Isolement et caractérisation de nouveaux stilbènes prénylés à partir des fruits de Macaranga tanarius (Euphorbiaceae)

Juliette Walek

▶ **To cite this version:**

Juliette Walek. Isolement et caractérisation de nouveaux stilbènes prénylés à partir des fruits de Macaranga tanarius (Euphorbiaceae). Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02451118

HAL Id: dumas-02451118

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02451118

Submitted on 23 Jan 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROCAMPUS OUEST

☒ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

Année universitaire : 2018 - 2019

Spécialité : Horticulture

Spécialisation : Polymères et principes actifs d'origine naturelle

Mémoire de fin d'études

☒ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Isolement et caractérisation de nouveaux stilbènes prénylés à partir des fruits de *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae)

Juliette WALEK

***Soutenu à** l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes* ***le** 21 juin 2019*

Devant le jury composé de :

Président : Corinne Miral (MCF)

Enseignant référent : Marie-Hélène Macherel (MCF)

Autres membres du jury :

Samuel Bertrand (MCF)

David Guilet (PU)

Cédric Logé (MCF)

Pascal Marchand (PU)

Sophie Tomasi (PU)

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

☐ Non ☐ Oui si oui : ☐ 1 an ☐ 5 ans ☐ 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible [1].

Date et signature du tuteur de stage [2] :

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur[3]
autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☐ Oui ☐ Non

Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☐ la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) ☐ accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur :

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☐ Oui ☐ Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.
Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☐ la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.
(2) Signature et cachet de l'organisme
(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études
(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

La réalisation de ce stage dans les meilleures conditions qui soient a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance à Madame la Directrice de Recherche Fanny Roussi pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de son équipe à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles et pour sa disponibilité durant mon stage.

Je remercie Marc Litaudon, mon maître de stage, pour m'avoir fait confiance pour la réalisation de cette étude, pour ses conseils et sa bonne humeur.

J'aimerais exprimer ma gratitude à Cécile Apel pour m'avoir encadrée tout au long de mon stage à travers un enseignement de qualité, pour avoir eu la patience de répondre à mes innombrables questions, pour sa disponibilité, ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion ainsi que pour sa bienveillance et son amitié.

Je tiens également à remercier toute l'équipe 45 de l'ICSN, Sandy Desrat, les doctorants Gwenaelle et Simon ainsi que Céline et Laura pour leurs multiples conseils et encouragements, pour leur bienveillance et leur contribution à l'ambiance de travail. Je remercie les autres stagiaires de l'équipe, Carole, Olivier, Solène mais aussi Suzanne ainsi que tous les étudiants du bâtiment 23b, Ý, Marceau, Orianne, pour leur soutien, leur bonne humeur au quotidien et tous les bons moments passés avec eux.

Merci à Jean-François Gallard pour m'avoir formée à l'utilisation des appareils et pour les RMN 500 MHz totales, Odile Thoison et Vincent Steinmetz pour leur aide en HPLC et en spectrométrie de masse, Nicolas Elie pour les analyses de spectrométrie de masse et son aide pour l'installation du logiciel de réseaux moléculaires.

Je remercie enfin Jérôme Bignon et Hélène Levaique pour la réalisation des tests de cytotoxicité, pour leur bienveillance, leur gentillesse et pour le temps passé à m'expliquer leur travail.

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CF : Chromatographie Flash
COSY : *COrrelated SpectroscopY*
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge
d : Doublet
dd : Doublet dédoublé
DAD : *Diode Array Detector* (détecteur à barrette de diodes)
DEDL : Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
ESI : *ElectroSpray Ionization*
GNPS : *Global Natural Product Social Molecular Networking*
HHX : Hexahydroxanthène
HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HPLC : *High Pressure Liquid Chromatography*
HRESIMS : *High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry*
HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
ICSN : Institut de Chimie des Substances Naturelles
IR : Infra-Rouge
IC_{50} : *Half maximal Inhibitory Concentration*
J : Constante de couplage (Hz)
LC-HRMS : *Liquid chromatography high resolution mass spectrometry*
LC-HRMS/MS : *Liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry*
m : Multiplet
NCI : *National Cancer Institute*
ppm : partie par million
PI : Phase inverse
PN : Phase normale
q : Quadruplet
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY : *Rotating-frame Overhauser SpectroscopY*
s : Singulet
SW : Schweinfurthine
t : Triplet
UPLC : *Ultra-high Pressure Liquid Chromatography*
UV : Ultra-Violet
VDL : védélianine
δ_C : déplacement chimique en ppm, RMN ^{13}C
δ_H : déplacement chimique en ppm, RMN ^{1}H

Table des matières

1 Introduction générale 1

2 Étude bibliographique 3

2.1 La découverte des schweinfurthines 3

2.2 Une activité antiproliférative puissante et sélective 3

2.3 Travaux antérieurs 3

2.4 *Macaranga tanarius* 4

2.4.1 Description botanique et distribution géographique 4

2.4.2 Usage traditionnel 4

2.5 Objectifs de l'étude 4

3 Matériels et méthodes 4

3.1 Matériel végétal 4

3.2 Extraction (Vietnam) 5

3.3 Méthodes chromatographiques d'analyse, de fractionnement et de purification 5

3.3.1 Chromatographie sur Couche Mince 5

3.3.2 Chromatographie Flash 5

3.3.3 Chromatographie Liquide Haute Performance 6

3.4 Méthodes de détermination structurale 6

3.4.1 Spectrométrie de Masse Haute Résolution 6

3.4.2 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire 7

3.4.3 Spectroscopie Ultra-Violet 7

3.4.4 Spectroscopie Infrarouge 7

3.4.5 Polarimètre 7

3.5 Déréplication : réalisation d'un réseau moléculaire 8

3.6 Évaluation de l'activité biologique 8

4 Résultats 9

4.1 Travaux antérieurs 9

4.1.1 Fractionnement préalable par Chromatograhie de Partage Centrifuge 9

4.1.2 Chromatographie Flash 9

4.2 Étude phytochimique 9

4.2.1 Orientation du travail : utilisation des UV comme outil de déréplication 9

4.2.2 Étude déréplicative grâce aux réseaux moléculaires 10

4.2.3 Purification des composés minoritaires 12

4.2.4 Détermination structurale 14

4.3 Étude biologique des composés isolés 18

5 Discussion 19

6 Conclusion et perspectives 21

7 Bibliographie 22

8 Annexes i

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la védélianine 2
Figure 2 : Structures des schweinfurthines isolées de *Macaranga* spp. 2
Figure 3 : Photographie des fruits non matures de *Macaranga tanarius* 3
Figure 4 : Photographies au microscope de la surface des fruits et des bractées de *M. vedeliana* 3
Figure 5 : Pharmacophore des SWs 3
Figure 6 : Cluster d'intérêt des SWs observé dans le réseau moléculaire obtenu grâce aux extraits des 21 espèces de *Macaranga* 3
Figure 7 : Photographie de *Macaranga tanarius* 4
Figure 8 : Photographie des fruits de *Macaranga tanarius* 4
Figure 9 : Localisation de la récolte des fruits de *Macaranga tanarius* 4
Figure 10 : Photographie de la planche d'herbier de *Macaranga tanarius* 4
Figure 11 : Premiers travaux d'isolement effectués au Vietnam suite à la récolte des fruits de *M. tanarius* 5
Figure 12 : Facteur de transposition du débit 6
Figure 13 : Principe du réactif CellTiter-GLo® 8
Figure 14 : Schéma de fractionnement de la chromatographie de partage centrifuge réalisée sur l'extrait de *M. tanarius* 9
Figure 15 : Chromatographie sur couche mince récapitulative des fractions F1 à F9 obtenues de la chromatographie de partage centrifuge 9
Figure 16: Schéma récapitulatif des travaux de la chromatographie flash de F8 effectuée par Céline Rampal à l'ICSN 9
Figure 17 : Réseaux moléculaires obtenus de F1 à F9 et F8-1 à F8-6 réalisé par Cécile Apel à l'ICSN 10
Figure 18 : Clusters d'intérêt des SWs 10
Figure 19 : Résumé des travaux de purification sur F7 11
Figure 20 : Résumé des travaux de purification sur F8-4 11
Figure 21 : Profil chromatographique de F7-13 obtenu par un gradient général d'élution, accompagné de certains UV caractéristiques des SWs 12
Figure 22 : Mises au point en HPLC analytique de F7-13c, F7-13d, F7-13e et F7-13f 12
Figure 23 : Profil chromatographique de F8-4e obtenu par un gradient d'élution général 13
Figure 24 : Mises au point en HPLC analytique de F8-4eb, F8-4ec et F8-4ee 13
Figure 25 : Structure des nouveaux composés isolés des fruits de *M. tanarius* 14
Figure 26 : Spectre de masse du composé 8 14
Figure 27 : Comparaison de la RMN ^{1}H du composé 8 avec celle de la SW G (RMN 500 MHz, CD_3CN) 15
Figure 28 : Spectres HMBC du composé 8 (CD_3CN, 500 MHz) 16
Figure 29 : Spectres COSY du composé 8 16
Figure 30 : Corrélations COSY, HMBC et ROESY du composé 8 16
Figure 31 : Comparaison de la RMN ^{1}H du composé 8 avec celle du composé 10 (RMN 500 MHz, CD_3CN) 17
Figure 32 : Corrélations COSY, HMBC et ROESY du composé 10 17
Figure 33: Corrélations COSY, HMBC et ROESY du composé 2 17
Figure 34 : Corrélations COSY, HMBC et ROESY du composé 1 18

Liste des tableaux

Tableau 1 : Conditions expérimentales des chromatographies flash 5
Tableau 2 : Gradient d'élution général utilisé en CLHP pour les contrôles analytiques 6
Tableau 3 : Conditions expérimentales des CLHP semi-préparatives 6
Tableau 4 : Synthèse de l'élucidation des composés 3, 4, 7 et 11 14
Tableau 5 : Données RMN des composés 8 et 10 (CD_3CN, 500 MHz) 15
Tableau 6 : Données RMN des composés 2 (CD3CN, 500 MHz) 18
Tableau 7 : Données RMN des composés 1 (CD3CN, 500 MHz) 18

1 Introduction générale

L'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS) est situé à Gif-sur-Yvette dans la vallée de Chevreuse (Essonne) à une trentaine de kilomètres au sud-ouest de Paris. Créé en 1959, il est l'un des plus grands établissements publics de recherche en chimie de France. Il est constitué de quatre départements de recherche : Département de Chimie des Substances Naturelles et Chimie Médicinale (SNCM), Département de Synthèse Organique et Méthodes Catalytiques, Département de Chimie Biologique et Département de Biologie et Chimie Structurales et Analytiques ainsi que d'une Plateforme de Services de soutien à la recherche. Ce stage s'est déroulé dans le département SNCM, au sein du pôle « Métabolites de plantes et micro-organismes associés : isolement, synthèse et bioactivité », dans l'équipe dirigée par le Dr. Fanny Roussi où l'on retrouve un groupe phytochimie (extraction et isolement de nouvelles molécules) et un groupe chimie médicinale (synthèse et pharmacomodulation).

Afin d'étudier et valoriser de nouveaux métabolites secondaires de plantes, l'équipe a développé de nombreuses collaborations avec des pays de la zone intertropicale à forte biodiversité. Ces collaborations ont abouti à la création d'une extractothèque de plus de 14 000 extraits provenant de plus de 6 500 plantes.

A la faveur de criblages biologiques sur une panel de 60 lignées cellulaires cancéreuses de différentes séries chimiques, le National Cancer Institute (NCI) a mis en évidence en 1998 la famille des schweinfurthines (SWs) aux propriétés cytotoxiques particulièrement puissantes et sélectives envers une lignée du glioblastome, qui constitue la forme de cancer du cerveau la plus agressive. Ces métabolites secondaires de type stilbènes prénylés ont été retrouvés chez plusieurs espèces du genre *Macaranga* (Euphorbiaceae). Le profil de cytotoxicité des SWs indique qu'elles agissent *via* un nouveau mécanisme d'action encore mal connu aujourd'hui, et qu'elles pourraient être les chefs de file d'une nouvelle classe thérapeutique pour le traitement du cancer du cerveau.

Une étude « déréplicative » a été effectuée sur toutes les espèces de *Macaranga* incluses dans la collection de l'ICSN, aboutissant à la conclusion que l'intérêt devait se porter sur les fruits de certaines espèces en particulier. Le but de ce stage de Master 2 est de réaliser une étude phytochimique à partir d'une très grande quantité d'extrait de fruits de *Macaranga tanarius*, avec l'objectif d'isoler des quantités suffisantes de composés minoritaires de la famille des SWs pour les caractériser et évaluer leur activité cytotoxique sur la lignée du glioblastome.

Ainsi, cette étude présente l'analyse phytochimique des fruits de *M. tanarius*, suivi de l'analyse de l'activité biologique des composés isolés.

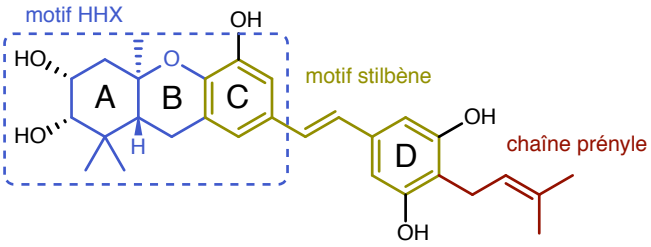


Figure 1 : Structure de la védélianine

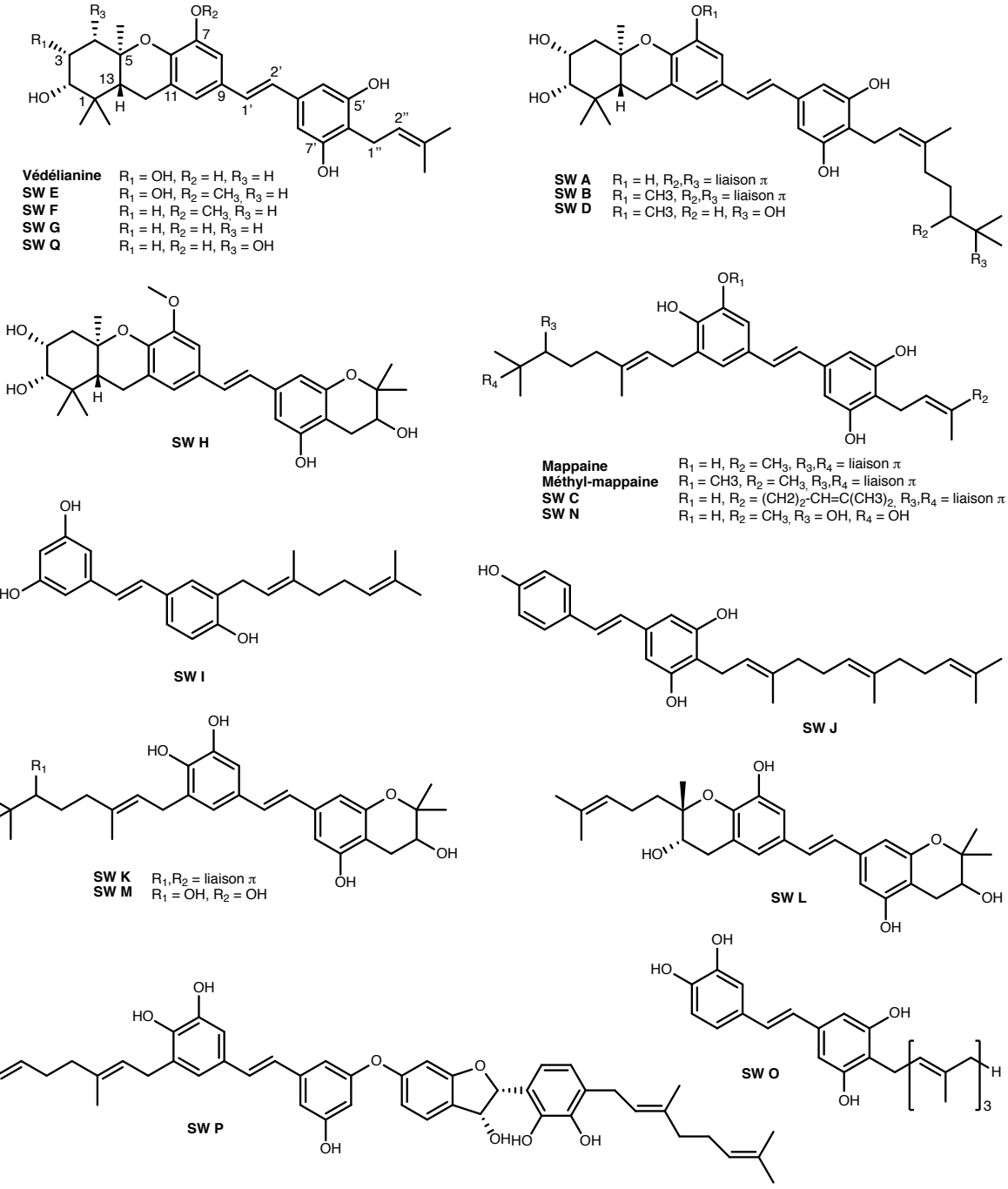


Figure 2 : Structures des schweinfurthines isolées de Macaranga spp.

2 Étude bibliographique

2.1 La découverte des schweinfurthines

Les SWs sont des stilbènes prénylés biosynthétisés par des espèces du genre *Macaranga* (Euphorbiacées), dont le premier composé, la védélianine (VDL), a été isolé et décrit à l'ICSN à partir de l'espèce endémique néocalédonienne *M. vedeliana* (Thoison and Hnawia, 1992). La védélianine est un polyphénol peu commun comportant un motif stilbène associé à une chaine prényle portée par le cycle aromatique D et à une chaîne géranyle cyclisée en motif hexahydroxanthène (HHX) au niveau du cycle aromatique C (cf. Figure 1). Depuis, d'autres SWs ont été isolées à partir de diverses espèces du genre *Macaranga* (*schweinfurthii*, *alnifolia*, *mappa, pleiostemona, indica, tanarius*) : **SWs A**, **B** et **C** (Beutler et al., 1998), **D** (Beutler et al., 2000), **E**, **F**, **G** et **H** (Yoder et al., 2007), **I** et **J** (Klausmeyer et al., 2010), **K**, **L**, **M**, **N**, **O**, **P** et **Q** (Péresse et al., 2017b), la **mappaïne** (van der Kaaden et al., 2001) et la **méthyl-mappaïne** (Péresse et al., 2017b). A noter que toutes les SWs ne comportent pas le motif HHX (cf. Figure 2).

Des travaux récents ont permis de localiser précisément les SWs. Ces dernières sont présentes spécifiquement dans les trichomes glandulaires qui se trouvent à la surface des fruits et sur la face inférieure des feuilles et des bractées (Péresse et al., 2017a) (cf. Figure 3 et Figure 4). Ces trichomes glandulaires sont connus pour synthétiser, sécréter et stocker de grandes quantités de métabolites secondaires (utilisés essentiellement comme moyen de défense contre les insectes herbivores et les agents pathogènes) (Guo et al., 2013).

