04):344-350.

50. Falasca A, Franceschi A, Rossi CA, Stirpe F. Mitogenic and haemagglutinating properties of a lectin purified from *Hura crepitans* seeds. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1980;632(1):95–105.

51. 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):667-679.

52. Sperling P, Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2003;1632(1):1-15.

53. Cateni F, Zilic J, Falsone G, Scialino G, Banfi E. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2003;13(24):4345-4350.

54. Sun J, Xu J, Wang S, Hou Z, Lu X, An L, et al. A new cerebroside from cordyceps militaris with anti-PTP1B activity. Fitoterapia. 2019;138:104342:1-6.

55. Cateni F, Zilic J, Zacchigna M, Procida G. Cerebrosides with antiproliferative activity from *Euphorbia peplis* L. Fitoterapia. 2010;81(2):97-103.

56. 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. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2006;70(12):2906-2912.

57. 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 [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 1983 [cité 24 juill 2018]. Disponible sur: http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3099637

58. He W, Cik M, Appendino G, Puyvelde L, Leysen J, Kimpe N. Daphnane-type diterpene orthoesters and their biological activities. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2002;2(2):185-200.

59. Liao S-G, Chen H-D, Yue J-M. Plant orthoesters. Chemistry Review. 2009;109(3):1092-1140.

60. Chen Y-Y, Guo J-M, Qian Y-F, Guo S, Ma C-H, Duan J-A. Toxicity of daphnane-type diterpenoids from Genkwa Flos and their pharmacokinetic profile in rat. Phytomedicine. 2013;21(1):82-89.

61. 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 β. Journal of Medicinal Chemistry. 2015;58(21):8638-8646.

62. Liu Q, Cheng Y-Y, Li W, Huang L, Asada Y, Hsieh M-T, et al. Synthesis and Structure–Activity Relationship Correlations of Gnidimacrin Derivatives as Potent HIV-1 Inhibitors and HIV Latency Reversing Agents. Journal of Medicinal Chemistry. 2019;62(15):6958-6971.

63. Yan M, Lu Y, Chen C-H, Zhao Y, Lee K-H, Chen D-F. Stelleralides D–J and Anti-HIV Daphnane Diterpenes from *Stellera chamaejasme*. Journal of Natural Product. 2015;78(11):2712-2718.

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

65. Rashad AA, Mahalingam S, Keller PA. Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. Journal of Medicinal Chemistry. 2014;57(4):1147-1166.

66. Olivon F, Remy S, Grelier G, Apel C, Eydoux C, Guillemot J-C, et al. Antiviral Compounds from *Codiaeum peltatum* Targeted by a Multi-informative Molecular Networks Approach. Journal of Natural Product. 2019;82(2):330-340.

67. Jo S-K, Hong J-Y, Park HJ, Lee SK. Anticancer activity of novel daphnane diterpenoids from *Daphne genkwa* through cell-cycle arrest and suppression of Akt/STAT/Src

signalings in human lung cancer cells. Biomolecules and Therapeutics. 2012;20(6):513-519.

68. 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. Journal of Ethnopharmacology. 2019;237:255-265.

69. 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. Molecular Genetics and Metabolism. 2003;79(3):189-196.

70. Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. Mass Spectrometry Review. 2005;24(3):367-412.

71. Trufelli H, Famiglini G, Termopoli V, Cappiello A. Profiling of non-esterified fatty acids in human plasma using liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011;400(9):2933-2941.

72. 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. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001;281(3):657-662.

73. Elson S, Howe I, Jarman M, McDougal PG, Polonsky J, Schmuff NR, et al. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 1985 [cité 26 mars 2019]. Disponible sur: http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3100274

74. Zhang X-D, Ni W, Yan H, Li G-T, Zhong H-M, Li Y, et al. Daphnane-Type Diterpenoid Glucosides and Further Constituents of *Euphorbia pilosa*. Chemistry & Biodiversity. 2014;11(5):760-766.

75. Bouju E, Berthod A, Faure K. Carnosol purification. Scaling-up centrifugal partition chromatography separations. Journal of Chromatography A. 2016;1466:59-66.

76. Issaadi HM, Tsai Y-C, Chang F-R, Hunyadi A. Centrifugal partition chromatography in the isolation of minor ecdysteroids from Cyanotis arachnoidea. Journal of Chromatography B. 2017;1054:44-49.

