



HAL
open science

Contribution à l'étude du lien entre Annonaceae et parkinsonisme : identification et quantification d'acétogénines par déréplication; métabolisation de phase I et approche de la distribution de l'annonacine

Jessica Le Ven

► **To cite this version:**

Jessica Le Ven. Contribution à l'étude du lien entre Annonaceae et parkinsonisme : identification et quantification d'acétogénines par déréplication; métabolisation de phase I et approche de la distribution de l'annonacine. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114810 . tel-00784165

HAL Id: tel-00784165

<https://theses.hal.science/tel-00784165>

Submitted on 4 Feb 2013

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE : Chimie pharmaceutique

ANNÉE 2011- 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1127

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 03/02/2012

par

Jessica LE VEN

Contribution à l'étude du lien entre Annonaceae et parkinsonismes : identification et quantification d'acétogénines par déréplication ; métabolisation de phase I et approche de la distribution de l'annonacine.

Directeur de thèse : Mr Guy LEWIN Professeur (Faculté de Pharmacie Université Paris-sud 11)

Co-directeur de thèse : Mr Pierre CHAMPY MCU (Faculté de Pharmacie Université Paris-sud 11)

Composition du jury :

Rapporteurs : Mme Sophie TOMASI Professeur (Faculté de Pharmacie-Université Rennes 1)

Mr Xavier DECLEVES MCU-PH (Faculté de pharmacie-Université Paris Descartes)

Examineurs : Mme Françoise GUERITTE Directeur de recherche (ICSN-CNRS)

Mr Thierry CRESTEIL Directeur de recherche (ICSN-CNRS)

Mme Sabrina BOUTEFNOUCHET MCU (Faculté de Pharmacie Université Paris Descartes)

Président du jury : Mr Olivier LAPREVOTE PU-PH (Faculté de pharmacie-Université Paris Descartes)

Sommaire

Liste des figures.....	20
Liste des tableaux.....	28
Liste des photos.....	32
Liste des équations.....	34
Abréviations	36
Introduction générale.....	38
Chapitre 1 : Généralités sur les Annonaceae et les espèces étudiées	40
1. La famille des Annonaceae	40
1.1 Origine et répartition géographique	40
1.2 Caractères botaniques.....	40
1.3 Classification.....	42
1.4 Utilisations des Annonaceae	42
1.5 Composition chimique.....	43
1.5.1 Alcaloïdes	43
1.5.2 Acétogénines	44
1.5.3 Autres métabolites secondaires	51
1.5.3.1 Terpènes.....	51
1.5.3.2 Composés polyphénoliques	52
1.5.3.3 Composés divers	52
2. Description du genre et des espèces étudiées	53
2.1 <i>Annona muricata</i> L.	54
2.1.1 Classification, distribution et description botanique.....	54
2.1.2 Utilisation alimentaire, en médecine traditionnelle et en phytothérapie	56
2.1.3 Phytochimie d' <i>Annona muricata</i>	57
2.1.3.1 Alcaloïdes	57
2.1.3.2 Acétogénines	59
2.2 <i>Annona cherimolia</i> Mill.	60

2.2.1	Classification, distribution et description botanique.....	60
2.2.2	Utilisations alimentaires et medicinales.....	62
2.2.3	Phytochimie d' <i>Annona cherimolia</i>	63
2.2.3.1	Alcaloïdes	63
2.2.3.2	Acétogénines.....	63
Chapitre 2 : Consommation d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques		64
1.	Syndrome parkinsonien et parkinsonismes.....	64
1.1	Maladie de Parkinson idiopathique.....	64
1.1.1	Définition et historique	64
1.1.2	Physiopathologie	64
1.1.3	Symptômes.....	66
1.1.3.1	Akinésie	66
1.1.3.2	Rigidité.....	66
1.1.3.3	Tremblement de repos	66
1.1.3.4	Instabilité posturale.....	67
1.1.3.5	Autres symptômes.....	67
1.1.4	Étiologie [De Lau L.M., 2006]	67
1.2.	Parkinsonismes atypiques et parkinsonismes guadeloupéens	69
1.3	Parkinsonismes guadeloupéens	70
1.3.1	Épidémiologie	70
1.3.1.1	Paralysie supranucléaire progressive Guadeloupéenne (Gd-PSP)	71
1.3.1.2	Complexe Parkinson-démence (Gd-CPD)	74
1.3.2	Imagerie cérébrale.....	75
2.	Association entre syndromes parkinsoniens et consommation d'Annonaceae.....	76
2.1	Facteurs génétiques mis en cause.....	76
2.2.	Facteurs environnementaux	77
2.2.1.	Étude quantitative	77
2.2.2	Autres études évoquant un lien entre parkinsonisme et Annonaceae	79
2.3	Inhibition du complexe I de la mitochondrie et Parkinsonismes	81
2.4	Facteurs environnementaux inhibiteurs du complexe I.....	82

2.4.1	MPTP	82
2.4.2	Roténoïdes et roténone	83
2.4.3	Paraquat et Manèbe	84
2.5	Études antérieures du lien entre <i>Annona muricata</i> et les syndromes parkinsoniens guadeloupéens	86
2.5.1	Mise en cause des alcaloïdes	86
2.5.1.1	Composition et études quantitatives.....	86
2.5.1.2	Biodisponibilité.....	87
2.5.1.3	Neurotoxicité.....	87
2.5.1.4	Conclusion	89
2.5.2	Mise en cause des acétogénines	89
2.5.2.1	Étude qualitative et quantitative.....	89
2.5.2.2	Biodisponibilité.....	90
2.5.2.3	Étude du mécanisme d'action de l'annonacine	90
2.5.2.4	Propriétés biologiques et neurotoxicité des acétogénines	94
2.5.2.5	Conclusion	96
3.	Saisine de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments)	98
4.	Conclusion.....	99
Chapitre 3 : Généralités sur la spectrométrie de masse		100
1.	Généralités.....	100
2.	Source d'ionisation	101
2.1	Ionisation électronique	101
2.2	Bombardement d'atomes rapides	101
2.3	Désorption/Ionisation laser assistée par matrice MALDI.....	102
2.4	Electrospray.....	103
2.5	Résumé des sources d'ionisation	105
3.	Analyseurs.....	105
3.1	Hybrides magnétiques et électrostatiques	106
3.2	Quadripôle.....	106
3.3	Piège ionique quadripolaire	107

3.3.1	Piège à ions 3D	107
3.3.2	Pièges linéaires (piège 2D)	108
3.4	Orbitrap®	109
3.5	Temps de vol	109
3.6	Résumé des analyseurs	111
4.	Spectrométrie de masse en Tandem ou SM/SM	111
4.1	Décompositions d'ions métastables	112
4.2	Décomposition induite par collision (CID).....	112
5.	Appareils utilisés historiquement pour l'étude des acétogénines et appareils utilisés au cours de cette thèse.....	113
5.1	FAB ZabSpec/T.....	113
5.2	MALDI TOF-TOF	113
5.3	CLHP-ESI-MSD.....	114
5.4	CLHP-ESI-piège ionique	114
5.5	UPLC-ESI-TSQ Vantage.....	114
5.6	CLHP-ESI-LTQ- Orbitrap®	116
	Résumé.....	117
	Chapitre 4 : Étude phytochimique et déréplication	118
1.	Obtention de l'annonacine : extraction et purification d'annonacine à partir d'un nectar .	118
1.1	Extraction sur le nectar	118
1.2	Purification de l'extrait polaire.....	119
1.3	Identification structurale de l'annonacine	120
2.	Détermination structurale des acétogénines par SM/SM	121
2.1	Identification structurale des acétogénines : état de l'art	121
2.1.1	MALDI-TOF-TOF	126
2.1.2	CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®	127
2.2	Études de déréplication.....	137
2.2.1	État de l'art.....	137
2.2.2	Méthodologie de l'analyse	139

2.2.2.1	Mise au point analytique	139
2.2.2.2	Avantages du lithium	139
2.2.2.3	Analyse des données	140
3.	Déréplication sur un nectar d' <i>Annona muricata</i>	143
3.1	Matière première et extraction.....	143
3.2	Résultats	143
3.2.1	Aspects des chromatogrammes	143
3.2.2	ACGs sans « insaturation » : $C_{35}H_{66}O_x$ et $C_{37}H_{70}O_x$	144
3.2.3	Acétogénines à 1 « insaturation » : $C_{35}H_{64}O_xLi$ et $C_{37}H_{68}O_xLi$	151
3.2.4	Acétogénines à 2 « insaturations » $C_{35}H_{62}O_xLi$ et $C_{37}H_{66}O_xLi$	167
3.2.5	Acétogénines à 3 « insaturations » $C_{35}H_{60}O_xLi$ et $C_{37}H_{64}O_xLi$	180
3.2.6	Acétogénines à 4 « insaturations » $C_{35}H_{58}O_xLi$	188
3.3	Conclusion	189
4.	Déréplication sur un alcool d' <i>Annona cherimolia</i>	194
4.1	Présentation de l'alcool et extraction des acétogénines	194
4.2	Acétogénines contenues dans l'extrait d'alcool.....	195
5.	Étude qualitative et quantitative de produits commerciaux.....	199
5.1	Présentation des différents produits	199
5.1.1	Fruits.....	199
5.1.2	Nectars	201
5.1.3	Produits originaux.....	202
5.1.3.1	Bonbons.....	202
5.1.3.2	Confitures	203
5.1.4	Compléments alimentaires	203
5.1.4.1	Formes sèches	203
5.1.4.2	Teinture.....	204
5.2	Extraction des échantillons	205
5.3	Étude qualitative	207
5.3.1	Étude par CLHP- UV	207
5.3.2	Étude par CLHP-UV-SM.....	209

5.4	Étude quantitative	212
5.4.1	Validation analytique	212
5.4.2	Résultats	212
5.4.3	Exposition humaine	217
	Conclusion de la déréplication	219
	Introduction à la pharmacocinétique : étude ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion)	220
	Chapitre 5 : Approches de l'absorption et de la distribution	222
1.	Absorption	222
1.1	Introduction.....	222
1.2	Passage de membranes.....	222
1.2.1	Caractéristiques des membranes biologiques	222
1.2.2	Caractéristiques physicochimiques des molécules pouvant traverser les membranes de manière passive.....	222
1.2.2.1	pKa	222
1.2.2.2	Coefficient de partage (Log P).....	223
1.3	Milieu intestinal.....	223
1.3.1	Barrière intestinale.....	223
1.3.1.1	Rôle du mucus dans l'absorption des médicaments	223
1.3.1.2	Structure de la muqueuse intestinale	223
1.3.1.3	Mécanismes d'absorption intestinale.....	225
1.3.2	Modèle d'étude : cellules Caco-2	228
2.	Approche de la distribution	228
2.1	Barrière hémato-encéphalique	229
2.1.1	Organisation	229
2.1.1.1	Complexe neurovasculaire	229
2.1.1.2	Jonctions serrées.....	230
2.1.2	Transport	230
2.2	Modèle d'étude : cellules hCMEC/D3	231
3.	Travaux personnels.....	232

3.1	Mise au point physicochimique.....	232
3.1.1	Solvant de solubilisation	232
3.1.2	Analyse de différentes méthodes de contre-extraction	232
3.1.3	Solution mère d'annonacine	232
3.1.4	Stabilité à pH alcalin	233
3.2	Étude prédictive de la capacité de l'annonacine à traverser les membranes	234
3.3	Passage des barrières	235
3.3.1	Principe de l'expérience.....	235
3.3.2	Étude des inserts.....	236
3.3.3	Étude de l'intégrité des barrières modèles après incubation avec l'annonacine	237
3.3.3.1	Caco-2 et TEER.....	238
3.3.3.2	hCMEC/D3 et Lucifer Yellow	238
3.4	Approche de l'absorption.....	240
3.4.1	Test de séquestration de l'annonacine (Uptake) sur cellules Caco-2	240
3.4.2	Cytotoxicité	241
3.5	Distribution : récupération de l'annonacine après incubation avec les protéines plasmatiques	242
	Conclusion	243
	Chapitre 6 : La métabolisation	244
1.	Généralités.....	244
1.1	Métabolisation de phase 1 et de phase 2	244
1.2	Mono-oxygénase à cytochromes P450	244
2.	Mise au point physicochimique	247
2.1	Solution et solubilisation	247
2.2	Mise en pratique sur des acétogénines plus polaires	247
3.	Étude biologique de la métabolisation de phase 1.....	247
3.1	Détermination des conditions de métabolisation sur microsomes hépatiques	247
3.2	Métabolisation par microsomes de rat.....	248
3.2.1	Comparaison du TIC de l'échantillon métabolisé et du blanc	248

3.2.2	Recherche des différents métabolites	248
3.2.3	Validation des résultats	250
3.2.4	Pourcentage de métabolisation	251
3.2.5	Km et Vi des métabolites « majoritaires »	251
3.3	Métabolisation humaine	253
4.	Identification des cytochromes impliqués.....	256
4.1	Microsomes de rats induits	256
4.2	Étude sur microsomes humains avec inhibiteurs spécifiques.....	257
4.3	Cytochromes transfectés.....	259
4.3.1	Mise au point	259
4.3.2	Résultats.....	260
5.	Étude structurale des métabolites par spectrométrie de masse	263
5.1	Métabolites obtenus après incubation avec microsomes de rats	263
5.1.1	Mode positif	263
5.1.1.1	Molécules protonées.....	263
5.1.1.2	Molécules cationisées par le sodium.....	263
5.1.2	Mode négatif	265
5.1.3	Molécules cationisées par le lithium.....	267
5.2	Métabolites obtenus après incubation avec des microsomes humains	272
5.2.1	Métabolites les plus polaires (M_H1 et M_H2)	272
5.2.2	Métabolite le plus apolaire (M_H3).....	273
6.	Hémisynthèse des métabolites.....	274
6.1	Hydroxylation d'une chaîne aliphatique et d'une lactone	274
6.1.1	Chimie organique classique	274
6.1.2	Électrochimie	274
6.1.3	Catalyse biomimétique par squelette de type porphyrinique	275
6.1.4	Biotechnologies	276
6.1.5	Bioconversion	277
6.2	Travaux personnels	277
6.2.1	Bioconversion	277

6.2.2	Catalyse biomimétique	281
6.2.2.1	Étude analytique	281
6.2.2.2	Échelle préparative	286
7.	Étude structurale des métabolites hemisynthétiques.....	287
7.1	MALDI-TOF-TOF	287
7.2	RMN.....	287
7.2.1	Métabolite polaire (M_H1)	287
7.2.2	Métabolite polaire (M_H2)	289
7.2.1	Métabolite apolaire (M_H3)	290
	Conclusion de la métabolisation de phase I de l'annonacine	294
	Conclusion générale	296
	Chapitre 7 : Matériels et méthodes	300
1.	Matériels	300
1.1	Produits chimiques	300
1.1.1	Solvants	300
1.1.2	Réactifs.....	300
1.1.3	Étalons.....	300
1.1.4	Réactifs biologiques.....	301
1.1.5	Analytique	301
1.2	Chimie extractive et analytique.....	301
1.2.1	Chromatographie sur colonne ouverte et chromatographie couche mince.....	301
1.2.2	CLHP-DAD	302
1.2.2.1	CLHP-DAD analytique	302
1.2.2.2	CLHP-DAD préparative	302
1.2.3	Spectrométrie de masse.....	302
1.2.3.1	MALDI-TOF-TOF	302
1.2.3.2	CLHP-DAD-ESI-MSD	302
1.2.3.3	CLHP-ESI-piège à ions	303
1.2.3.4	UPLC-ESI-TSQ-Vantage.....	303
1.2.3.5	CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®	303

1.2.3.6	CLHP-ESI-TQ QUATTRO ULTIMA WATERS	303
1.2.4	RMN (Résonance magnétique)	304
1.2.4.1	400 MHz	304
1.2.4.2	600 MHz	304
1.2.5	IR	304
1.2.6	Fluorimètre.....	304
1.2.7	Turbidimétrie.....	304
1.2.8	Voltmètre pour cellules épithéliales (EVOM).....	304
1.3	Centrifugeuses.....	304
1.4	Speedvac®	304
1.5	Matériel végétal	305
1.5.1	Fruits d' <i>A. muricata</i>	305
1.5.2	Nectars et purée d' <i>A. muricata</i>	305
1.5.2.1	Purée de corossol pour l'obtention de l'annonacine.....	305
1.5.2.2	Nectar Brésilien	305
1.5.2.3	Nectar Guyanais.....	305
1.5.2.4	Jus Brésilien	305
1.5.2.5	Jus Péruvien.....	305
1.5.3	Compléments alimentaires	306
1.5.3.1	Gélules Raintree®	306
1.5.3.2	Gélules et poudre en vrac Graviola Inka Natural®	306
1.5.3.3	Gélules Maximize®	306
1.5.4	Teinture mère	306
1.5.5	Produits alimentaires transformés	306
1.5.5.1	Bonbons à base d' <i>A. muricata</i>	306
1.5.5.2	Confiture de corossol.....	306
1.5.5.3	Alcool à base d' <i>A. cherimolia</i>	307
1.6	Matériel de culture de traitement des échantillons biologiques.....	307
1.6.1	Cellules	307
1.6.2	Microsomes	307
1.6.3	Inserts	307

1.6.4	Kit LDH	308
1.6.5	Milieux de culture.....	308
1.6.5.1	Cellules transfectées	308
1.6.6	Tampons de perméabilité	308
1.6.6.1	Uptake	308
1.6.6.2	Bioconversion	309
1.6.6.3	Métabolisation microsomale	309
1.6.6.3.1	Tampon phosphate	309
1.6.6.3.2	Système générateur.....	309
1.6.7	Micromycètes.....	309
2.	Méthodes.....	310
2.1	Phytochimie.....	310
2.1.1	Obtention de l'annonacine.....	310
2.1.1.1	Extraction et traitement de la matière première	310
2.1.1.2	Isolement et purification.....	310
2.1.1.3	Identification de l'annonacine	311
2.1.2	Déréplication.....	313
2.1.2.1	Extraction.....	313
2.1.2.2	Préparation des échantillons et analyse.....	313
2.1.3	Études quantitatives	313
2.1.3.1	Extraction.....	313
2.1.3.2	Analyse	315
2.2	Absorption Distribution.....	316
2.2.1	Stabilité à pH alcalin	316
2.2.2	Étude des inserts.....	317
2.2.3	Caco-2	318
2.2.3.1	Uptake	318
2.2.3.2	Toxicité	319
2.2.4	Fixation aux protéines	320
2.2.5	hCMEC/D3 et Lucifer Yellow	320
2.3	Métabolisation	321

2.3.1	Mise au point	321
2.3.1.1	Manipulation	321
2.3.2	Microsomes induits	321
2.3.3	Étude cinétique : détermination du Km et Vi	322
2.3.4	Microsomes humains	323
2.3.4.1	Manipulation	323
2.3.5	Métabolisation en présence d'inhibiteurs des cytochromes	323
2.3.6	Cytochromes transfectés	323
2.3.6.1	Mise au point	323
2.3.6.2	Étude des cytochromes impliqués	323
2.4	Synthèse des métabolites	324
2.4.1	Bioconversion	324
2.4.1.1	Étude par lots	324
2.4.1.2	Étude individuelle des champignons	324
2.4.1.3	Étude des bioconversions par <i>Aspergillus alliaceus</i>	324
2.4.2	Catalyse biomimétique	325
2.4.3	Catalyse biomimétique avec protection et déprotection de l'annonacine	325
2.5	Analyse des métabolites hémisynthétiques par MALDI-TOF-TOF	326
	Bibliographie	328
	Annexes	344
	Sources d'images	352

Remerciements

Voici la partie que tout le monde attendait avec impatience. Elle sera sans doute, celle qui sera la plus lue, la plus feuilletée et la plus commentée. Je vous assure que le reste de cette thèse mérite autant votre intérêt !

Mes remerciements vont tout d'abord :

Au Dr. Françoise GUERITTE, qui a accepté d'être dans mon jury et de m'avoir accueillie dans son laboratoire au cours de mon master 2. Ceci m'a permis d'obtenir de solides bases en isolement et analyse des substances naturelles, très utiles au cours de cette thèse.

Au Pr Olivier LAPRÉVOTE, pour avoir bien voulu examiner mon travail, m'avoir fait découvrir la spectrométrie de masse et m'avoir permis de collaborer et de travailler avec le laboratoire de Gif-sur-Yvette.

Au Dr. Thierry CRESTEIL, pour avoir accepté non seulement d'être dans mon jury de thèse mais aussi d'avoir participé à son élaboration en m'apprenant les différentes techniques d'étude de métabolisation de phase I. Grand merci pour son aide, son écoute et à sa grande disponibilité.

Au Pr Sophie TOMASI, pour la gentillesse dont elle a fait preuve en étant rapporteur de ce travail de thèse. Tu as toujours été là dans les moments forts de mon cursus, et je te suis à nouveau reconnaissante pour ta présence dans cette nouvelle étape importante.

Au Dr. Xavier DECLÈVES, pour l'honneur que vous m'avez fait d'avoir rapporté ce travail qui n'est pas vraiment dans votre domaine. J'espère que la chimie des substances naturelles vous aura intéressé.

Au Dr. Sabrina BOUTEFNOUCHET, qui a accepté d'être dans mon jury et pour votre disponibilité.

À **BioCIS**, mon laboratoire d'accueil, et tout particulièrement à l'équipe de pharmacognosie et au **Dr. Bruno FIGADÈRE**, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir permis d'effectuer différentes formations comme : les doctoriales, la semaine de formation des jeunes en spectrométrie de masse, le congrès Eurotox ou le congrès de l'ASP en Floride.

Au **Pr Guy LEWIN**, tu as été une personne indispensable pour cette thèse. Merci pour ton soutien, pour ton écoute et pour toutes les conversations professionnelles et extraprofessionnelles que nous avons pu partager. Je pense qu'une des premières phrases que tu as prononcée en débutant ma thèse résume tout : « ma fille et toi vous commencez une thèse fléchée exactement au même moment **LEWIN**, **LE VEN** ça se ressemble non ? »

Au **Dr. Pierre CHAMPY**, mon encadrant et directeur de thèse « non officiel » pour avoir écrit un sujet de thèse m'ayant passionné et qui m'a permis d'obtenir une bourse fléchée du ministère. Merci pour ta disponibilité, ta patience, ta confiance et la liberté que tu m'as accordées, là. J'espère que bientôt, je pourrais t'appeler professeur et que tu seras enfin et de nombreuses fois un directeur de thèse officiel.