Figure 3 : Photographie des fruits non matures de Macaranga tanarius

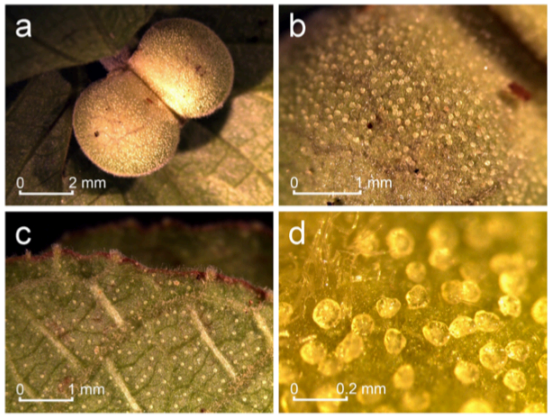


Figure 4 : Photographies au microscope de la surface des fruits (a) et (b) et des bractées (c) et (d) de M. vedeliana d'après T. Péresse et al. Anal. Chem, 2017, 89, 9247-9252

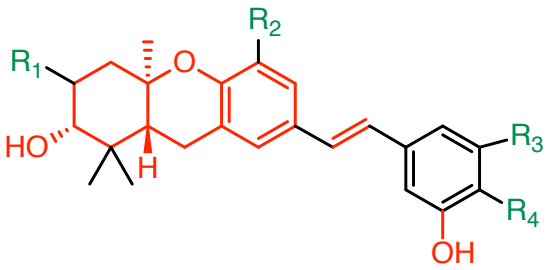


Figure 5 : Pharmacophore des SWs, en rouge : les sites de modulations impliquant une diminution importante de l'activité cytotoxique, en vert: les sites de modulations possibles

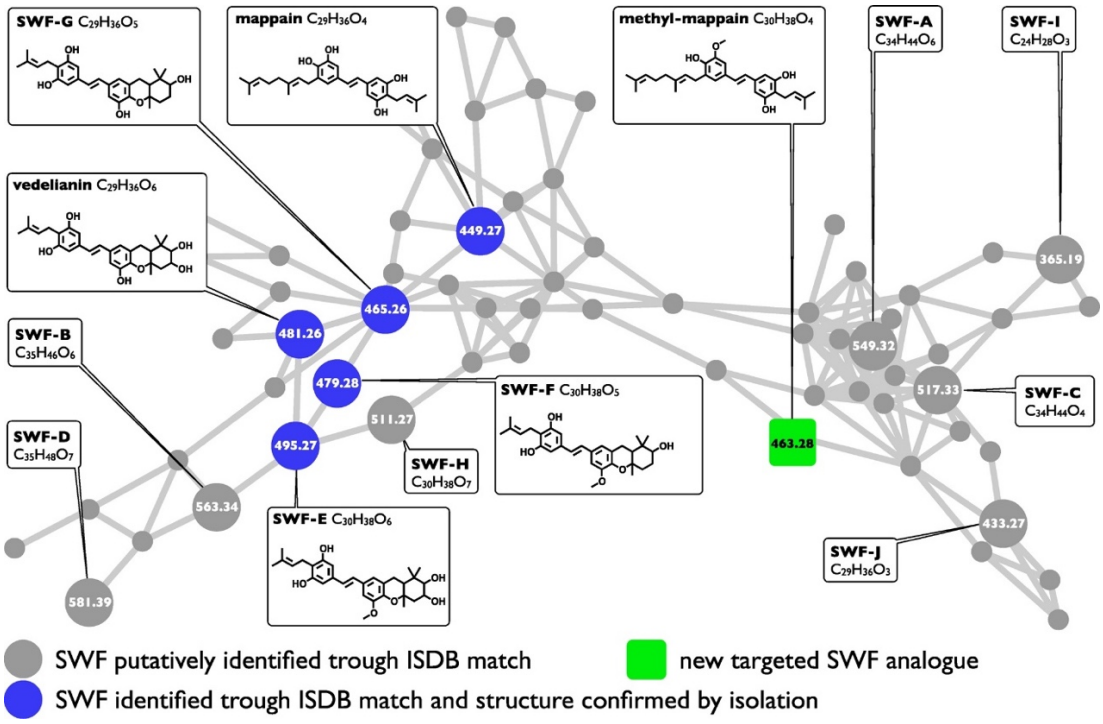


Figure 6 : Cluster d'intérêt des SWs observé dans le réseau moléculaire obtenu grâce aux extraits des 21 espèces de Macaranga d'après P.-M. Allard et al. Anal Chem, 2016, 88, 3317-3323

2.2 Une activité antiproliférative puissante et sélective

En 1998, le NCI a réalisé un criblage sur un panel de 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines en mesurant l'inhibition de croissance (IC_{50}) d'extraits de *Macaranga* spp.. Les SWs ont montré une activité cytotoxique remarquable et sélective, notamment sur une lignée du système nerveux central : la lignée du glioblastome SF-295 (Beutler et al., 1998; Neighbors et al., 2006; Shoemaker, 2006). En effet, l'IC_{50} de la **SW A** est de 11 nM vis-à-vis de la lignée sensible du glioblastome SF 295 (Beutler et al., 1998), et l'IC_{50} de la **védélianine** est, en moyenne, de l'ordre du sub nanomolaire vis-à-vis de l'ensemble du panel de 60 lignées du NCI (Topczewski and Wiemer, 2011).

Le motif HHX semble conférer une puissante cytotoxicité car les SWs ne possédant pas ce motif présentent une activité cytotoxique plus faible, comme les SWs I et J (Klausmeyer et al., 2010). Des études de relations structure-activité ont permis de construire un pharmacophore présentant les sites de modulations possibles (cf. Figure 5) (Kuder, 2009).

Les SWs présentent un mécanisme d'action encore mal connu, mais original (Kuder, 2009), ce qui permettra la découverte potentielle d'une(de) nouvelle(s) cible(s) biologique(s) anticancéreuse(s).

2.3 Travaux antérieurs

De nombreux partenariats ont été mis en place entre l'ICSN et des laboratoires de recherches situés en zones tropicales (Vietnam, Malaisie, Nouvelle-Calédonie…), ce qui a permis la création d'une extractothèque à l'ICSN de plus de 6 500 plantes. Actuellement, 308 espèces de *Macaranga* ont été décrites. L'extractothèque comprend 78 extraits issus de 24 espèces provenant de quatre pays différents (Vietnam, Madagascar, Nouvelle-Calédonie et Ouganda). Afin de détecter rapidement les espèces contenant des SWs, et d'identifier dans quelle(s) partie(s) de plante elles se trouvaient, une étude de « déréplication » a été réalisée en 2016 sur les diverses parties de ces plantes (écorce, tige, feuille, fleur et fruit) grâce à l'emploi de la méthodologie des réseaux moléculaires (Allard et al., 2016). L'utilisation de standards de stilbènes prénylés tels que les **SWs E**, **F, G**, la **védélianine** et la **mappaïne** ont permis de repérer le cluster d'intérêt comportant potentiellement de nouvelles SWs (cf. Figure 6). A l'aide de filtres « espèce de plantes » et « partie de plante » utilisés sur ce cluster, il a été mis en évidence que les stilbènes prénylés étaient principalement dans les feuilles et les fruits, et que les espèces contenant majoritairement cette famille de molécules étaient *M. tanarius, lowii, denticulata* et *schweinfurthii*. Par la suite, dans le but d'isoler en plus grande quantité des SWs connues et de caractériser de nouveaux analogues, le choix s'est porté sur les fruits de *Macaranga tanarius*.

Figure 7 : Photographie de Macaranga tanarius

Figure 8 : Photographie des fruits de Macaranga tanarius

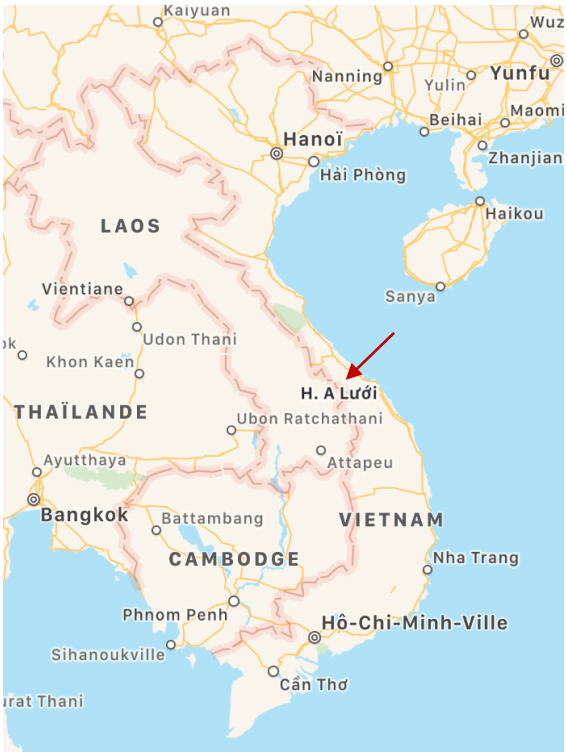


Figure 9 : Localisation de la récolte des fruits de Macaranga tanarius (flèche rouge)

Figure 10 : Photographie de la planche d'herbier de Macaranga tanarius

2.4 Macaranga tanarius

2.4.1 Description botanique et distribution géographique

Macaranga tanarius (L.) Müll. Arg., de la famille des Euphorbiacées, est un arbre dioïque à feuilles persistantes mesurant de 4 à 10 mètres de hauteur (cf. Figure 7). Ses feuilles, de très grandes tailles, lui donnent le nom d'arbre aux feuilles parasol. Les fleurs sont organisées en panicule et les fruits correspondent à des capsules à trois loges (cf. Figure 8) (Starr et al., 2003). C'est une espèce myrmécophile (association symbiotique avec les fourmis) (Guhling et al., 2005). L'espèce *M. tanarius* est localisée dans les zones tropicales d'Asie, dont le Vietnam, le sud du Japon, aux îles Okinawa, en Chine continentale et en péninsule Malaise (Kawakami et al., 2008).

2.4.2 Usage traditionnel

Différentes parties de la plante sont utilisées traditionnellement : les feuilles entières comme contraceptif et sous forme de poudre comme cicatrisant, la décoction d'écorces et de racines pour lutter contre la dysenterie et l'hémoptysie, et enfin le latex des tiges comme suture pour les coupures profondes ou comme topique contre les douleurs dentaires (Fern, 2014).

2.5 Objectifs de l'étude

La précédente étude de 2016 réalisée sur les réseaux moléculaires a également permis de détecter la présence de nouveaux analogues de SWs. En effet, dans le cluster présenté Figure 6, des nodes ne sont pas identifiées comme étant des SWs connues.

L'objectif de cette étude est d'isoler et caractériser les composés minoritaires présents dans les fruits de *M. tanarius,* étant potentiellement de nouveaux analogues de SWs. Une étude de l'activité biologique de ces minoritaires sera alors réalisée afin de compléter les connaissances de relations structure-activité.

3 Matériels et méthodes

3.1 Matériel végétal

Ce travail concerne les fruits de *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae) provenant de la récolte du 10 juin 2014 effectuée au Vietnam à A Lưới (dans la province de Thừa Thiên-Huế) (cf. Figure 9). La plante a été identifiée lors de la récolte par N.T. Cuong. Un herbier de référence est disponible à l'Institut d'Ecologie et des Ressources Biologiques (IEBR) de l'Académie des Sciences et Technologies du Vietnam (VAST) à Hanoi, au Vietnam, dont le code est VN-2371 (cf. Figure 10).

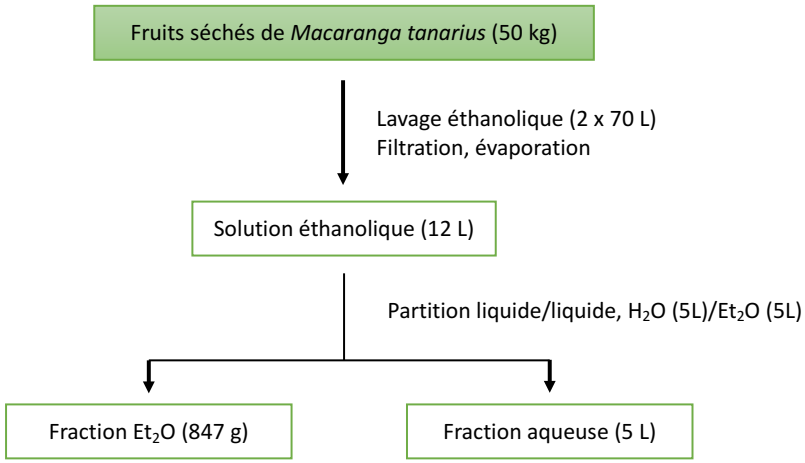


Figure 11 : Premiers travaux d'isolement effectués au Vietnam suite à la récolte des fruits de M. tanarius

Tableau 1 : Conditions expérimentales des chromatographies flash

Fraction	Masse (g)	Type de colonne	Phase mobile	Débit (ml/min)	Durée de la méthode (min)
F7	12	PN, FlashPure EcoFlex Silica® 330 g	Gradient Heptane-Acétate d'éthyle, 7:3 à 0:1	200	50
F7-13	0,768	PI, C18 Reveleris® 40 g	Gradient Eau-ACN, 6:4 à 0:1	40	60
F8	18	PN, FlashPure EcoFlex Silica® 220 g	Gradient Heptane-Acétate d'éthyle, 6:4 à 0:1	90	N.R.
F8-4	1,300	PI, C18 FlashPure EcoFlex® 80g	Gradient Eau-ACN, 7:3 à 0:1	60	60
F8-4e	0,205	PI, C18 Reveleris® 12 g	Gradient Eau-ACN, 8:2 à 0:1	30	80

3.2 Extraction (Vietnam)

Des premières extractions ont été effectuées au Vietnam. Les fruits séchés de *Macaranga tanarius* (50 kg) ont été lavés avec de l'éthanol (2 x 70 L), puis une partition liquide/liquide a été réalisée en ajoutant de l'eau (5 L) et du diéthyléther (5 L) (cf. Figure 11). La solution de diéthyléther a été évaporée, et les 847 g d'extrait ont été envoyés à l'ICSN.

3.3 Méthodes chromatographiques d'analyse, de fractionnement et de purification

3.3.1 Chromatographie sur Couche Mince

Les dépôts ont été réalisés sur des plaques de silice 60 F_{254} (Merck®) sur support en aluminium, d'une épaisseur de 0,25 mm.

C'est une technique utilisée avant et après chaque étape de fractionnement afin de trouver le meilleur système de solvants pour la séparation et pour visualiser les différents composés d'une fraction.

Après migration et séchage, la révélation s'effectue dans un premier temps par lumière UV à 254 nm (par extinction de fluorescence) et 366 nm (par fluorescence) puis par pulvérisation d'un révélateur chimique non spécifique, la vanilline sulfurique, et chauffage.

3.3.2 Chromatographie Flash

Le fractionnement de certains extraits a été réalisé par chromatographie flash (CF) sur un appareil CombiFlash® Companion® (Teledyne ISCO®). Les conditions de chaque fractionnement par CF sont résumées Tableau 1 :

- En phase normale (PN) sur une colonne de silice FlashPure EcoFlex Silica® 330 g (Buchi®) à partir de 12 g d'extrait **F7** (dépôt solide avec célite), avec une phase mobile constituée d'un mélange Heptane/Acétate d'éthyle en mode gradient et un débit de 200 ml/min ; d'une colonne de silice FlashPure EcoFlex Silica® 220 g (Buchi®) à partir de 18 g d'extrait **F8** (dépôt solide avec célite), avec une phase mobile constituée d'un mélange Heptane/Acétate d'éthyle en mode gradient et un débit de 90 ml/min.

La CF de **F8** a été réalisée au préalable par Céline Rampal.

- En phase inverse (PI) sur une colonne C18 Reveleris® 40 g (Grace®) à partir de 768 mg d'extrait **F7-13** (dépôt solide avec célite), avec une phase mobile constituée d'un mélange Eau/Acétonitrile en gradient et un débit de 40 ml/min ; d'une colonne C18 FlashPure EcoFlex® 80 g (Buchi®) à partir de 1,30 g d'extrait **F8-4** (dépôt solide avec célite), avec une phase mobile constituée d'un mélange Eau/Acétonitrile en gradient et

Tableau 2 : Gradient d'élution général utilisé en CLHP pour les contrôles analytiques

Temps (min)	Eau (%)	Acétonitrile (%)
0	90	10
5	90	10
35	0	100
49	0	100

$$Débit_{prep} = Débit_{ana}\ x\ \frac{L_p}{L_a}\ x\ \frac{D_p^2}{D_a^2}$$

Avec :

$Débit_{prep}$: débit utilisé en CLHP préparative

$Débit_{ana}$: débit utilisé en CLHP analytique

L_p et **L_a** : longueur de la colonne préparative (p) et analytique (a)

D_p et **D_a** : diamètre de la colonne préparative (p) et analytique (a)

Figure 12 : Facteur de transposition du débit

Tableau 3 : Conditions expérimentales des CLHP semi-préparatives

Fraction	Masse (mg)	Type de colonne	Phase mobile	Débit (ml/min)	Durée de la méthode (min)
F7-13c	14,1	Semi-préparative, Kromasil (5µm, 10 x 250 mm)	Isocratique H_2O-ACN, 40-60	4,7	40
F7-13d	64,6	Semi-préparative, Kromasil (5µm, 10 x 250 mm)	Isocratique H_2O-ACN + HCOOH, 60-40	4,7	60
F7-13e	22,1	Semi-préparative, Kromasil (5µm, 10 x 250 mm)	Isocratique H_2O-ACN, 50-50	4,7	40
F7-13f	143,4	Semi-préparative, Kromasil (5µm, 10 x 250 mm)	Isocratique H_2O-ACN, 45-55	4,7	40
F8-4eb	5,6	Semi-préparative, Kromasil (5µm, 10 x 250 mm)	Isocratique H_2O-ACN, 35-65	4,7	50
F8-4ec	21,4	Semi-préparative, Kromasil (5µm, 10 x 250 mm)	Isocratique H_2O-ACN + HCOOH, 35-65	4,7	60
F8-4ee	7,2	Semi-préparative, Kromasil (5µm, 10 x 250 mm)	Isocratique H_2O-ACN, 55-45	4,7	30

un débit de 60 ml/min ; et d'une colonne C18 Reveleris® 12 g (Grace®) à partir de 204,6 mg d'extrait **F8-4e** (dépôt solide avec célite), avec une phase mobile constituée d'un mélange Eau/Acétonitrile en gradient et un débit de 30 ml/min. Cet appareil est équipé d'un détecteur UV, ce qui a permis le suivi et l'adaptation de l'élution à une longueur d'onde de 330 nm (caractéristique des schweinfurthines).

3.3.3 Chromatographie Liquide Haute Performance

3.3.3.1 Analytique

Un contrôle analytique de chaque fraction (obtenues à la suite du fractionnement par CF) est réalisé sur une chaîne de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou *HPLC en anglais*) Alliance® (Waters 2695) équipée de deux systèmes de détection : un détecteur UV/Visible à barrettes de diode (DAD) (Waters 2996) et un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) (Waters 2424).

La colonne analytique utilisée est une phase inverse Kromasil C18® (Thermo®), 5 µm, 250 mm x 4,6 mm, avec un système binaire de solvants Eau/Acétonitrile. Le débit est de 1 ml/min. Pour les contrôles analytiques, un gradient d'élution général est utilisé (cf. Tableau 2).

Les mises au point pour assurer la purification des composés s'effectuent également sur la chaîne CLHP Alliance®, avec un mode d'élution isocratique.

3.3.3.2 Préparative

Les composés ont ensuite été isolés sur une chaîne CLHP semi préparative Autopurif (Waters®) avec injecteur collecteur (Waters 2767 Sample Manager, Waters 2545 Binary Gradient Module, Waters 515 HPLC pump), relié à un détecteur UV (Waters 2996) et DEDL (PL ELS 1000).

La colonne utilisée est une colonne semi préparative Kromasil C18® (Thermo®), 5 µm, 250 mm x 10 mm, avec un système de solvant binaire Eau/Acétonitrile en mode isocratique et un débit correspondant selon les mises au point effectuées au préalable sur la chaîne analytique et la formule de transposition du débit (cf. Figure 12 et Tableau 3).

3.4 Méthodes de détermination structurale

3.4.1 Spectrométrie de Masse Haute Résolution

Les spectres de masse ont été acquis sur une chaîne de Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (*UHPLC en anglais*) Acquity® (Waters®) couplée à un appareil LCT Premier XE (Waters®) équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI) en mode positif ou négatif et d'un analyseur à temps de vol (TOF).

L'injection des échantillons a été effectuée sur une colonne BEH C18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, avec un gradient Eau/Acétonitrile de 95/5 à 0/100, à la concentration de 2 ng/µL.
Les spectres ont été visualisés et traités avec le logiciel MassLynx®.