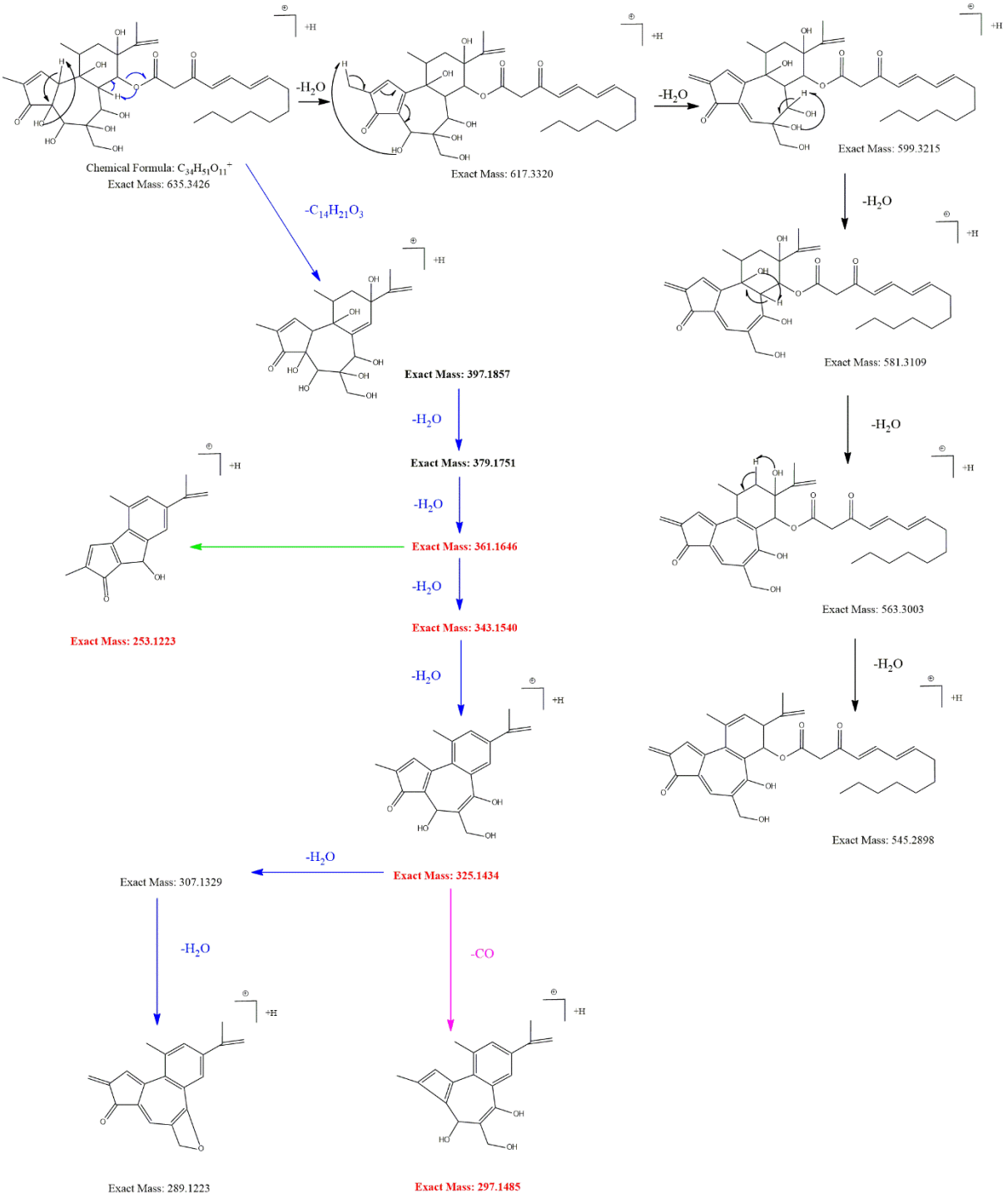
77. Marlot L, Batteau M, Faure K. Classification of biphasic solvent systems according to Abraham descriptors for countercurrent chromatography. Journal of Chromatography A. 2019;460820:1-8.

78. Morley R, Minceva M. Operating mode and parameter selection in liquid–liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 2019;460479:1-21.

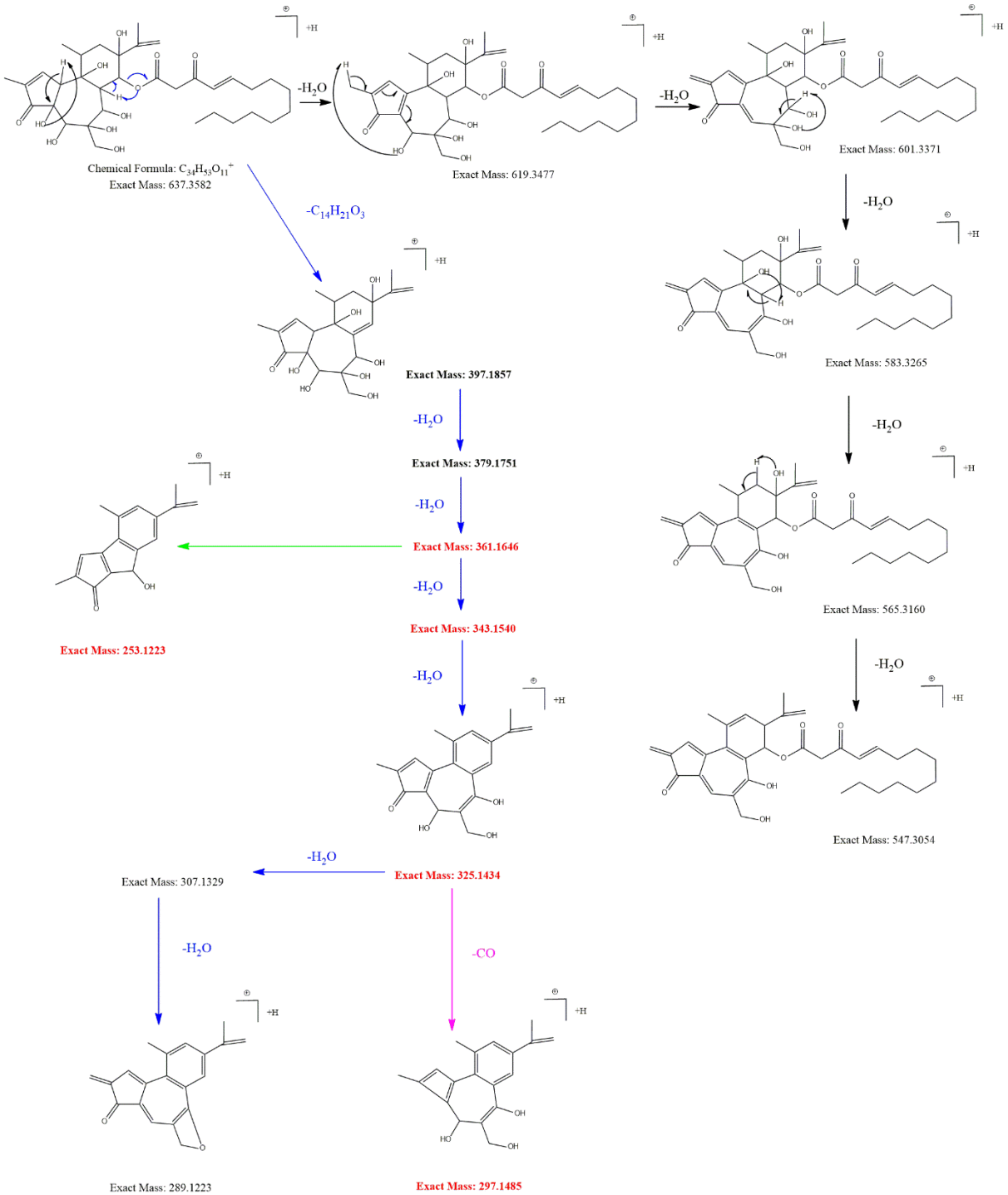
79. Fromme A, Fischer C, Keine K, Schembecker G. Characterization and correlation of mobile phase dispersion of aqueous-organic solvent systems in centrifugal partition chromatography. Journal of Chromatography A. 2020;460990:1-11.