À **Mme Agnès BERTON**, personne incontournable du laboratoire BioCIS, qui m'a aidée pour tous les démarches administratives. Merci aussi pour sa grande gentillesse et son écoute.

À **Mme Karine LEBLANC**, qui m'a grandement aidée lors des nombreuses purifications d'annonacine et merci d'avoir toujours trouvé le temps pour me permettre de les réaliser.

À **Mme Blandine SÉON-MÉNIEL**, que dire de plus que tous les remerciements des nombreux doctorants et futurs docteurs qui sont passés avant moi dans ce laboratoire. Tu en es un pilier (la maman). Tu es là pour nos soucis techniques et personnels et toujours à l'écoute.

Au **Dr. François ROBLOT**, tu m'as énormément apporté en me livrant les ficelles de l'enseignement et tous tes petits conseils techniques pour l'extraction et l'isolement en grande quantité. Tout cela agrémenté de nombreuses discussions animées.

Au **Pr Mr LEBOEUF** toujours là à la première heure pour m'accueillir au laboratoire. À ses petites sucreries (chocolats et gâteaux bretons) qui m'ont permis de remonter la pente lors des moments difficiles.

À **Zahra ABADA**, ma co-équipière de paillasse. Tu es devenue une véritable amie. Je croise les doigts pour toi le 1^{er} février et j'espère que tu trouveras un magnifique poste en chimie organique où tu t'épanouiras.

À mes stagiaires tous de caractères très différents mais tous autant passionnés :

- À Yazid KHALED KHODJA pour son implication et sa force de travail (il fallait les porter les 30 kgs).

- À Nourchen OUALI et à sa bonne humeur constante.

- À Estella VALLADE pour sa passion et sa rigueur.

- À Baptiste FOURMAUX pour avoir pris du temps à travailler l'annonacine qui n'était pas ton sujet direct.

J'espère que vous trouverez tous votre voie et je vous souhaite tout le bonheur pour votre vie future.

Aux autres membres permanents du laboratoire de pharmacognosie, Pr Erwan POUPON, Dr. Christophe FOURNEAU, Dr. Alexandre MACIUK, Dr. Laurent ÉVANNO, Dr. Laurent FERRIÉ qui créent une bonne ambiance au sein du laboratoire : merci à tous pour votre disponibilité et vos différents conseils scientifiques.

Aux anciens thésards ou presque anciens thésards Rim SALAMÉ, Gerardo CEBRIAN, Lok-Hang YAN, Zacaria CHEIK ALI, Gael LE DOUARON merci pour cette bonne ambiance qui me permettait malgré le peu de fois où je passais au laboratoire de me sentir toujours intégrée dans votre équipe.

Aux nouveaux thésards Johan FENNETEAU, Asmaa BOUFRIDI, Nicolas BARBAHN, Abha HARFOUCHE bon courage profitez bien de vos années de thèse. Elles peuvent parfois sembler dures mais elles sont vraiment enrichissantes. Un bon courage tout particulier à Natacha BONNEAU, avec ces petites bêtes, les acétogénines, pas très sympathiques au niveau physico-chimique mais pourtant si passionnantes.

Aux différents membres de l'équipe de service commun de RMN et du SAMM, pour toutes les analyses que vous avez effectuées et particulièrement à Audrey SOLGADI pour sa disponibilité.

Cette thèse n'aurait jamais pu exister sans l'association de nombreux laboratoires.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr. Alain BRUNELLE, directeur de l'équipe de spectrométrie de masse à l'ICSN, pour m'avoir permis de faire autant de manipulations et de m'avoir intégrée dans ce laboratoire qui est devenu un point central de cette thèse. Je tiens aussi à te remercier pour ton écoute et pour ton soutien.

À **Mme Isabelle SCHMITZ-AFONSO**, pour ta passion pour mon sujet, ta rigueur, ton dévouement même lors de ton congé maternité mais aussi pour tous les « à côté » personnels. Merci pour tout.

Au **Dr. David TOUBOUL**, pour avoir pris le relais lorsqu'Isabelle était indisponible pour tes conseils tant scientifiques que personnels.

Au **Dr. Mathieu GAUDIN**, personne aux nombreuses qualités, comme celle d'être breton par exemple. J'espère que notre amitié grandira dans les années à venir.

Au **Dr. Nicolas DESBENOIT**, qui a mis une super ambiance dans ce laboratoire d'accueil. Tes bonnes vanes me manqueront et j'espère que tu ne vas pas trop t'habituer à la bière allemande. La bière belge restera toujours la meilleure pour moi.

Au **Dr. Vanessa PETIT**, pour ta bonne humeur et tes nombreux conseils. Tu es devenue une véritable amie et j'espère que tu t'épanouiras dans ta vie professionnelle comme dans ta vie personnelle.

Aux autres permanents :

Mr. Vincent GUÉRINEAU et sa bonne humeur continuelle, **Mr. Jean-Pierre LE CAER**, **Mme Olinda GIMELLO**, **Mr Nicolas ELIE** (vive les semaines de formation!), **Mme Manuela ARGENTINI** et **Mr. David CORNU**, pour leur gentillesse et leur bonne humeur qui rend cette équipe si vivante.

Aux **Dr. Claudia BICH**, **Dr. Hanane KHADAR**, **Mlle Marie MEJEAN**, **Dr. Paul MILLARES**, **Mlle Julie ALLEGRAND**, **Mr. Christopher CERRUTI** pour cette bonne ambiance qui nous donne envie en se réveillant le matin d'aller travailler.

Au laboratoire du **MCAM (Molécule de Communication et Adaptation des Micro-organismes)** du **Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris** et plus particulièrement au **Dr. Didier BUISSON** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour le temps consacré à mes manipulations, pour sa gentillesse et sa passion pour la bioconversion.

À **Mlle Audrey VALLADEAU**, qui m'a été d'une grande aide lors de mes différentes manipulations. Merci pour ton sens pratique et pour ta bonne humeur. J'ai apprécié de travailler avec toi.

À l'entreprise innovante Alpha-Chimica[®], notamment au Dr. Bernadin AKAGAH, qui m'a permis d'utiliser ses porphyrines, qui m'a aidé lors des différentes manipulations mais aussi à son grand humour et ses différents conseils.

À Anh Tuan LORMIER qui a effectué les manipulations préliminaires de ces études et pour sa joie de vivre.

Au groupe de biologie de l'endothélium cérébral de l'Institut Cochin tout particulièrement au Dr. Pierre Olivier COURAUD qui m'a permis de faire mes différentes manipulations au sein de son laboratoire. Merci pour ses conseils très enrichissants et sa disponibilité malgré son emploi du temps très chargé

À Mlle Fabienne GLACIAL, pour tout le temps passé à préparer les cellules mais aussi pour toutes nos discussions.

À Mlle Kayathiri GANESHAMOORTH, à ton enthousiasme en particulier pour téléphoner aux commerciaux. Tu es arrivée en cours des études de passage de BAE et tu as formé un binôme de choc avec Fabienne.

A votre duo et surtout aux chouquettes ! Promis, j'essayerai de vous en apporter quelques unes un matin.

Au laboratoire de pharmacie Clinique de la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry et au Dr. Marion BUYSE pour sa grande pédagogie, sa gentillesse. J'ai vraiment apprécié le temps que tu as passé avec moi malgré ton emploi du temps très chargé.

A mes autres collègues doctorants des autres équipes de la faculté en particulier Romain VERPILLOT et Olivier CAUCHOIS pour m'avoir dépanné lorsqu'il me manquait du matériel.

À mes parents et ma famille, qui m'ont toujours soutenue, même dans mes moments difficiles

*Tout particulièrement à **ma mère**, pour sa tendresse, sa patience. Oui maman, tu es une super maman! À **mon père**, toujours passionné par les sciences et le domaine de la santé, merci d'être là pour écouter en boucle les parkinsonismes associés à un drôle de fruit.*

*À **mon frère Florent**, qui découvre maintenant à son tour le monde de la recherche avec un petit accent canadien quand même. J'espère qu'on te donnera enfin la place que tu mérites.*

*À **mon parrain Pierre et ma marraine Nicole** toujours là aux moments importants de ma vie. À **Gugu, Marie et Georgette** pour être tout simplement vous.*

*À **Chinh et la petite Joan** les dernières arrivés dans la famille. Joan, j'espère que tu ensoleilleras notre famille comme ta maman le fait depuis une dizaine d'années maintenant.*

À mes anciens amis, nouveaux, bretons, pharmaciens, non pharmaciens, scientifiques, non scientifiques, parisiens, non parisiens, plutôt à l'Ouest, plutôt à l'Est, filles, garçons à tous les gens qui m'ont soutenue et qui ont même cru qu'ils passaient eux même une thèse. J'espère que vous vous retrouverez dans ce petit mot. Je vous suis extrêmement reconnaissante.

*Au **bar sans nom** et à sa patronne **Françoise** où j'y ai passé des moments inoubliables qui m'ont permis de décompresser malgré mon stress et mes erreurs car il ne faut surtout pas oublier que l'erreur est cubaine !*

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme floral pour le genre <i>Annona</i>	41
Figure 2 : Exemples de différents fruits d'Annonaceae	41
Figure 3 : Différents noyaux alcaloïdiques rencontrés chez les Annonaceae	43
Figure 4 : Uvaricine	44
Figure 5 : Structure générale des acétogénines	44
Figure 6 : Acétogénines en C33.....	50
Figure 7 : Rollicosine <i>R. mucosa</i>	50
Figure 8 : 15-palmitoylsolamine.....	50
Figure 9 : Limonène.....	51
Figure 10: α -Pinène	51
Figure 11 : Caryophyllène	51
Figure 12 : Acide kaurénoïque	51
Figure 13 : β -sitostérol.....	52
Figure 14 : Polycarpol.....	52
Figure 15 : Syringarésinol.....	52
Figure 16 : Répartition du genre <i>Annona</i>	53
Figure 17 : Benzyl-tétrahydroisoquinoléines isolées d' <i>Annona muricata</i>	57
Figure 18 : Tétrahydroprotoberbérine isolée d' <i>Annona muricata</i>	58
Figure 19 : Aporphines isolées d' <i>Annona muricata</i>	58
Figure 20 : Annonacine	59
Figure 21 : Organisation fonctionnelle du circuit moteur des noyaux gris centraux pour un sujet sain et pour un parkinsonien [Leys 2004]	65
Figure 22 : Posture caractéristique d'un sujet Parkinsonien	67
Figure 23 : Mécanisme de la maladie de Parkinson idiopathique [Brown T.P. 2006].....	68
Figure 24: Classification des différents parkinsonismes	69
Figure 25 : Dystonies nucale et dorsale	71
Figure 26 : Paralysie oculaire supranucléaire verticale.....	71
Figure 27 : Accumulation de protéine tau.....	73
Figure 28 : Atrophie du mésencéphale chez un patient Gd-PSP IRM de patients (A) parkinsonien idiopathique (B) Gd-PSP [Lannuzel A. 2007].....	75
Figure 29 : Évaluation de la consommation d' <i>Annona muricata</i> chez des patients Guadeloupéens [Lannuzel A. 2007].....	77
Figure 30 : Répartition des différentes études épidémiologiques impliquant un lien entre parkinsonismes et Annonaceae	79
Figure 31 : Représentation schématique des différents profils électrophorétiques de diverses tauopathies	80
Figure 32 : β -N-méthyl-amino-L-alanine.....	80
Figure 33 : Chaîne mitochondriale	81

Figure 34 : Structure du MPTP et de son métabolite actif le MPP+.....	82
Figure 35 : Roténone.....	83
Figure 36 : Structure du Paraquat et du Manèbe.....	84
Figure 37 : Mécanisme d'action de différents pesticides pouvant être impliqués dans la maladie de Parkinson [Cicchetti F. 2009].....	85
Figure 38 : Rolliniastatine-1.....	91
Figure 39 : Différents sites d'action des ACGs au niveau du complexe I.....	91
Figure 40 : Relation structure activité des ACGs pour l'inhibition du complexe I.....	92
Figure 41 : Squamocine fluorescente.....	93
Figure 42 : Étude cinétique de la distribution cellulaire de la squamocine fluorescente.....	93
Figure 43 : Accumulation de tau au niveau des mitochondries après incubation par de l'Annonacine.....	95
Figure 44 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse.....	100
Figure 45 : Ionisation par FAB.....	102
Figure 46: Principe d'ionisation par electrospray.....	104
Figure 47 : Équations différentielles de Mathieu.....	106
Figure 48 : Principe de l'analyseur quadripolaire.....	107
Figure 49 : Principe du piège ionique 3D.....	108
Figure 50 : Modes d'éjections par un piège 2D.....	109
Figure 51 : Orbitrap®.....	109
Figure 52 : TOF avec réflectron.....	110
Figure 53 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse en tandem constitué de deux analyseurs.....	113
Figure 54 : Schéma d'un triple quadripôle.....	114
Figure 55 : Différents modes d'utilisations d'un triple quadripôle.....	115
Figure 56 : ESI-LTQ-Orbitrap®.....	116
Figure 57 : Extraction d'annonacine à partir d'un nectar commercial.....	118
Figure 58 : Purification de l'annonacine à partir de l'extrait polaire.....	119
Figure 59 : Fragmentation d'un époxyde et d'une double liaison par IE.....	122
Figure 60 : Nomenclature des fragments obtenus par SM/SM proposée par Laprèvote <i>et al.</i>	123
Figure 61 : Mécanismes de fragmentation des fragments caractéristiques des acétogénines [Laprèvote O. 1994].....	124
Figure 62 : Nomenclature des fragments obtenus par SM/SM proposée par Laprèvote <i>et al.</i>	125
Figure 63 : Mécanismes de fragmentation caractéristiques des acétogénines des ACGs porteuses d'époxydes.....	125
Figure 64 : Principaux fragments caractéristiques d'acétogénines « cationisées » par le lithium obtenus en MALDI-TOF-TOF.....	126
Figure 65 : Spectre SM/SM de l'adduit de $[M+Li]^+$ de l'annonacine par ESI-LTQ-Orbitrap®.....	128
Figure 66: Spectre SM/SM de l'adduit $[M+Li]^+$ de la gonionenine par ESI-LTQ-Orbitrap®.....	129
Figure 67 : Spectre SM/SM de l'adduit $[M+Li]^+$ de l'annonacinone par ESI-LTQ-Orbitrap®.....	131
Figure 68 : Spectre SM/SM de l'adduit $[M+Li]^+$ de la squamocine par ESI-LTQ-Orbitrap®.....	133

Figure 69: Spectre SM/SM de l'ion $[M+Li]^+$ de la gigantecine et ses fragments caractéristiques.....	134
Figure 70 : Spectre SM/SM de l'ion $[M+Li]^+$ de la diépomuricanine et ses fragments caractéristiques	135
Figure 71 : Résumé des fragments caractéristiques des étalons	137
Figure 72 : Étude de déréplication par LC/(+)ESI-APCI-SM d'un extrait d'une fraction méthanolique de <i>Rollinia mucosa</i> [Gu Z.-M 1997].....	138
Figure 73 : Chromatogrammes de l'extrait de nectar d' <i>A. muricata</i>	139
Figure 74 : Résumé de la méthodologie employée pour la déréplication d'extraits bruts.....	141
Figure 75 : Attribution des structures des ACGs identifiées.....	142
Figure 76 : Acétogénines mono ou polyhydroxylées (sans « insaturation »).....	144
Figure 77 : Chromatogramme des acétogénines en C35 sans « insaturation ».....	144
Figure 78: Chromatogramme des acétogénines en C37 « sans insaturation ».....	145
Figure 79 : Donhepocine	149
Figure 80 : Époxymurine-A, <i>A. muricata</i>	150
Figure 81 : Tripoxyrolline, <i>R. mebranaceae</i>	151
Figure 82 : Hypothèse de structure d'acétogénines ayant 1 « insaturation »	151
Figure 83 : Chromatogrammes des acétogénines en C35 à « 1 insaturation ».....	152
Figure 84 : Chromatogrammes des acétogénines en C37 à 1 « insaturation ».....	153
Figure 85 : Comparaison <i>cis</i> et <i>trans</i> solamine	157
Figure 86 : Longifolicine <i>Asimina longifolia</i>	158
Figure 87 : muricine-H <i>A. muricata</i>	159
Figure 88 : Muricatenol, <i>A. muricata</i>	160
Figure 89 : Xylopianine, <i>Xylopija aromatica</i>	161
Figure 90 : Goniotalamcine, <i>A. muricata</i>	161
Figure 91 : Annomutacine, <i>A. muricata</i>	163
Figure 92 : Goniodonine, <i>G. donnaiensis</i>	164
Figure 93 : Hypothèse de structure des acétogénines de formule $C_{35}H_{64}O_9$ à $tr = 10,73$ et $tr = 11,22$ min	165
Figure 94 : Annohexocine, <i>A. muricata</i>	165
Figure 95 : Hypothèses de structure d'acétogénines ayant 2 « insaturations ».....	167
Figure 96 : Chromatogrammes des acétogénines en C35 à 2 « insaturations » $C_{35}H_{62}O_xLi$	168
Figure 97 : Chromatogrammes des acétogénines en C37 à 2 « insaturations » $C_{37}H_{66}O_xLi$	170
Figure 98 : Annojahnine, <i>A. jahnii</i>	173
Figure 99 : Bullatencine, <i>A. bullata</i>	173
Figure 100 : Annocatacine-A, <i>A. muricata</i>	174
Figure 101 : Spectre SM/SM m/z 617,46 des molécules majoritaires	176
Figure 102 : Mécanisme de formation de l'ion $[C_{24}H_{46}O_4Li]^+$ à m/z 405,35.....	177
Figure 103 : Muricatine-C, <i>A. muricata</i>	178
Figure 104 : Montanacine-H, <i>A. montana</i>	179
Figure 105 : Donnaiénine, <i>G. donnaiensis</i>	179

Figure 106 : Salzmanoline, <i>A. salzmanii</i>	179
Figure 107: Chromatogrammes des acétogénines en C35 à 3 "insaturations" $C_{35}H_{60}O_xLi$	180
Figure 108 : Chromatogrammes des acétogénines en C37 à 3 "insaturations" $C_{35}H_{64}O_xLi$	181
Figure 109 : Annondienine, <i>A. jahnii</i>	183
Figure 110 : Tripoxyrolline, <i>R. membranaceae</i>	183
Figure 111 : Spectre SM/SM m/z 599,44 des molécules majoritaires	185
Figure 112 : Mécanisme de formation du fragment Y1 : $C_{26}H_{48}O_4Li$ à m/z 431,37	185
Figure 113 : Mécanisme de formation du fragment $C_{29}H_{52}O_5Li$ à m/z 487,40	186
Figure 114 : Goniocine, <i>G. giganteus</i>	187
Figure 115 : Chromatogramme des acétogénines en C35 à 4 "insaturations", $C_{35}H_{58}O_7Li$	188
Figure 116: Résumé de différentes formules brutes en C35 retrouvées dans le nectar d' <i>A. muricata</i> lors de la déréplication.....	190
Figure 117 : Résumé de différentes formules brutes en C37 retrouvées dans le nectar d' <i>A. muricata</i> lors de la déréplication.....	192
Figure 118 : UV et TIC obtenu par DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® avec infusion de lithium post-colonne et Chromatogrammes UV à $\lambda = 210$ nm à de l'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	195
Figure 119 : Récapitulatif des acétogénines en C35 visibles sur le chromatogramme totale de l'extrait d'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	196
Figure 120 : Récapitulatif des acétogénines en C37 visibles sur le chromatogramme total de l'extrait d'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	197
Figure 121 : Schéma d'extraction des acétogénines des fruits et des compléments alimentaires.....	205
Figure 122 : Schéma d'extraction des acétogénines de la purée, des nectars et de la confiture.....	206
Figure 123 : Schéma d'extraction des acétogénines des bonbons.....	206
Figure 124 :Schéma d'extraction des acétogénines de la teinture mère	207
Figure 125 : Chromatogramme UV représentant le fruit vietnamien	208
Figure 126 : Chromatogramme UV comparant le jus péruvien et les gélules Raintree®	209
Figure 127 : Chromatogramme des ions extraits $[M+Na]^+$ correspondant aux acétogénines majoritaire en SM et en UV de la pulpe du fruit vietnamien	210
Figure 128 : Proposition des structures des majoritaires des fruits et produits d' <i>A. muricata</i>	211
Figure 129 : Schéma du processus d'ADME	220
Figure 130 : Muqueuse intestinale	224
Figure 131 : Epithélium intestinal	224
Figure 132 : Glande de Lieberkühn.....	225
Figure 133 : Différents transports transcellulaires.....	226
Figure 134 : Protéines humaines impliquées dans le transports des médicaments et des substances endogènes au niveau intestinal.....	227
Figure 135 : Complexe neurovasculaire.....	229
Figure 136 : Protéines humaines impliquées dans le transports des médicaments et des substances endogènes au niveau de la BHE	231
Figure 137 : Stabilité de l'annonacine à pH alcalin (A) pH 7 et (B) pH 14	233