3.4.2 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

Afin d'identifier les composés isolés, des expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à une dimension ont été réalisées (^{1}H et ^{13}C), ainsi que des expériences à deux dimensions homonucléaires (COSY, ROESY) et hétéronucléaires (HMBC, HSQC). Elles ont été effectuées sur un appareil Brucker® Advance AMX-500 (RMN à 500 MHz).
Les échantillons à analyser ont été solubilisés dans de l'acétonitrile-d_3.
Les spectres ainsi obtenus ont été retraités avec le logiciel TopSpin® (Brucker®). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

3.4.3 Spectroscopie Ultra-Violet

Les valeurs d'absorbance (A) et le coefficient d'extinction molaire (ε) ont été obtenus sur un spectrophotomètre Cary 100 (Varian®), les composés ayant été solubilisés dans du méthanol à une concentration de 0,01 mg/ml.

3.4.4 Spectroscopie Infrarouge

Les spectres infrarouge (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre à transformée de Fourier Spectrum 100 FT-IR (Perkin-Elmer®). La mesure de l'absorption (en cm^{-1}) a été effectuée sur des produits secs.

3.4.5 Polarimètre

Les pouvoirs rotatoires ont été calculés sur un polarimètre MCP 300 (Anton Paar®), à une température de 20 °C. La source lumineuse monochromatique utilisée correspond à la raie D du sodium (λ = 589,3 nm). Les composés ont été solubilisés dans du méthanol à une concentration de 0,005 g/ml, et ont été placés dans une cuve de 350 µl et 100 mm.

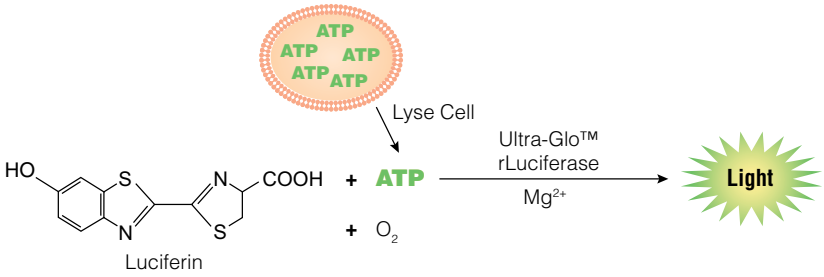


Figure 13 : Principe du réactif CellTiter-GLo®

3.5 Déréplication : réalisation d'un réseau moléculaire

Une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-HRMS/MS) des fractions **F1** à **F9** ainsi que des sous-fractions obtenues de **F8** a été réalisée. Les données en format propriétaire ont été converties en format libre grâce au logiciel MS Convert® puis prétraitées avec le logiciel MZmine2®. Les réseaux moléculaires ont été générés en utilisant le logiciel MetGem. C'est un logiciel libre d'accès permettant la construction et la visualisation parallèle de deux types de réseaux moléculaires complémentaires, dont l'un est basé sur l'analyse GNPS, et l'autre sur un algorithme nommé t-SNE. Les données du réseau moléculaire ont été comparées à des standards de SWs (synthétisés ou isolés lors de travaux antérieurs à l'ICSN) et aux bases de données publiques. Ce travail a été réalisé par Cécile Apel.

3.6 Évaluation de l'activité biologique

Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur deux lignées cellulaires cancéreuses : U87 MG et A549, cultivées respectivement dans des milieux DMEM et RPMI 1640 complémentés à 10 % de sérum de veau fœtal. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37 °C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. Des repiquages sont réalisés deux fois par semaine afin d'entretenir le stock et de préparer les cellules pour les tests de cytotoxicité.

Afin d'évaluer l'IC_{50} des composés purifiés, les cellules des différentes lignées ont été ensemencées sur des plaques 96 puits (3 500 cellules/puits) contenant 100 µL de milieu. Après 24 h d'incubation (37 °C, 5 % CO_2), les cellules ont ensuite été mises en présence des composés. Pour cela, chaque produit est dissous dans du DMSO à 10^{-2} M, utilisé comme solution mère pour les différentes dilutions. Chaque dilution au DMSO (10^{-2} à 5.10^{-7} M) a ensuite été diluée au centième avec du milieu de culture dont 1/10 a été prélevé pour traiter les lignées cellulaires selon la gamme de concentration suivante, en triplicat : 1.10^{-5}, 5.10^{-6}, 1.10^{-6}, 5.10^{-7}, 1.10^{-7}, 5.10^{-8}, 1.10^{-8}, 5.10^{-9}, 1.10^{-9}, 5.10^{-10} M. Après 72 h d'incubation (37 °C, 5 % CO_2), 100 µL du réactif CellTiter-Glo ® ont été ajoutés dans chaque puit, et la luminescence a été mesurée au bout de 30 minutes. Le principe du réactif utilisé est présenté Figure 13. La luminescence observée est proportionnelle à la quantité d'ATP présent, elle-même proportionnelle au nombre de cellules vivantes contenues dans la culture. Les valeurs ainsi obtenues sont comparées aux cellules non traitées, permettant l'obtention d'un pourcentage de viabilité cellulaire, et donc de l'IC_{50}, concentration à laquelle il reste 50 % de cellules vivantes.

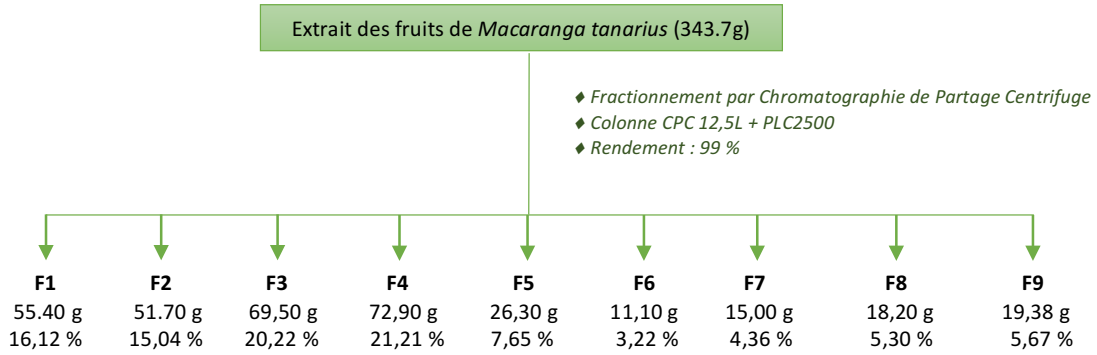


Figure 14 : Schéma de fractionnement de la chromatographie de partage centrifuge réalisée sur l'extrait de M. tanarius

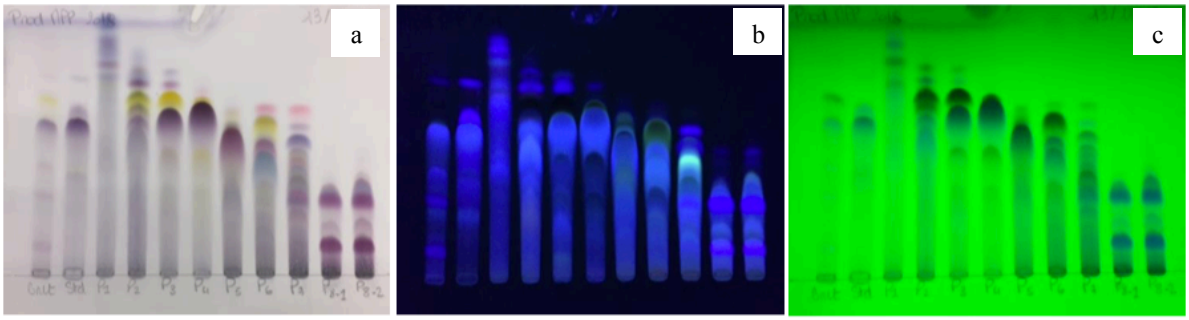


Figure 15 : Chromatographie sur couche mince récapitulative des fractions F1 à F9 obtenues de la chromatographie de partage centrifuge : (a) vanilline sulfurique, (b) 366 nm, (c) 254 nm

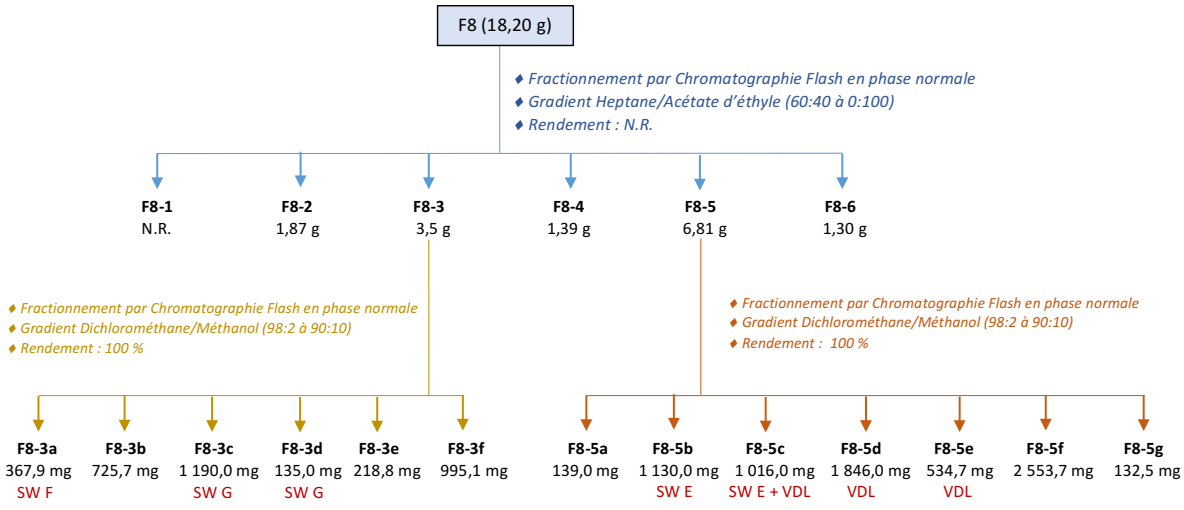


Figure 16: Schéma récapitulatif des travaux de la chromatographie flash de F8 effectuée par Céline Rampal à l'ICSN

4 Résultats

4.1 Travaux antérieurs

4.1.1 Fractionnement préalable par Chromatograhie de Partage Centrifuge

En 2018, un laboratoire indépendant a réalisé le fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) de 343,7 g de l'extrait de fruits de *M. tanarius* provenant du Vietnam : 9 fractions (**F1-F9**) ont été obtenues avec un rendement de 99 % (cf. Figure 14). La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) récapitulative est présentée Figure 15.

4.1.2 Chromatographie Flash

Afin d'isoler certaines SWs, une CF a été réalisée sur **F8** par Céline Rampal à l'ICSN qui a ensuite effectué deux autres CF sur **F8-3** et **F8-5**, ce qui a permis l'extraction de la **SW F** et de la **SW G** à partir de **F8-3**, et de la **SW E** et de la **VDL** à partir de **F8-5**. La synthèse de ses travaux sont présentés Figure 16. Ils ont permis un pré-fractionnement de **F8**.

4.2 Étude phytochimique

4.2.1 Orientation du travail : utilisation des UV comme outil de déréplication

Un contrôle analytique par HPLC a été effectué sur **F1** à **F9**. Avant de créer et d'explorer les réseaux moléculaires, les spectres UV des composés contenus dans chacune des fractions ont été analysés de façon à repérer celles contenant les SWs. En effet, le spectre d'absorption UV caractéristique d'une SW présente un maximum à ~ 330 nm correspondant au motif *trans*-stilbène. Ce travail préliminaire a permis de sélectionner la fraction F7 contenant les bandes d'absorption caractéristiques UV des SWs pour les purifications ultérieures.

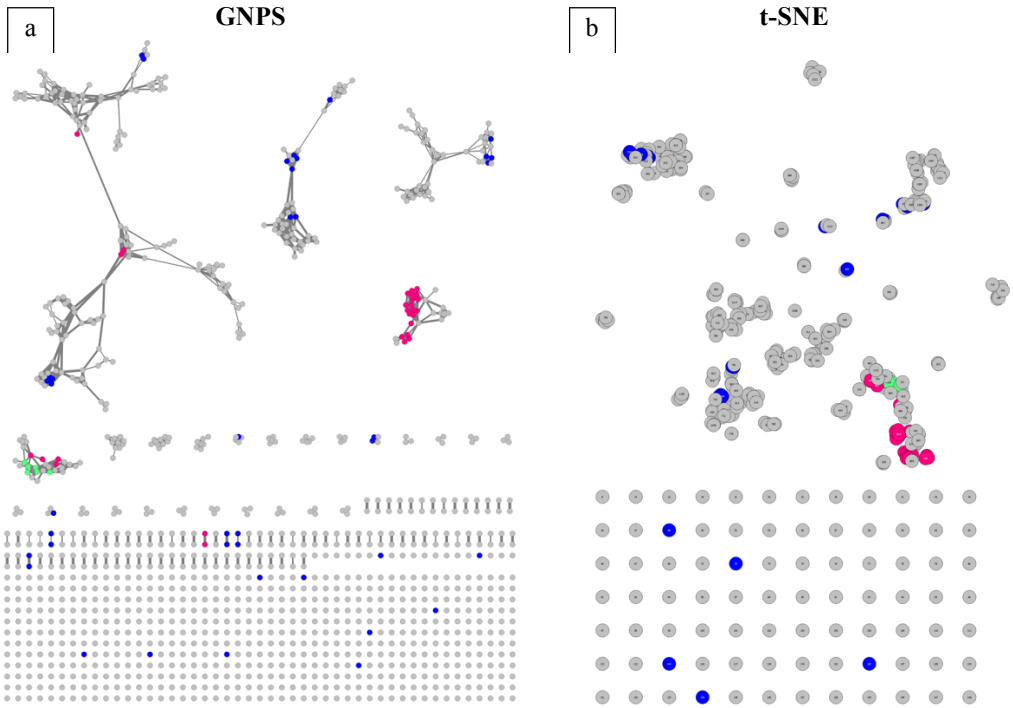


Figure 17 : Réseaux moléculaires obtenus de F1 à F9 et F8-1 à F8-6 réalisé par Cécile Apel à l'ICSN, (a) visualisation GNPS, (b) visualisation t-SNE. En rouge : masses correspondants aux SWs des bases de données interne, en vert : masses correspondants aux SWs des bases de données publiques, en bleu : masses correspondants aux produits naturels des bases de données publiques

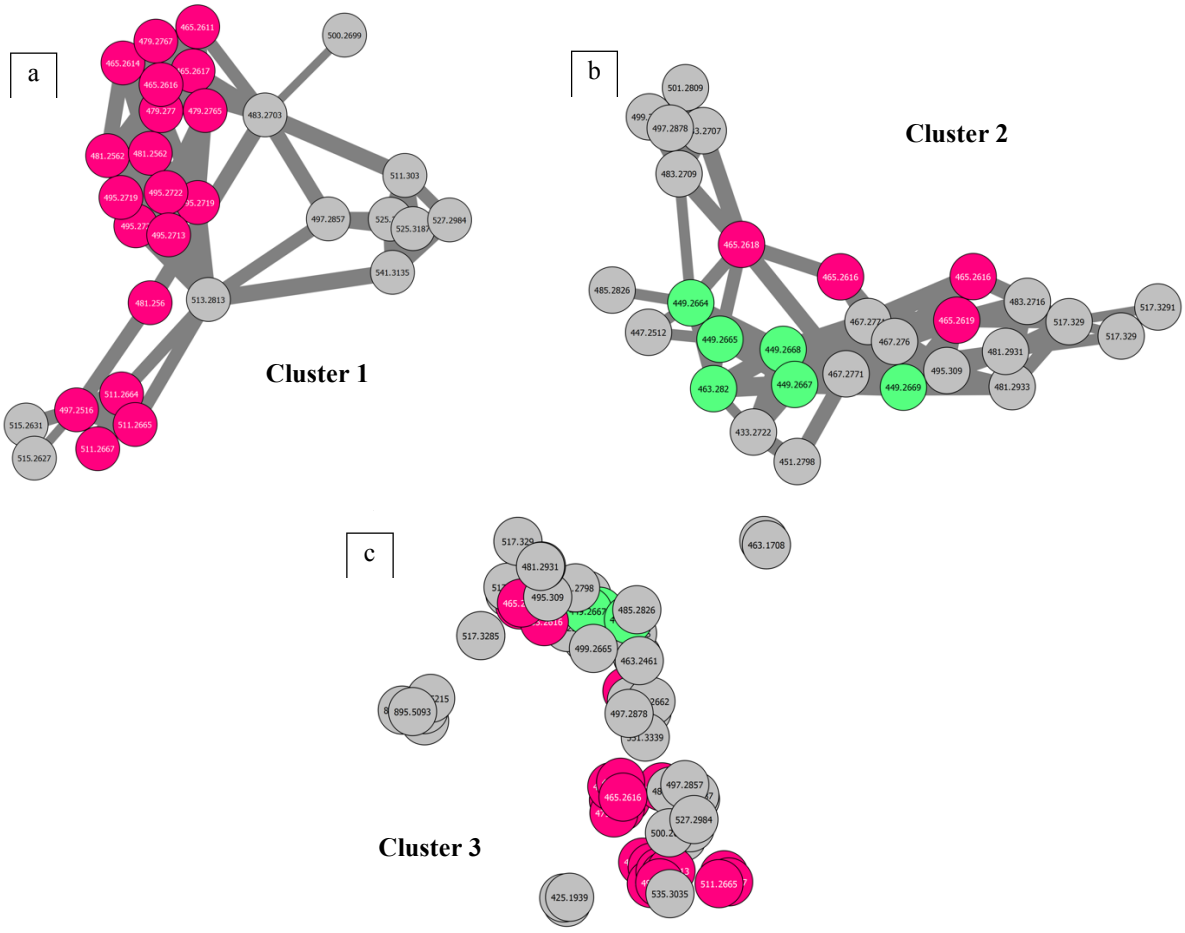


Figure 18 : Clusters d'intérêt des SWs, (a) et (b) visualisation du GNPS, (c) visualisation t-SNE. En rouge : masses correspondants aux SWs des bases de données interne, en vert : masses correspondants aux SWs des bases de données publiques

4.2.2 Étude déréplicative grâce aux réseaux moléculaires

La réalisation d'un réseau moléculaire par Cécile Apel à l'ICSN à partir des fractions obtenues de la CPC (**F1**-**F9**) ainsi que des sous-fractions obtenues par CF de **F8** (**F8-1**-**F8-6**) a permis de repérer les fractions contenant potentiellement de nouvelles SWs. Ce réseau est présenté Figure 17.

Les composés de référence ont permis d'identifier facilement les clusters d'intérêt (cf. Figure 18). Les nodes en rouge correspondent aux spectres de masse des standards de SWs de la base de données interne à l'ICSN. Les nodes en vert correspondent aux spectres de masse des SWs des bases de données publiques et les nodes en bleu correspondent aux spectres de masse d'autres produits naturels de ces bases de données publiques.

Deux clusters distincts sont retrouvés sur l'analyse classique GNPS. Les masses *m/z* des ions $[M+H]^+$ retrouvées dans le cluster 1 correspondent à celles de SWs comportant le motif HHX telles que les **SWs E**, **F**, **G**, **Q** et la **VDL**. Celles retrouvées dans le cluster 2 correspondent à celles de SWs ne comportant pas ce motif telles que les **SWs C**, **K**, **N**, la **mappaïne** et la **méthyl-mappaïne**. Hypothétiquement, le cluster 1 correspondrait au cluster des SWs à motif HHX, et le cluster 2 regrouperait les SWs sans motif HHX.

Le réseau moléculaire obtenu par l'analyse t-SNE de MetGem permet quant à lui d'observer un regroupement des nodes d'intérêt au sein d'une même zone (nommée cluster 3) (cf. Figure 18), confirmant une relation structurelle proche entre ces différentes SWs, à motif HHX ou non.

Les nodes grises des clusters 1 et 2 correspondent potentiellement à de nouveaux analogues des SWs connues. De plus, on retrouve plusieurs nodes rouges correspondant à des composés de masses identiques, indiquant l'existence de plusieurs isomères au sein de l'extrait. Il sera donc important de vérifier la présence éventuelle de nouveaux isomères.