80. Sarrade SJ. Supercritical CO2 extraction coupled with nanofiltration separation. Applications to natural products. Separation and Purification Technology. 1998:1-7.

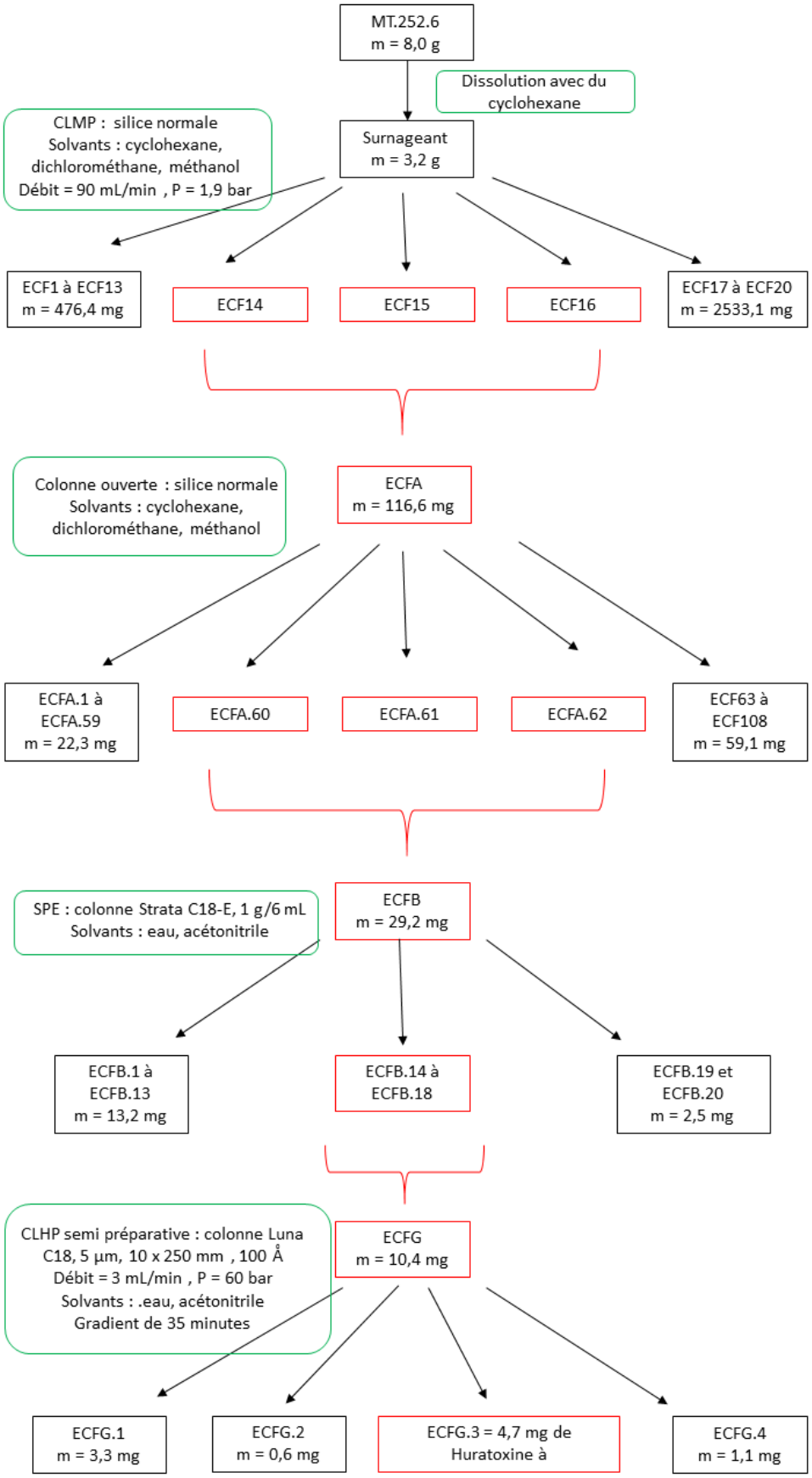
Annexe I : Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1.C