Figure 138 : Molécule tr = 18,1 min.....	234
Figure 139 : isoannoacine	234
Figure 140 : Principe de l'expérience de passage de barrière.....	235
Figure 141: Étude du passage de la LY en fonction de la concentration en annonacine.....	239
Figure 142 : Étude du passage de la LY en fonction de la concentration en annonacine.....	239
Figure 143 : Pourcentages relatifs d'annonacine dans la fraction cellulaire par rapport au milieu en fonction du temps d'incubation pour une concentration de 10 µM d'annonacine	241
Figure 144 : Conversion de l'acide lactique en acide pyruvique par la lactate déshydrogénase libérée par les cellules mortes ou à la perméabilité altérée	241
Figure 145 : Cytotoxicité de l'Annonacine à 24 h.....	242
Figure 146 : Complexe de cytochrome au niveau du réticulum endoplasmique	245
Figure 147 : Cycle catalytique de cytochrome P450.....	245
Figure 148 : Principaux cytochromes humains et leur proportion par rapport à la métabolisation des médicaments	246
Figure 149 : Comparaison des chromatogrammes obtenus en CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®-pour le témoin négatif et l'échantillon métabolisé par des microsomes de rats au PB.....	248
Figure 150 : Hypothèses de métabolisation de l'annonacine.....	249
Figure 151 : Chromatogramme SIM des métabolites [C ₃₅ H ₆₄ O ₈ Na] ⁺ obtenu après incubation d'annonacine par les microsomes de rats PB (M _R 1 à M _R 25).....	250
Figure 152 : Vitesse initiale de formation (A) des métabolites polaires (M _R 1 et M _R 2) (B) et du métabolite apolaire M _R 25	251
Figure 153 : Vitesses initiales des métabolites en fonction des concentrations initiales en annonacine (A) Métabolites polaires M1 et M2 (B) Métabolite apolaire M25	252
Figure 154 : Calcul du Km et Vmax des métabolites polaires M1 et M2 (A) et du métabolite apolaire M25 (B).....	253
Figure 155 : Comparaison des chromatogrammes obtenus en CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®-pour le témoin négatif et l'échantillon métabolisé par des microsomes humains	254
Figure 156: Comparaison du SIM 635,45 de l'échantillon de métabolisation par microsomes humains et par microsomes de rats.....	255
Figure 157 : Chromatogrammes obtenus après métabolisation par microsomes non induits, induits avec le PB ou la BNF	256
Figure 158 : Comparaison du chromatogramme d'un échantillon témoin et des chromatogrammes des échantillons inhibés par les différents inhibiteurs sélectifs.....	258
Figure 159 : Aire du métabolite M _H 3 en fonction de la concentration initiale en annonacine	259
Figure 160 : Aire du métabolite M _H 3 en fonction de l'incubation par différentes cellules transfectées.....	260
Figure 161 : Chromatogramme des métabolites polaires (M _C 1 à M _C 10) obtenus par les cellules transfectées Ad293-Red-CYP2C19 ; Ad293-Red-CYP1A2 et Ad293-Red-CYP3A4.....	261
Figure 162 : Chromatogramme des métabolites (M _C 1 à M _C 25) obtenus par les cellules transfectées Ad293-Red-CYP3C4	262

Figure 163 : Fragmentation des ions $[M+O+Na]^+$ des métabolites polaires (M_{R1} à M_{R10}) et des métabolites intermédiaires (M_{R11} à M_{R23}).....	264
Figure 164 : Fragmentation des ions $[M+O+Na]^+$ des métabolites apolaires (M_{R24} à M_{R25}).....	264
Figure 165 : Perte de la lactone et formation du fragment X4 des métabolites M_{R24} et M_{R25}	265
Figure 166 : Fragmentation des ions $[M+O-H]^-$ des métabolites polaires (M_{R1} à M_{R2})	266
Figure 167 : Fragmentation des ions $[M+O-H]^-$ du métabolite le plus apolaire (M_{R25}).....	266
Figure 168 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ des métabolites polaires (M_{R1} à M_{R8})	268
Figure 169 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ des métabolites polaires (M_{R9} à M_{R12}).....	268
Figure 170 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ du métabolite intermédiaire (M_{R13})	269
Figure 171 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ des métabolites intermédiaires (M_{R14} à M_{R23})	270
Figure 172 : Chromatogrammes des ions extraits des fragments X3 et X4 permettant de positionner les hydroxyles des métabolites intermédiaires M_{R14} à M_{R23}	271
Figure 173 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ des métabolites apolaires (M_{R24} et M_{R25})	272
Figure 174 : Emplacement hypothétique des hydroxylations des métabolites humains	274
Figure 175 : Exemple de production de métabolites hydroxylés par électrochimie	274
Figure 176 : Dérivés hémiques.....	275
Figure 177 : Exemple d'un cycle catalytique avec catalyseur porphyrinique associé au fer	276
Figure 178 : Bioconversion du mestranol par <i>Cunninghamella elegans</i>	277
Figure 179 : Chromatogramme SIM Comparant les différents produits obtenus en fonction des lots	279
Figure 180 : Chromatogrammes SIM comparant les différents produits formés par les différents champignons du lot C à $t = 18$ h.....	280
Figure 181 : Chromatogrammes SIM comparant les différents produits formés pour les différentes conditions : effet du couple oxydant / métal	282
Figure 182 : Chromatogrammes SIM m/z 613 comparant les différents produits formés par différentes substitutions des catalyseurs.....	283
Figure 183 : Étude cinétique de la formation des différents composés par catalyse biomimétique ($C_2/Mn/H_2O_2/$ Imidazole) à température ambiante.....	284
Figure 184 : Annonacine protégée par du TBDMSi	285
Figure 185: Produit de réaction après protection de l'annonacine, catalyse biomimétique puis déprotection	286
Figure 186 : Spectre RMN 1H du métabolite M_{H1} (600 MHz)	288
Figure 187 : Corrélation observée sur le spectre COSY entre les signaux du méthyl terminal en C-32 et du proton en C-31	288
Figure 188 : Spectre RMN 1H du métabolite M_{H2} à 600 MHz.....	289
Figure 189 : Corrélation observée sur le spectre HSQC entre le nouveau proton et son carbone (600 MHz)	289
Figure 190 : Corrélation observée sur le spectre HMBC du méthyl terminal et du carbone en C-31 et C-30 portant l'hydroxyle (600 MHz).....	290
Figure 191 : Spectre RMN 1H du métabolite M_{H3} (600 MHz)	291
Figure 192 : Hypothèse de structure du métabolite M_{H3}	291

Figure 193 : Pseudo-éthyl ester de l'acide <i>cis</i> - γ -acétylacrylique et ses produits d'hydrolyse	292
Figure 194 : Prédiction des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C obtenus pour l'annonacine et les deux hypothèses pour le métabolite $\text{M}_{\text{H}3}$	292
Figure 195 : Résumé des études biologiques et structurales de la métabolisation de phase I de l'annonacine par incubation avec des microsomes de rats et humains	295
Figure 196 : Gradient utilisé pour les études quantitatives	315
Figure 197 : Droite d'étalonnage pour les études quantitatives établie à partir des aires UV	316
Figure 198 : Gamme d'annonacine (5 μl) obtenue par CLHP-SRM pour étude d'Uptake.....	319
Figure 199 : Gamme 1 μl pour test uptake.....	319
Figure 200 : Gradient UPLC utilisé pour les études de métabolisation	322

Liste des tableaux

Tableau 1 : ACGs à Mono-THF	45
Tableau 2 : ACGs à Bis-THF	45
Tableau 3 : ACGs Bis-THF non adjacents	46
Tableau 4 : ACGs Tri-THF	46
Tableau 5 : ACGs à noyau THP	47
Tableau 6 : ACGs originales	47
Tableau 7 : ACGs sans THF	48
Tableau 8 : Sous-types de lactones	49
Tableau 9 : Recensement des acétogénines d' <i>Annona muricata</i>	59
Tableau 10: Classification d' <i>Annona cherimolia</i>	60
Tableau 11 : Recensement des acétogénines d' <i>A. cherimolia</i>	63
Tableau 12 : Classification des patients parkinsoniens guadeloupéens [Caparros-Lefebvre D. 2002]	70
Tableau 13 : Tableau diagnostique des Gd-PSP	72
Tableau 14 : Critères diagnostiques de Gd-CPD	74
Tableau 15 : Distribution et caractère démographique des patients à parkinsonismes atypiques [Caparros-Lefebvre D. 1999]	76
Tableau 16 : Quantité d'alcaloïdes totaux pour les préparations médicinales d' <i>Annona muricata</i> [Ch y P. 2004b]	86
Tableau 17 : Quantité d'alcaloïdes totaux dans la pulpe et le nectar d' <i>Annona muricata</i>	86
Tableau 18 : Toxicité des alcaloïdes d' <i>A. muricata</i> sur cultures primaires mésencéphaliques d'embryons de rats	87
Tableau 19 : Activité inhibitrice du complexe I de la mitochondrie par des alcaloïdes d' <i>A. muricata</i> ...	88
Tableau 20 : Quantité d'annonacine dans les feuilles et préparation à base de feuilles d' <i>Annona muricata</i>	89
Tableau 21 : Quantité d'annonacine dans la pulpe et le nectar d' <i>Annona muricata</i>	89
Tableau 22 : Toxicité aiguë de différentes acétogénines chez la souris par voie orale	90
Tableau 23 : Toxicité d'inhibiteurs du complexe I sur culture primaire mésencéphalique à 24 h	94
Tableau 24 : Source d'ionisation et application	105
Tableau 25 : Caractéristiques des analyseurs	111
Tableau 26 : Spectromètres utilisés dans cette thèse	117
Tableau 27 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de l'annonacine	128
Tableau 28: Fragments permettant le positionnement des fonctions de la gonionénine	130
Tableau 29 : Autres fragments visibles sur le spectre de la gonionénine	130
Tableau 30 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de l'annonacinone	131
Tableau 31 : Autres fragments et hypothèses de structure	132
Tableau 32 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de la squamocine	133
Tableau 33 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de la gigantécine	135

Tableau 34 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de la diépomuricanine.....	136
Tableau 35 : Intensité des ions permettant d'identifier les acétogénines.....	136
Tableau 36 : Récapitulatif des acétogénines en C35 sans insaturation	145
Tableau 37 : Récapitulatif des acétogénines en C37 sans insaturation	146
Tableau 38 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_3$	146
Tableau 39 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_4$	147
Tableau 40 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_5$	147
Tableau 41 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_7$	148
Tableau 42 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_8$	148
Tableau 43 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_9$	149
Tableau 44 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_{10}$	150
Tableau 45 : Tableau récapitulatif des acétogénines en C35 à 1 « insaturation »	153
Tableau 46: Récapitulatif des acétogénines en C37 et une insaturation.....	154
Tableau 47: Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_3$	155
Tableau 48 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_4$	156
Tableau 49 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_4$	156
Tableau 50 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_5$	157
Tableau 51 : Acétogénines en $C_{37}H_{68}O_5$	158
Tableau 52 : Acétogénines $C_{35}H_{64}O_6$	159
Tableau 53 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_6$	160
Tableau 54 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_7$	162
Tableau 55 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_7$	162
Tableau 56 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_8$	163
Tableau 57 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_8$	164
Tableau 58 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_9$	166
Tableau 59 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_9$	166
Tableau 60 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_{10}$	167
Tableau 61 : Récapitulatif des acétogénines en C35 à 2 « insaturations »	169
Tableau 62 : récapitulatif des acétogénines en C37 à 2 « insaturations »	170
Tableau 63 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_3$	171
Tableau 64 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_4$	172
Tableau 65: Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_5$	172
Tableau 66 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_6$	174
Tableau 67 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{66}O_6$	175
Tableau 68 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_7$	175
Tableau 69 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{66}O_7$	176
Tableau 70 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_8$	177
Tableau 71 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{66}O_8$	178
Tableau 72 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{66}O_9$	179
Tableau 73 : Récapitulatif des acétogénines en C35 à 3 « insaturations »	181

Tableau 74 : Récapitulatif des acétogénines en C37 à 3 « insaturations »	182
Tableau 75 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_5$	183
Tableau 76: Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_6$	184
Tableau 77 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_7$	186
Tableau 78 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_8$	187
Tableau 79: Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{58}O_7$	189
Tableau 80: Acétogénines de type E en C35 identifiées par la déréplication.....	190
Tableau 81 : Acétogénines en C35 de type A identifiées par la déréplication.....	191
Tableau 82 : Acétogénines de type E en C37 identifiées par la déréplication.....	192
Tableau 83 : Acétogénines de type A en C37 identifiées par la déréplication.....	193
Tableau 84 : Acétogénines de type C en C37 identifiées par la déréplication.....	193
Tableau 85 : Recensement des acétogénines du nectar d' <i>Annona muricata</i> obtenues par notre méthode de déréplication	193
Tableau 86 : Acétogénines de type E en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	196
Tableau 87 : Acétogénines de type A en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	196
Tableau 88 : Acétogénines de type B en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	197
Tableau 89 : Acétogénines de type B en C37 identifiées par la déréplication de l'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	198
Tableau 90 : Acétogénines de type E en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d' <i>A. cherimolia</i>	198
Tableau 91 : Recensement des acétogénines du nectar d' <i>Annona muricata</i> obtenus par notre méthode de déréplication	198
Tableau 92 : Répartition de la masse des fruits étudiés	200
Tableau 93 : Résultats de l'étude quantitative des deux lots de fruits d' <i>A. muricata</i>	213
Tableau 94 : Résultats de l'étude quantitatives des nectars et jus à base d' <i>A. muricata</i>	214
Tableau 95 : Résultats de l'étude quantitative des compléments alimentaire et de la teinture mère À base d' <i>A. muricata</i>	215
Tableau 96 : Résultats de l'étude quantitative des produits préparés à base du fruit d' <i>A. muricata</i> ...	216
Tableau 97 : Exposition annuelle à l'annonacine par les fruits pour un adulte	217
Tableau 98 : Exposition annuelle à l'annonacine par les nectars pour un adulte	217
Tableau 99 : Récapitulatif des doses totale et annuelle consommée pour un adulte pour les compléments alimentaires.....	218
Tableau 100 : Récapitulatif des doses totale par unités pour les produits préparés à base de corossol	218
Tableau 101 : Teneur en ACGs totales pour les différents produits et fruits étudiés.....	218
Tableau 102: Tableau prédictif du passage des barrières physiologiques pour l'annonacine.....	235
Tableau 103 : Étude de différents inserts.....	237

Tableau 104 : Inhibiteurs de CYP employés et leur spécificité	257
Tableau 105 : Micromycètes testés et leur code d'identification.....	278
Tableau 106 : « Lots » mis en oeuvre pour le criblage des micromycètes	278
Tableau 107 : Conditions des réactions d'oxydation et comparaison de l'association oxydant / métal	281
Tableau 108: Étude de différentes substitutions du catalyseur.....	283
Tableau 109 : Déplacements chimiques obtenus pour l'annonacine et les métabolites M _H 1, M _H 2 et M _H 3 à 600 MHz.....	293
Tableau 110 : Déplacements chimiques obtenus pour l'annonacine.....	312
Tableau 111 : Liste des ions à fragmenter	316
Tableau 112 : Concentration des inhibiteurs employés	323
Tableau 113 : Conditions oxydantes utilisées lors des études de catalyse biomimétique	325

Liste des photos

Photo 1 : Feuilles d' <i>Annona muricata</i>	55
Photo 2 : Fleur d' <i>Annona muricata</i>	55
Photo 3 : Fruit d'<i>Annona muricata</i>	55
Photo 4 : Graine et pulpe d' <i>Annona muricata</i>	55
Photo 5 : <i>Annona Cherimolia</i>	61
Photo 6 : Fleur d'<i>Annona cherimolia</i>	61
Photo 7 : Fruit d' <i>Annona cherimolia</i>	61
Photo 8: Produits dérivés d' <i>Annona cherimolia</i>	62
Photo 9 : Les corps de Lewy [Beal, 2001].....	65
Photo 10 : <i>Annona squamosa</i>	78
Photo 11: <i>Annona glabra</i>	78
Photo 12 : <i>Annona reticulata</i>	78
Photo 13 : <i>Annona montana</i>	78
Photo 14 : <i>Annona cherimolia</i>	78
Photo 15 : <i>Rollinia mucosa</i>	78
Photo 16 : Agriculteur asiatique utilisant du paraquat.....	84
Photo 17 : Nectar de corossol guyanais.....	143
Photo 18: Alcool d' <i>A. cherimolia</i> utilisé lors de l'étude de dérégulation.....	194
Photo 19: Corossol Vietnamien employé	200
Photo 20 : Purée de corossol pour l'obtention de l'annonacine	201
Photo 21 : Nectar de Graviola	201
Photo 22 : Nectar Guyanais	202
Photo 23 : Jus du Pérou	202
Photo 24 : Bonbons vietnamien	202
Photo 25 : Confiture Malgaches	203
Photo 26: Compléments alimentaires Raintree®	203
Photo 27 : Compléments alimentaires Inka Natural®	204
Photo 28 : Complément alimentaire Maximize®	204
Photo 29: Teinture mère d' <i>A. muricata</i>	204
Photo 30: Cellules Caco-2.....	228
Photo 31 : Cellules hCMEC/D3	231

Liste des équations

Équation 1: Formation d'ion moléculaire par IE en mode positif	101
Équation 2 : Transfert du proton de la matrice (S) à la molécule à analyser (M).....	102
Équation 3 : Temps de vol.....	110

Abréviations

ACGs : Acétogénines	IRM : Imagerie par résonance magnétique
ACN : Acétonitrile	J : Constante de couplage (en Hz)
AcOEt : Acétate d'éthyle	LY : Lucifer Yellow
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire Alimentation	MALDI : <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
ATP : Adénosine triphosphate	MAO-B : Monoamine oxydase-B
CID : Décomposition induite par collision	MeOH : Méthanol
C ₆ H ₁₂ : Cyclohexane	MPP ⁺ : ion 1-méthyl-4-phényl pyridium
CH ₂ Cl ₂ : Dichlorométhane	MPTP : 1-méthyl-4-phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance	MSA : Atrophie multisystématisée
CYP : Cytochrome P450 (mono-oxygénase à -)	m/z : masse-sur-charge
DA : Dopamine	NBA : Alcool <i>mé</i> ta-nitrobenzylique
DAT : Transporteur de la dopamine	Nd/YAG : Néodyme/yttrium-aluminium-grenat
DCB : Dégénérescence cortico-basale	NLS: <i>Neutral Loss Scan</i>
DCL : Démence à corps de Lewy	PB : Phénobarbital
DMSO : Diméthyl sulfoxyde	PIS: <i>Precursor Ion Scan</i>
ESI : <i>ElectroSpray Ionization</i>	PSP : Paralyse supranucléaire progressive
FAB : <i>Fast-atom Bombardement</i>	Q : Quadripôle
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
FAO : <i>Food and Agriculture Organization</i>	ROS : Espèce réactive de l'oxygène
Gd-PDC : Complexe Parkinson démence Guadeloupéen	SEM : Standard Error of Mean
Gd-PSP : Paralyse supranucléaire progressive Guadeloupéenne	SIM : <i>Single Ion Monitoring</i>
IE : Ionisation électronique	SM : Spectrométrie de masse
iNOS : oxyde nitrique synthase inductible	SM/SM : Spectrométrie de masse tandem
i.p. : intra-péritonéal	SP : Syndrome parkinsonien
	SRM : <i>Selected Reaction Monitoring</i>

s.c. : sous cutanée

TIC : *Total Ionic Chromatogram*

TH : *Tyrosine hydroxylase*

THF : Tétrahydrofurane

THP : Tétrahydropyrane

TQ: Triple quadripôle

TOF : *Time-of-Flight*

UPLC : Chromatographie Liquide Ultra
Performance

Δ : erreur sur la mesure de masse (ppm)

δ : déplacement chimique (ppm)

Introduction générale

En Guadeloupe, la prévalence de tauopathies se traduisant cliniquement par des syndromes parkinsoniens atypiques résistant à la dopathérapie et souvent associé à une démence est anormalement élevée [Caparros-Lefèbvre D. 1999, Litvan I. 1999, Steele J.C 1999]. Les individus touchés sont fortement handicapés et ont une espérance de vie réduite par rapport aux parkinsoniens idiopathiques (3 à 5 ans après diagnostic). Cette pathologie a été définie comme une entité nosologique à part entière, avec deux phénotypes : le parkinsonisme guadeloupéen à paralysie supranucléaire (GD-PSP) et le Complexe Parkinson démence Guadeloupéen (GD-PDC) [Caparros-Lefèbvre D. 2002, Lannuzel A. 2007].

L'étiologie de ces parkinsonismes, manifestation sporadiques, n'est pas résolue. Il est probable que leurs causes soient multiples, comme cela est proposé pour l'ensemble des parkinsonismes atypiques : facteurs de prédispositions génétiques et facteurs environnementaux. Des études épidémiologiques ont mis en évidence un facteur étiologique probable : l'utilisation de plantes et de fruits issus d'une famille tropicale, les Annonaceae, à des fins alimentaires et médicinales. En effet, une association entre l'apparition des syndromes parkinsoniens atypiques et la consommation de fruits et de tisanes d'annonces a été trouvée. En Guadeloupe, l'espèce la plus couramment consommée est *A. muricata*. D'autres espèces du genre sont incriminées en raison de leur abondance en zone rurale et de leur culture (*A. cherimolia*, *A. squamosa*, *A. montana*, *A. reticulata*). De plus, au cours des 60 dernières années, une prévalence anormalement élevée de parkinsonismes atypiques a été signalée dans d'autres régions géographiques : île de Guam, Nouvelle-Guinée, péninsule de Kii, Martinique, Nouvelle-Calédonie et Angleterre (population immigrées), suscitant un intérêt pour la compréhension de l'étiologie de ces maladies. Les Annonaceae sont largement consommées pour leurs fruits. Enfin, ces plantes émergent sur le marché occidental et sud-américain sous forme de compléments alimentaires, représentant un problème potentiel de santé publique mondial.

Des études phytochimiques et biologiques menées sur les Annonaceae, particulièrement *Annona muricata*, ont mis en évidence deux familles de molécules pouvant constituer des neurotoxines environnementales : les alcaloïdes isoquinoléiques et les acétogénines d'Annonaceae. Des études biologiques axées sur les alcaloïdes (réticuline, coreximine et annonaine) suggèrent que ceux-ci peuvent altérer la transmission dopaminergique et provoquer la mort cellulaire dans des cultures mésencéphaliques. Cependant, ces métabolites neurotoxiques identifiés ne semblent pas susceptibles d'engendrer à eux seuls les neurodégénérescences sévères observées chez l'humain [Caparros-Lefèbvre D. 2002, Collins M.A. 1999]. Des études sur les acétogénines, inhibiteurs puissants du complexe I de la mitochondrie, ont été entreprises, associant principalement notre laboratoire, l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN – au sein de laquelle une partie du travail présenté dans ce manuscrit a été réalisée, ainsi que le laboratoire « Neurologie expérimentale de Marbourg ». Elles ont montré que l'annonacine est le composant majoritaire des organes d'*A. muricata*, y compris des fruits [Champy P. 2004b]. Des études sur modèles animaux et cellulaires ont mis en évidence une neurotoxicité de la molécule [Lannuzel A. 2003, Escobar-Khondiker M. 2007 ; Champy P. 2004a,b, Höllerhage M. 2009, Höllerhage M. 2009b, Potts L. 2011]. Cependant, aucune étude de la biodisponibilité des acétogénines, pouvant valider l'hypothèse de l'implication de ces neurotoxines, d'origine *a priori* principalement alimentaire, dans la survenue de parkinsonisme, n'a été effectuée.

