

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

Encadrée par Nicolas Fabre et co-encadrée par Valérie Jullian

Soutenance le 24 mars 2023 à 9h en salle du conseil

Résumé

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

Abstract

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