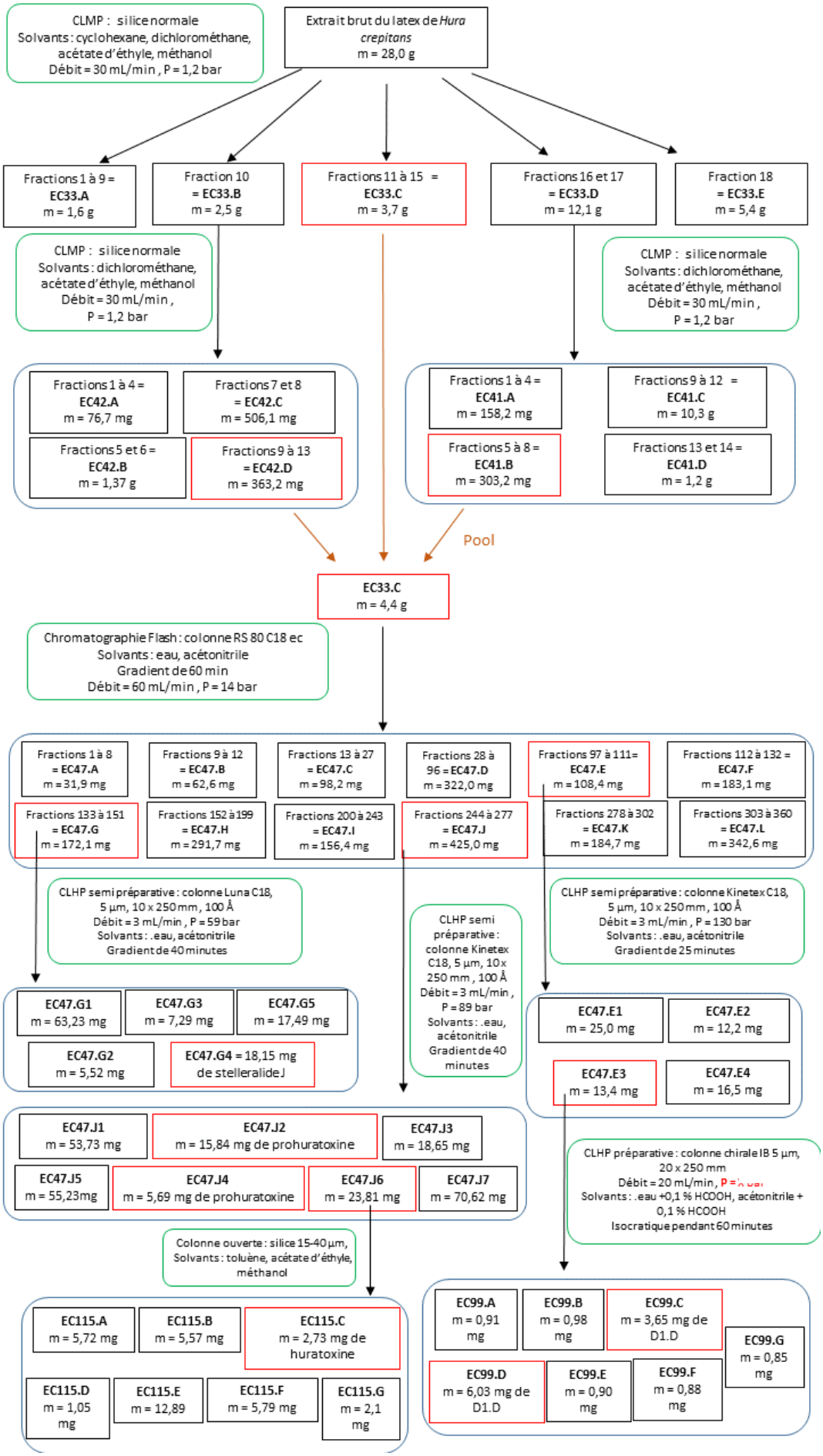
Annexe II : Proposition d'un schéma de fragmentation pour la molécule D1. B