Grâce au prétraitement des données de LC-HRMS/MS par MZmine2, les métadonnées associées aux réseaux indiquent les aires de pic et permettent de comparer les abondances relatives des ions au sein des fractions. Il est donc possible de déterminer dans quelle fraction un composé est majoritairement présent. Ainsi, appliquer un critère « d'aire maximale » sur les nodes grises et rouges des clusters 1 et 2 permet de repérer les fractions contenant de potentiels nouveaux analogues de SWs, et par conséquent de prioriser leur étude. On constate ainsi qu'ils sont présents majoritairement dans les fractions **F7**, **F8-4**, **F8-5** et **F8-6**. Le choix de la suite de l'étude a donc été porté sur **F8-4**, avec confirmation de l'intérêt porté à **F7**.

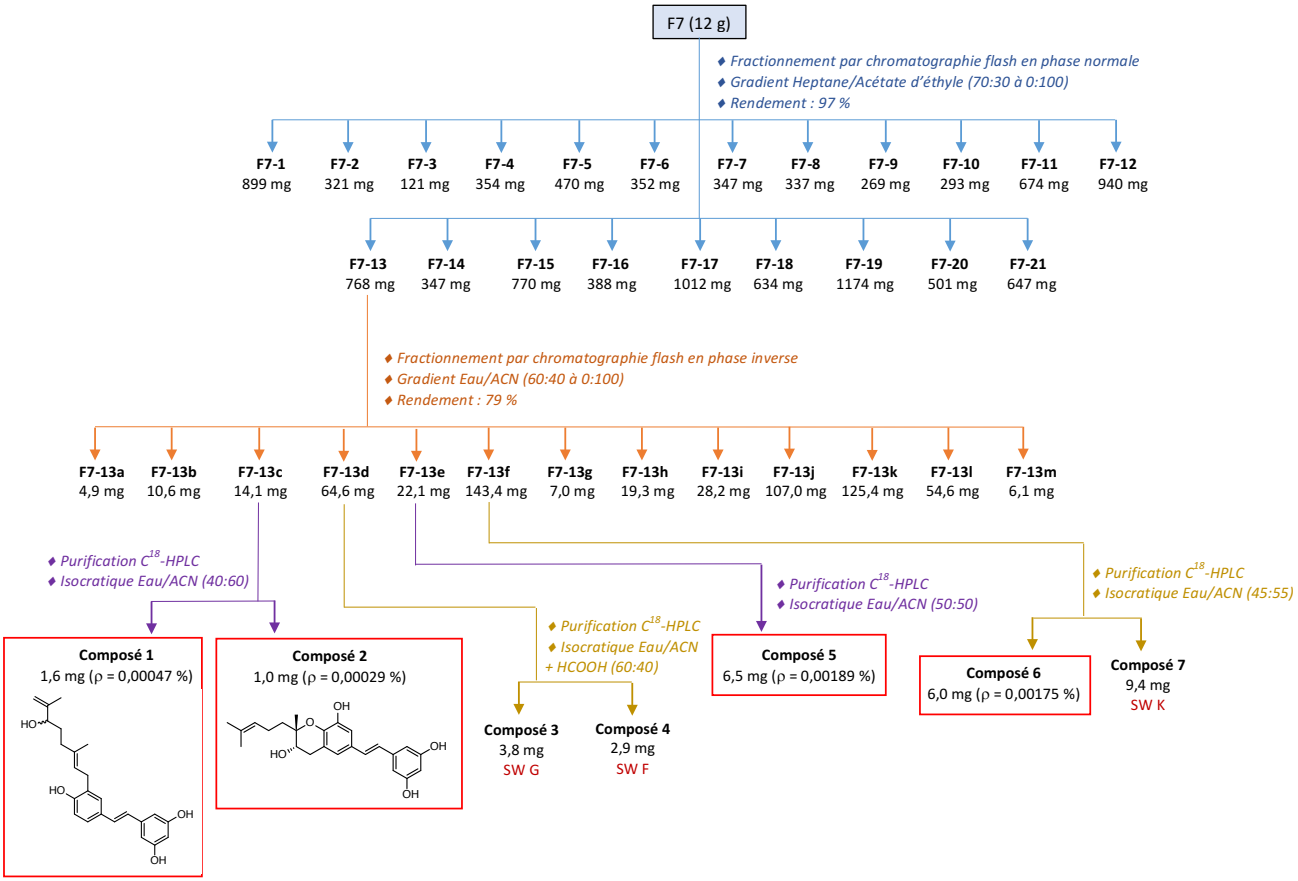


Figure 19 : Résumé des travaux de purification sur F7

La synthèse des travaux de purification sur **F7** et **F8-4** est présentée Figure 19 et Figure 20. Les nouveaux composés minoritaires isolés de ces fractions sont encadrés en rouge.

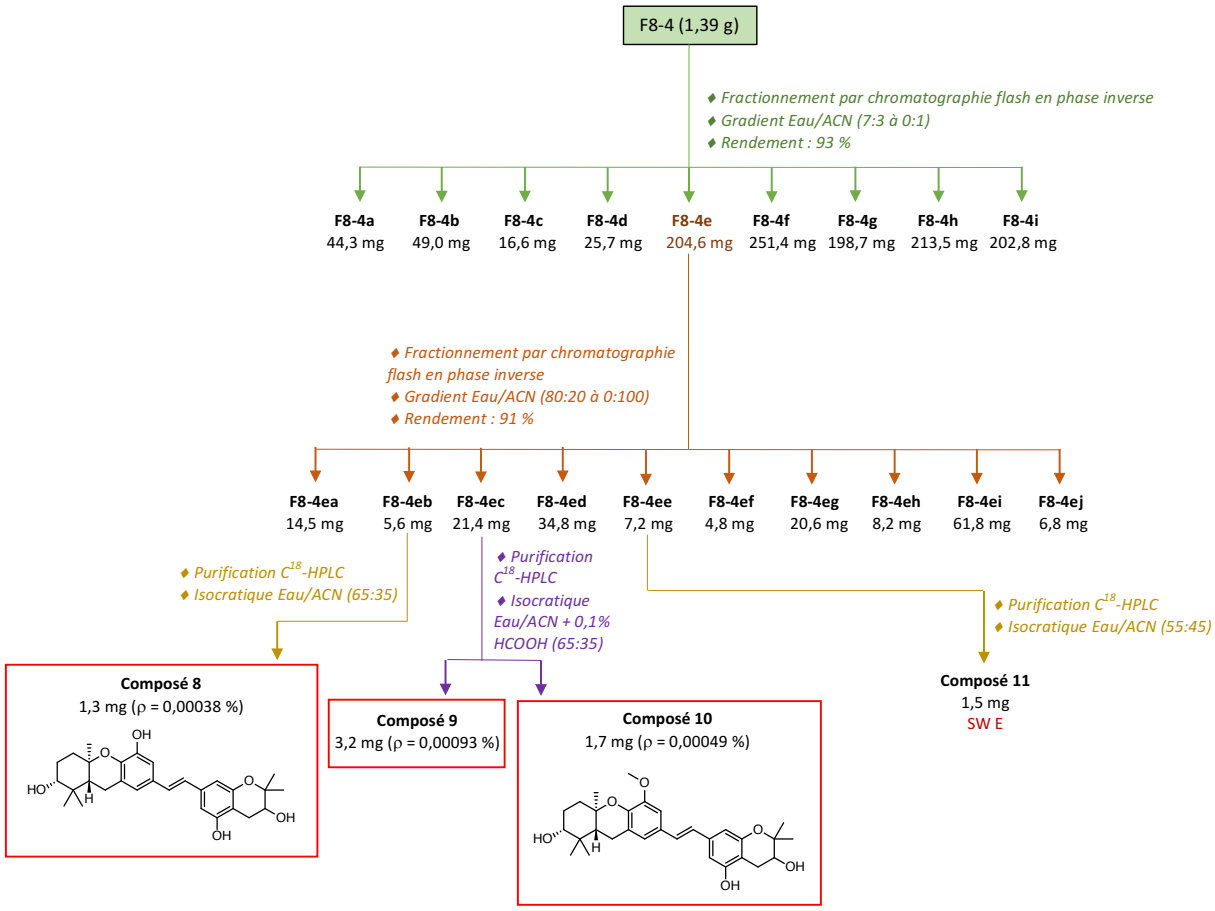


Figure 20 : Résumé des travaux de purification sur F8-4

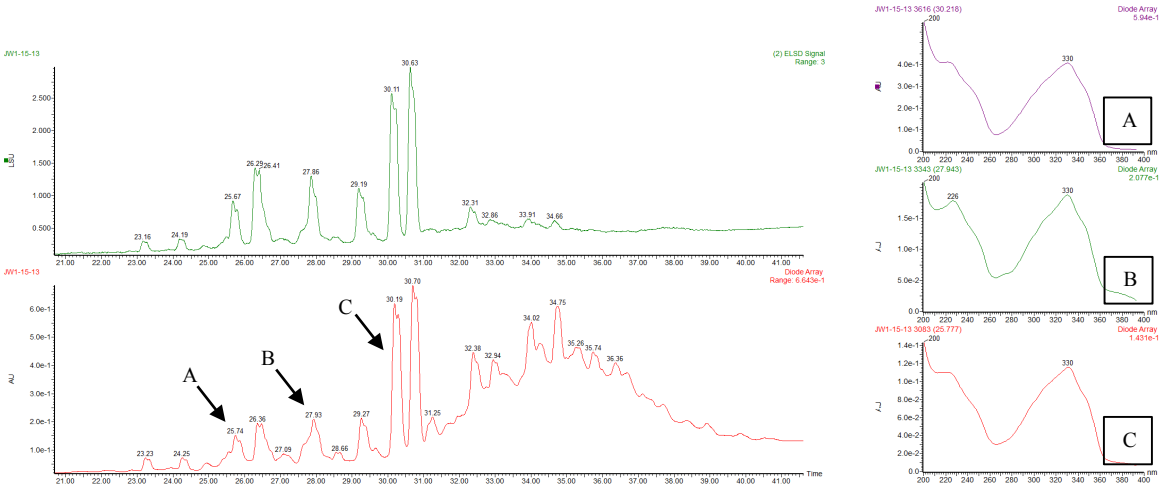


Figure 21 : Profil chromatographique de F7-13 obtenu par un gradient général d'élution, accompagné de certains UV caractéristiques des SWs

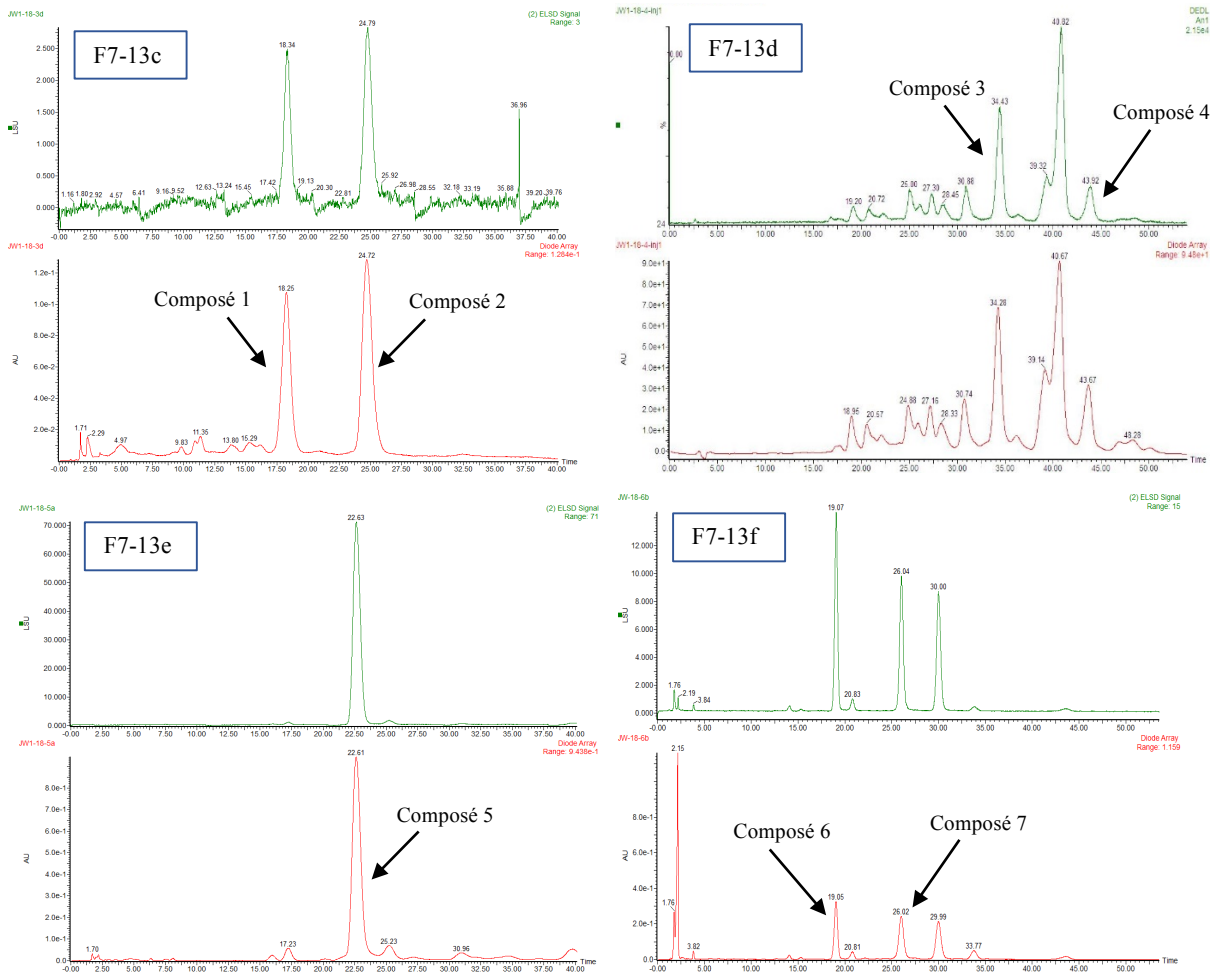


Figure 22 : Mises au point en HPLC analytique de F7-13c, F7-13d, F7-13e et F7-13f

4.2.3 Purification des composés minoritaires

4.2.3.1 Étude de la fraction F7 :

- **Fractionnement** : Cf. Figure 19

Une première CF en phase normale a permis le fractionnement de **F7** en 21 fractions (**F7-1**-**F7-21**). Un contrôle analytique par CLHP de chacune de ces fractions a orienté la poursuite du travail sur **F7-13**, dont les mises au point de purification paraissent relativement simples, dont la quantité disponible est importante (768 mg) et présentant de nombreux UV caractéristiques de SWs (cf. Figure 21).

Après mise au point en HLPC analytique, une CF en phase inverse de **F7-13** a donc été effectuée, aboutissant à l'obtention de 13 fractions (**F7-13a**-**F7-13m**), suivi d'un contrôle analytique de chacune de ces fractions. Les plus simples à purifier directement en HPLC semi-préparative sont **F7-13c**, **F7-13d, F7-13e** et **F7-13f**. Une mise au point des conditions de séparation a donc été effectuée sur ces quatre fractions (cf. Figure 22) :

F7-13c : cette fraction présente deux composés intéressants dont les conditions de purification correspondent à une élution isocratique Eau-ACN, 40-60. Leur temps de rétention t_R dans ces conditions est de 18,25 min et 24,72 min pour le premier et deuxième pic respectivement.

F7-13d : cette fraction a été sélectionnée pour être purifiée car elle présente deux pics ayant le même t_R que la **SW G** et **F** (comparaison effectuée avec les SWs précédemment isolées à l'ICSN et injectée en HPLC analytique avec un gradient général d'élution). Elle servira d'entrainement pour l'analyse structurale de ces composés. La mise au point pour les purifier correspond à une élution isocratique Eau-ACN, 60-40 avec 0,1 % d'acide formique. Leur temps de rétention t_R dans ces conditions est de 34,28 min pour le premier pic et 43,67 min pour le deuxième.

F7-13e : cette fraction présente un composé intéressant dont les conditions de purification correspondent à une élution isocratique Eau-ACN, 50-50, avec un t_R de 22,61 min.

F7-13f : cette fraction présente trois composés intéressants dont les conditions de purification correspondent à une élution isocratique Eau-ACN, 45-55, avec un t_R de 19,05 min, 26,02 min et 29,99 min pour le premier, deuxième et troisième pic respectivement.

- **Purification** :

Les pics précédemment repérés ont été isolés en HPLC semi-préparative selon les mises au point effectuées et le calcul du nouveau débit grâce au facteur de transposition.

F7-13c : deux produits ont été isolés de cette fraction : le **composé 1** et le **composé 2**, dont les quantités respectives sont 1,6 mg et 1,0 mg.

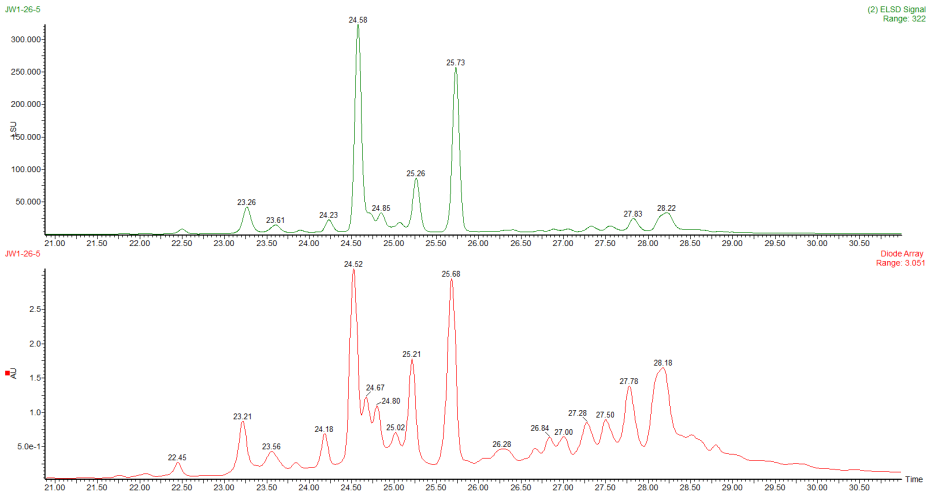


Figure 23 : Profil chromatographique de F8-4e obtenu par un gradient d'élution général

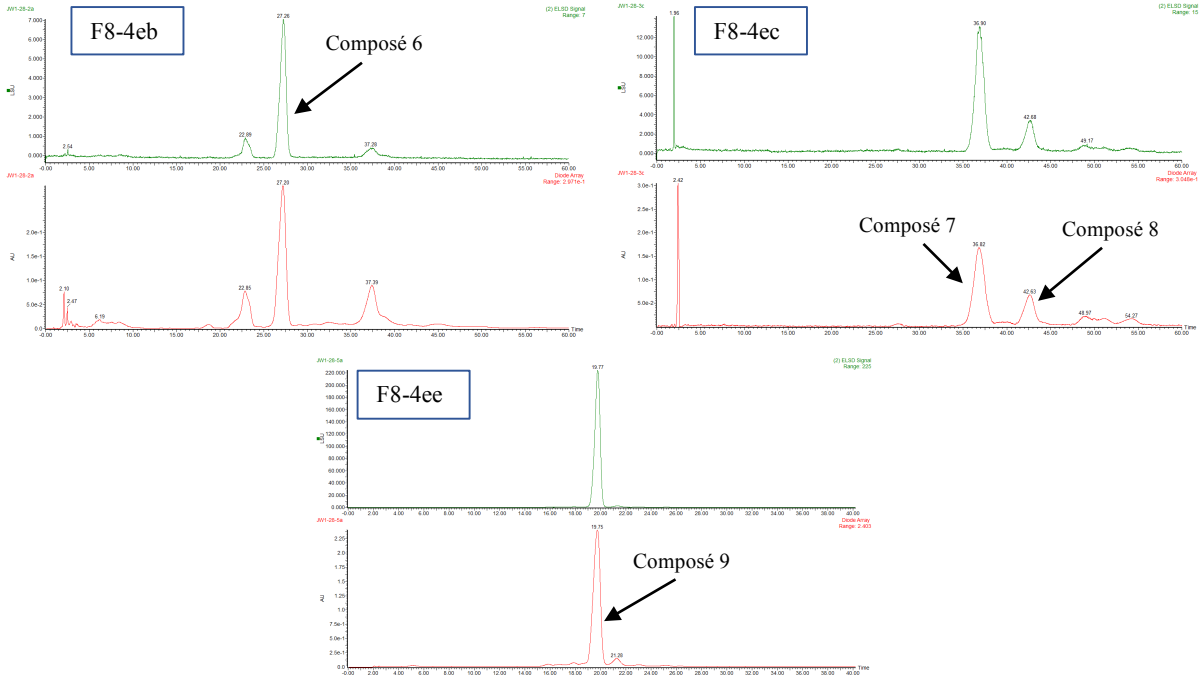


Figure 24 : Mises au point en HPLC analytique de F8-4eb, F8-4ec et F8-4ee

F7-13d : deux produits ont été isolés de cette fraction : le **composé 3** et le **composé 4**, dont les quantités respectives sont 3,8 mg et 2,9 mg.