En avril 2010, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments a publié une saisine relative à la possible implication de ces neurotoxines dans la survenue de syndromes parkinsoniens. Elle estime que des recherches sur l'annonacine sont nécessaires afin de mieux caractériser le risque lié à la consommation de corossol, principal fruit consommé contenant de l'annonacine. Ces recherches doivent notamment porter sur les propriétés cinétiques de la molécule (biodisponibilité orale, métabolisme) et sa toxicité à long terme ainsi que sur une quantification précise des apports quotidiens en annonacine [AFSSAPS 2010]. Néanmoins, l'étude de cette toxicité ne doit pas être

réduite à l'annonacine seule. En effet, des acétogénines de structures différentes pourraient avoir une bonne biodisponibilité et une plus forte toxicité que l'annonacine et seraient donc les molécules impliquées dans cette maladie.

L'objectif de notre travail a consisté en l'évaluation quantitative et qualitative des acétogénines et plus particulièrement de l'annonacine au sein de fruits et de différents produits commerciaux d'*A. muricata* (fruits et dérivés) et d'*A. cherimolia* (alcool). De plus, les acétogénines étant connues pour être des molécules cytotoxiques et l'annonacine ayant montré des activités neurotoxiques *in vitro* et *in vivo* (iv, sc), des études de sa détoxification par l'organisme et de passage des barrières intestinale et hémato-encéphalique ont été amorcées afin de comprendre sa réelle implication dans la maladie.

Dans les trois chapitres constituant la partie introductive de ce document, le premier porte sur une présentation générale des Annonaceae et plus particulièrement des deux plantes étudiées (*A. cherimolia* et *A. muricata*). Dans le second chapitre sont explicités des rappels concernant la maladie de Parkinson idiopathique et les parkinsonismes, avec une description des parkinsonismes guadeloupéens, leurs étiologies et l'état des connaissances sur l'implication des alcaloïdes et des acétogénines dans leur survenue. Le troisième chapitre est consacré à une présentation générale de la technique analytique la plus utilisée au cours de cette thèse : la spectrométrie de masse.

La seconde partie de ce manuscrit est consacrée au volet phytochimique. L'obtention de l'annonacine en grande quantité est décrite. Un développement méthodologique originale et puissante de dérégulation par spectrométrie de masse est proposé. Ensuite, les études quantitatives et qualitatives réalisées à partir des fruits et des dérivés d'*A. muricata* et d'*A. cherimolia* seront présentées.

Une dernière partie présentant les aspects biologiques décrit les études préliminaires *in vitro* de distribution et d'absorption plus particulièrement les études de passage de barrière intestinale (cellules Caco-2) et de barrière hémato-encéphalique (cellules hCMEC/D3). Enfin, les études biologique et structurale de métabolisation de phase 1 seront décrites.

Chapitre 1 : Généralités sur les Annonaceae et les espèces étudiées

La famille des Annonaceae est une des plus archaïques des angiospermes. Avec 2300 espèces et 130 genres, elle est la plus importante de l'ordre des Annonales qui compte 2620 espèces réparties en 152 genres [Takhtajana A., 1986].

1. La famille des Annonaceae

1.1 Origine et répartition géographique

Elle est rencontrée de manière quasi-exclusive sous les tropiques et est particulièrement caractéristique des forêts de basse altitude. Les genres *Asimina* et *Deeringothalamus* poussent dans certaines régions tempérées d'Amérique du Nord [Hutchinson J. 1964]. Il existe aussi des cultures dans le bassin méditerranéen.

L'origine de cette famille serait sud-américaine et africaine, d'après les études phytogéographiques, morphologiques florales et palynologiques de Le Thomas [Le Thomas A. 1983].

1.2 Caractères botaniques

C'est Jussieu qui décrit pour la première fois, en 1789, les caractères botaniques de la famille [Jussieu A. L. 1789]. Ce sont des plantes ligneuses, souvent aromatiques, aux formes variées : arbres (15-20 m), arbustes et arbrisseaux (1-10 m) ou lianes. Les formes arborescentes ont un tronc généralement cylindrique, à écorce plissée et fissurée, de couleur le plus souvent grisâtre [Le Thomas A. 1980].

Les Annonaceae présentent une grande homogénéité morphologique. Elles ont un certain nombre de caractères botaniques témoignant de leur appartenance aux Magnoliales et donc de leur archaïsme. La pollinisation est entomophile.

Feuilles

Les feuilles, de taille variable, sont simples, sans stipules, alternes et distiques courtement pétiolées ou subsessiles, jamais lobées ni dentées. Les nervures sont souvent de type penninerve à angle variable et l'indument est constitué de poils simples, parfois de poils étoilés (genres *Uvaria*, *Enantia* et *Pachypodanthium*).

Fleurs

Les fleurs généralement solitaires ou regroupées en inflorescences (pauciflores ou grappes), peuvent être terminales, extra-axillaires ou oppositifoliées [Le Thomas A. 1980]. Elles sont en majorité hermaphrodites, à l'exception des espèces du genre *Uvariopsis*, aux fleurs unisexuées.

Toutes les pièces florales sont distinctes. La fleur présente un périanthe en trois cycles : (3S + (3+3) P). Ainsi, le calice est formé de trois sépales valvaires de petite taille libres ou partiellement unis. La corolle est constituée de six pétales regroupés en deux cycles alternes. L'androcée et le

gynécée sont caractéristiques des dicotylédones de type archaïque ($n \text{ St} + 1-n \text{ C}$) (Figure 1). Les étamines, très nombreuses, insérées en spirale autour des carpelles, sont le plus souvent libres. Ceux-ci sont le plus souvent indépendants (sous-famille des *Annoïdeae* à l'exception de la sous tribu des *Annonaneae*, tribu des *Unoneae*), parfois soudés (sous tribu des *Annonaneae*), plus rarement réunis en un ovaire uniloculaire à placentation pariétale (sous-famille des *Monodoroïdeae*) [Spichiger R. -E. 2004, Guignard J.-L. 2001, Le Thomas A. 1983].

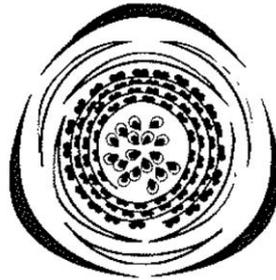


Figure 1 : Diagramme floral pour le genre *Annona*

Fruits

- les fruits des Annonaceae, dont l'organisation découle du degré d'évolution du gynécée, permettent une séparation des genres (Figure 2).
- les fruits apocarpiques proviennent de carpelles libres et sont le type le plus fréquent et le plus primitif. Ils sont formés de monocarpes sessiles (genre *Duguetia*) ou stipités (genres *Uvaria*, *Cananga*,...);
- les fruits pseudosyncarpiques, résultent de la juxtaposition des carpelles avec le thalamus. Ce type est caractéristique de la sous tribu des Annonanèeae (genres *Annona*, *Rollinia*...);
- les fruits parasyncarpiques (ou syncarpiques vrais) ont pour origine la fusion des carpelles en un ovaire uniloculaire pluriséminé. Le fruit se présente sous la forme d'une masse charnue homogène. Ce type, le plus évolué rencontré chez les Annonaceae, caractérise la sous famille des Monodoroïdeae (genres *Monodora* et *Isolona*) [Hutchinson J. 1964].

Fruits apocarpiques
(ex : *Cananga odorata*)



Fruits pseudosyncarpiques
(ex : *Annona squamosa*)



Fruits parasyncarpiques
(ex : *Isolona madagascariensis*):



Figure 2 : Exemples de différents fruits d'Annonaceae

Graines

Les graines des Annonaceae, souvent lisses, à tégument dur et luisant, présentent un embryon de petite taille au centre d'un albumen ruminé. Ce caractère, ainsi que l'absence de stipule de la feuille, constituent des critères de différenciation au sein des Magnoliales [Guignard.J.-L. 2001, Walker J.W. 1971]

1.3 Classification

L'importante homogénéité de la famille des Annonaceae rend sa classification interne difficile, ce qui explique les divergences entre botanistes au niveau des tribus et de leurs subdivisions. Les différentes classifications proposées sont basées sur des données morphologiques florales [Fries R.E. 1959, Hutchinson J. 1964] et sur des observations palynologiques ainsi que phytogéographiques [Le Thomas A. 1983, Walker J.-L. 1971].

Tous les auteurs admettent la division des Annonaceae en deux sous-familles évoquées précédemment, suivant le degré d'évolution du gynécée :

- la sous-famille des *Annonoideae* (120 genres) : carpelles libres accolés dans la fleur et dans le fruit, avec ovules insérés latéralement à la soudure carpellaire, en un ou plusieurs rangs.

- la sous-famille des *Monodoroideae* (2 genres : *Monodora* et *Isolona*) : carpelles soudés en un ovaire uniloculaire avec placentation pariétale des ovules, conduisant à un fruit parasyncarpique.

Des études récentes par phylogénie moléculaire ont validé cette classification [Couvreur T.L., 2008].

Les divergences entre botanistes ont lieu au sujet des niveaux des tribus de la sous-famille des Annonoideae, comportant la majorité des genres et espèces. La classification est basée essentiellement sur la préfloraison des pétales, leur forme et leur taille.

Hutchinson [1964] divise cette sous famille en trois tribus : *Uvarieae* (36 genres), *Miliuseae* (11 genres), *Unoneae* (2 sous-tribus, 271 genres).

Pour sa part, Fries [1959] subdivise les Annonaceae en trois tribus : les *Uvarieae*, *Unoneae* et les *Tetramerantheae*.

Enfin, Walker [1971] a proposé une classification « informelle », fondée essentiellement sur les caractères morphologiques du pollen, et sur des données phytogéographiques, le degré d'évolution du fruit et la morphologie florale. Elle est subdivisée en 3 sous-familles : *Malmeae* (3 tribus comprenant 78 genres et 1944 espèces), *Fuseae* (10 genres, 310 espèces) ; *Annona* (4 tribus, 19 genres, 311 espèces, dont 198 pour les 4 genres de la tribu *Annona*).

1.4 Utilisations des Annonaceae

La famille des Annonaceae présente une importance économique car elle constitue une source de plantes à fruits comestibles avec principalement le genre *Annona*, dont il sera question dans cette thèse. Ses espèces sont cultivées et des produits alimentaires dérivés existent. L'un des fruits très consommés aux États-Unis de ce genre est *Asimina triloba* (*Paw Paw*). Cet aspect étant discuté plus loin (chapitre 1 partie 2.1 et 2.2),

Certaines espèces à fleurs odorantes trouvent un emploi en parfumerie et en cosmétologie (*Cananga odorata* ou « Ylang Ylang »). Les graines constituent parfois des condiments (*Xylopiya aethiopica*, « poivre d'Ethiopie ») [Lebœuf M. 1982a].

Les Annonaceae sont aussi employées en médecine traditionnelle dans des indications très variées. Par exemple au Sénégal, les écorces de tiges d'*Annona senegalensis* sont utilisées, entre autres, en traitement des pneumonies, des diarrhées, des blennorragies... [Magassouba F.B., 2007].

Depuis quelques années, la commercialisation de produits dérivés des annonnes se développe en Occident; dans les magasins alimentaires ou *via* internet sous forme de jus, et d'autres produits dérivés (voir chapitre 4 partie 5). Des compléments alimentaires sont également disponibles, notamment en Amérique du Sud et aux États-Unis.

1.5 Composition chimique

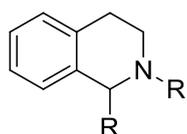
Du point de vue chimiotaxonomique, les Annonaceae ont une composition conforme à leur statut de famille archaïque des angiospermes. Dans cette famille sont surtout retrouvées des molécules issues du métabolisme shikimique, avec la présence d'alcaloïdes benzyloisoquinoléiques. Des marqueurs chimiotaxonomiques spécifiques de cette famille sont le polycarpol ou des dérivés polyacétiques particuliers : les acétogénines.

Vu l'étendue des études sur cette famille, nous nous limiterons à présenter brièvement les principales classes de métabolites secondaires (alcaloïdiques et non alcaloïdiques). Nous insisterons sur la classe des molécules ayant fait l'objet de cette thèse : les acétogénines.

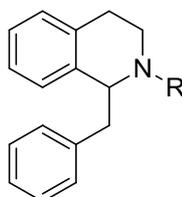
1.5.1 Alcaloïdes

La majorité des alcaloïdes isolés dérive du noyau tétra-hydro-isoquinoléique qui est généralement benzylé. Ces alcaloïdes sont présents dans tous les organes de ces plantes. En général, ils se répartissent entre les groupes structuraux suivants (Figure 3) :

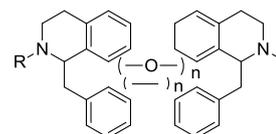
Tétrahydroisoquinoléines simples



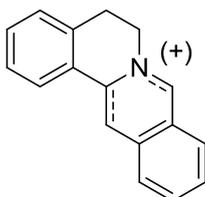
Benzyl- tétrahydroisoquinoléines



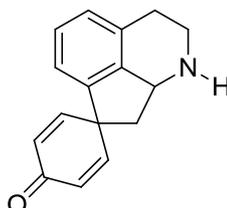
Bis-benzyl- tétrahydroquinoléines



Protoberbérines et tétrahydroprotoberbérines



Proaporphines



Aporphines

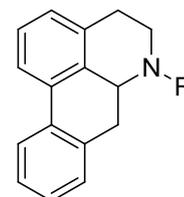


Figure 3 : Différents noyaux alcaloïdiques rencontrés chez les Annonaceae

Le groupe le plus important est constitué par les aporphinoïdes : ceux qui possèdent le noyau aporphine (aporphine *sensu stricto*) et ceux qui sont dérivés directement (déhydroaporphines, oxoaporphines, aminoéthylphénanthrènes....). Les activités de ces alcaloïdes et leur probable implication dans l'apparition de syndromes parkinsoniens seront présentées dans le chapitre 2.

Quelques alcaloïdes sont également décrits comme les alcaloïdes indoliques et pyrimidylcarbologiques [Lebœuf M., 1982b].

1.5.2 Acétogénines

Les acétogénines des Annonaceae (ACGs) constituent une classe de produits naturels d'origine polyacétique, à part entière et spécifique de la famille des Annonaceae¹. La première acétogénine, l'uvaricine, a été isolée en 1982, par Jolad *et al.*, des racines d'*Uvaria acuminata* (Figure 4) [Jolad S.D. 1982].

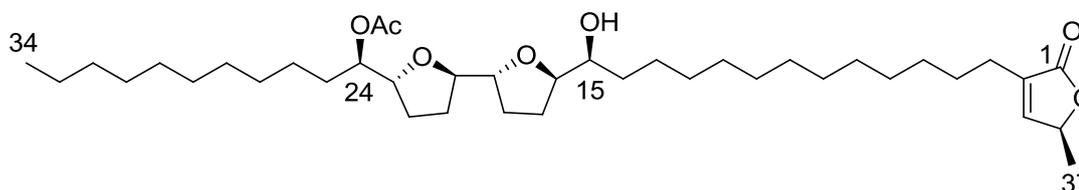


Figure 4 : Uvaricine

Pendant trente ans, l'engouement pour cette famille a été assez fort, en raison de leur propriétés biologiques cytotoxiques, antiparasitaires, pesticides, antimicrobiennes. Ainsi, le nombre d'acétogénines isolées est d'environ 450 [Bermejo A. 2005, Liaw C.-C. 2010]. Depuis une dizaine d'années, les études biologiques se sont centrées principalement sur deux problématiques en opposition : la grande activité cytotoxique aux applications potentielles en cancérologie [Liaw C.-C. 2010, Mc Laughlin J.L. 2008] et l'implication de ces molécules dans des parkinsonismes atypiques. Ces propriétés biologiques et le mécanisme d'action de ces composés seront développés dans le chapitre suivant.

Structure.

Les acétogénines comportent généralement 35 ou 37 atomes de carbone. Leur squelette commun est constitué d'une γ -méthyl- γ -lactone α,β -saturée ou insaturée, éventuellement hydroxylée, substituée en position 2 par une longue chaîne alkyle de 32 ou 34 atomes de carbone. Celle-ci peut porter 1, 2 ou 3 cycles tétrahydrofuraniques (THF), des hydroxyles libres ou acétylés, des cétones, des doubles liaisons ou des époxydes. Plusieurs de ces groupements peuvent être présents simultanément sur une molécule (Figure 5).

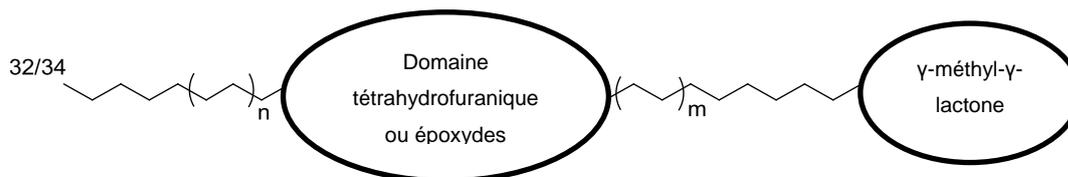


Figure 5 : Structure générale des acétogénines

¹ Une publication montre que certaines ACGs ont été retrouvées au sein de la famille des Vitaceae [Pettit G. R. 2008]

Classification

Deux classifications sont utilisées actuellement. La première est classiquement employée par les auteurs français, américains et asiatiques [Cavé A., 1997]. La seconde, proposée par Zafra-Polo et al. en 1998, plus précise et plus raffinée bien que moins pratique, tient compte des ACGs nouvellement isolées. Ces deux classifications sont définies sur la base de l'agencement du domaine tétrahydrofuranique ou époxydique. Les ACGs mono-THF (Tableau 1), bis-THF adjacents ou non adjacents (Tableau 2, Tableau 3), tri-THF, des ACGs (rares, avec seulement 2 ACGs isolées) (Tableau 4).

* Classification de Cavé et al. [Cavé A. 1997]

** Classification de Zafra-Polo et al. 1998 enrichie par Bermejo et al. [Bermejo A. 2005].

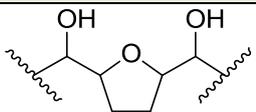
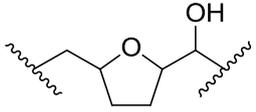
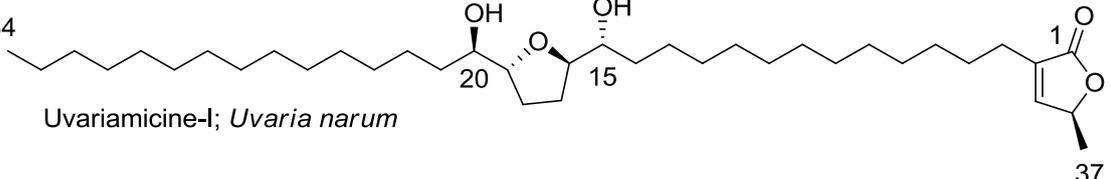
Type A* : Mono THF (α , α' -dihydroxylé ou α -hydroxylé)		
T-A**	Mono THF α , α' -dihydroxylé	
T-B**	Mono THF α -hydroxylé	
<p>34  37</p> <p>Uvariamicine-I; <i>Uvaria narum</i></p>		

Tableau 1 : ACGs à Mono-THF

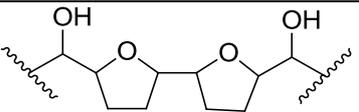
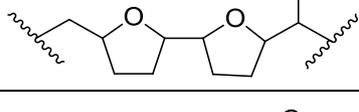
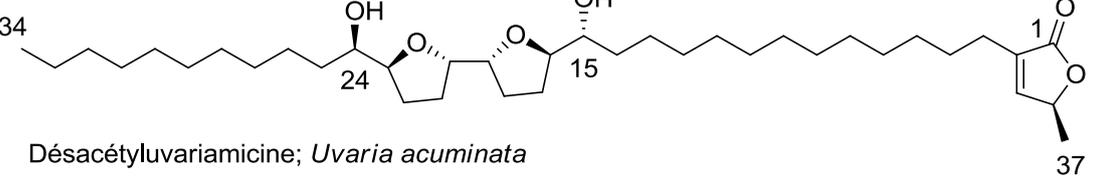
Type B* : Bis-THF à cycles adjacents		
T-C**	Bis-THF adjacent α - α' -dihydroxylés	
T-E**	Bis-THF adjacents hydroxylé en α'	
<p>34  37</p> <p>Désacétyluvariamicine; <i>Uvaria acuminata</i></p>		

Tableau 2 : ACGs à Bis-THF

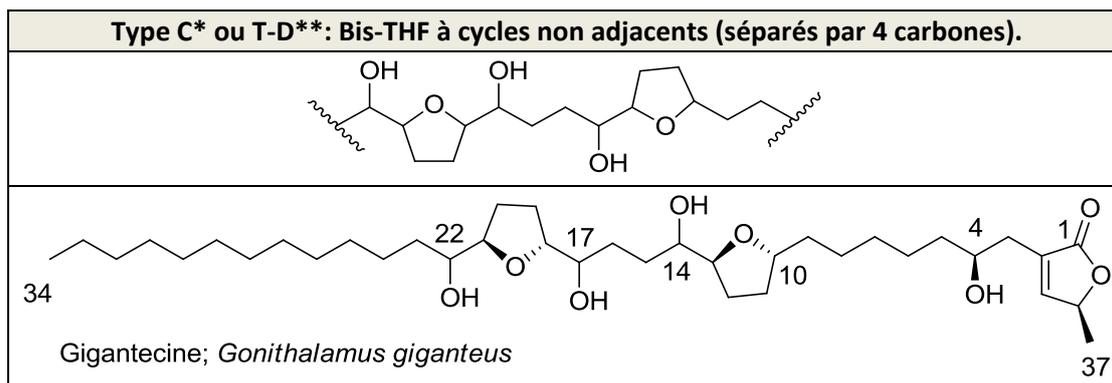


Tableau 3 : ACGs Bis-THF non adjacents

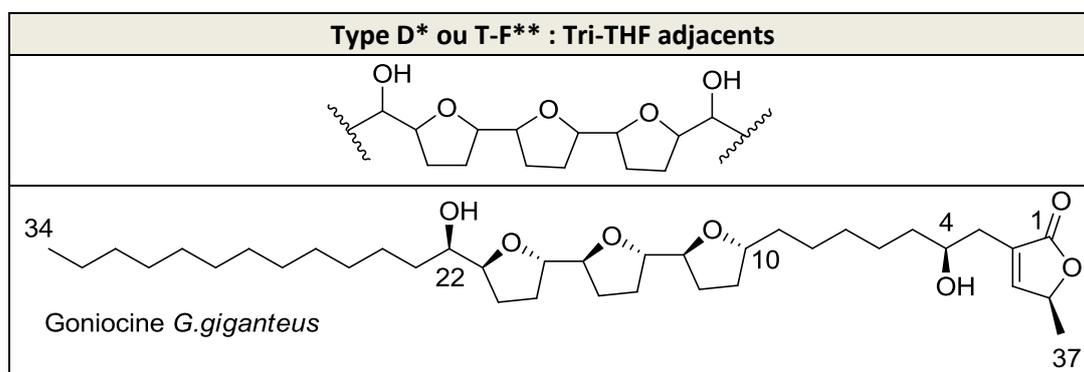


Tableau 4 : ACGs Tri-THF

Deux nouveaux types ont été ajoutés à cette classification initiale [Bermejo A. 2005] regroupant les ACGs ayant un noyau tétrahydropyranique (THP) d'une part, (Tableau 5) et les ACGs Bis-THF à noyau non adjacent porteur d'une cétone d'autre part (Tableau 6).