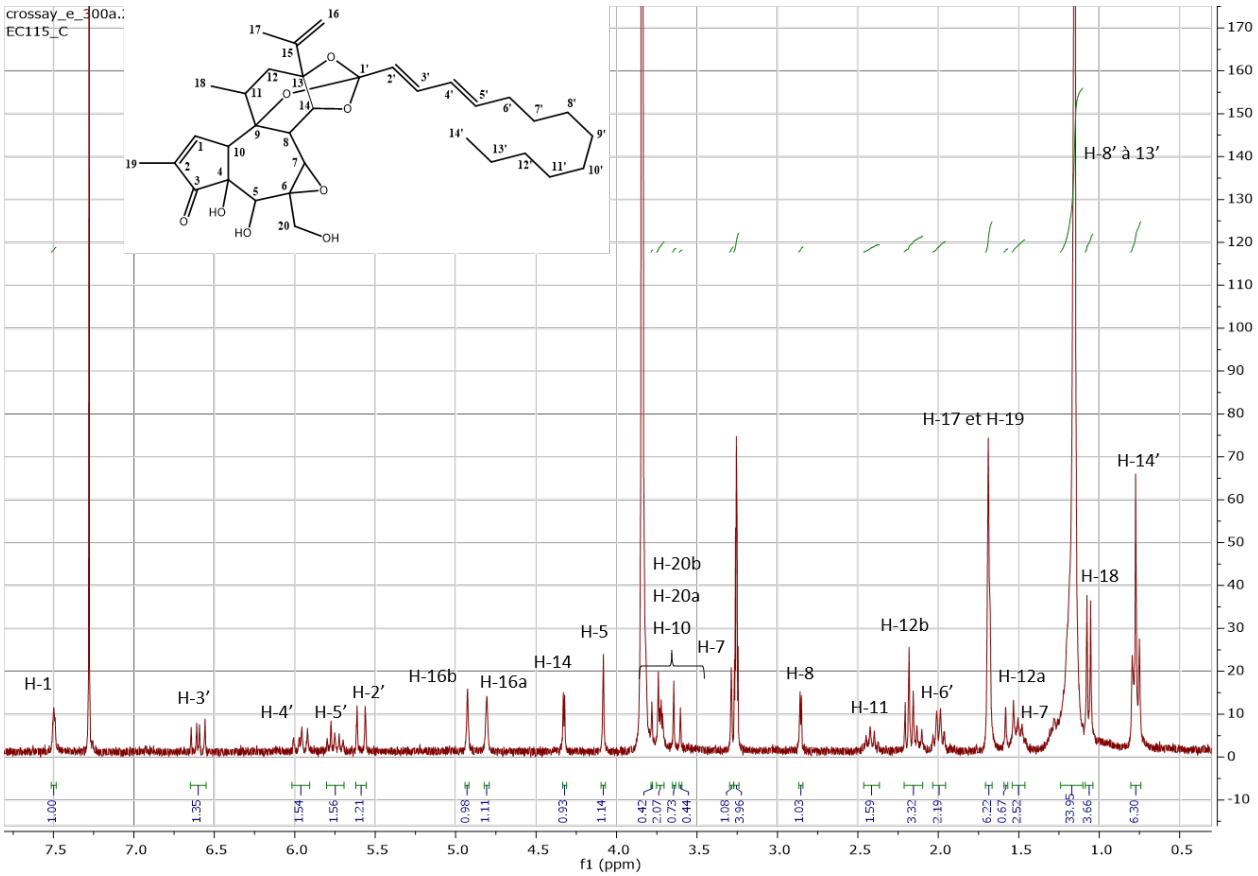
Annexe III : Arbre de purification de la huratoxine



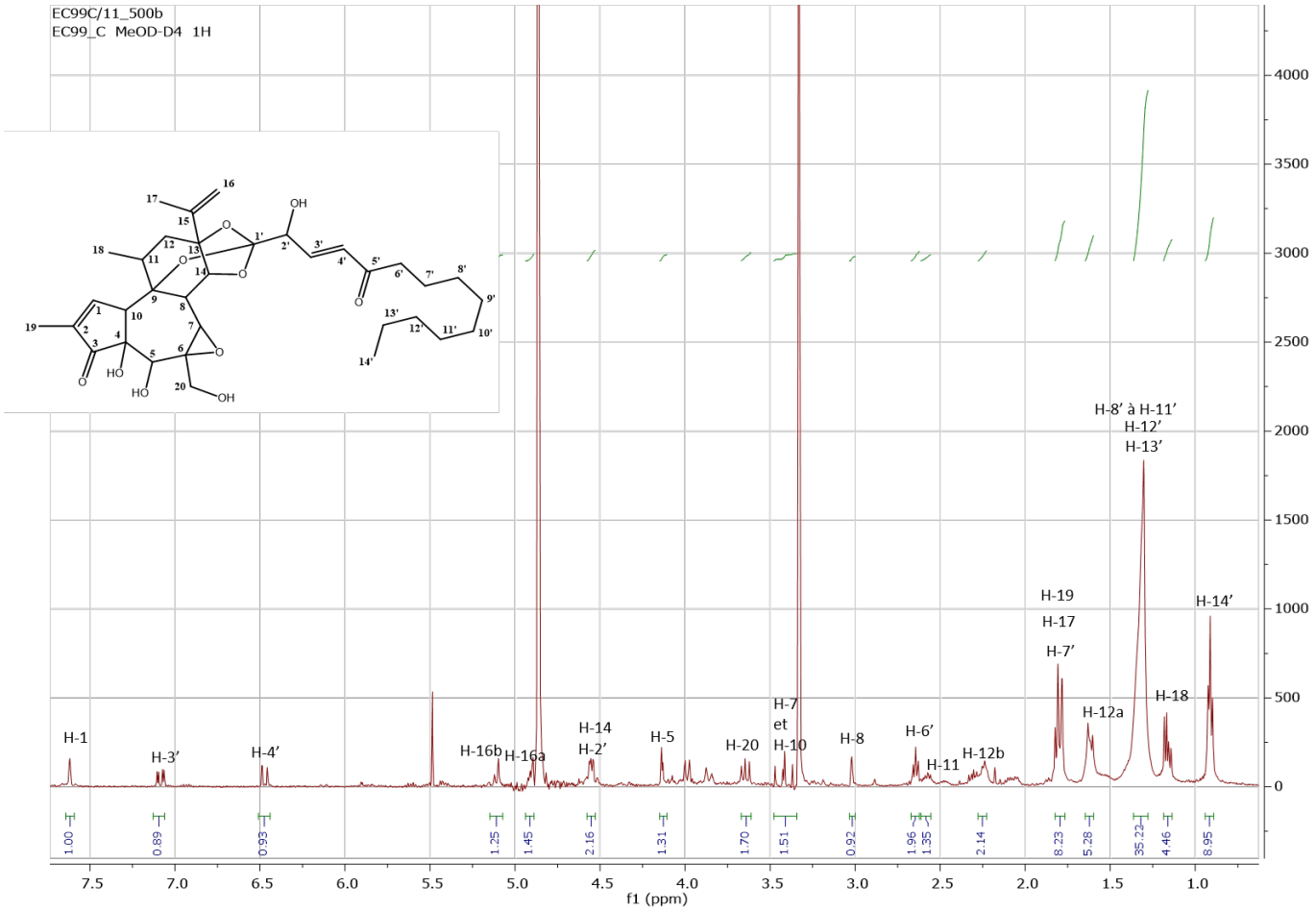
Annexe IV : Arbre de purification du stelleralide J, de la prohuratoxine, de la huratoxine et de la molécule D1.