F7-13e : 6,5 mg d'un produit ont été isolés de cette fraction, il sera nommé **composé 5**.

F7-13f : les trois pics de cette fraction ont été purifiés, cependant il semble y avoir deux composés sous le troisième pic qui ne seront pas étudiés dans ce rapport. Les deux autres produits isolés seront nommés **composés 6** et **7**, leur quantité respective est de 6,0 et 9,4 mg.

4.2.3.2 Étude de la fraction F8-4 :

- **Fractionnement** : Cf. Figure 20

Une première CF en phase inverse a permis le fractionnement de **F8-4** en 9 fractions (**F8-4a**-**F8-4i**). Un contrôle analytique par CLHP de chacune de ces fractions a orienté la poursuite du travail sur **F8-4e** (cf. Figure 23) car cette dernière est en quantité plus importante et elle contient de nombreux UV de SWs.

Ainsi, après mise au point en HPLC analytique, une CF en phase inverse de **F8-4e** a été effectuée, aboutissant à l'obtention de 10 fractions (**F8-4ea**-**F8-4ej**), suivi d'un contrôle analytique de chacune de ces fractions. Celles pouvant être directement purifiées en CLHP semi-préparative sont **F8-4eb**, **F8-4ec** et **F8-4ee**. Une mise au point a donc été effectuée sur ces trois fractions (cf. Figure 24) :

F8-4eb : cette fraction présente un composé intéressant dont les conditions de purification correspondent à une élution isocratique Eau-ACN, 65-35. Son temps de rétention t_R dans ces conditions est de 27,20 min.

F8-4ec : cette fraction présente deux composés intéressants dont les conditions de purification correspondent à une élution isocratique Eau-ACN avec acide, 65-35. Leur temps de rétention t_R dans ces conditions est de 36,82 min pour le premier pic et 42,63 min pour le deuxième.

F8-4ee : cette fraction présente un composé intéressant dont les conditions de purification correspondent à une élution isocratique Eau-ACN, 55-45, avec un t_R de 19,75 min.

- **Purification** :

Les pics précédemment repérés ont été isolés en HPLC semi-préparative selon les mises au point effectuées et le calcul du nouveau débit grâce au facteur de transposition.

F8-4eb : 1,3 mg d'un produit a été isolé de cette fraction, il sera nommé **composé 8**.

F8-4ec : deux produits ont été isolés de cette fraction : le **composé 9** et le **composé 10**, dont les quantités respectives sont 3,2 mg et 1,7 mg.

F8-4ee : 1,5 mg d'un produit a été isolé de cette fraction, il sera nommé **composé 11**.

Tableau 4 : Synthèse de l'élucidation des composés 3, 4, 7 et 11

	$[M+H]^+$ (*m/z*)	Masse calculée	Masse molaire (g/mol)	Formule brute	Identification	Remarque
Composé 3	465,2637	$C_{29}H_{37}O_5^+$ = 465,2636	464,6020	$C_{29}H_{36}O_5$	SW G	Confirme les observations faites en 4.2.3.1
Composé 4	479,2795	$C_{30}H_{39}O_5^+$ = 479,2792	478,6290	$C_{30}H_{38}O_5$	SW F	Analogue méthoxylé de la SW G
Composé 7	465,2635	$C_{29}H_{37}O_5^+$ = 465,2636	464,6020	$C_{29}H_{36}O_5$	SW K	-
Composé 11	495,2721	$C_{30}H_{39}O_6^+$ = 495,2747	494,6280	$C_{30}H_{38}O_6$	SW E	-

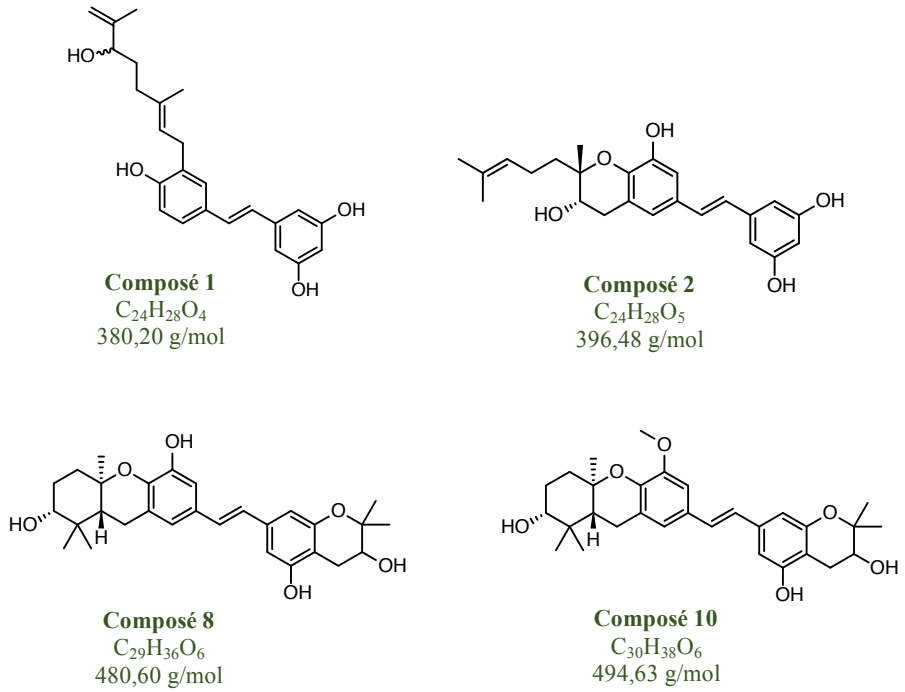


Figure 25 : Structure des nouveaux composés isolés des fruits de M. tanarius

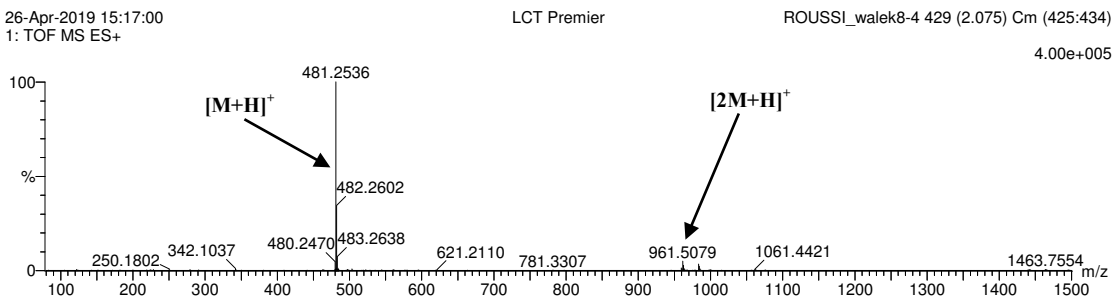


Figure 26 : Spectre de masse du composé 8

Ainsi, ces travaux de purification ont abouti à l'isolement de onze composés dont quatre sont connus, les **SWs E**, **F**, **G** et **K**, et sept sont nouveaux. Pour des raisons de confidentialité, les nouveaux **composés 5**, **6** et **9** ne seront pas présentés dans ce rapport.

4.2.4 Détermination structurale

L'analyse structurale des composés commence par l'obtention de leur masse exacte par analyse HRESIMS, permettant une proposition de formule brute.

4.2.4.1 Schweinfurthines connues :

Les spectres RMN ^{1}H des **composés 3**, **4**, **7** et **11** ont permis leur identification en comparant les données des spectres avec les données de la littérature et les spectres RMN ^{1}H de SWs isolées précédemment en interne à l'ICSN. Une analyse HRESIMS a été réalisée pour ces quatre composés, ainsi qu'une RMN totale pour les **composés 3**, **4** et **7** afin de valider leur structure, ce qui a été un bon entrainement pour l'élucidation future des nouveaux composés. Le détail de l'analyse des RMN totales de ces composés ne sera pas présenté dans ce rapport. La synthèse de leur identification est présentée Tableau 4.

4.2.4.2 Nouveaux composés

Les nouveaux composés isolés sont présentés Figure 25. Seule l'analyse structurale du **composé 8** sera décrite entièrement.

- **Composé 8** :

Le spectre de masse du **composé 8** obtenu en HRESIMS présente un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 481,2562 (calculé pour $C_{29}H_{37}O_6^+$ = 481,2590) correspondant à la formule brute $C_{29}H_{36}O_6$ (cf. Figure 26). Le degré d'insaturation de ce composé est 12.

Le spectre UV présente une bande avec un maximum d'absorption à 330 nm, caractéristique du motif *trans*-stilbène des SWs.

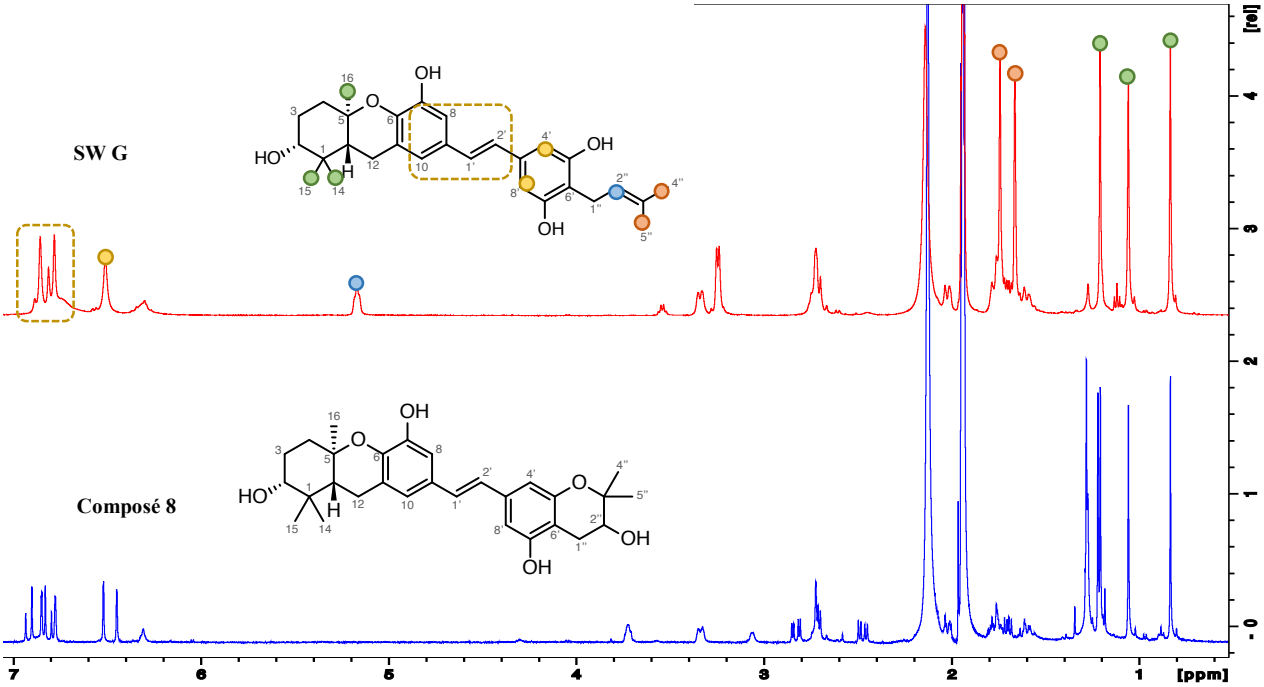


Figure 27 : Comparaison de la RMN ^{1}H du composé 8 avec celle de la SW G (RMN 500 MHz, CD_3CN)

Tableau 5 : Données RMN des composés 8 et 10 (CD_3CN, 500 MHz)

Position	Composé 8		Composé 10	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	39,2	-	39,2	-
2	78,0	3,34, m	78,0	3,32, dd (11,0, 3,3)
3a	29,0	1,77, m	29,0	1,74, m
3b		1,60, m		1,59, m
4a	38,5	2,02, m	38,7	1,96, m
4b		1,75, m		1,71, m
5	78,6	-	77,9	-
6	141,7	-	143,8	-
7	146,7	-	150,1	-
8	110,6	6,85, s	108,0	6,96, s
9	130,5	-	130,0	-
10	120,5	6,78, s	121,8	6,85, s
11	124,0	-	124,1	-
12	23,6	2,72, m	23,8	2,71, d (9,0)
13	48,2	1,70, m	47,8	1,65, t (9,0)
14	27,7	1,06, s	27,7	1,05, s
15	14,8	0,83, s	14,8	0,83, s
16	20,4	1,21, s	20,3	1,18, s
17	-	-	56,3	3,80, s
1’	129,1	6,92, d (16,3)	129,1	6,97, d (16,3)
2’	127,0	6,81, d (16,3)	127,0	6,87, d (16,3)
3’	138,3	-	138,3	-
4’	107,3	6,45, d (1,2)	107,2	6,47, s
5’	156,6	-	156,6	-
6’	108,1	-	108,2	-
7’	155,8	-	155,3	-
8’	105,2	6,52, d (1,2)	105,2	6,53, s
1’’a	27,1	2,83, dd (17,2, 5,4)	27,1	2,83, dd (17,4, 5,2)
1’’b		2,47, dd (17,2, 6,8)		2,48, dd (17,4, 6,9)
2’’	69,7	3,72, m	69,7	3,73, t (6,0)
3’’	77,6	-	77,6	-
4’’	25,6	1,28, s	25,6	1,29, s
5’’	21,3	1,22, s	21,3	1,22, s

Le spectre RMN ^{1}H présente les signaux spécifiques aux SWs possédant le motif HHX (cf. Figure 27 et Tableau 5). En effet, on observe :

- Plusieurs singulets entre 0,8 et 1.4 ppm correspondants aux méthyles du motif HHX : ils se situent à δ_H 0,83, 1,06 et 1,21 ppm (respectivement H-15, H-14, H-16).
- Un massif de signaux entre 6,4 et 7 ppm correspondant aux protons de la double liaison *trans*-stilbène et aux protons aromatiques des cycles C et D : on retrouve deux protons oléfiniques à δ_H 6,81 et 6,92 (respectivement H-2' et H-1', J = 16,3 Hz) indiquant la présence d'une double liaison de configuration *E* en C-1'/C-2'. Ces deux protons sont corrélés en HMBC avec les carbones à δ_C 130,5 et 138,3 (respectivement C-9 et C-3') (cf. Figure 28A). La double liaison relie donc deux cycles aromatiques (C et D). Les protons aromatiques du cycle C se situent à δ_H 6,78 et 6,85 ppm (respectivement H-10 et H-8), ceux du cycle D à δ_H 6,45 et 6,52 ppm (respectivement H-10 et H-8, J = 1,2 Hz).

De plus, on retrouve la présence d'un système de spin de type –CH(O)-CH_2-CH_2- sur le spectre COSY du composé 8 suggérant que le groupement hydroxyle est positionné en C-2 (cf. Figure 29A et B). Cela est confirmé par les corrélations H-3/C-2, H-4/C-2, H-15/C-1 et C-2, et H-16/C-4 en HMBC (cf. Figure 28B, C et D). La configuration relative du carbone C-2 a été déterminée à partir des données de la littérature et des corrélations ROESY d'une part entre le proton H-2 et les protons H-3a, H-4b, H13 et H14, et d'autre part entre le proton H-16 et les protons H-4a et H-15, ainsi qu'entre le proton H-4a et le proton H3b (cf. Figure 30) (Yoder et al., 2007).

Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du **composé 8** et de la **SW G** sont très proches mais des différences sont observées (cf. Figure 27) :

- L'absence chez le **composé 8** du triplet intégrant pour un proton à δ_H 5,17 ppm de la **SW G** (proton éthylénique de la chaîne prényle en *para* du cycle D).
- Le singulet à 6,51 ppm intégrant pour deux protons pour la **SW G** (et correspondant aux protons aromatiques du cycle D) se retrouve scindé en deux singulets à 6,45 et 6,52 ppm intégrant chacun pour un proton chez le **composé 8**.
- Deux singulets intégrant pour trois protons à δ_H 1,22 et 1,28 ppm correspondant à deux méthyles chez le **composé 8**.
- Le **composé 8** présente un système ABX à δ_H 2,47 ppm (H-1'', dd, J = 6,8 et 17,2 Hz) et 2,83 ppm (H-2'', dd, J = 5,4 et 17,2 Hz), ainsi qu'un multiplet à δ_H 3,72 ppm (H-2'').

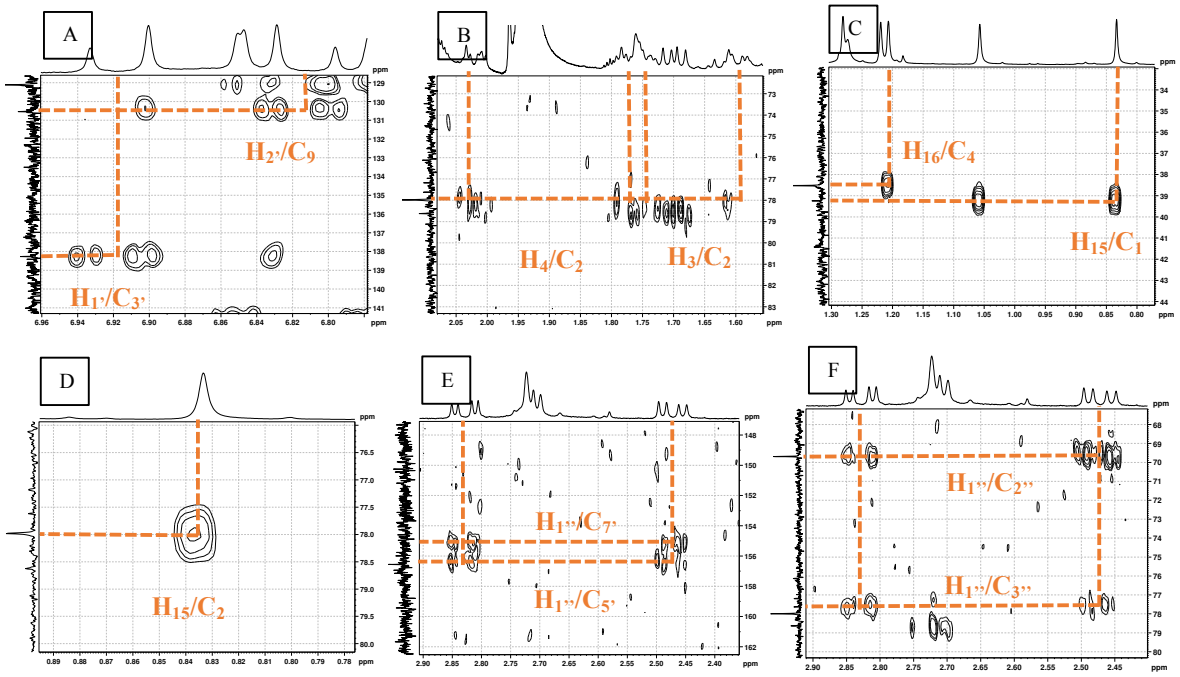


Figure 28 : Spectres HMBC du composé 8 (CD_3CN, 500 MHz)