Type T-G** : Noyau THP		
T-G.1**	Mono-THP α -hydroxylé non-adjacent à un THF α' -hydroxylé	
T-G.2**	Mono-THP α -hydroxylé adjacent à un THF	
T-G.3**	mono-THP	
<p>Pyranicine; <i>Goniiothalamus giganteus</i></p>		

Tableau 5 : ACGs à noyau THP

T-H** : Bis-THF non adjacents avec cétone entre les deux noyaux THF
<p>Aromine-A; <i>Xylopiia aromatica</i></p>

Tableau 6 : ACGs originales

Enfin, les ACGs de type E ne comportent aucun THF, mais des époxydes, des hydroxyles et/ou des doubles liaisons. Les ACGs de cette dernière classe sont considérés comme les précurseurs biogénétiques des ACGs appartenant aux types précédents. Le type E-A est très rare, il n'y a que deux ACGs référencées [Melot A. 2009].

Type E* : Sans THF : groupement hydroxyle, double liaison et/ou époxydes		
E- A**	Mono-époxyde avec double liaison (espacés de 4 carbones)	
E- B**	Bis-époxyde (espacés de 4 carbones)	
E- C**	Tris-époxyde (espacés de 4 carbones)	
	Aliphatique hydroxyle et/ou double liaison	
32	Epoxydurin-A <i>A.muricata</i>	
32	Chatenaytrienines-2 <i>A.muricata</i>	

Tableau 7 : ACGs sans THF

Les ACGs sont également réparties en sous-types, selon la nature du cycle lactonique (Tableau 8).

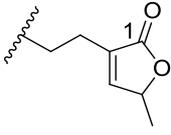
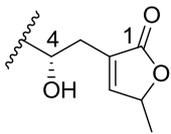
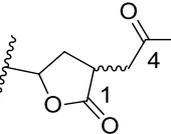
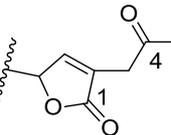
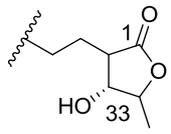
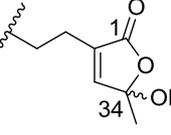
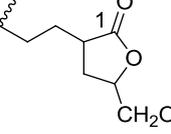
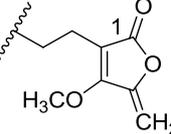
sous-type 1a* ou L-A 1a**	γ -méthyl- γ -lactone- α,β -insaturée	
sous-type 1b* ou L-A 1b**	γ -méthyl- γ -lactone α, β -insaturée et hydroxyle en β du noyau lactonique (position C-4)	
sous-type 2* ou L-B1** « isoacétogénines »	γ -lactone saturée substituée par un groupement propanone ²	
L-B2** « isoacétogénines »	γ -lactone α, β -insaturée substituée par un groupement propanone	
sous-type 3* ou L-C**	γ -méthyl- γ -lactone saturée hydroxyle en position β	
L-D**	α -acétonyl- γ -lactone α,β -insaturée	
L-E**	γ -hydroxyméthyl- γ -lactone saturée	
L-F**	β -méthoxy- γ -méthylène- γ -lactone α,β insaturée	

Tableau 8 : Sous-types de lactones

² Les isoacétogénines ont généralement été considérées comme des artefacts obtenus après extraction et purification et formés à partir du sous-type 1b [Duret P. 1997].

Depuis quelques années au vu du nombre d'acétogénines extraites, les recherches ont été dirigées sur la recherche d'acétogénines originales.

Quelques ACGs atypiques sont décrites :

- des ACGs à mono-THF à squelette C33 telles que la muricine-D et la muricine-E isolée d'*A. muricata* [Chang F.-R. 2001].

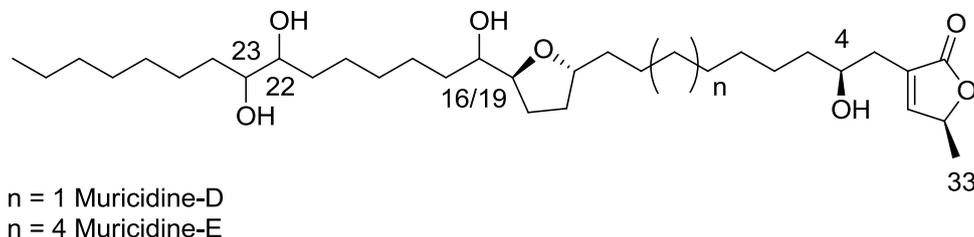


Figure 6 : Acétogénines en C33

- deux ACGs bis-lactoniques en C22. Ces dernières sont composées de fragments terminaux de lactones courtes dépourvues de noyau THF: la rollicosine isolée de *R. mucosa* et la squamostolide isolée d'*A. squamosa* (Figure 7).

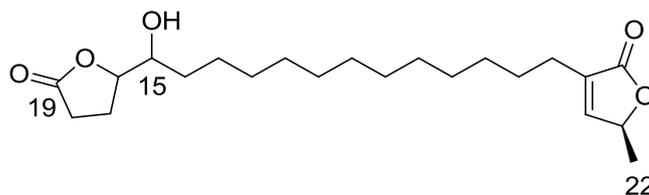


Figure 7 : Rollicosine *R. mucosa*

Enfin, il existe deux ACGs estérifiées par des acides gras isolées des graines d'*A. muricata* : le palmitoyle et l'oleyle [Gleye C. 1998a] (Figure 8).

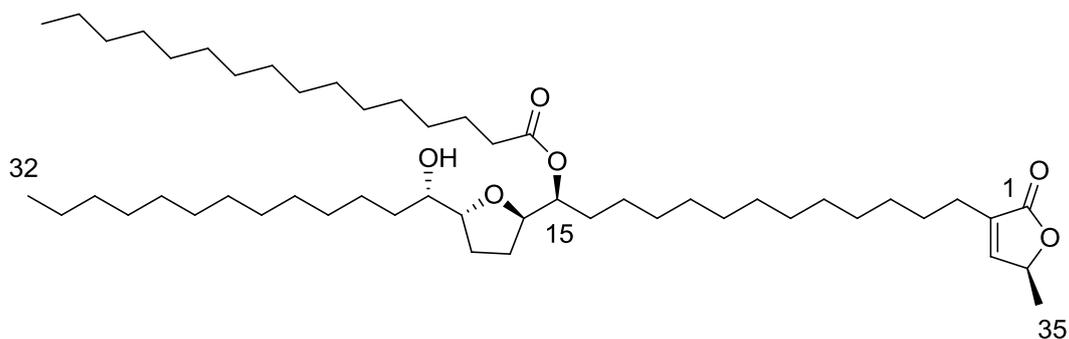


Figure 8 : 15-palmitoylsolamine

1.5.3 Autres métabolites secondaires

1.5.3.1 Terpènes

Huiles essentielles

Les Annonaceae sont des plantes aromatiques dont les huiles essentielles sont habituellement constituées de monoterpènes et de sesquiterpènes. Par exemple, les huiles essentielles des graines des feuilles et des péricarpes d'*A. squamosa* contiennent toutes l' α -pinène et selon l'organe du limonène, du β -caryophyllène, [Lebœuf M. 1982a]. De même, on retrouve le β -caryophyllène pour constituant majoritaire de l'huile essentielle de feuilles d'*A. muricata* [Fekam Boyom F. 1996] (Figure 9, Figure 10, Figure 11).

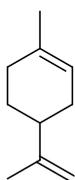


Figure 9 : Limonène

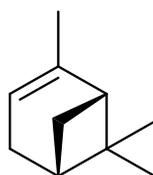


Figure 10: α -Pinène

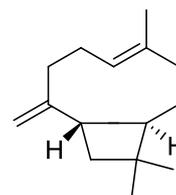


Figure 11 : Caryophyllène

Diterpènes

Les diterpènes sont fréquents et abondants dans le *genre Annona*. Souvent, ils possèdent un noyau de type kaurane, comme l'acide kaurénoïque (acide *ent*-kaur-16-èn-19-oïque) (Figure 12) isolé des graines d'*Annona squamosa*, ou d'*Annona cherimolia*, possédant une activité cytotoxique [Costa-Lotufo L.V. 2002]. Des hypothèses d'une application de cette molécule dans la neurotoxicité ont été infirmées par des études *in vitro* sur des cellules embryonnaires striatales de rats [Guillopé R. 2011].

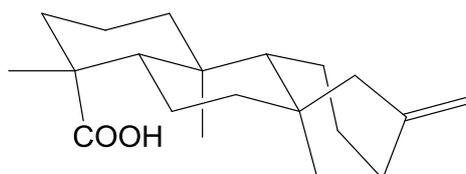


Figure 12 : Acide kaurénoïque

Triterpènes

Le β -sitostérol et le polycarpol sont les triterpènes les plus fréquents chez les Annonaceae (Figure 13 ; Figure 14).

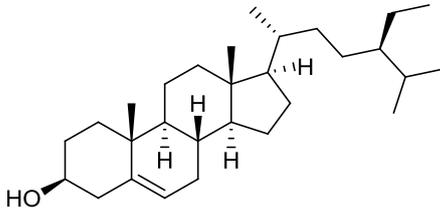


Figure 13 : β -sitostérol

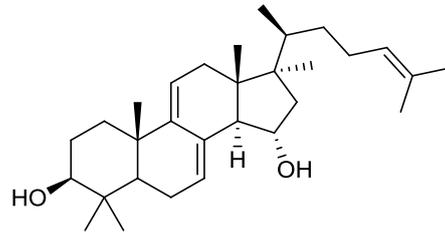


Figure 14 : Polycarpol

1.5.3.2 Composés polyphénoliques

La présence de tanins est mentionnée dans la famille. Chez *A. muricata*, elle expliquerait leur utilisation en médecine traditionnelle pour leurs propriétés astringentes, antidiarrhéiques, cicatrisantes et antihémorragiques [Lebœuf M. 1982a ; Descourtiz E. 1977 ; Cabre H. 1939].

1.5.3.3 Composés divers

Des hétérosides cyanogènes ont été isolés des feuilles d'Annonaceae, comme chez *A. muricata*. Cependant, aucune intoxication aiguë n'a été rapportée pour cette plante, ce qui conférerait une non toxicité à ces drogues par absorption orale.

Une caractéristique du genre *Annona* est la présence de cyclopeptides dans les graines d'*A. muricata*, *A. cherimolia*.

Enfin, des lignanes ont été isolés des Annonaceae. La plupart sont de type furofurannique, comme le syringarésinol (Figure 15).

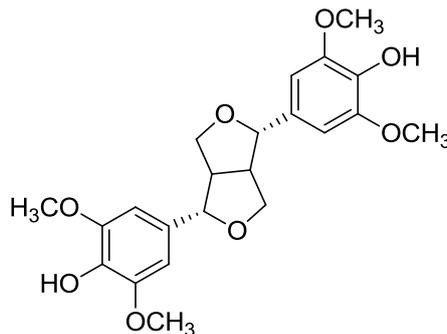


Figure 15 : Syringarésinol

2. Description du genre et des espèces étudiées

Le genre *Annona* est l'un des plus riches en espèces avec 118 espèces connues dont 108 originaires d'Amérique tropicale et 10 d'Afrique tropicale et de Madagascar. Ses caractéristiques botaniques sont homogènes ; les fruits sont pseudosyncarpiques charnus, permettant de les classer dans la sous famille des Annonoïdeae. Ce genre est connu en raison de ses espèces cultivées pour leurs fruits : *A. squamosa*, *A. muricata*, *A. cherimolia*, *A. montana*, *A. atemoya*. Compte tenu de leur importance en médecine traditionnelle et de leur consommation, deux espèces ont été étudiées au cours de ma thèse : *A. muricata* et *A. cherimolia*.

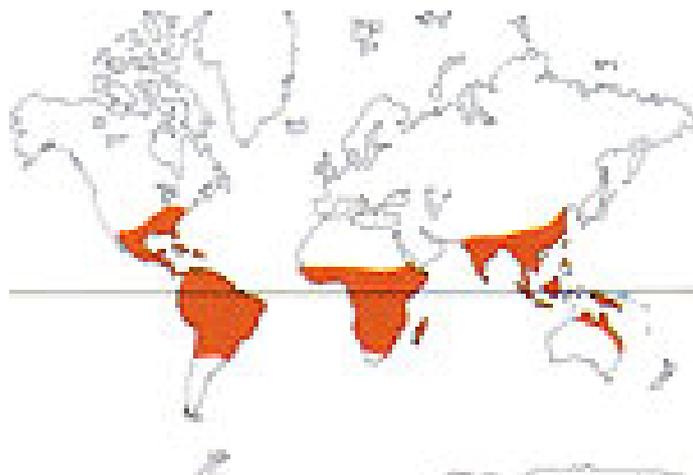


Figure 16 : Répartition du genre *Annona*

2.1 *Annona muricata* L.

2.1.1 Classification, distribution et description botanique

Classification (Fries 1959)

Famille :	Annonaceae
Sous famille :	Annoideae
Tribu :	Unoneae
Sous-tribu :	Annonideae
Genre :	<i>Annona</i>
Espèce :	<i>Annona muricata</i> L.

Distribution

Annona muricata L. (corossolier) est originaire du Nord de l'Amérique du Sud. Après l'arrivée des Espagnols en Amérique centrale, l'espèce a été disséminée à travers les tropiques. Aujourd'hui, le corossolier est très répandu, en zone subtropicale en Amérique du Nord, centrale et du Sud, au niveau des plaines africaines (Cameroun, Kenya, Gabon, Nigeria, Sénégal...), les îles du Pacifique et dans le Sud-Est asiatique.

Noms vernaculaires

Dans les pays francophones, *A. muricata* porte le nom de corossolier et est parfois appelé par le nom de son fruit : le corossol. Par ailleurs, le fruit est désigné par de nombreux noms comme cachémentier, corossol épineux, cachiman épineux, grand corossol, sapotille... Au vu de sa distribution étendue au niveau mondial, différents noms sont utilisés dans de nombreux pays pour définir l'arbre ou son fruit : soursop, prickly custard en anglais ; Guanabano, Guanabana en espagnol; ou Graviola en portugais.

Description botanique

Annona muricata est un arbuste persistant de 3 à 9 m de haut. Ses feuilles, oblongues à ovales, mesurent de 6 à 20 cm de long et de 2 à 6 cm de large, à la base arrondie à cunéiformes. Celles-ci sont alternes, épaisses, luisantes sur la face supérieure, glabres, plus ou moins acuminées. L'apex est aigu à obtus. Elles sont courtement pétiolées (Photo 1).



Photo 1 : Feuilles d'*Annona muricata*



Photo 2 : Fleur d'*Annona muricata*

Les fleurs, solitaires, d'un diamètre d'environ 4 cm, peuvent apparaître partout sur le tronc ou les branches. Elles sont de couleur jaunâtre, avec des sépales pétaloïdes charnus, les 3 pétales internes étant plus petits que les 3 pétales externes (Photo 2). Leur formule florale est présentée dans la Figure 1.

Le fruit est pseudosyncarpique, ovoïde ou réniforme. D'une longueur de 15 à 20 cm, voire 30 cm, et d'une largeur pouvant atteindre 15 cm, sa masse varie de 0,7 à 2 ou 3 kg selon les variétés. La peau, tendre, au goût amer, est hérissée d'épines souples. Sa couleur varie du vert sombre pour le fruit immature au jaune vert à maturité (Photo 3).



Photo 3 : Fruit d'*Annona muricata*



Photo 4 : Graine et pulpe d'*Annona muricata*

Le fruit peut se séparer en carpelles et l'endocarpe, blanc crème, a un aspect granuleux. Dans chaque carpelle fertile on trouve une graine noire ovale, aplatie, dure et lisse, mesurant de 1 à 2 cm de long. Un gros fruit peut contenir de quelques dizaines à 200 graines (Photo 4). À Puerto Rico les fruits sont classés en fonction de leur goût : doux, moyennement acide et acide [Badrie N. 2010].

2.1.2 Utilisation alimentaire, en médecine traditionnelle et en phytothérapie

Culture et utilisation alimentaire

Le Mexique est le principal fournisseur en corossol des États-Unis, suivi de la Colombie et de l'Équateur. En Asie du Sud-Est, comme au Viêt Nam la culture s'est largement développée. Néanmoins, ce fruit n'est pas la culture prioritaire de ces pays. En effet, la production et la vente de fruits ou de graines plus communs comme la goyave, la mangue ou la noix de cajou sont plus importantes. Le fruit est ainsi considéré comme une culture mineure (*minor crop*) pour la FAO (*Food and Agriculture Organization*). On remarquera la culture du fruit dans les Antilles française, en Nouvelle Calédonie, et dans une moindre mesure à la Réunion.

Dans les pays producteurs le corossol peut être mangé en l'état, pressé ou préparé en *milkshake* ou en glace. Il est parfois cuit comme un légume, frit, grillé ou cuisiné en soupe comme en Indonésie. Les fruits étant fragiles, leur exportation est limitée. Cependant, on observe une mondialisation de la vente de ce fruit sur les étalages du monde entier comme à Paris par exemple. En Amérique du sud, des boissons, des nectars, des glaces produits industriellement sont commercialisés et exportés.

D'autres produits dérivés moins communs, comme des extraits destinés à l'aromatisation de gâteaux, sont vendus en Afrique de l'Ouest et dans les Antilles, ainsi que du vin ou des liqueurs obtenus par fermentation.

Utilisation en médecine traditionnelle

Annona muricata est une plante utilisée de manière fréquente en médecine populaire. À cause de la grande toxicité des graines, leur utilisation se fait en usage externe, comme pellucide ou contre les dermatoses [Longuefosse J.-L., 1995]. L'infusion de feuilles est l'utilisation la plus courante, pour ses propriétés sédatives, astringentes, tonicardiaques, stomachiques et antidiarrhéiques. *Annona muricata* est fréquemment utilisé en association en infusion ou décoction. Par exemple, dans le nord de Madagascar, les tiges feuillées sont utilisées en décoction ou en inhalation en mélange avec différentes plantes tels que le lantanier (*Lantana camara* L.), l'eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) et le goyavier (*Psidium guajava* L.) contre la fièvre et la fatigue [Boyer A., 2009]

En Guadeloupe, les infusions d'*Annona muricata* sont parfois associées à des parties aériennes de la mille-fleurs (*Lantana camara* L.), pour les problèmes d'insomnies ou aux feuilles de Menthe (*Mentha* spp.) pour les gaz, ballonnements et flatulences. Buraud, lors de son enquête à La Désirade (Guadeloupe), comptabilise 54 % d'utilisateurs (infusion ou décoction) parmi les usagers de la médecine populaire. [Buraud M. 2010]. Le mode de préparation en décoction est de 15 feuilles par demi-litre d'eau alors qu'en infusion 6 feuilles par demi-litre d'eau sont utilisées, soit environ 4 feuilles pour une tasse. Les tisanes sont consommées de manière journalière ou hebdomadaire [Caparros-Lefèbvre D. 1999]. En Martinique, selon Longuefosse, il y a 68 % d'utilisateurs des feuilles comme sédatif parmi les informateurs dans la population générale en Martinique [Longuefosse J.-L. 1996].

En phytothérapie en Occident

Depuis quelques années le marché de la phytothérapie et des compléments alimentaires subit un accroissement vertigineux. De nombreux sites internet proposent des plantes pour la prévention et le traitement de diverses maladies.

Plusieurs sites Internet, en majorité aux États-Unis et en Amérique du Sud, commercialisent de tels produits d'Annonaceae principalement des poudres et des extraits de feuilles et d'écorces d'*A. muricata* et d'*As. triloba* pour le traitement ou la prévention des cancers. Le fort potentiel cytotoxique des ACGs est mis en avant [McLaughlin L. 2008] (<http://alternativecancer.us/pawpaw.htm>).

Cependant, ces produits n'ont pas été évalués par la FDA (*Food and Drug Administration*), selon la définition légale et n'ont pas le statut de médicament. En 2010, un export de différentes capsules et jus provenant du Pérou ont été interdits de vente par la FDA car ils avaient été vendus comme nouveau médicament.

L'étude sur un moteur de recherche *via* Internet permet de trouver de multiples sites proposant ce type de produits, souvent désignés par le nom portugais, Graviola.

2.1.3 Phytochimie d'*Annona muricata*

Les différents organes d'*Annona muricata* ont été abondamment étudiés. La composition chimique de la plante est complexe : plus de 200 métabolites primaires et secondaires ont été isolés à partir de différents organes. Parmi eux, les alcaloïdes et les ACGs d'Annonaceae qui nous intéresseront particulièrement au cours de cette thèse.