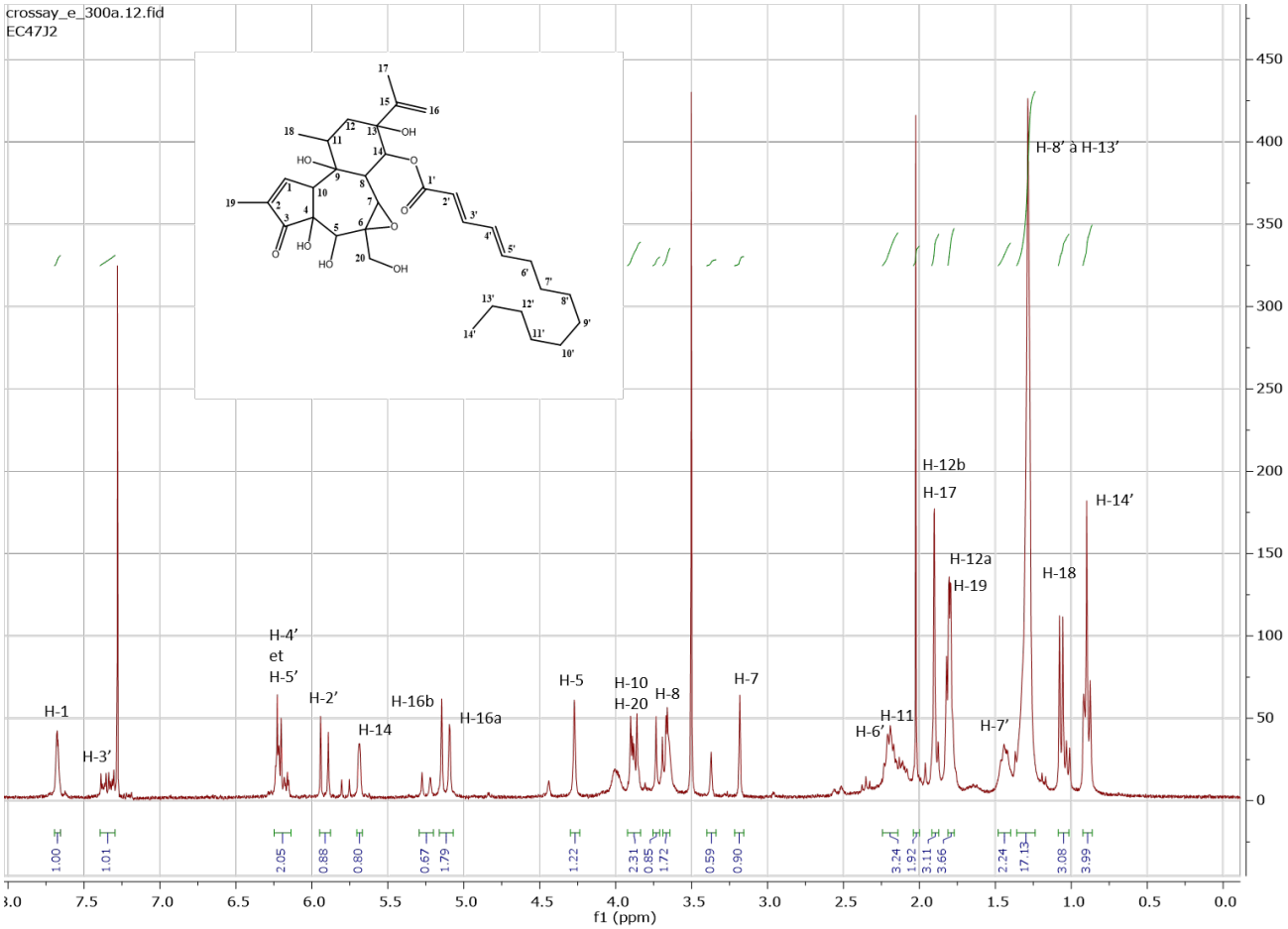
Annexe V : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC115.D