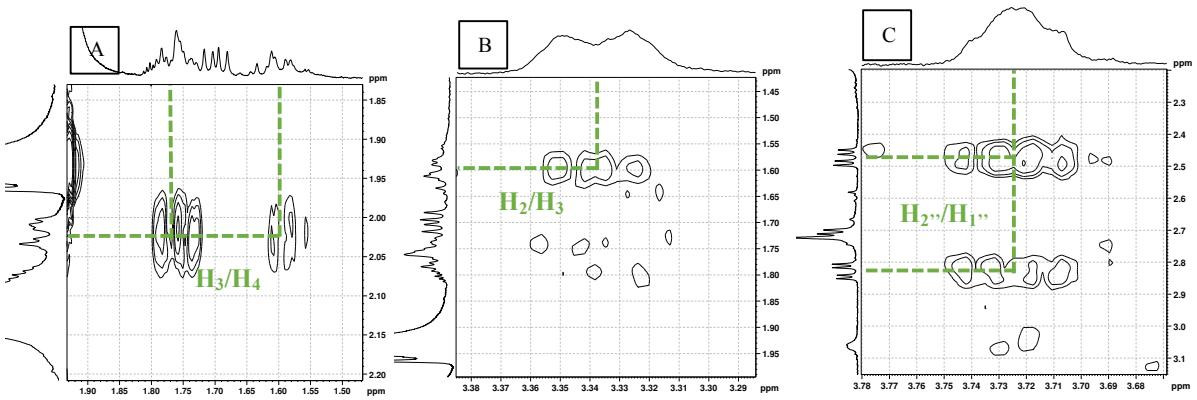


Figure 29 : Spectres COSY du composé 8

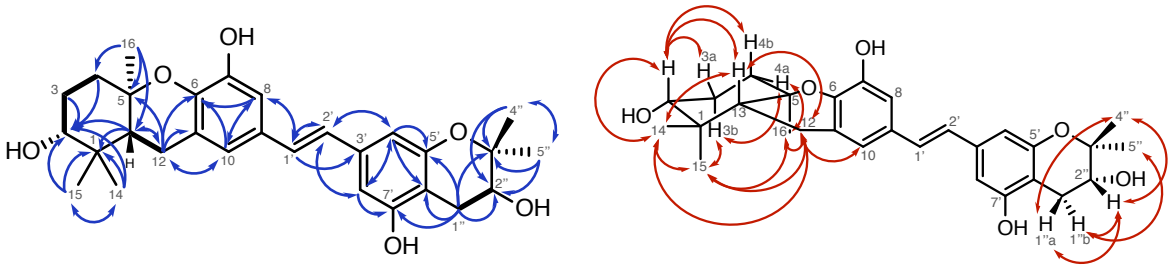


Figure 30 : Corrélations COSY (en gras), HMBC (flèches bleues) et ROESY (flèches rouges) du composé 8

Ces observations révèlent la présence d'un motif 2,2-diméthyldihydropyranol. C'est-à-dire qu'il y a eu fusion du cycle pyranol en C-5'/C-6' du cycle benzénique. Cela est confirmé par les corrélations COSY entre les protons H_2-1'' et H-2'' (cf. Figure 29C), et par les corrélations HMBC entre les protons H-1'' et les carbones tertiaires oxygénés C-5' et C-7' à δ_C 155,8 et 156,6 ppm, le carbone C-2'' portant l'hydroxyle à δ_C 69,7 ppm, et le carbone tertiaire oxygéné C-3'' (cf. Figure 28E et F). Les données RMN ^{1}H et ^{13}C de ce motif sont similaires à celles de la **SW L** possédant un cycle dihydropyranol identique, qui résulte de l'addition intramoléculaire d'un groupe hydroxyle phénolique sur la chaîne isoprénique dont la double liaison a été époxydée (Péresse et al., 2017b).

Les corrélations ROESY entre les protons H-1''a et H_3-4'', entre les protons H-1''b et H_3-5'' et entre les protons H-2'' et H_3-4'' permettent d'établir une configuration relative des carbones C-1'', C-2'' et C-3'' : les protons H_3-4'' et H-1''a sont orientés dans le plan opposé à celui de l'hydroxyle. De plus, H-2'' possède deux constantes de couplage de faibles intensités (5,4 et 6,8 Hz), traduisant son orientation pseudo-équatoriale. On en déduit la position axiale de l'hydroxyle porté par C-2'', ainsi que des protons H_3-4'' et H-1'' situés sur une face opposée à l'hydroxyle.

Les corrélations COSY, HMBC et ROESY du **composé 8** sont présentées Figure 30. Les spectres de la RMN ^{1}H et ^{13}C sont présentés en Annexes I et II.

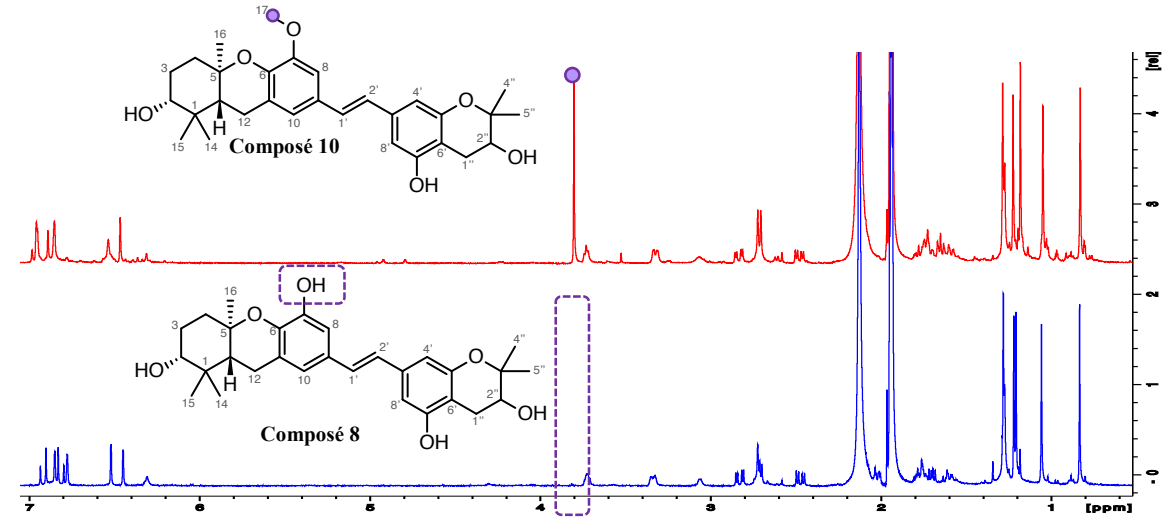


Figure 31 : Comparaison de la RMN ^{1}H du composé 8 avec celle du composé 10 (RMN 500 MHz, CD_3CN)

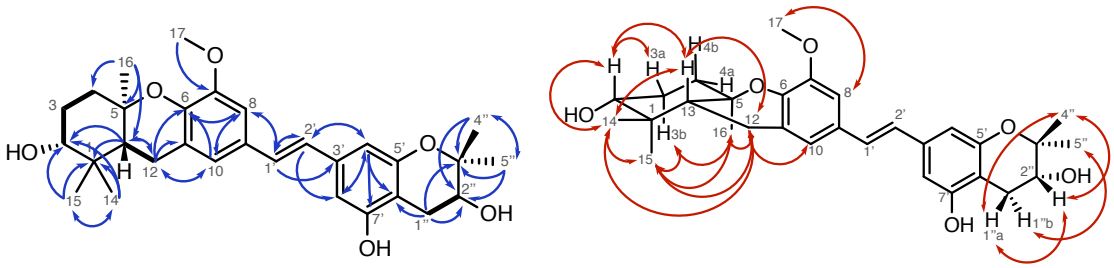


Figure 32 : Corrélations COSY (en gras), HMBC (flèches bleues) et ROESY (flèches rouges) du composé 10

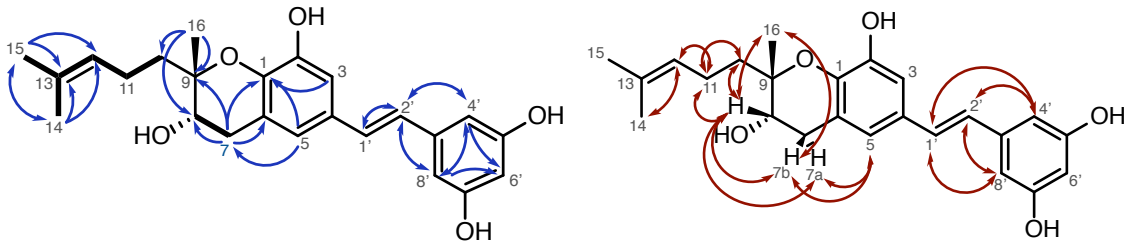


Figure 33: Corrélations COSY (en gras), HMBC (flèches bleues) et ROESY (flèches rouges) du composé 2

- **Composé 10** :

Le spectre de masse du **composé 10** obtenu en HRESIMS présente un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 495,2729 (calculé pour $C_{30}H_{39}O_6^+$ = 495,2741) correspondant à la formule brute $C_{30}H_{38}O_6$. Le degré d'insaturation de ce composé est 12.

Le spectre UV présente une bande avec un maximum d'absorption à 330 nm, caractéristique du motif *trans*-stilbène des SWs.

Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du **composé 8** et du **composé 10** sont très proches. On retrouve la présence du motif HHX et du cycle diméthyldihydropyranol comme décrit pour le **composé 8**. La seule différence observée est l'apparition d'un singulet à 3,80 ppm intégrant pour 3 protons (cf. Figure 31 et Tableau 5), correspondant à la présence d'un groupe méthoxy positionné sur le phénol en position C-7. Cela est confirmé par les corrélations HMBC entre les protons H_3-17 et le carbone C-7. Ainsi, le **composé 10** est un analogue méthoxylé du **composé 8**.

Les corrélations COSY, HMBC et ROESY du **composé 10** sont présentées Figure 32.

- **Composé 2** :

Le spectre de masse du **composé 2** obtenu en HRESIMS présente un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 397,2027 (calculé pour $C_{24}H_{29}O_5^+$ = 397,2015) correspondant à la formule brute $C_{24}H_{28}O_5$. Le degré d'insaturation de ce composé est 11.

Le spectre UV présente une bande avec un maximum d'absorption à 330 nm, caractéristique du motif *trans*-stilbène.

Il est déduit du spectre RMN ^{1}H que le **composé 2** est un analogue de SWs dépourvu du motif HHX (la chaîne géranyle n'est pas cyclisée). En comparant les données RMN du **composé 2** avec celles de la littérature, et notamment celles de la **SW L** (Péresse et al., 2017b), il apparait que la partie ouest est constituée d'un cycle dihydropyranol fusionné avec le cycle C *via* les carbones C-1 et C-6, confirmé par les corrélations H_2-7/C-1, H_2-7/C-8, H-5/C-7, H-16/C-8 et H-16/C-10 en HMBC (Figure 33).

Le spectre ROESY présente de fortes corrélations entre les protons H_3-16 à δ_H 1,59 et les protons H-8 (δ_H 3,86, m) et H-7b (δ_H 2,69, dd). En s'appuyant sur ces résultats et sur ceux de la littérature, notamment les données RMN d'une benzophénone isolée à partir des feuilles de *Tovomita longifolia* possédant le même motif, on peut déduire la configuration *trans*-diaxiale entre l'hydroxyle OH-8 et le méthyle CH_3-16 (Pecchio et al., 2006; Péresse et al., 2017b).

Tableau 6 : Données RMN des composés 2 (CD_3CN, 500 MHz)

Position	Composé 2	
	δ_C	δ_H (*J* in Hz)
1	141,6	-
2	146,7	-
3	111,0	6,92, s
4	130,8	-
5	120,7	6,82, s
6	121,7	-
7a	31,7	2,99, dd (16,9, 4,7)
7b		2,69, dd (16,9, 6,5)
8	68,1	3,86, m
9	80,8	-
10	38,0	1,65, m
11	22,5	2,17, m
12	125,4	5,13, t (6,6)
13	132,4	-
14	25,8	1,66, s
15	17,7	1,59, s
16	19,3	1,28, s
1’	129,7	6,94, d (16,2)
2’	127,1	6,84, d (16,2)
3’	141,1	-
4’	105,9	6,48, s
5’	159,2	-
6’	102,6	6,17, s
7’	159,2	-
8’	105,9	6,48, s

Tableau 7 : Données RMN des composés 1 (CD_3CN, 500 MHz)

Position	Composé 1	
	δ_C	δ_H (*J* in Hz)
1	129.2	-
2	155.5	-
3	128,9	7,29, d (1,5)
4	130.4	-
5	126,4	7,22, dd (8,2, 1,5)
6	116,2	6,78, d (8,2)
1’	129,7	7,00, d (16,3)
2’	126,6	6,84, d (16,3)
3’	141,3	-
4’	105,9	6,48, d (1,4)
5’	159,2	-
6’	102,5	6,17, s
7’	159,2	-
8’	105,9	6,48, d (1,4)
1’’	29,0	3,30, d (7,2)
2’’	123,3	5,36, t (7,2)
3’’	137,2	-
4’’	36,5	2,04, m
5’’	34,6	1,60, m
6’’	75,5	3,96, t (6,3)
7’’	149,4	-
8’’a	110,7	4,87, s
8’’b		4,77, s
9’’	17,9	1,68, s
10’’	16,4	1,73, s

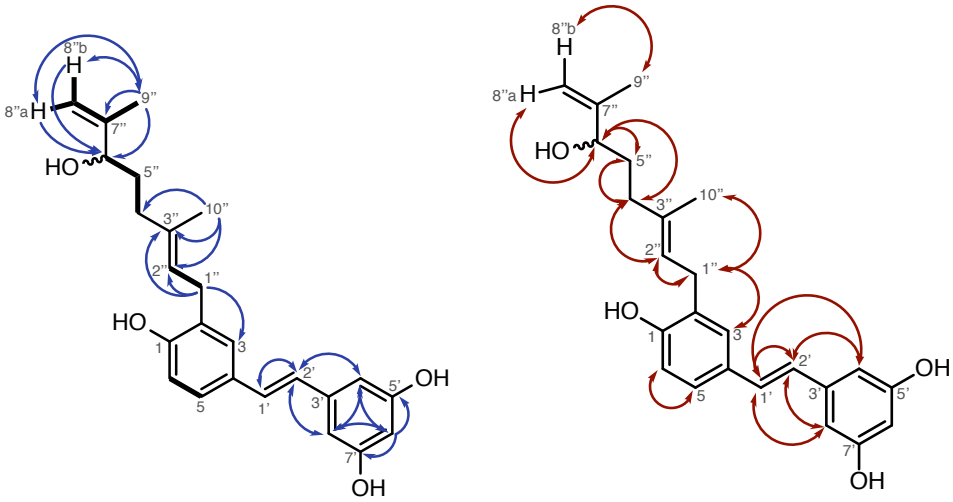


Figure 34 : Corrélations COSY (en gras), HMBC (flèches bleues) et ROESY (flèches rouges) du composé 1

De plus, le **composé 2** ne possède pas de chaîne prényle cyclisée en cycle dihydropyranol au niveau du cycle D. En effet, le spectre RMN ^{1}H du **composé 2** présente un singulet intégrant pour deux protons à 6,48 ppm, ce qui diffère des **composés 8** et **10** possédant un cycle dihydropyranol accolé au cycle D, et dont les spectres RMN ^{1}H présentent ce singulet scindé en deux singulets intégrant chacun pour un proton. Les protons H-4' et H-8' possèdent donc le même environnement, traduisant une symétrie au niveau du cycle D.
Les données RMN et les corrélations COSY, HMBC et ROESY du **composé 2** sont présentées Tableau 6 et Figure 33. Le spectre RMN ^{1}H du **composé 2** est présenté en Annexe III.

- **Composé 1** :

Le spectre de masse du **composé 1** obtenu en HRESIMS présente un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 381,2063 (calculé pour $C_{24}H_{29}O_4^+$ = 381,2060) correspondant à la formule brute $C_{24}H_{28}O_4$. Le degré d'insaturation de ce composé est 11. En comparant les données RMN du **composé 1** avec celles d'un composé isolé chez *Macaranga trichocarpa* en 2018 (Tanjung et al., 2018), on peut déduire qu'une chaîne géranyle hydroxylée est positionnée sur le carbone C-2 du cycle C. Cela est notamment confirmé par les corrélations COSY entre les protons H-5 et H-6, ainsi que par les corrélations H-1''/C-3, H-1''/C-2'' et H-1''/C-3''en HMBC (cf. Figure 34).
De plus, le **composé 1,** comme le **composé 2**, ne possède pas de chaîne prényle cyclisée en cycle dihydropyranol au niveau du cycle D. Le spectre RMN ^{1}H présente un singulet intégrant pour deux protons à 6,48 ppm, traduisant une symétrie au niveau du cycle D.
Les données RMN et les corrélations COSY, HMBC et ROESY du **composé 1** sont présentées Tableau 7 et Figure 34. Le spectre RMN ^{1}H du **composé 1** est présenté en Annexe IV.

Les fiches produits des nouveaux composés isolés sont présentées en Annexe V à VIII.

4.3 Étude biologique des composés isolés

Afin de tester l'activité biologique des différents composés isolés, une étude de cytotoxicité a été effectuée sur deux lignées cancéreuses : la lignée U87 MG (lignée humaine du glioblastome) connue pour être sensible aux SWs, et la lignée A549 (cancer du poumon) connue pour leur être résistante.
Les résultats ne sont pas disponibles pour être intégrés à ce rapport.

Il sera intéressant de comparer les résultats avec ceux de la littérature et de déterminer :

- Si les **composés 8** et **10** qui possèdent le motif HHX présentent les mêmes activités cytotoxiques différentielles entre les deux lignées, avec une cytotoxicité plus forte envers la lignée U87 MG que les composés structurellement proches.
- Si le **composé 10**, analogue méthoxylé en C-7 du **composé 8**, est moins actif ou non que ce dernier.
- Si les **composés 1** et **2** qui ne possèdent pas de motif HHX présentent une activité cytotoxique variable et non différentielle entre les deux lignées, comme c'est le cas de dérivés proches (Péresse et al., 2017b).

5 Discussion

- **Choix de la plante et de la partie de plante à étudier :**

Les réseaux moléculaires comme « outil de déréplication » ont été une étape déterminante dans la sélection de l'espèce de *Macaranga* et de la partie de plante à travailler (les fruits) afin d'isoler de nouveaux stilbènes prénylés (Allard et al., 2016).

De plus, une récolte de 50 kg de fruits a été nécessaire pour la recherche de composés minoritaires afin d'en purifier des quantités suffisantes pour pouvoir les caractériser.

- **Choix des fractions étudiées** :

Avant de pouvoir réaliser un réseau moléculaire, l'étude a débuté sur **F7** en utilisant les UV comme « outil de déréplication ». Ils ont permis de cibler une fraction présentant un nombre conséquent de composés ayant un spectre UV caractéristique de la fonction *trans*-stilbène des SWs.

- **Étude des réseaux moléculaires** :

La masse de certains composés nouveaux isolés durant cette étude a bien été retrouvée dans les clusters d'intérêt initialement repérés. Les métadonnées confirment leur présence majoritaire dans les fractions **F7**, **F8-4**, **F8-5** et **F8-6**. Le pré-traitement des données de LC-HRMS/MS par MZmine2 permet de séparer des isomères en fonction de leur temps de rétention. Ainsi, une masse donnée peut apparaitre plusieurs fois au sein d'un même cluster mais également se retrouver dans les deux clusters de SWs. Afin d'identifier clairement la position des composés isolés sur les réseaux, il serait nécessaire de les réinjecter en LCHR-MS/MS dans les mêmes conditions chromatographiques que celles utilisées pour les fractions et les standards de SWs. La comparaison des temps de rétention permettrait alors de faire la correspondance entre les différentes nodes et les nouveaux composés.

Cela permettrait également d'appuyer ou non l'hypothèse formulée en 4.2.2, à savoir si le cluster 1 regroupe les SWs possédant le motif HHX, et le cluster 2 regroupe celles ne le possédant pas. L'étude des schémas de fragmentation permettrait également d'aller en faveur ou non de cette hypothèse.

- **Purification :**

Selon les CCM réalisées au préalable des purifications par CF, il s'est avéré que les composés de certaines fractions semblaient difficiles à séparer en phase normale. C'est la raison pour laquelle une colonne C18 a été utilisée, permettant la purification de la quasi-totalité des composés ciblés.

Il reste de nombreuses fractions à étudier, certaines étant un peu plus complexes à purifier. En effet, certains paramètres seront à modifier afin d'arriver à isoler les composés, comme le type de colonne et l'utilisation d'acide formique par exemple.