2.1.3.1 Alcaloïdes

Comme il a été précédemment décrit, la famille des Annonaceae du fait de son archaïsme contient surtout des alcaloïdes de type isoquinoléique, protoberberinique et aporphinoïque. Des études phytochimiques par isolement et par spectrométrie de masse ont permis d'identifier les alcaloïdes majoritaires d'*A.muricata*. Les différents alcaloïdes et leurs propriétés biologiques sont représentés dans les tableaux suivants (Figure 17 ; Figure 18 ; Figure 19). L'alcaloïde majoritaire des différents organes de la plante (écorce, feuilles, fruit) semble être la réticuline.

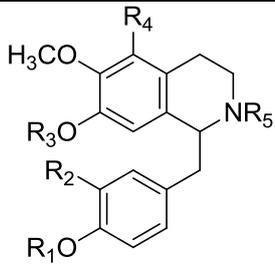
Benzyltétrahydroisoquinoléine		
Structure	Organe et dérivés	Propriétés pharmacologiques
 <p>R₁=R₃=CH₃; R₂=R₅=H; R₄= OH : anomuricine R₁=R₃=CH₃; R₂=R₅=H; R₄= OCH₃ : anomurine R₁=R₂=R₃= R₄=R₅=H : coclaurine R₁=R₂=R₃= R₄=H; R₅=CH₃ : N-méthyl-coclaurine R₁=R₅=CH₃; R₂=OH; R₃=R₄=H : réticuline</p>	<p>Écorces et tronc : anomuricine (0,5 %); anomurine (0,5%); réticuline (40 %) [Leboeuf M. 1982b]</p> <p>Feuilles : coclaurine (16-18 %) [Leboeuf M. 1981]; N-méthylcoclaurine (9,7 µg.g-1); réticuline (35-40 %) (0,9 µg.g-1)[Kotake Y. 2003] ; anomurine [Champy P. 2004b]</p> <p>Fruits : N-méthylcoclaurine (0,09 µg.g-1) [Kotake Y. 2003,2004], Réticuline, caclaurine [Champy P. 2004b]</p>	<p>Antagonistes dopaminergiques : anomuricine, anomurine, coclaurine réticuline [Banning J.W.1980, Watanabe H. 1981, 1983]</p> <p>Antibactérien; Antiagrégant plaquettaire, Spasmolytique, Dépresseur du système nerveux central... : réticuline</p>

Figure 17 : Benzyl-tétrahydroisoquinoléines isolées d'*Annona muricata*

% Alcaloïdes totaux

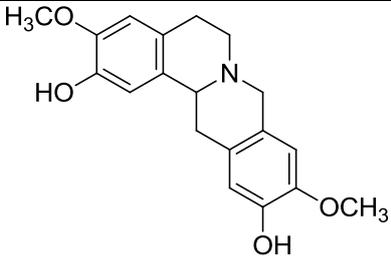
Tétrahydroprotoberbérine : Coreximine		
Structure	Organe	Propriétés pharmacologiques
	<p>Fruits : [Champy P. 2004b]³ Feuilles : [Champy P. 2004b]³ Écorces de racine et tronc : (10 %) [Leboeuf M. 1982]</p>	<p>Antihypertenseur [Leboeuf M. 1982b]</p>

Figure 18 : Tétrahydroprotoberbérine isolée d'*Annona muricata*

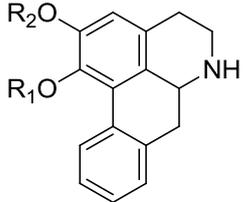
Aporphines		
Structure	Organe	Propriétés pharmacologiques
 <p>R₂,R₃= O₂CH₃ : annonaine</p> <p>R₂=OCH₃; R₃= OH : asimilobine</p> <p>R₂=R₃= OCH₃ : nornuciférine</p>	<p>Feuilles : [Champy P. 2004b]³ Fruits : [Hasrat J.A. 1997b]</p>	<p>Antifongique (<i>Candida albican</i>) : annonaine [Villar A. 1987]</p> <p>Sérotoninergiques (5HT1A) : annonaine, asimilobine, nornuciférine [Hasrat J.A. 1997a]</p>

Figure 19 : Aporphines isolées d'*Annona muricata*

³ Mise en évidence proposée sur la base d'une analyse MALDI-TOF de l'extrait brut, confirmé par E.Bony par CLHP-SM/SM au cours de son stage de master 2 au laboratoire.

2.1.3.2 Acétogénines

À ce jour 80 acétogénines ont été identifiées au sein d'*A.muricata*, on y retrouve 67 ACGs (74%) en C35 et 13 ACGs (26 %) en C37. La majorité des ACGs isolées sont monotétrahydrofuraniques de type 1b (Tableau 9). L'annonacine, acétogénine majoritaire de cette plante et modèle d'étude de cette thèse en est l'exemple (Figure 20) [Champy P. 2004b]. Les tableaux regroupant les différentes acétogénines isolées de cette plante sont proposés en annexes.

Type	Sous-type ACGs	C35	C37
E	1a	16 (17,8 %)	8 (7,5 %)
	1b	2 (2,2 %)	1 (1,1 %)
A	1a	7 (7,8 %)	5 (5,6 %)
	1b	50 (55,5)	1 (1,1 %)
B	1a	-	-
	1b	-	-
C	1a	-	-
	1b	-	1 (1,1 %)
Total		75 (74 %)	15 (26 %)

Tableau 9 : Recensement des acétogénines d'*Annona muricata*

Nb ACGs référencées (% par rapport aux ACGs totales)

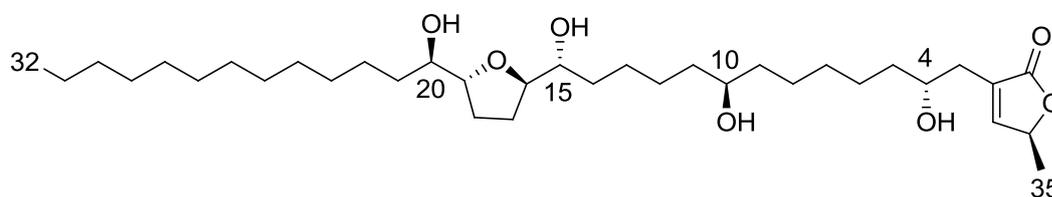


Figure 20 : Annonacine

Les propriétés biologiques des acétogénines seront vues au chapitre 2.

2.2 *Annona cherimolia* Mill.

2.2.1 Classification, distribution et description botanique

Classification (Fries 1959) :

Famille :	Annonaceae
Sous famille :	Annoïdeae
Tribu :	Unoneae
Sous-tribu :	Annonideae
Genre :	<i>Annona</i>
Espèce :	<i>Annona cherimolia</i>

Tableau 10: Classification d'*Annona cherimolia*

Distribution

Originaire d'Amérique du Sud, *Annona cherimolia* pousse à l'état sauvage dans les régions frontalières entre l'Équateur et le Pérou, à des hauteurs de 1400 à 2000 m au-dessus du niveau de la mer. Du fait de son fruit comestible, cette espèce est cultivée en Amérique équatoriale ou subtropicale (Équateur, Chili et Pérou) ainsi qu'en Europe, principalement au sud de l'Espagne. L'Espagne est le leader mondial de sa production, avec 3600 hectares cultivés en 2009, qui a rapporté 20 000 tonnes de fruits en 1991 [Guillopé R. 2011].

Noms vernaculaires

Le fruit d'*A.cherimolia* étant consommé et l'arbre étant cultivé au niveau mondial, différents noms sont répertoriés pour définir l'arbre ou son fruit en français : Chérimollier, Cachiman cœur de bœuf, corossol du Pérou en anglais : cherimoya et en portugais : Atemóia; Cherimóia.

Description botanique

Annona cherimolia est un arbre fruitier mesurant environ 3 à 7 m. Il possède des feuilles ovales simples et lancéolées de 8 à 15 cm de long et 4 à 7 cm de large, à limbe elliptique, à l'apex obtus à obtusément aigu au sommet, cunéiforme à subarrondi à la base, pubescent et laineux sur la face inférieure, glabrescent sur la face supérieure (Photo 5).



Photo 5 : Annona Cherimolia



Photo 6 : Fleur d'Annona cherimolia

Les fleurs solitaires ou par groupe de deux ou trois, sont extra-axillaires ou oppositifoliées. Les pétales externes longs de 1 à 2,5 cm sont linéaires et étroites, rouge à rouge verdâtre à l'extérieur et jaunâtre à blanc à l'intérieur. Les pétales internes sont rudimentaires (Photo 6).

Les carpelles sont unis dans un fruit ovoïde mesurant 20 cm de long et 15 cm de large, vert, avec de légères dépressions polygonales, et pesant parfois plus de 2 kg. Les graines brunes de 1 à 2 cm, sont noyées dans une pulpe blanche. L'organisation du fruit étant identique à celle d'*A. muricata*. (Photo 7).



Photo 7 : Fruit d'Annona cherimolia

2.2.2 Utilisations alimentaires et médicinales

Utilisation alimentaire

Le fruit d'*Annona cherimolia* comme le corossol est un fruit cultivé très consommé en Amérique du Sud et en Asie, mais aussi en Europe et tout particulièrement dans le sud de l'Espagne. Il peut être consommé en l'état. Comme le corossol, il est fragile et son exportation est difficile. Cependant, la production étant mondiale, on peut retrouver ce fruit assez couramment en Amérique et en Europe.

Les fruits peuvent être mis à fermenter ou à macérer pour obtenir des boissons alcoolisées. D'autres produits dérivés existent comme des glaces ou des confitures (Photo 8).

Les autres organes peuvent être utilisés à d'autres fins qu'alimentaire. En Jamaïque par exemple, où les fleurs séchées sont utilisées comme aromatisant pour le tabac à rouler.



Photo 8: Produits dérivés d'*Annona cherimolia*

Utilisation en médecine traditionnelle

Les utilisations médicinales semblent moins nombreuses que pour *Annona muricata*. Au Mexique, les graines sont pulvérisées et additionnées avec du lait ou de l'eau, permettant d'utiliser cette solution comme anti-émétique. Mélangé avec de la graisse, cette poudre est utilisée comme antiparasitaire. Une décoction du péricarpe est utilisée contre la pneumonie [Duret P. 1997].

2.2.3 Phytochimie d'*Annona cherimolia*

La composition chimique des graines et des fruits de l'espèce *Annona cherimolia* a été étudiée à diverses reprises, sans doute en raison de l'utilisation des graines en médecine populaire et de la consommation importante du fruit. Comme pour *A. muricata* les alcaloïdes et les ACGs d'Annonaceae nous intéressent particulièrement.

2.2.3.1 Alcaloïdes

La composition alcaloïdique d'*A. cherimolia* ressemble à la celle d'*A. muricata*. Il a été isolé environ une trentaine d'alcaloïdes isoquinoléiques, benzyltétrahydroprotoberberines et aporphinoïdes. On retrouve entre autre la réticuline, l'annonaine, l'isocoreximine [Lebœuf M. 1982a, Chulia S. 1995].

2.2.3.2 Acétogénines

À ce jour, seulement 18 acétogénines ont été identifiées au sein d'*A. cherimolia*. Les études phytochimiques des ACGs de cette plante ont été initiées plus tardivement que celle d'*A. muricata* et celles qui ont été publiées sont le plus souvent originales. On y retrouve 9 (50%) ACGs en C35 et 9 (50 %) ACGs en C37. La majorité des ACGs isolées sont de type mono-THF de sous-type 1b (Tableau 11). Les tableaux regroupant les différentes acétogénines isolées de cette plante sont proposés en annexes.

Type	Sous-type ACGs	C35	C37
A	1a	1 (5,6 %)	-
	1b	3 (16,7 %)	-
	3	1 (5,6 %)	-
B	1a	1 (5,6 %)	1 (5,6 %)
	1b	1 (5,6 %)	3
	3	1 (5,6 %)	1 (5,6 %)
C	1a	1 (5,6 %)	1 (5,6 %)
	1b	-	2 (11,1 %)
	3	-	1 (5,6 %)
	Total	9 (50 %)	9 (50 %)

Tableau 11 : Recensement des acétogénines d'*A. cherimolia*

Nb ACGs référencées (% par rapport aux ACGs totales)

Chapitre 2 : Consommation d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques

Dès 1999, le Docteur Dominique Capparos-Lefèbre chef de service de neurologie au CHU de Pointe à Pitre en Guadeloupe constatait que plus des deux tiers de ses patients parkinsoniens souffraient de parkinsonismes atypiques appelés maintenant parkinsonismes guadeloupéens [Capparos-Lefevbre D. 1999]. Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord définir les syndromes parkinsoniens et plus particulièrement les parkinsonismes guadeloupéens puis nous verrons dans une seconde partie quels travaux suggèrent que les acétogénines sont des neurotoxines environnementales.

1. Syndrome parkinsonien et parkinsonismes

1.1 Maladie de Parkinson idiopathique

1.1.1 Définition et historique

La maladie de Parkinson idiopathique est une pathologie neurodégénérative progressive décrite pour la première fois en 1817 par Sir James Parkinson [Parkinson J. 1817]. Cette maladie est décrite comme une maladie du vieillissement car les symptômes sont le plus souvent tardifs et touchent environ 1,5 % de la population âgée de plus de 65 ans. Néanmoins, 5 à 10 % des malades développent la maladie entre 30 et 55 ans. Elle affecte 0,1% de la population mondiale, son importance ne cesse de croître avec le vieillissement de la population des pays industrialisés, avec une incidence estimée de 20 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes. En France, environ 10 000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an [Richard D., 2006].

1.1.2 Physiopathologie

Cette maladie est causée par la destruction progressive des neurones dopaminergiques constituant la voie nigro-striée. Ces neurones prennent naissance dans la substance noire et projettent des axones dans le striatum (noyau caudé et putamen) formant ainsi le premier relais de la voie des ganglions de la base, qui assure le contrôle de la voie moteur extrapyramidale. Cette dégénérescence induit une déplétion en dopamine (DA) dans la voie nigro-striée (Figure 21). D'autres lésions neuronales : le système noradrénergique du locus coeruleus, le système cholinergique et des voies sérotoninergiques sont également sujets aux phénomènes dégénératifs. Une solution thérapeutique transitoire est apportée par supplémentation en dopamine, par administration de son précurseur, la L-DOPA.

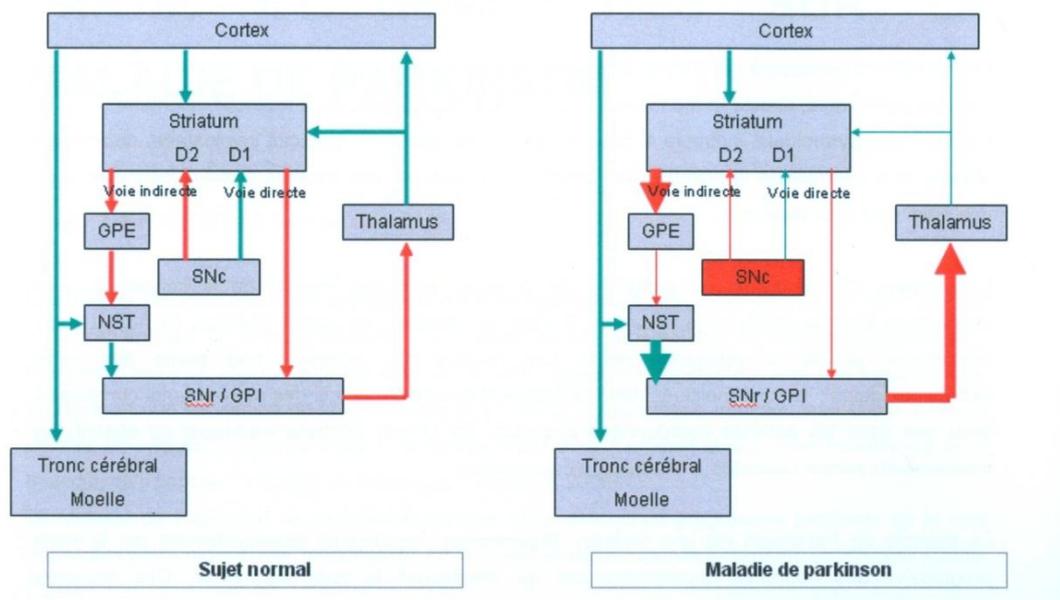


Figure 21 : Organisation fonctionnelle du circuit moteur des noyaux gris centraux pour un sujet sain et pour un parkinsonien [Leys 2004]

Rouge : GABA (inhibiteur), Vert : glutamate (excitateur), voies éfférentes de la SNc : dopamine, GPE : *globus pallidus* externe, GPI : *globus pallidus* interne, NST : noyau subthalamique, SNc : substance noire *pars compacta*, SNr : substance noire *pars reticulata*

Les lésions de la *pars compacta* de la substance noire va diminuer l'effet excitateur de la dopamine sur la voie directe inhibitrice (récepteurs D1) entre le striatum et le pallidum interne. L'activité du pallidum interne se retrouve renforcée. En parallèle, l'effet inhibiteur exercé par la dopamine, sur la voie directe (récepteurs D2) se retrouve diminuée. En conséquence, l'activité des neurones glutaminergiques sera augmentée. Cette hyperactivité, entraîne une inhibition tonique du thalamus moteur, la perte de l'activation normale des aires motrices corticales qui rend compte de la symptomatologie parkinsonienne.

La neurodégénérescence est lente et les premiers signes apparaissent lorsque environ 50 % du stock de neurones de la substance noire des patients ont subi l'apoptose. En fin de vie, l'apoptose touche environ 80% des neurones [Naoi M, 2004].

Histologiquement, la déplétion en neurones dopaminergiques se traduit par une pâleur de la substance noire. L'examen microscopique permet de mettre en évidence une autre anomalie : les corps de Lewy (Photo 9). Ce sont de petites inclusions éosinophiles de formes sphériques, à centre hyalin entourées d'un halo clair, situées à l'intérieur des neurones. Leurs composants majeurs seraient l' α -synucléine et l'ubiquitine.

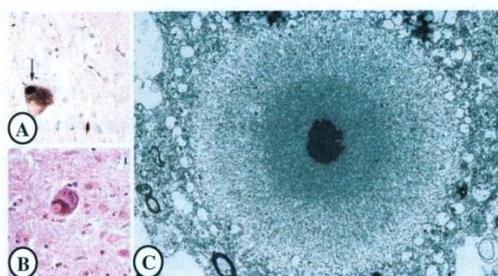


Photo 9 : Les corps de Lewy [Beal, 2001]

Corps de Lewy (A) Immunomarqué par un anticorps dirigé contre l' α -synucléine (B) marqué par l'éosine-hématoxyline (C) en microscopie électronique

1.1.3 Symptômes

Cette maladie se caractérise par une triade clinique [Houeto J.L., 2005] : akinésie, rigidité et tremblements de repos. Un quatrième élément est souvent retrouvé lors d'un examen clinique : l'instabilité posturale. Aux stades tardifs de la maladie, une dépression peut apparaître, ainsi qu'un ralentissement psychique intense, conduisant à une inertie comportementale.

1.1.3.1 Akinésie

L'akinésie est considérée comme le symptôme central permettant le diagnostic des parkinsonismes. Elle est caractérisée par une difficulté d'initiation du mouvement, une lenteur d'exécution (bradykinésie), une pauvreté (hypokinésie) et d'une diminution de l'amplitude (amimie : perte du ballant du bras) des mouvements. L'akinésie touche un membre ou un segment de membre. Certains auteurs considèrent que seule l'akinésie des membres supérieurs a une valeur diagnostique, car les troubles de la marche « d'allure parkinsonienne » témoigneraient d'un pseudo-syndrome parkinsonien. Au niveau des membres supérieurs, l'akinésie peut se traduire par une réduction de l'amplitude du balancement d'un bras à la marche, par une gêne à l'écriture avec réduction progressive de la taille des lettres (micrographie), ou par une gêne lors de l'exécution de gestes répétitifs. L'akinésie peut également s'exprimer à travers une fatigue précoce, une instabilité posturale, une mimique figée (hypomimie), ou une voix monotone et monocorde.

1.1.3.2 Rigidité

Lors des examens cliniques, comme lors d'un étirement passif, les muscles des membres offrent une résistance constante et tendent à garder la position qui leur a été donnée, cette résistance est appelée rigidité en « tuyau de plomb ». De plus, cette rigidité peut céder par à-coups, ce qui donne lieu à un phénomène appelé « roue dentée ». Ces phénomènes sont dus au non relâchement des muscles antagonistes au moment où les muscles agonistes se contractent. Cette rigidité ou hypertonie plastique est une augmentation du tonus musculaire de type extrapyramidal.

1.1.3.3 Tremblement de repos

Le tremblement de repos a été longtemps considéré comme emblématique de cette maladie. Dans 70 % des cas, c'est le symptôme initial chez les patients. Il sera initialement unilatéral ou très asymétrique, au niveau de la main ou du pied. La caractéristique principale de ce symptôme est qu'il s'atténue lors de l'exécution de mouvements volontaires. Les erreurs de diagnostic avec un syndrome parkinsonien atypique se situent le plus souvent dans cette dernière catégorie. En effet, le tremblement « classique » lent, de repos, de pronosupination ou d'émiettements à 4 à 6 Hz rencontré dans la maladie de Parkinson est un symptôme important pour le diagnostic alors que son absence ou la notion de tremblement atypique (irrégulier, myoclonique, d'action ou d'intention) va plutôt orienter vers le diagnostic de syndrome parkinsonien atypique [Tison F. 2006].

1.1.3.4 Instabilité posturale

L'instabilité posturale est peu sensible pour le diagnostic de la maladie de Parkinson car ce symptôme est tardif dans l'évolution de la maladie. Néanmoins, il peut avoir un intérêt certain pour le diagnostic de parkinsonisme atypique où il est précoce et très spécifique (Figure 22).



Figure 22 : Posture caractéristique d'un sujet Parkinsonien

1.1.3.5 Autres symptômes

Les signes cardinaux du syndrome parkinsonien peuvent être associés à d'autres symptômes apparaissant à des degrés variables au cours de l'évolution de la maladie ou même parfois au stade initial, entraînant progressivement une majoration du handicap fonctionnel [Leys D., 2004]. Ces signes peuvent être soit neurovégétatifs (hypersialorrhée, hypersécrétion sébacée, troubles vésico-sphinctériens, hypotension orthostatique), soit sensitifs (crampes, engourdissements), soit des troubles du sommeil et de la vigilance. La dépression est fréquente (40 % des cas) de même que l'anxiété. Le traitement dopaminergique peut provoquer chez certains patients des troubles compulsifs, des hallucinations mais aussi de véritables délires (en particulier paranoïaques). La survenue de ces complications peut être indicatrice d'une évolution de la maladie vers un état démentiel associé. Le risque de survenue de ces troubles psychiques augmente avec l'âge.