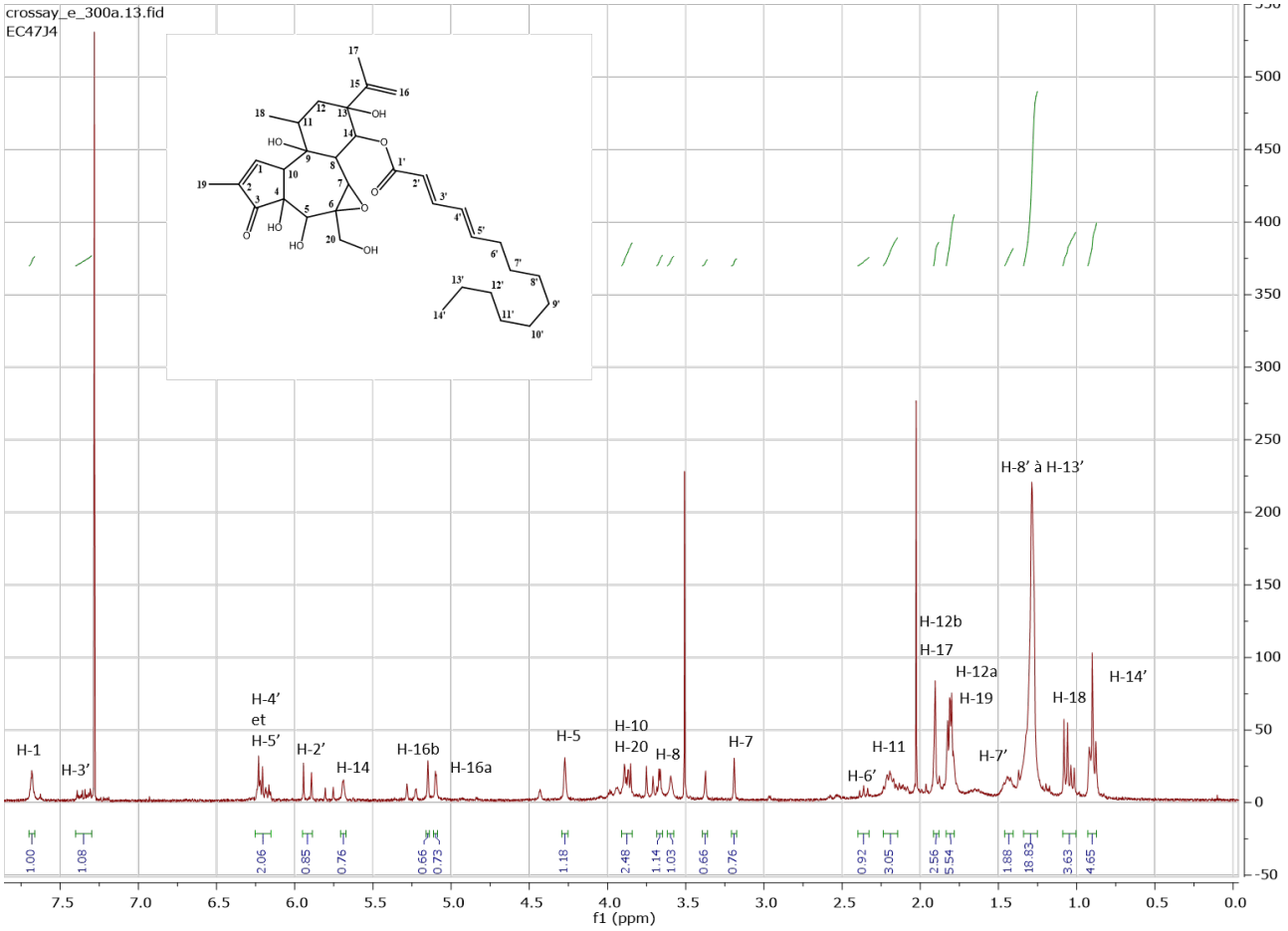
Annexe VI : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC99.C = composé D1.D