- **Identification structurale**

De nombreuses SWs ont été isolées auparavant, notamment à l'ICSN, ce qui a permis d'identifier rapidement les composés isolés lors de cette étude. En effet, la démarche fut la suivante :

1) Utilisation des analyses en HRESIMS comme « outil de déréplication » afin d'obtenir la masse et une proposition de formule brute des composés isolés
2) Recherche des SWs connues possédant la même masse molaire dans la littérature
3) Comparaison des spectres RMN ^{1}H des composés isolés avec ceux des SWs qui pourraient correspondre
4) Réalisation d'une RMN totale pour les composés isolés dont la masse est inconnue ou étant connue mais dont les spectres RMN ^{1}H ne coïncident pas avec ceux des SWs de la littérature
5) Élucidation structurale des nouveaux composés

- **Relation structure-activité** :

Les IC_{50} obtenus des tests de cytotoxicité sur la lignée U87 MG sensible et la lignée A549 résistante permettront d'affirmer ou non les observations faites dans la littérature, à savoir :

- Les composés à motif HHX présentent une activité cytotoxique avec une IC_{50} de l'ordre du sub-micromolaire au nanomolaire, avec une activité différentielle selon les lignées cellulaires. Cela confirmerait la nécessité de la présence du motif HHX

pour une forte activité cytotoxique spécifique des SWs. Ces faits pourront être vérifiés avec les **composés 8** et **10**.

- Les modulations chimiques au niveau de la chaîne en *para* du cycle D semblent avoir peu d'effet sur l'activité cytotoxique des SWs. Cela pourra être vérifié en comparant le profil d'activité du **composé 8** ayant un cycle pyranol, avec celui de la **SW G** ayant une chaîne prényle.
- L'hypothèse d'un mécanisme d'action différent entre les SWs à motif HHX et les SWs à motif(s) pyranol ayant une activité cytotoxique de l'ordre du sub-micromolaire. L'étude du profil d'activité du **composé 2** ayant un cycle pyranol à la place du motif HHX permettra d'appuyer ou non ces observations.

6 Conclusion et perspectives

L'étude phytochimique d'une grande quantité de fruits de *Macaranga tanarius* a permis d'isoler onze stilbènes prénylés dont sept nouveaux composés minoritaires qui ont été caractérisés. Leur potentiel anti-cancéreux sur la lignée cellulaire du glioblastome est en cours d'évaluation. L'étude biologique de ces nouveaux composés permettra de compléter les relations de structure-activité dans cette série.

Certaines molécules nouvellement isolées lors de cette étude présentent des caractéristiques structurales particulières (justifiant leur confidentialité), ce qui pourrait conduire à les sélectionner pour des études précliniques ultérieures.

Des travaux sur l'étude du mécanisme d'action cytotoxique des SWs ont permis de déceler une interaction entre ces dernières et deux protéines impliquées plus ou moins directement dans l'homéostasie du cholestérol : PKM2 et OSBP (Burgett et al., 2011) . L'implication directe de ces protéines n'a pas été clairement démontrée, et des travaux de recherche s'effectuent actuellement à l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire) à Nice. Il est prévu que les nouveaux composés isolés lors de cette étude soient testés sur les protéines OSBP dans cet institut.

D'autre part, le rendement d'extraction de ces composés minoritaires étant très faible et l'accès à ces bio-ressources étant difficile, une synthèse totale ou hémi-synthèse serait nécessaire afin d'étudier plus en détails les potentialités de ces composés.

Finalement, les SWs semblent former une grande famille dont de nombreuses molécules restent encore à découvrir.

7 Bibliographie

Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V.C., Roussi, F., Litaudon, M., Wolfender, J.-L. (2016). Integration of molecular networking and In-Silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Anal. Chem.*, 88, pp. 3317–3323.

Beutler, J.A., Jato, J., Cragg, G.M., Boyd, M.R. (2000). Schweinfurthin D, A Cytotoxic Stilbene from *Macaranga schweinfurthii*. *Natural Product Letters* 14, pp. 399–404.

Beutler, J.A., Shoemaker, R.H., Johnson, T., Boyd, M.R. (1998). Cytotoxic geranyl stilbenes from *Macaranga schweinfurthii*. *J. Nat. Prod.,* 61, pp. 1509–1512.

Burgett, A.W.G., Poulsen, T.B., Wangkanont, K., Anderson, D.R., Kikuchi, C., Shimada, K., Okubo, S., Fortner, K.C., Mimaki, Y., Kuroda, M., Murphy, J.P., Schwalb, D.J., Petrella, E.C., Cornella-Taracido, I., Schirle, M., Tallarico, J.A., Shair, M.D. (2011). Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins. *Nat Chem Biol,* 7, pp. 639–647.

Guhling, O., Kinzler, C., Dreyer, M., Bringmann, G., Jetter, R. (2005). Surface composition of myrmecophilic plants: cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. *J Chem Ecol*, 31, pp. 2323–2341.

Guo, J., Yuan, Y., Liu, Z., Zhu, J. (2013). Development and structure of internal glands and external glandular trichomes in Pogostemon cablin. *PloS ONE,* 8, pp. e77862.

Kawakami, S., Harinantenaina, L., Matsunami, K., Otsuka, H., Shinzato, T., Takeda, Y. (2008). Macaflavanones A−G, prenylated flavanones from the leaves of *Macaranga tanarius*. *J. Nat. Prod.*, 71, pp. 1872–1876.

Klausmeyer, P., Van, Q.N., Jato, J., McCloud, T.G., Beutler, J.A. (2010). Schweinfurthins I and J from *Macaranga schweinfurthii*. *J. Nat. Prod*., 73, pp. 479–481.

Kuder, C.H. (2009). Schweinfurthins as novel anticancer agents. Doctorat Philosophie Pharmacologie, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA, 173 p.

Neighbors, J.D., Salnikova, M.S., Beutler, J.A., Wiemer, D.F. (2006). Synthesis and structure–activity studies of schweinfurthin B analogs: Evidence for the importance of a D-ring hydrogen bond donor in expression of differential cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, pp. 1771–1784.

Pecchio, M., Solís, P.N., López-Pérez, J.L., Vásquez, Y., Rodríguez, N., Olmedo, D., Correa, M., San Feliciano, A., Gupta, M.P. (2006). Cytotoxic and antimicrobial benzophenones from the leaves of *Tovomita longifolia*. *J. Nat. Prod.*, 69, pp. 410–413.

Péresse, T., Elie, N., Touboul, D., Pham, V.-C., Dumontet, V., Roussi, F., Litaudon, M., Brunelle, A. (2017a). Dual beam depth profiling and imaging with argon and bismuth clusters of prenylated stilbenes on glandular trichomes of *Macaranga vedeliana*. *Anal. Chem*., 89, pp. 9247–9252.

Péresse, T., Jézéquel, G., Allard, P.-M., Pham, V.-C., Huong, D.T.M., Blanchard, F., Bignon, J., Lévaique, H., Wolfender, J.-L., Litaudon, M., Roussi, F. (2017b). Cytotoxic prenylated

stilbenes isolated from *Macaranga tanarius*. *J. Nat. Prod*., 80, pp. 2684–2691.

Shoemaker, R.H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. Nat Rev Cancer 6, 813–823.

Starr, F., Starr, K., Loope, L. (2003). *Macaranga tanarius,* parasol leaf tree, Euphorbiaceae. Haleakala Field Station, Maui, Hawaï, 4 p.

Tanjung, M., Juliawaty, L.D., Hakim, E.H., Syah, Y.M. (2018). Flavonoid and stilbene derivatives from *Macaranga trichocarpa*. *Fitoterapia*, 126, pp. 74–77.

Thoison, O., Hnawia, E. (1992). Vedelianin, a hexahydroxanthene derivative isolated from *Macaranga vedeliana*. *Phytochemistry,* 31, pp. 1439–1442.

Topczewski, J.J., Wiemer, D.F. (2011). First total synthesis of (+)-vedelianin, a potent antiproliferative agent. *Tetrahedron Letters*, 52, pp. 1628–1630.

van der Kaaden, J.E., Hemscheidt, T.K., Mooberry, S.L. (2001). Mappain, a new cytotoxic prenylated stilbene from *Macaranga mappa*. *J. Nat. Prod*., 64, pp. 103–105.

Yoder, B.J., Cao, S., Norris, A., Miller, J.S., Ratovoson, F., Razafitsalama, J., Andriantsiferana, R., Rasamison, V.E., Kingston, D.G.I. (2007). Antiproliferative prenylated stilbenes and flavonoids from *Macaranga alnifolia* from the Madagascar rainforest. *J. Nat. Prod*., 70, pp. 342–346.

Sitographie

Fern, K. (2014). Useful Tropical Plants - *Macaranga tanarius.* http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Macaranga+tanarius (consulté le 16/05/2019).

8 Annexes

Annexe I- RMN ^{1}H du **composé 8** (CD_3CN, 500 MHz)……ii

Annexe II- RMN ^{13}C du **composé 8** (CD_3CN, 125 MHz)……iii

Annexe III- RMN ^{1}H du **composé 1** (CD_3CN, 500 MHz)……iv

Annexe IV- RMN ^{1}H du **composé 2** (CD_3CN, 500 MHz)…….……v

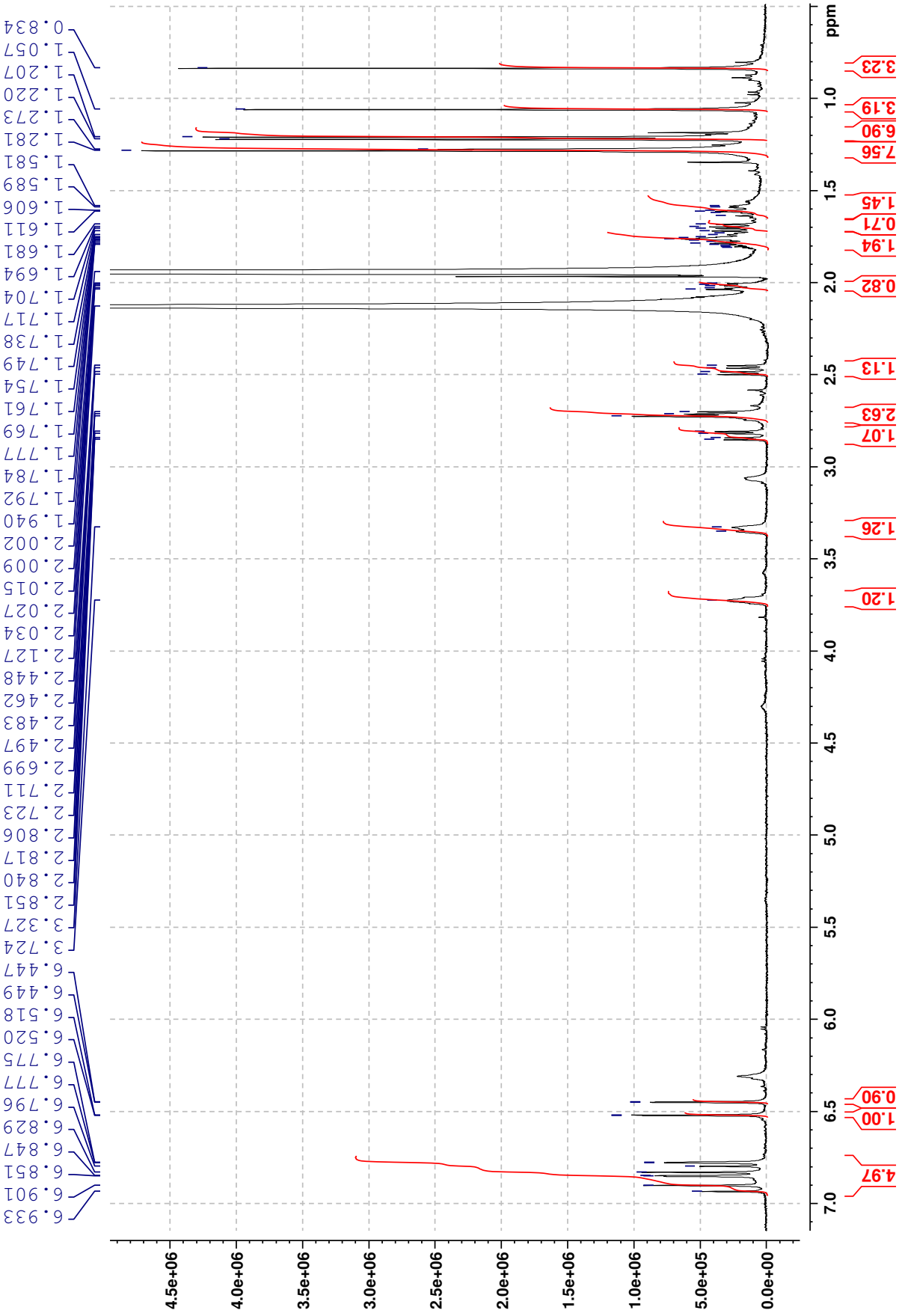
Annexe V- Fiche produit du **composé 1**..…….…….……vi

Annexe VI- Fiche produit du **composé 2**…….....……vii

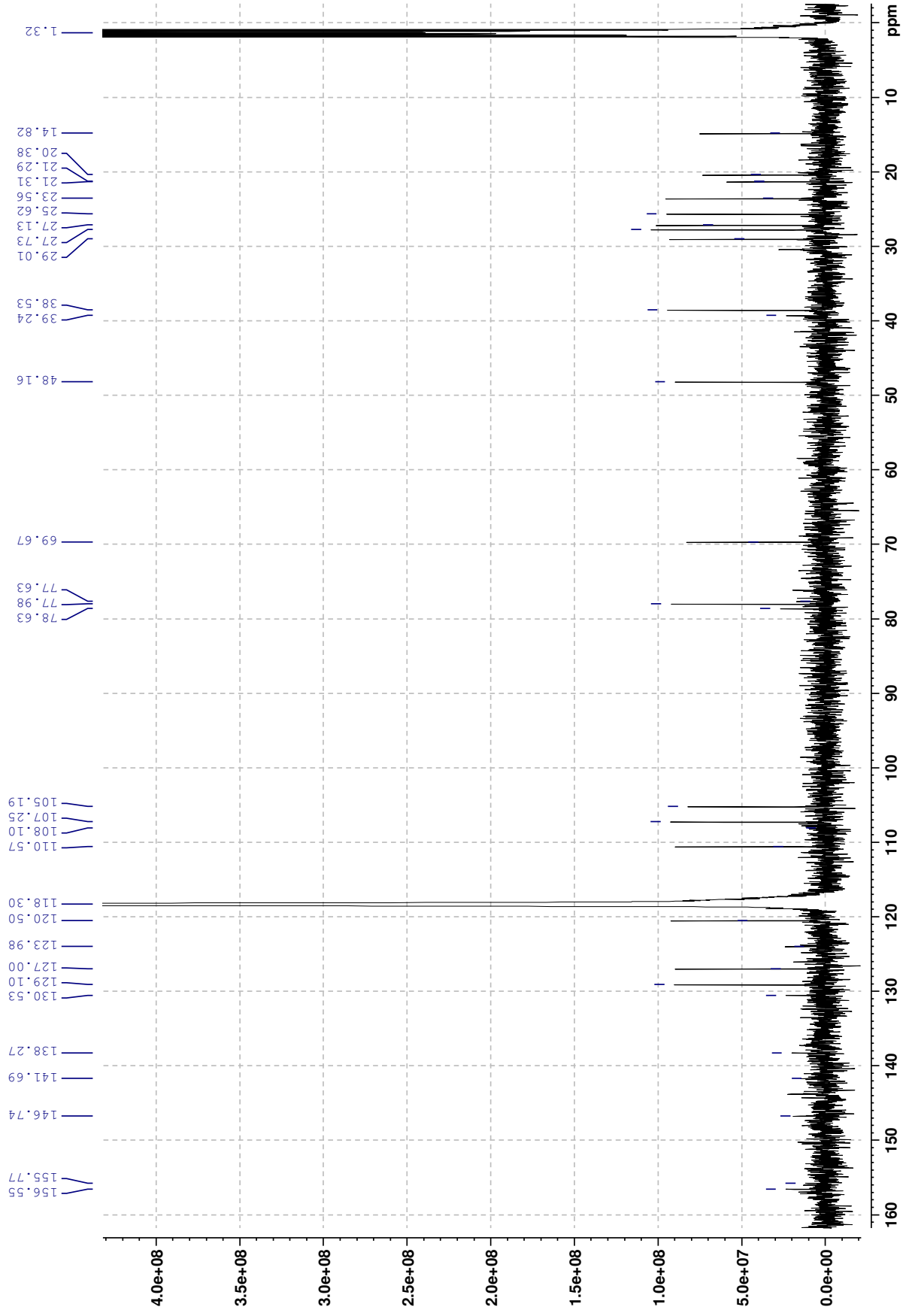
Annexe VII- Fiche produit du **composé 8**……..……..…...…viii

Annexe VIII- Fiche produit du **composé 10**……...…….……..iv

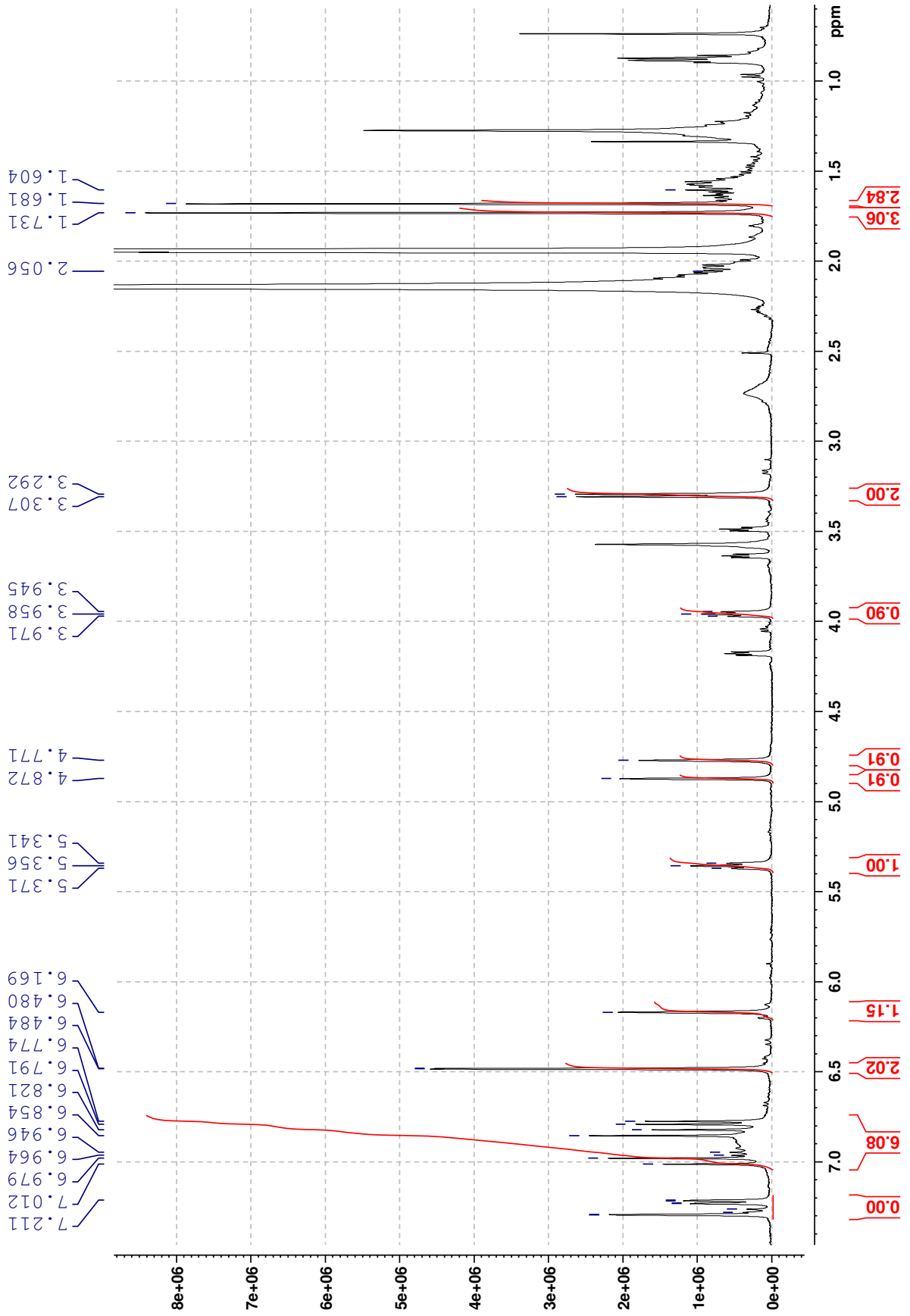
Annexe I- RMN ^{1}H du **composé 8** (CD_3CN, 500 MHz)