1.1.4 Étiologie [De Lau L.M., 2006]

10 % des cas de maladie de Parkinson sont des formes familiales. On dénombre actuellement 12 gènes responsables : de PARK 1 à PARK 11, et le gène NURR 1.

Cependant, les causes de cette maladie restent inconnues et semblent être d'origines multifactorielles (environnementales et génétiques).

Néanmoins, 90 % des cas de maladie de Parkinson correspondraient à des formes sporadiques d'origine inconnue pouvant être dues à une sensibilité génétique augmentant la susceptibilité à un facteur environnemental exogène.

Plusieurs pistes environnementales sont ainsi étudiées : exposition aux métaux lourds, aux pesticides (roténone) ou aux herbicides (paraquat). Ces deux derniers sont des molécules utilisées comme modèle chez les animaux de laboratoire pour induire un parkinsonisme. Certains d'entre eux sont connus pour être des inhibiteurs des complexes de la mitochondrie en particulier du complexe I. L'intervention de ces inhibiteurs dans la maladie de Parkinson sera développée dans la prochaine partie.

D'autres hypothèses proposent une vulnérabilité accrue des neurones dopaminergiques par rapport aux autres populations neuronales. Enfin, un troisième type d'hypothèses propose que les neurones dopaminergiques seraient soumis à des stimuli provenant d'autres cellules du système nerveux qui induiraient leur mort : ce sont les hypothèses d'excitotoxicité et d'inflammation.

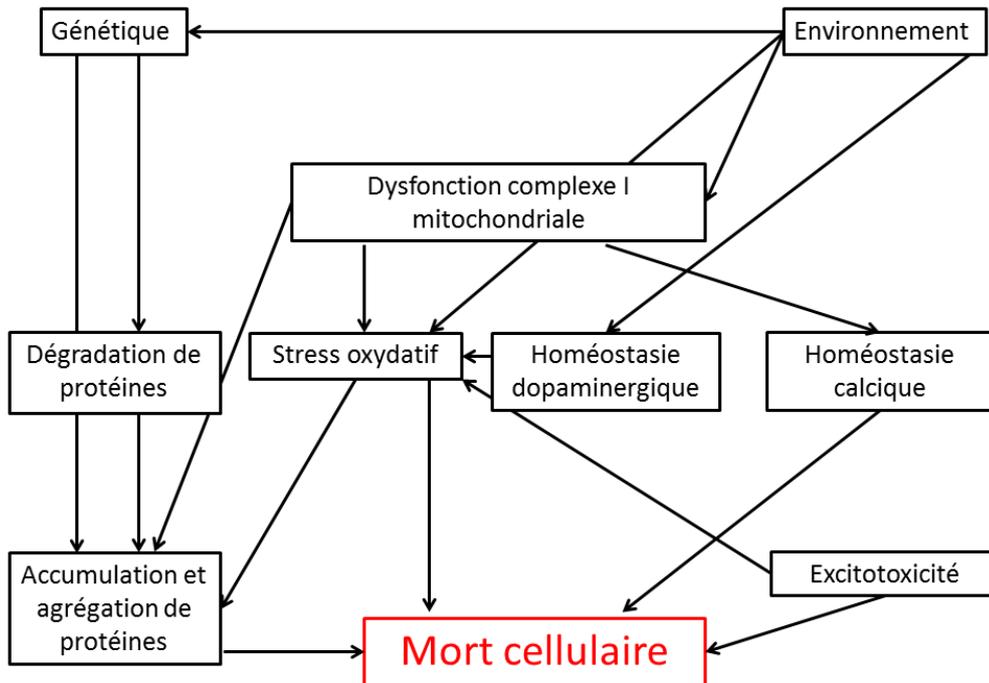


Figure 23 : Mécanisme de la maladie de Parkinson idiopathique [Brown T.P. 2006]

1.2. Parkinsonismes atypiques et parkinsonismes guadeloupéens

Le terme de parkinsonisme atypique (Parkinson « plus ») a été défini pour regrouper des syndromes parkinsoniens différant de la maladie de Parkinson par : leur sémiologie différentielle, leurs signes cliniques habituellement atypiques; la pauvreté ou l'absence de réponse au traitement habituel (Lévo-DOPA) et leur pronostic et survie plus défavorable [Tison F., 2006].

Le syndrome parkinsonien atypique peut se scinder en trois groupes en fonction de l'étiologie de la maladie. Les syndromes parkinsoniens héréditaires, les parkinsonismes secondaires dus à une cause extérieure identifiée et parfois curable (iatrogène, vasculaire, tumoral...) et les syndromes parkinsoniens primaires, sans cause identifiée. Ces syndromes primaires peuvent être divisés en deux groupes en fonction de la neuropathologie : les maladies à agrégation d' α -synucléine comme l'atrophie multisystématisée (MSA) ou la démence à corps de Lewy (DCL) et les tauopathies comme la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence cortico-basale (DCB) et les syndromes faisant l'objet de cette thèse : les syndromes parkinsoniens guadeloupéens (Figure 24) [Buée L. 2000.].

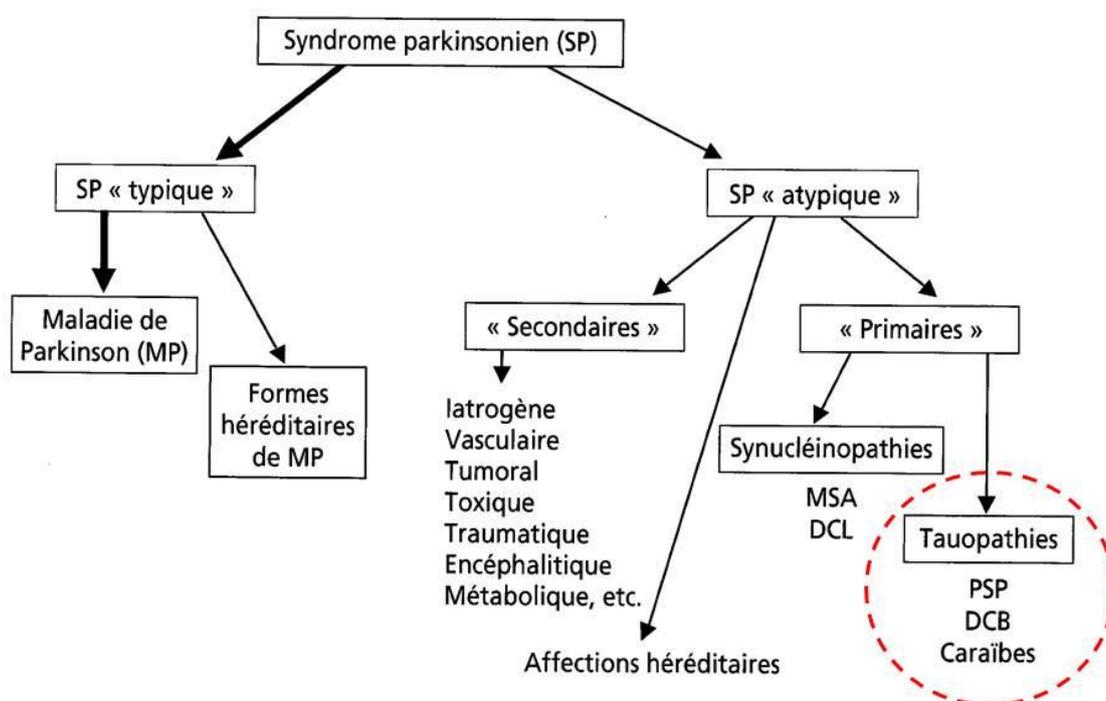


Figure 24: Classification des différents parkinsonismes

1.3 Parkinsonismes guadeloupéens

1.3.1 Épidémiologie

Comme il a été vu auparavant, le Docteur Dominique Caparros-Lefèbre constatait que plus des deux tiers de ses patients (65 pour 87 patients) présentaient des symptômes de parkinsonismes atypiques [Caparros-Lefèbre D., 1999]. Cette constatation était inattendue par rapport aux proportions en Occident (2/3 idiopathique; 1/3 atypique). Une seconde étude sur un plus grand nombre de patients pris en charge (265 patients) au Centre Hospitalo Universitaire de Pointe à Pitre a validé cette observation [Caparros-Lefèbre D., 2002], avec 5 types de parkinsonismes atypiques en proportions variables (Tableau 12).

Diagnostic	Nombre	%
Maladie de Parkinson idiopathique	57	22,5 %
Parkinsonisme atypique (avec résistance à la lévo-Dopa)	196	77,5 %
PSP	55	28,0 %
PSP sans paralysie oculaire	102	40,0 %
Démence avec maladie des corps de Lewy	28	14,0 %
Atrophie multi-systèmes	5	2,5 %
Dégénérescence cortico-basale (DCB)	6	3,0 %

Tableau 12 : Classification des patients parkinsoniens guadeloupéens [Caparros-Lefebvre D. 2002]

Pour établir des corrélations entre les patients et les possibles facteurs épidémiologiques et génétiques, il a été nécessaire de définir clairement les caractéristiques cliniques de ces symptômes. La poursuite de cette étude par le Dr. Lannuzel a permis de définir deux phénotypes dominants (Gd-PSP) et (Gd-PDC). Il s'agit de la classification actuellement reconnue [Lannuzel A., 2007].

Lors de cette étude 50 patients (31 %) répondaient aux critères diagnostiques pour la maladie de Parkinson, 3 (2 %) pour l'atrophie multi systémique avec parkinsonisme prédominant et 3 (2 %) pour la dégénérescence corticobasale (DCB). Les 104 patients restants (63%) avaient des formes atypiques de syndrome parkinsonien et pouvaient être divisés en deux groupes principaux. La moitié (n = 51) avait une paralysie supranucléaire progressive avec syndrome oculaire important (Gd-PSP). Un autre groupe de 50 patients avait des syndromes cliniques homogènes : une résistance à la lévo-Dopa et une démence sans problème oculomoteur. Ce groupe a été désigné comme complexe Parkinson-démence Guadeloupéen (Gd-PDC).

1.3.1.1 Paralysie supranucléaire progressive Guadeloupéenne (Gd-PSP)

Le diagnostic de Gd-PSP était retenu lorsque les patients présentaient les signes cardinaux de la PSP typique.

La PSP a été définie en 1964 par John C. Steele, J. Clifford Richardson et Jerzy Olszewski [Richardson J.C. 1963, Steele J.C. 1964]. Elle est probablement le syndrome parkinsonien neurodégénératif atypique le plus fréquemment rencontré et représenterait 5 à 10 % des syndromes parkinsoniens. Sa prévalence varie selon les études de 1,4 à 6,5 pour 100 000 personnes et son incidence de 0,3 à 1,1. L'âge moyen de début de la maladie varie entre 63 ans +/- 6 ans [Litvan I. 1992, Litvan I. 1996].

Selon Steele, la maladie toucherait plutôt les hommes avec un ratio de 2,4. Après diagnostic, l'évolution vers la mort est rapide, d'environ 4 ans [Steele J.C. 1972].

La PSP se définit du point de vue des syndromes parkinsoniens par l'absence ou la faible présence de tremblements de repos (15 % des malades), une rigidité symétrique et bilatérale et une résistance à la dopathérapie. L'hypertonie touche préférentiellement la partie supérieure du tronc et la musculature de la nuque avec un torticolis spasmodique dans 50% des cas (Figure 25). L'apparition de l'instabilité posturale (avec chutes vers l'arrière) est très précoce. L'aspect de la figure est caractéristique et est dit « reptilien », dû à l'amimie et au regard écarquillé et fixe occasionné par l'ophtalmoplégie et la disparition presque complète du clignement des paupières (Figure 26). L'aggravation des symptômes est sévère et assez rapide. Aucun traitement, pour l'instant, ne s'avère convaincant. Le décès est en général dû à une pneumonie.



Figure 25 : Dystonies nucale et dorsale



Figure 26 : Paralysie oculaire supranucléaire verticale

Dans la grande majorité des cas cependant, des différences phénotypiques significatives sont observées par rapport aux formes « classiques », définies selon des critères dits de NINDS-SPSP établis par la *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* et la *Society for PSP* en 1996.

Paralysie Supranucléaire Progressive Guadeloupéenne

Le diagnostic de Gd-PSP était retenu lorsque les patients avaient des symptômes débutants après 40 ans, un syndrome parkinsonien, de l'ophtalmoplégie et une instabilité posturale entraînant des chutes. Dans la grande majorité des cas (80%), il existe tout de même des différences phénotypiques par rapport à la PSP classique (myoclonie, hallucinations...) (Tableau 13).

Gd-PSP n= 51	
Principales caractéristiques cliniques	
Durée de la maladie	4,0 +/- 0,5 années
Réponse à la lévo-Dopa	
0-30 % n (% de patients)	49 (96)
30-50 % n (% de patients)	2 (4)
50 - 100 % n (% de patients)	0
Signes cliniques non Parkinsoniens	
Dysfonction oculomotrice	51 (100)
Dysfonction pyramidal	12 (23)
Incontinence urinaire	27 (53)
Symptômes psychiatriques	
Hallucination	30 (59)
Démence	47 (92)

Tableau 13 : Tableau diagnostique des Gd-PSP

Une dernière étude en électrophysiologie a été effectuée permettant de mieux différencier la Gd-PSP de la PSP-classique. Les patients examinés Gd-PSP (n = 9 patients) ont montré des myoclonies corticales et des déficiences corticales oculomotrices et peu de signes oculomoteurs du tronc cérébral. La fréquence des myoclonies pour les patients atteints de Gd-PSP pourrait être l'une des principales caractéristiques distinguant cette entité clinique des autres formes de PSP [Aparis E. 2008].

Néanmoins, les données d'anatomopathologie montrent que la Gd-PSP s'apparente à la PSP-classique. Une étude post-mortem sur cerveaux de 4 patients porteurs des signes « non classiques » (dystonie, hallucination...) a permis de valider cette hypothèse. En effet, l'étude histochimique en microscopie des coupes de cerveaux, malgré certaines particularités, a montré des critères diagnostiques de la PSP définie selon les critères de *Litvan et al.* [Litvan I. 1996]. La neurodégénérescence est étendue et hétérogène. Une perte des neurones dopaminergiques et d'autres populations neuronales au niveau du striatum, du noyau sous-thalamique, du cortex frontal et des dépôts de protéines Tau sont remarquables.

La PSP est classée dans les parkinsonismes à tauopathies. Ils sont représentés par l'accumulation pathologique de protéines Tau hyperphosphorylées au niveau des cellules du système nerveux central⁴ [Ludolph A.C. 2009]. Les cerveaux de 4 patients porteurs d'un syndrome

⁴ La protéine Tau intervient dans la stabilisation des microtubules. Une hyperphosphorylation diminue l'affinité de Tau pour les microtubules et déstabilise le cytosquelette.

parkinsonien de type PSP ont été analysés. Au niveau des coupes de la Gd-PSP, l'accumulation est nettement plus diffuse, on retrouve des inclusions fibrillaires tau-positives dans les prolongements neuronaux, notamment, au niveau du tegmentum (tronc cérébral) et intra-astrocytaires (Figure 27) [Tison F. 2006].

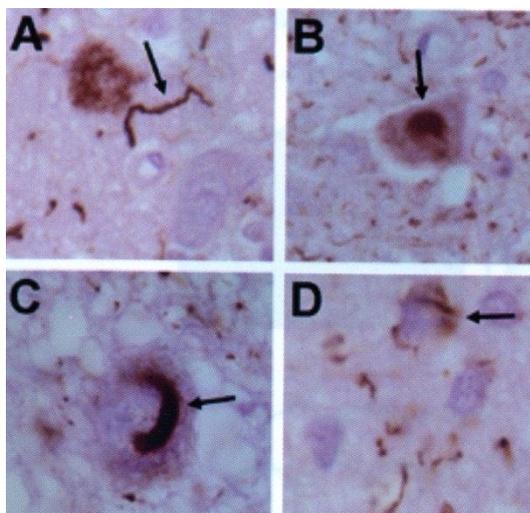


Figure 27 : Accumulation de protéine tau

(A) dans les prolongements neuronaux formant des fibres tortueuses au niveau d'un noyau du pont (B) dans le cytoplasme des neurones au niveau du noyau rouge formant des pré-dégénérescences neurofibrillaires (C) une neurodégénérescence au niveau du tegmentum (D) dans les astrocytes

Les isoformes de la protéine tau impliquées constituent une signature de la maladie et présentent un profil électrophorétique caractéristique, identique à celui de la PSP (doublet caractéristique tau 64 et tau 69, bande minoritaire à 74 kDa).

Ces études nous confirment donc que la Gd-PSP est une entité clinique à part entière s'approchant de la PSP classique.

1.3.1.2 Complexe Parkinson-démence (Gd-CPD)

Cette pathologie se présente comme une association de signes parkinsoniens avec une démence, sans trouble oculomoteur. Dans ce contexte, les patients répondent peu ou pas à la lévo-dopa. Les symptômes sont souvent asymétriques au stade initial de la maladie avec des tremblements au repos dans la moitié des cas et une akinésie, sans « *freezing* », dominante aux membres inférieurs. La présence d'hallucinations chez la moitié des patients fait évoquer le diagnostic de démence à corps de Lewy. Cependant, l'absence de données physiopathologiques et de signes radiologiques à l'IRM, non décrits dans la démence à corps de Lewy montre que ce rapprochement semble inopportun (Tableau 14 ; voir aussi Cohen De Cock V. 2007.).

Gd-CPD	
Principales caractéristiques cliniques	
Durée de la maladie	3,9 +/- 0,4 années
Réponse à la lévo-Dopa	
0-30 % n (% de patients)	49 (96)
30-50 % n (% de patients)	2 (4)
50 - 100 % n (% de patients)	5 (10)
Signes cliniques non parkinsoniens	
Dysfonction oculomotrice	0 (0)
Dysfonction pyramidal	9 (18)
Incontinence urinaire	25 (50)
Symptômes psychiatriques	
Hallucination	26 (52)
Démence	50 (100)

Tableau 14 : Critères diagnostiques de Gd-CPD

1.3.2 Imagerie cérébrale

L'imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) des formes guadeloupéennes Gd-PSP (n = 31) et Gd-CPD (n = 30) est sensiblement identique et montre une neurodégénérescence étendue. Dans les deux cas, une atrophie cérébrale est localisée dans les ganglions de la base et le tronc cérébral (noyaux participant aux mouvements oculaires). L'atrophie corticale est plus prononcée dans les lobes frontal et temporal des patients Gd-PSP et dans les lobes frontal et pariétal des patients Gd-PDC. Certaines aires corticales (cortex moteur primaire, cortex frontal) et le cervelet (noyau denté, cellules de Purkinje) sont également touchés. Cependant, il apparaîtrait que l'atrophie mésencéphalique serait plus prononcée pour les patients atteints de PSP et l'atrophie corticale pour les patients ayant le syndrome guadeloupéen, ce qui permettrait d'effectuer un diagnostic différentiel de cette maladie [Lehéricy L. 2010].

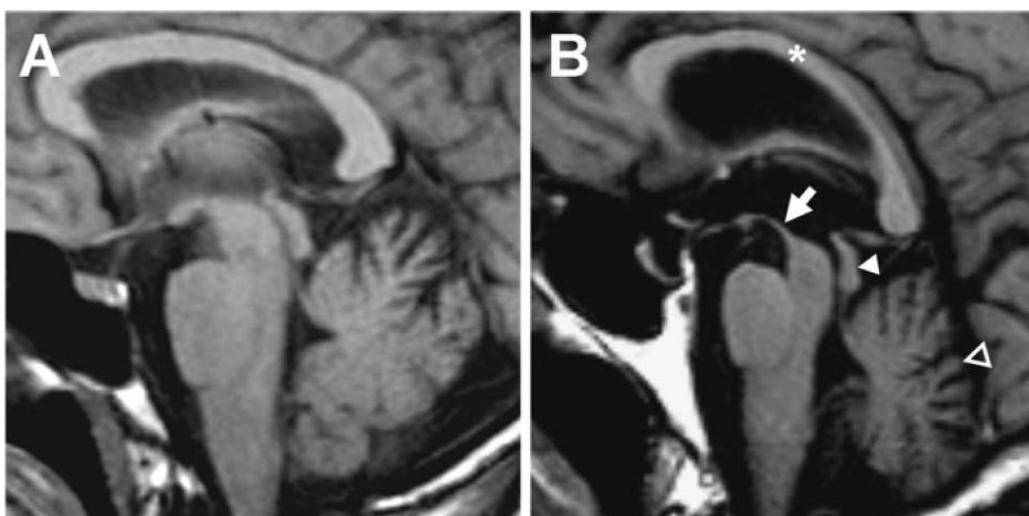


Figure 28 : Atrophie du mésencéphale chez un patient Gd-PSP IRM de patients (A) parkinsonien idiopathique (B) Gd-PSP [Lannuzel A. 2007]

→ Atrophie mésencéphalique sévère ; ▲ Atrophie du tectum ; ▽ Atrophie du cervelet ; * Atrophie du corps calleux.

2. Association entre syndromes parkinsoniens et consommation d'Annonaceae

Comme cela a été vu dans le paragraphe sur la maladie de Parkinson, l'étiologie des parkinsonismes n'est pas résolue et il semblerait que les causes de ces maladies soient d'origine multifactorielle. Lors des études du Dr. Caparros-Lefebvre, différentes hypothèses étiologiques ont été évaluées : des facteurs de prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux.

2.1 Facteurs génétiques mis en cause

D'après ces études, il n'y avait pas de différence significative entre le nombre de femmes et d'hommes atteints des syndromes parkinsoniens. De plus, même si la majorité des patients examinés étaient afro-caribéens ou métis, des individus d'origines indienne (15 %) et caucasienne (5 %) présentaient également des syndromes parkinsoniens atypiques. Enfin, aucune histoire familiale n'a été caractérisée pour la majorité des patients (Tableau 15). L'hypothèse de facteurs génétiques n'a pas été initialement privilégiée.