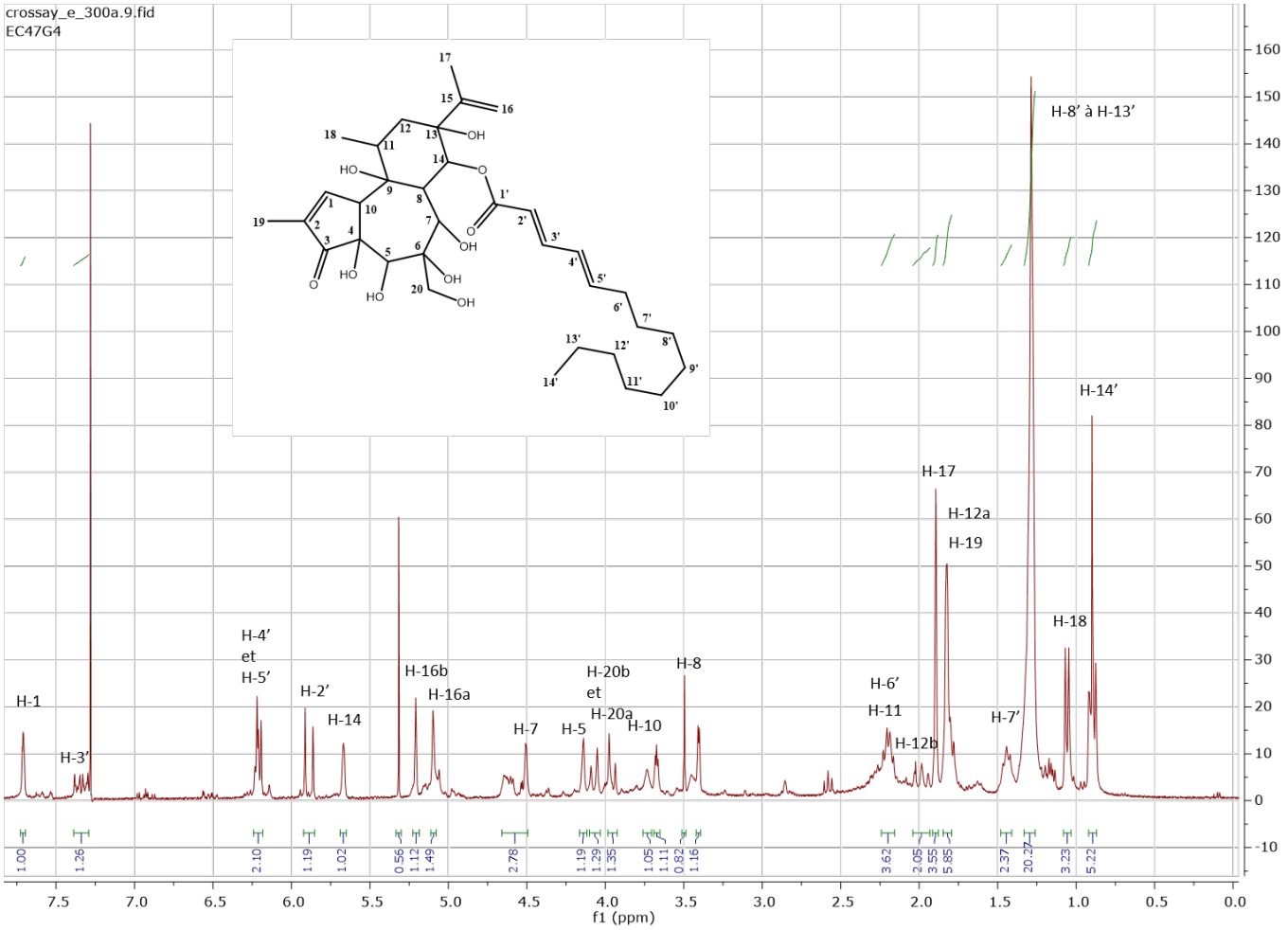
Annexe VII : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC47.J2 = prohuratoxine.



Annexe VIII : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC47.J4 = prohuratoxine.



Annexe IX : Spectre RMN ^{1}H de la fraction EC47.G4 = stelleralide J.



Vu, le Président du jury,

Vu, le Directeur de thèse,

UNIVERSITÉ DE NANTES **Année de la soutenance 2020**

Nom - Prénoms : CROSSAY Elise

Titre de la thèse : Recherche de nouveaux produits naturels pour le traitement du cancer colorectal : déréplication et isolement de daphnanes mono estérifiés du latex de *Hura crepitans* L.

Résumé de la thèse : *Hura crepitans* L. est une plante de la famille des *Euphorbiaceae* présente notamment dans la forêt amazonienne. Son latex est utilisé en médecine traditionnelle pour diverses indications. L'étude de sa composition chimique a révélée trois classes de composés majoritaires : les daphnanes mono estérifiés, les daphnanes di estérifiés et les cérébrosides. Des tests biologiques sur des lignées cellulaires de cancer colorectal ont montré une activité cytostatique portée par les daphnanes mono estérifiés et notamment par la huratoxine. Le cancer colorectal a été classé, en 2018, au troisième rang mondial au niveau de la mortalité par cancer selon l'OMS. Il est donc intéressant de continuer les investigations sur ces molécules. Des tests biologiques approfondis réalisé sur la huratoxine ont montré un mécanisme d'action original impliquant notamment l'activation de la PKC ζ. L'isolement de la huratoxine a donc été réalisé afin de confirmer cette activité. D'un autre côté la déréplication d'une fraction enrichie en daphnanes mono estérifiés a été effectuée permettant de mettre en avant des molécules originales pour lesquels des propositions structurales ont été réalisées sur la base des spectres UHPLC-APCI Full MS et MS/MS. Un daphnane mono estérifié original et trois daphnanes mono estérifiés connus ont été isolé et leur élucidation structurale a été réalisé grâce aux spectres RMN 1D et 2D.

MOTS CLÉS : *Euphorbiaceae*, *Hura crepitans* L., Daphnane, Déréplication, UHPLC-MS, Cancer colorectal

---

JURY

Adresse de l'auteur :