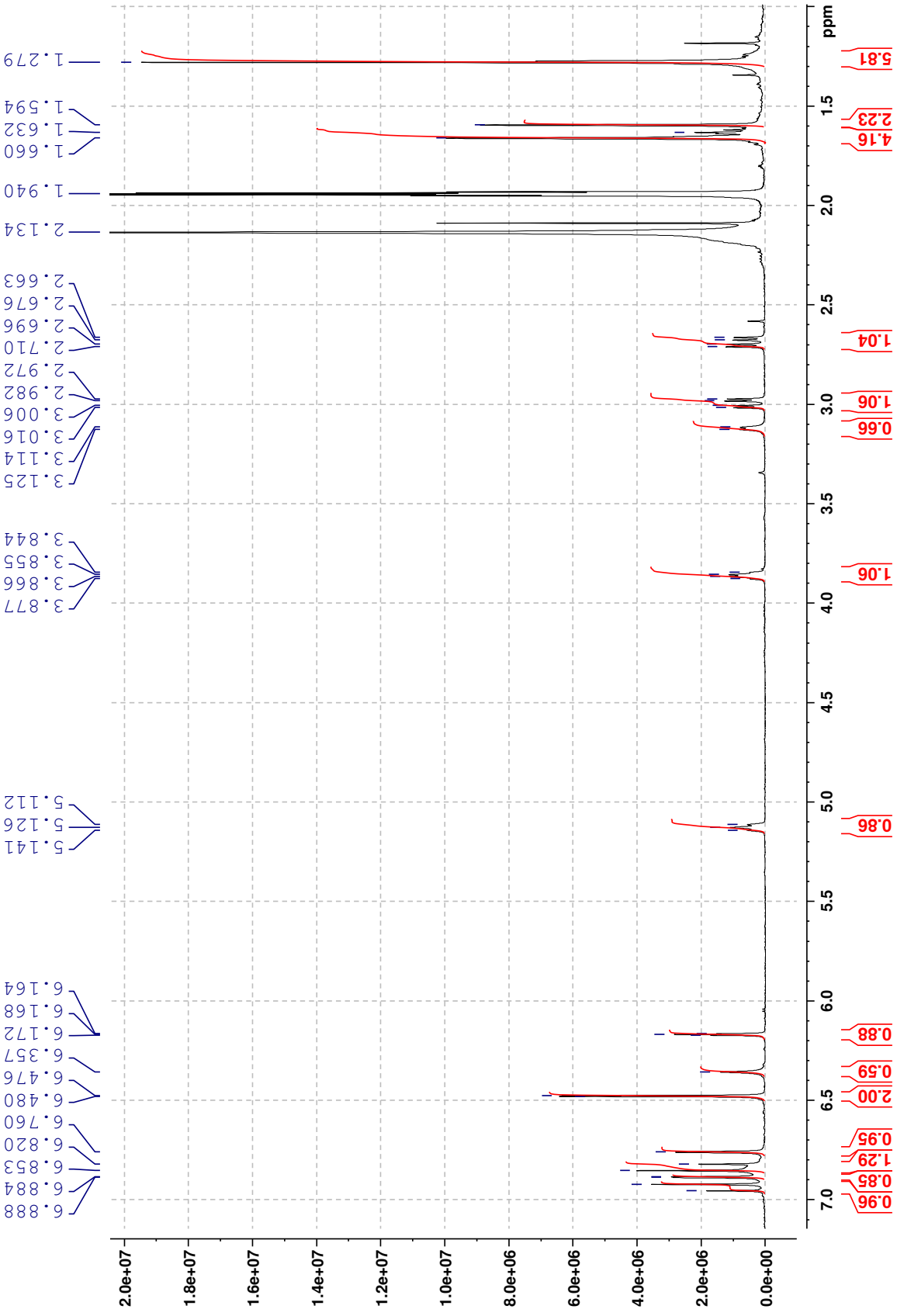
Annexe II- RMN ^{13}C du **composé 8** (CD_3CN, 125 MHz)



Annexe III- RMN ^{1}H du **composé 1** (CD_3CN, 500 MHz)

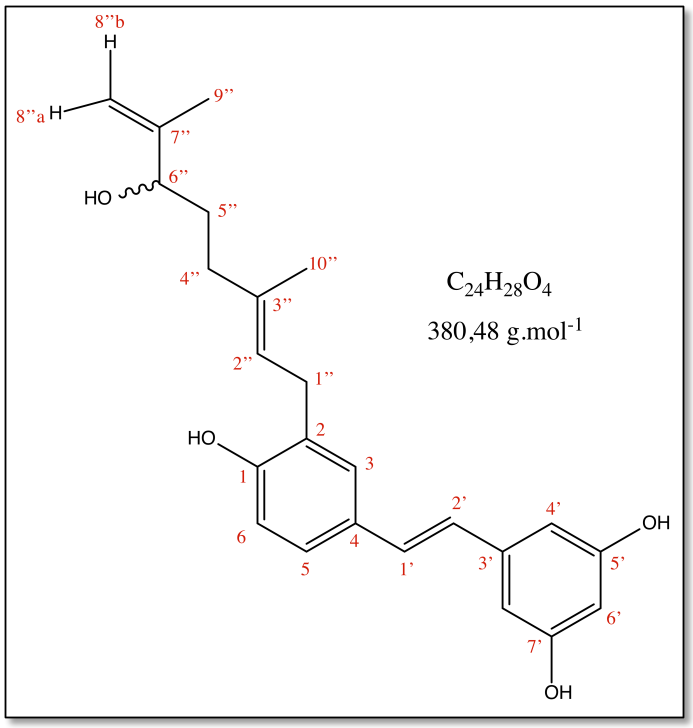


Annexe IV- RMN ^{1}H du **composé 2** (CD_3CN, 500 MHz)



Annexe V- Fiche produit du **composé 1**

Composé 1



Physical form : dark yellow oil

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 1.60 (m, 2H-**H5''**), 1.68 (s, 3H-**H9''**), 1.73 (s, 3H-**H10''**), 2.04 (m, 2H-**H4''**), 3.30 (d, 2H-**H1''**, J = 7.2 Hz), 3.96 (t, 1H-**H6''**, J = 6.3 Hz), 4.77 (s, 1H-**H8''b**), 4.87 (s, 1H-**H8''a**), 5.36 (t, 1H-**H2''**, J = 7.2 Hz), 6.17 (s, 1H-**H6'**), 6.48 (d, 2H-**H4'**,**H8'**, J = 1.4 Hz), 6.78 (d, 1H-**H6**, J = 8.2 Hz), 8.84 (d, 1H-**H2'**, J = 16.3 Hz), 7.00 (d, 1H-**H1'**, J = 16.3 Hz), 7.22 (dd, 1H-**H5**, J = 8.2, 1.5 Hz), 7.29 (d, 1H-**H3**, J = 1.5 Hz).

^{13}C NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 16.4 (**C10''**), 17.9 (**C9''**), 29.0 (**C1''**), 34.6 (**C5''**), 36.5 (**C4''**), 75.5 (**C6''**), 102.5 (**C6'**), 105.9 (**C4'**, **C8'**), 110.7 (**C8''**), 116.2 (**C6**), 123.3 (**C2''**), 126.4 (**C5**), 126.6 (**C2'**), 128.9 (**C3**), 129.2 (**C1**), 129.7 (**C1'**), 130.4 (**C4**), 137.2 (**C3''**), 141.3 (**C3'**), 149.4 (**C7''**), 155.5 (**C2**), 159.2 (**C5'**, **C7'**).

HRMS (ESI, positive mode) : $[M+H]^+$ *m/z* 381.2063 (calculated for $C_{24}H_{29}O_4^+$ = 381.2060)

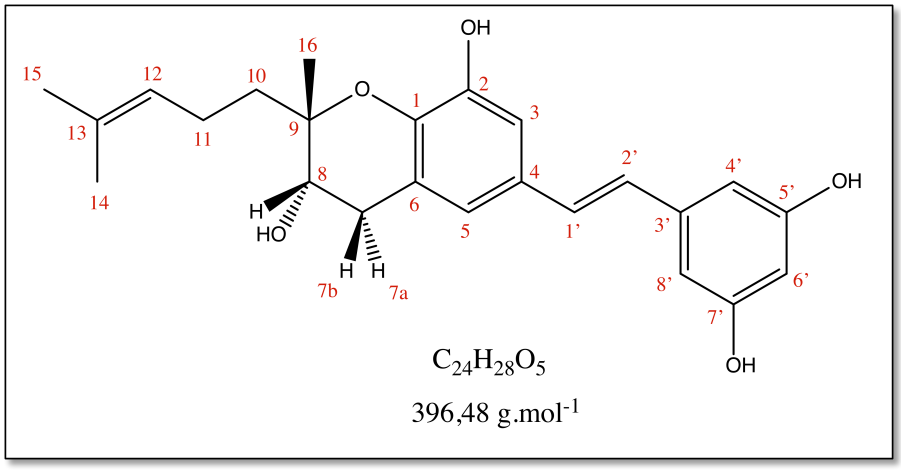
IR (ν, cm^{-1}) : 669, 686, 835, 903, 963, 1010, 1105, 1151, 1269, 1348, 1445, 1507, 1600, 1708, 2927, 3345.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 1.60 ° (*c* 0.5, MeOH).

Cytotoxicity :
U87 MG : IC_{50} = *not yet obtained*
A549 : IC_{50} = *not yet obtained*

Annexe VI- Fiche produit du **composé 2**

Composé 2



Physical form : dark yellow oil

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 1.28 (s, 3H-**H16**), 1.59 (s, 3H-**H15**), 1.65 (m, 2H-**H10**), 1.66 (s, 3H-**H14**), 2.17 (m, 2H-**H11**), 2.69 (dd, 1H-**H7b**, J = 16.9, 4.7 Hz), 2.99 (dd, 1H-**H7a**, J = 16.9, 4.7 Hz), 3.86 (m, 1H-**H8**), 5.13 (t, 1H-**H12**, J = 6.6 Hz), 6.17 (s, 1H-**H6'**), 6.48 (s, 2H-**H4',H8'**), 6.82 (s, 1H-**H5**), 6.84 (d, 1H-**H2'**, J = 16.2 Hz), 6.92 (s, 1H-**H3**), 6.94 (d, 1H-**H1'**, J = 16.2 Hz).

^{13}C NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 17.7 (**C15**), 19.3 (**C16**), 22.5 (**C11**), 25.8 (**C14**), 31.7 (**C7**), 38.0 (**C10**), 68.1 (**C8**), 80.8 (**C9**), 102.6 (**C6'**), 105.9 (**C4'**, **C8'**), 111.0 (**C3**), 120.7 (**C5**), 121.7 (**C6**), 125.4 (**C12**), 127.1 (**C2'**), 129.7 (**C1'**), 130.8 (**C4**), 132.4 (**C13**), 141.1 (**C3'**), 141.6 (**C1**), 146.7 (**C2**), 159.2 (**C5'**, **C7'**).

HRMS (ESI, positive mode) : $[M+H]^+$ *m/z* 397.2027 (calculated for $C_{24}H_{29}O_5^+$: 397.2010)

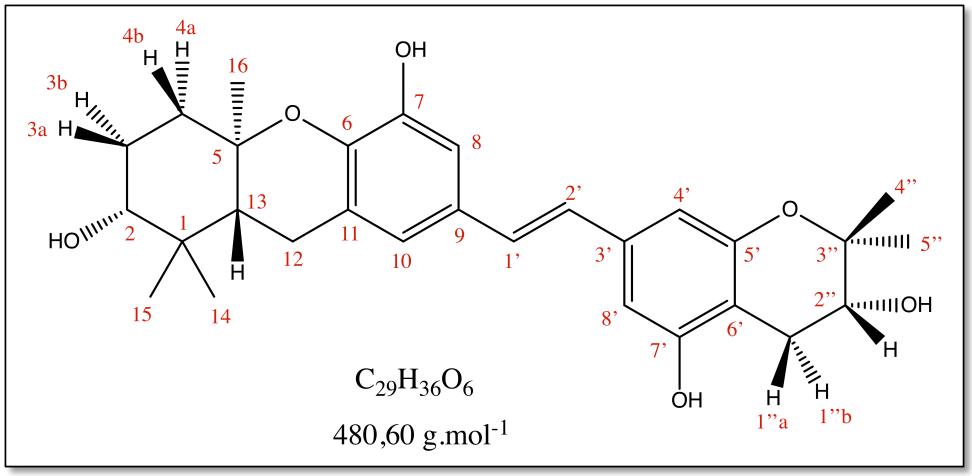
IR (ν, cm^{-1}) : 683, 848, 959, 1012, 1061, 1150, 1197, 1252, 1364, 1453, 1498, 1596, 2927, 3372.

$[\alpha]_D^{24}$ **= -** 3.60 ° (*c* 0.5, MeOH).

Cytotoxicity :
U87 MG : IC_{50} = *not yet obtained*
A549 : IC_{50} = *not yet obtained*

Annexe VII- Fiche produit du **composé 8**

Composé 8



Physical form : light brown oil

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 0.83 (s, 3H-**H15**), 1.06 (s, 3H-**H14**), 1.21 (s, 3H-**H16**), 1.22 (s, 3H-**H5''**), 1.28 (s, 3H-**H4''**), 1.60 (m, 1H-**H3b**), 1.70 (m, 1H-**H13**), 1.75 (m, 1H-**H4b**), 1.77 (m, 1H-**H3a**), 2.02 (m, 1H-**H4a**), 2.47 (dd, 1H-**H1''b**, J = 17.2, 6.8 Hz), 2.72 (m, 2H-**H12**), 2.83 (dd, 1H-**H1''a**, J = 17.2, 5.4 Hz), 3.34 (m, 1H-**H2**), 3.72 (m, 1H-**H2''**), 6.45 (d, 1H-**H8'**, J = 1.2 Hz), 6.52 (d, 1H-**H4'**, J = 1.2 Hz), 6.78 (s, 1H-**H10**), 6.81 (d, 1H-**H2'**, J = 16.3 Hz), 6.85 (s, 1H-**H8**), 6.92 (d, 1H-**H1'**, J = 16.3 Hz).

^{13}C NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 14.8 (**C15**), 20.4 (**C16**), 21.3 (**C5''**), 23.6 (**C12**), 25.6 (**C4''**), 27.1 (**C1''**), 27.7 (**C14**), 29.0 (**C3**), 38.5 (**C4**), 39.2 (**C1**), 48.2 (**C13**), 69.7 (**C2''**), 77.6 (**C3''**), 78.0 (**C2**), 78.6 (**C5**), 105.2 (**C8'**), 107.3 (**C4'**), 108.1 (**C6'**), 110.6 (**C8**), 120.5 (**C10**), 124.0 (**C11**), 127.0 (**C2'**), 129.1 (**C1'**), 130.5 (**C9**), 138.3 (**C3'**), 141.7 (**C6**), 146.7 (**C7**), 155.8 (**C7'**), 156.6 (**C5'**).

HRMS (ESI, positive mode) : $[M+H]^+$ *m/z* 481.2562 (calculated for $C_{29}H_{37}O_6^+$ = 481.2590)

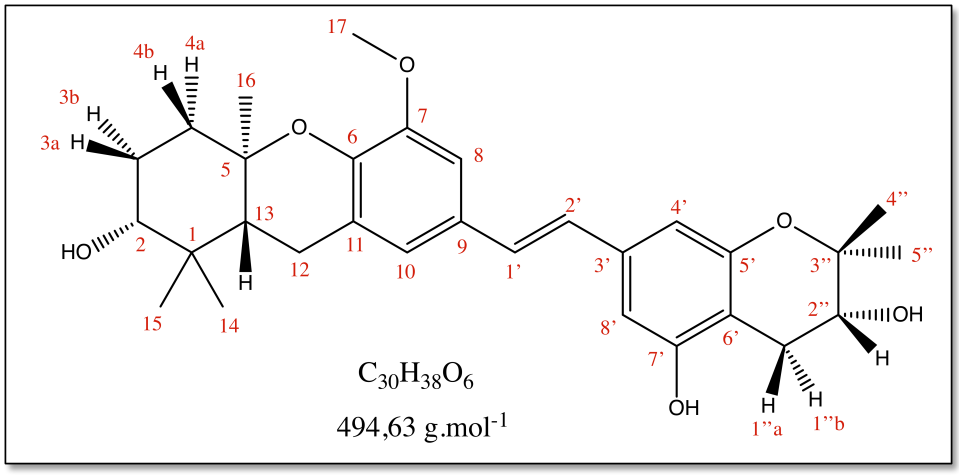
IR (ν, cm^{-1}) : 852, 929, 959, 1034, 1057, 1076, 1130, 1156, 1186, 1243, 1367, 1427, 1497, 1591, 1717, 2928, 3372.

$[\alpha]_D^{24}$ = + 22.60 ° (*c* 0.5, MeOH).

Cytotoxicity :
U87 MG : IC_{50} = *not yet obtained*
A549 : IC_{50} = *not yet obtained*

Annexe VIII- Fiche produit du **composé 10**

Composé 10



Physical form : light brown oil

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 0.83 (s, 3H-**H15**), 1.05 (s, 3H-**H14**), 1.18 (s, 3H-**H16**), 1.22 (s, 3H-**H5''**), 1.29 (s, 3H-**H4''**), 1.59 (m, 1H-**H3b**), 1.65 (t, 1H-**H13**, J = 9.0 Hz), 1.71 (m, 1H-**H4b**), 1.74 (m, 1H-**H3a**), 1.96 (m, 1H-**H4a**), 2.48 (dd, 1H-**H1''b**, J = 17.4, 6.9 Hz), 2.71 (d, 2H-**H12**, J = 9.0 Hz), 2.83 (dd, 1H-**H1''a**, J = 17.4, 5.2 Hz), 3.32 (dd, 1H-**H2**, J = 11.0, 3.3 Hz), 3.73 (t, 1H-**H2''**, J = 6.0 Hz), 3.80 (s, 3H-**H17**), 6.47 (s, 1H-**H4'**), 6.53 (s, 1H-**H8'**), 6.85 (s, 1H-**H10**), 6.87 (d, 1H-**H2'**, J = 16.3 Hz), 6.96 (s, 1H-**H8**), 6.97 (d, 1H-**H1'**, J = 16.3 Hz).

^{13}C NMR (CD_3CN, 500 MHz) :
δ (ppm) : 14.8 (**C15**), 20.3 (**C16**), 21.3 (**C5''**), 23.8 (**C12**), 25.6 (**C4''**), 27.1 (**C1''**), 27.7 (**C14**), 29.0 (**C3**), 38.7 (**C4**), 39.2 (**C1**), 47.8 (**C13**), 56.3 (**C17**), 69.7 (**C2''**), 77.6 (**C3''**), 77.9 (**C5**), 78.0 (**C2**), 105.2 (**C8'**), 107.2 (**C4'**), 108.0 (**C8**), 108.2 (**C6'**), 121.8 (**C10**), 124.1 (**C11**), 127.0 (**C2'**), 129.1 (**C1'**), 130.0 (**C9**), 138.3 (**C3'**), 143.8 (**C6**), 150.1 (**C7**), 155.3 (**C7'**), 156.6 (**C5'**).

HRMS (ESI, positive mode) : $[M+H]^+$ *m/z* 495.2729 (calculated for $C_{30}H_{39}O_6^+$ = 495.2741)

IR (ν, cm^{-1}) : 852, 954, 1033, 1077, 1131, 1244, 1365, 1430, 1494, 1586, 1619, 2938, 3413.

$[\alpha]_D^{24}$ = + 18.40 ° (*c* 0.5, MeOH).

Cytotoxicity :
U87 MG : IC_{50} = *not yet obtained*
A549 : IC_{50} = *not yet obtained*