Groupe de patients	MP (n=50)	Gd-PSP (n = 51)	Gd-PDC (n = 50)	MSA (n = 3)	CBD (n = 3)	Non déterminé (n = 3)
Total de la cohorte %	31	32	31	2	2	2
Sexe ratio (M/F)	1,5 (30/20)	2,6 (37/14)	1,5 (30/20)	0 (0/3)	3 (3/0)	2 (2/1)
Age	65,8 +/- 1,7	73,9 +/- 1,2	73,2 +/- 1,2	66,0 +/- 3,5	73,0 +/- 1,7	59,6 +/- 6
Age d'apparition des symptômes	59,6 +/- 1,6	71,1 +/- 1,3	69,5 +/- 1,2	61,0 +/- 2,0	69,0 +/- 1,5	54,6 +/- 5,0
% Afro-Caribéen	48 (96)	48 (94)	47 (94)	1 (33)	3 (100)	0
% Indien	2 (4)	3 (6)	3 (6)	2 (67)	0	1 (30)
% Caucasien	0	0	0	0	0	2 (70)
Antécédents familiaux	11 (22)	3 (6)	4 (8)	0	0	0

Tableau 15 : Distribution et caractère démographique des patients à parkinsonismes atypiques [Capparos-Lefebvre D. 1999]

De récentes données génétiques au niveau du gène tau ont montré l'hypothèse qu'une altération moléculaire de ce gène pouvait provoquer une agrégation de la protéine. Le gène tau est caractérisé par la présence de multiples polymorphismes bi-alléliques dont deux haplotypes majeurs : H1 et H2. Certaines études ont montré que l'haplotype H1 à l'état homozygote augmente le risque de PSP d'un facteur 4 ou de démence fronto-temporale d'un facteur 2 [Higgins J.J.1998, Verpillat P. 2002].

Le gène tau a été analysé pour les 3 cas autopsiés de Gd-PSP et aucune mutation n'a été détectée. Les trois patients se sont révélés être tous trois porteurs du génotype H1-H1 [Baker M. 1999]. Étant donné le petit nombre d'individus étudiés, aucune conclusion ne peut être tirée de cette observation. Ces résultats incitent à poursuivre les investigations sur le gène tau afin de déterminer si les syndromes parkinsoniens atypiques de Guadeloupe sont associés à une sur représentation de l'haplotype H1 et si ce dernier est un facteur de prédisposition.

2.2. Facteurs environnementaux

2.2.1. Étude quantitative

Le Dr. Caparros-Lefebvre a mis en évidence un facteur étiologique environnemental : la consommation d'annonces. En effet, une association entre l'apparition des syndromes parkinsoniens atypiques et la consommation de fruits et de tisanes de ce genre a été mise en évidence lors de différentes études épidémiologiques. Comme cela a été précisé dans le chapitre 1, les feuilles d'*A. muricata* de cette plante sont souvent utilisées en médecine traditionnelle en infusion et le fruit est apprécié pour ses qualités nutritionnelles. La fréquence de la consommation de produits d'Annonaceae par les patients présentant des syndromes atypiques est en général journalière ou hebdomadaire.

L'étude la plus récente par le Dr. Lannuzel [Lannuzel A. 2007], sur un panel de 69 patients a confirmé cette hypothèse. Une comparaison entre des personnes saines contrôles ayant l'âge moyen de parkinsoniens idopathiques (C1) et atypiques (C2) respectivement de 63,1 et de 72,9 ans et des malades atteints de maladie de Parkinson (I-PD), de Gd-PSP et de Gd-PDC a été effectuée. La proportion de fort consommateur de produits d'*A. muricata* par les patients témoins et les malades de Parkinson est faible tandis que pour les patients Gd-PSP et Gd-PDC, ceux-ci sont nombreux (Figure 29).

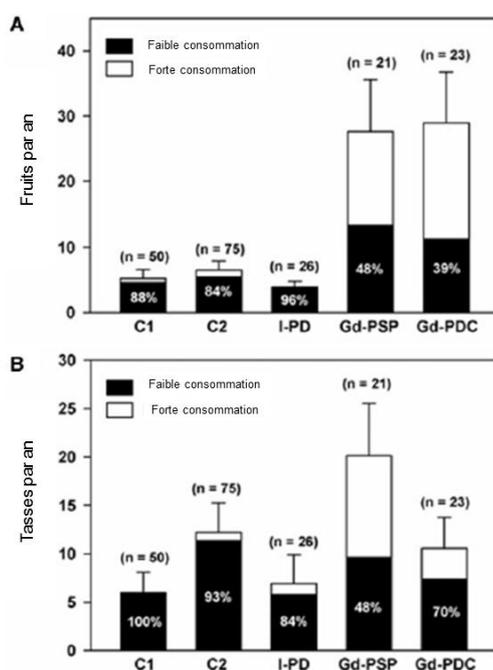


Figure 29 : Évaluation de la consommation d'*Annona muricata* chez des patients Guadeloupéens [Lannuzel A. 2007]

(A) Consommation du fruit ; (B) Consommation d'infusion C1 : Contrôle âge 63,1 C2 : Age contrôle 72,9 ans I-PD : Parkinson Idiopathique ; GD-PSP : Guadeloupéen PSP ; Gd-PDC : Complexe-Démence-Parkinson Guadeloupéen
Les barres représentent l'ensemble de la consommation cumulée exprimée en fruits par an ou en tasse par an. Les patients ont été séparés en faible ou fort consommateurs d'*A. muricata*.

De plus, le suivi des plus jeunes patients (40-50 ans) pendant 3 ans a montré une stabilisation ou une amélioration des symptômes (instabilité posturale) à l'arrêt de la consommation des fruits et des thés. Cet argument montrerait un lien entre la consommation d'Annonées et ces parkinsonismes atypiques.

En Guadeloupe, l'espèce la plus consommée est *Annona muricata*. Cependant, d'autres espèces pourraient avoir un lien avec l'apparition des syndromes en raison de leur abondance en zone rurale ou à l'état sauvage. Ces espèces sont aussi cultivées.

Voici une liste des autres espèces potentiellement impliquées :

Annona squamosa L.*

(pomme cannelle,
sweetsop, sugar apple)



Photo 10 : *Annona squamosa*

* explicitement cité par Capparos-Lefèbvre [Capparos-Lefèbvre D 1999, Bajin ba Ndob I., 2008.]°

Annona glabra L.

(mamen)



Photo 11: *Annona glabra*

Annona reticulata L.*

(cachiman, cœur de bœuf,
custard-apple)



Photo 12 : *Annona reticulata*

* explicitement cité par Capparos-Lefèbvre [Capparos-Lefèbvre D 1999]°

Annona montana Macfad.

(cachiman montagne)



Photo 13 : *Annona montana*

Annona cherimolia Mill.*

(cherimole, cherimolia)



Photo 14 : *Annona cherimolia*

Rollinia mucosa Baill.

(cachiman rhume, cachiman
morveux)



Photo 15 : *Rollinia mucosa*

2.2.2 Autres études évoquant un lien entre parkinsonisme et Annonaceae

Au cours des 60 dernières années, une prévalence anormalement élevée de parkinsonisme atypique a été signalée dans 5 régions géographiques différentes. La première étude a été décrite au niveau de l'île de Guam (1), puis en Nouvelle-Guinée (2), dans la péninsule de Kii (3), en Guadeloupe (4) en Nouvelle-Calédonie (5) et enfin, dans des communautés Afro-Caribéenne à Londres (6) [Capparos-Lefebvre D. 2005](Figure 30).

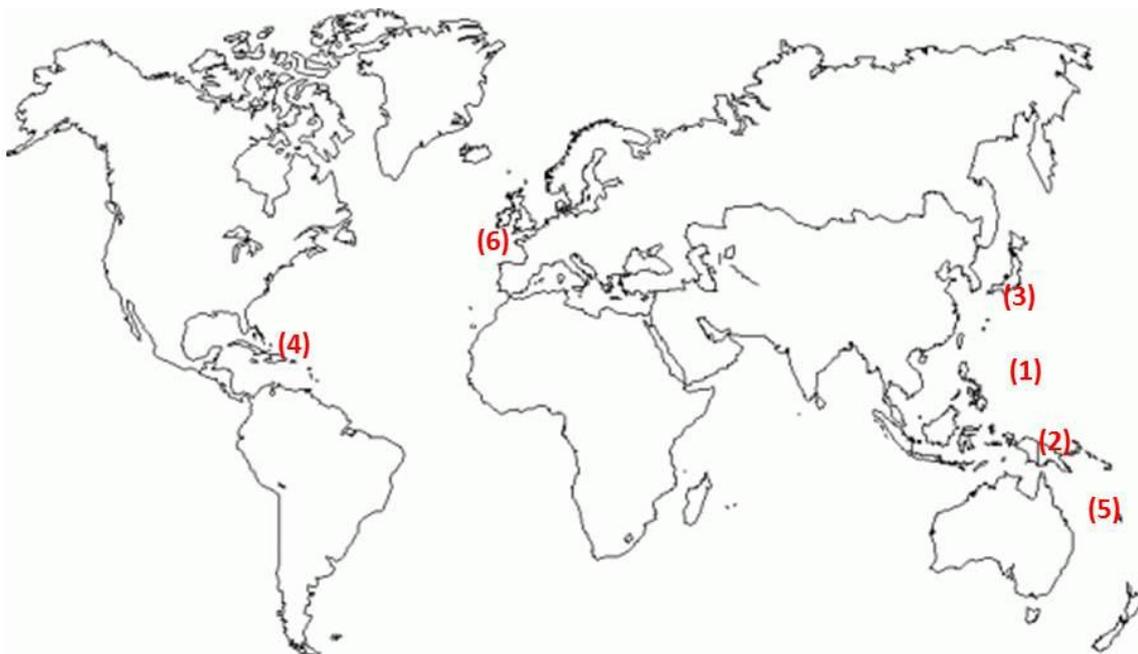


Figure 30 : Répartition des différentes études épidémiologiques impliquant un lien entre parkinsonismes et Annonaceae

Des patients de Guadeloupe et de l'île de Guam ont été étudiés [Steele J.C. 2002]. Il a été observé que les phénotypes des parkinsonismes atypiques incluaient une démence et des scléroses latérales amyotrophiques. De plus, au niveau neuropathologique, ces malades présentent des tauopathies. Néanmoins, la différence observée sur les caractéristiques biochimiques de la protéine tau entre les parkinsoniens atypiques guadeloupéens et les malades de Guam, suggérerait des maladies différentes (Figure 31).

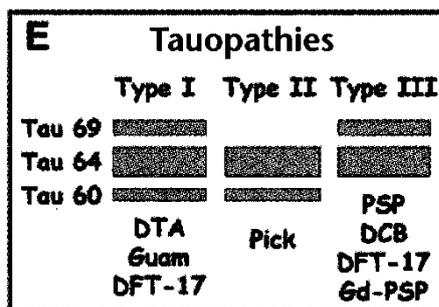


Figure 31 : Représentation schématique des différents profils électrophorétiques de diverses tauopathies

DTA : Démence de type Alzheimer, Guam : Complexe Parkinson-démence de l'île de Guam, DFT-17 : démence fronto-temporale liée au chromosome 17, Pick : Maladie de Pick, PSP, Gd-PSP

Les études étiologiques au niveau de l'île de Guam ont proposé différents facteurs. Le premier serait une neurotoxine excitotoxique potentielle, le β -N-méthyl-amino-L-alanine (Figure 32), produite par des bactéries symbiotiques de faux palmier de Sagou (*Cycas micronesica* Hill, Cycadaceae), concentrée dans les graines. Celles-ci, ont constitué une ressource alimentaire importante pour les indiens Chamorro (production de farine).

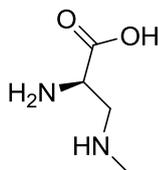


Figure 32 : β -N-méthyl-amino-L-alanine

L'autre hypothèse serait comme en Guadeloupe, la consommation d'Annonées, les habitants de cette île étant des consommateurs de fruits d'annonées et utilisant ces plantes en médecine traditionnelle (notamment *Annona muricata* pour ses propriétés sédatives).

Ces théories inciteraient à penser que l'implication des Annonaceae en lien avec d'autres facteurs environnementaux et génétiques provoqueraient la survenue de Parkinsonismes atypiques en zone tropicale. [Caparros-Lefebvre D. 2005].

En Nouvelle-Calédonie (Nouméa) et en Martinique, l'examen récent de petits panels (n = 33 et n = 10, respectivement) de patients parkinsoniens a révélé que la moitié des maladies sont des parkinsonismes atypiques, symptomatologiquement proches des cas relevés en Guadeloupe. Une grosse proportion de ces malades était des consommateurs d'annonées [Angibaud G. 2004, Caparros-Lefebvre D. 2002].

Enfin, une étude épidémiologique menée à Londres montre une forte incidence de parkinsonismes atypiques (proches des phénotypes observés en Guadeloupe) au sein de populations immigrées d'origine indienne ou afro-caribéenne, par rapport aux sujets caucasiens. Ces malades étaient également des consommateurs de tisanes de feuilles ainsi que de fruits d'annonées importés [Chaudhuri K.R. 2000]. Cependant, la spécificité de cette association n'a pas été évaluée.

2.3 Inhibition du complexe I de la mitochondrie et Parkinsonismes

Les études épidémiologiques précédentes, montrent qu'il existerait des facteurs environnementaux pouvant provoquer les syndromes parkinsoniens atypiques.

Au niveau cellulaire, les différents mécanismes (Figure 23), peuvent être dus à différents agents exogènes à potentiel neurotoxique. L'inhibition ou le dysfonctionnement de la fonction mitochondriale semble être un facteur important de l'apparition de la maladie de Parkinson et des parkinsonismes atypiques. En effet, les tissus cérébraux et musculaires sont les plus dépendants en énergie de l'organisme. Ces tissus ont une quantité importante de mitochondries et sont donc plus vulnérables à un dysfonctionnement de cette chaîne.

Le complexe I de la mitochondrie semble être une cible majeure pour ce dysfonctionnement ou pour l'inhibition de la respiration mitochondriale. En effet, ce complexe est la première composante protéique de la chaîne respiratoire mitochondriale et en tant que tel joue un rôle crucial dans la production d'ATP, le fonctionnement mitochondrial en général et la production de radicaux libres (Figure 33) [Banerjee J. 2009, Beal M.F. 2000.].

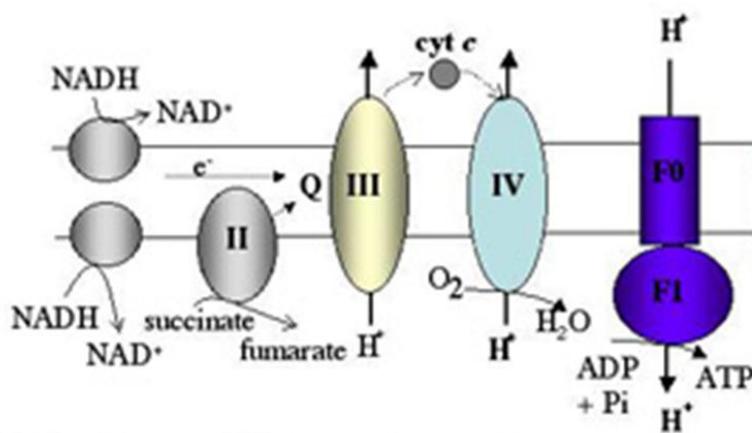


Figure 33 : Chaîne mitochondriale

Il oxyde le NADH et transfère les électrons à l'ubiquinone (Q), coenzyme assurant le lien avec le complexe III. Il transfère également des protons de la matrice mitochondriale dans l'espace intermembranaire, en aidant à l'affaiblissement du gradient électrochimique utilisé pour alimenter la production d'énergie cellulaire sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP). La déplétion en ATP résultant de cette inhibition peut conduire à des défauts de transport du calcium, des dégradations de protéines, entre autres une redistribution et accumulation de Tau et pourrait générer une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). [Betarbet R. 2002 ; Höllerhage M. 2009]. Ces trois processus peuvent, potentiellement, conduire à la mort cellulaire.

Une autre cause de la mort neuronale et de l'apparition de la maladie de Parkinson serait l'excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant être induites directement par des facteurs environnementaux ou secondairement par l'inhibition du complexe I. Les cellules neuronales sont très sensibles aux dommages oxydatifs, en rapport avec leur utilisation élevée en oxygène, à leur niveau élevé en fer et à leur concentration élevée de lipides sensibles à la peroxydation. De plus, la substance noire, a par rapport aux autres régions du cerveau, un niveau inférieur, en glutathion qui joue un rôle important dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit au cours du

métabolisme normal d'un cerveau adulte. L'épuisement du glutathion est la première indication du stress oxydatif dans la progression de la maladie de Parkinson [Bharath S. 2002].

L'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) est également connue pour être augmentée dans la substance noire de la maladie de Parkinson. L'augmentation de l'oxyde nitrique (NO) pourrait également rehausser le stress oxydatif local. Le NO peut réagir avec le radical superoxyde pour former l'anion peroxydrite, un puissant radical oxydant [Foley P. 2000].

Tous ces phénomènes peuvent mener à l'apoptose des cellules neuronales voir même à la nécrose. En effet, une proportion accrue de cellules apoptotiques ont été observées dans la substance noire, des patients atteints de Parkinson et d'autres maladies à corps de Lewy. De plus, une étude récente montre que les inhibiteurs du complexe I provoquent une redistribution des protéines Tau dans des cultures striatales. L'existence d'un lien entre les tauopathies, en particulier les parkinsonismes atypiques, et des inhibiteurs du complexe I est très probable [Schapira A.-H. 2010].

2.4 Facteurs environnementaux inhibiteurs du complexe I

Un grand nombre d'études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre la maladie de Parkinson idiopathique et l'exposition prolongée aux pesticides. De plus, beaucoup de pesticides naturels ou synthétiques et des herbicides ont un effet commun sur la fonction mitochondriale et sur l'inhibition de complexe I ou dans l'apparition d'un stress oxydatif au niveau cellulaire. Parmi ceux-ci, trois molécules (MPTP, roténone, paraquat) sont connues et sont utilisées maintenant en expérimentation animale pour induire les syndromes parkinsoniens chez l'animal.

2.4.1 MPTP

Le MPTP (1-méthyl-4-phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine) a été produit accidentellement au cours de la fabrication illicite de la mépéridine, un opioïde de synthèse utilisé par les toxicomanes (Figure 34). Le MPTP est métabolisée en MPP⁺, son métabolite actif, par la monoamine oxydase-B (MAO-B) dans les astrocytes. Le passage du MPTP, nécessite cette métabolisation pour permettre le passage à travers la barrière hémato-encéphalique par un transporteur de la dopamine (DAT). Relargué dans le milieu extracellulaire, le MPP⁺ est pris en charge par le transporteur de la dopamine (DAT) et pénètre spécifiquement dans les neurones dopaminergiques. C'est de cette façon que ses effets inducteurs de la maladie de Parkinson ont d'abord été découverts.

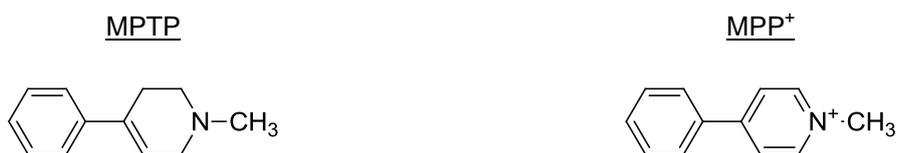


Figure 34 : Structure du MPTP et de son métabolite actif le MPP+

Le MPP⁺ est ainsi capable de s'accumuler dans les mitochondries de ces neurones et de provoquer la mort neuronale. L'hypothèse la plus communément admise est que le MPP⁺ induit un

stress oxydatif causant une mort cellulaire et serait dû à la production par réaction d'espèces partiellement réduites de la chaîne respiratoire avec le dioxygène. Le deuxième mécanisme serait l'inhibition du complexe I et de l' α -cétoglutarate déshydrogénase, entraînant une déplétion énergétique. (Figure 37) [Foley P. 2002, Betarbet R. 2002].

2.4.2 Roténoïdes et roténone

La roténone et les roténoïdes sont des isoflavonoïdes iso-prénylés (Figure 35). La roténone est le principe actif majoritaire des racines de diverses Fabaceae tropicales appartenant aux genres *Derris*, *Lonchocarpus*, *Milletia*, *Mundulea* et *Tephrosia*. Les roténoïdes sont les pesticides considérés comme les plus susceptibles d'être impliqués dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson. Ces produits étaient utilisés, en usage domestique, comme pesticides pour le jardinage et en agriculture biologique. Depuis avril 2008, la réglementation des produits phytopharmaceutiques dans l'Union européenne, interdit l'emploi de cette substance.

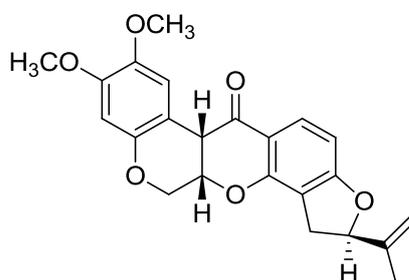


Figure 35 : Roténone

La roténone est lipophile et a une affinité pour les membranes biologiques. Par conséquent, contrairement au MPP⁺, la roténone ne nécessite pas le transporteur de la dopamine (DAT) pour l'accès au cytoplasme et est donc susceptible d'inhiber le complexe I sans spécificité vis à vis d'un type neuronal.

In vitro, la roténone induit l'apoptose dans différents modèles cellulaires, suite à un stress oxydant ou par déplétion énergétique et ne semble pas avoir un tropisme sur cellules dopaminergiques.

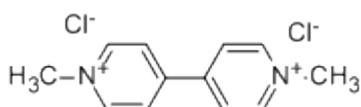
In vivo, la perfusion continue de roténone chez les rats réduit l'activité du complexe I, et donne des lésions au niveau de la substance noire et des neurones dopaminergiques. Les cerveaux de rats présentaient des inclusions cytoplasmiques contenant des agrégats d' α -synucléine dans les neurones nigrés, ressemblant à des précurseurs de Corps de Lewy retrouvés chez le Parkinsonien. Une augmentation anormale de protéines tau au niveau du cytoplasme des neurones, des oligodendrocytes et des astrocytes a été aussi retrouvée [Höglinger G.-U. 2005]. Les animaux traités par la roténone ont également développés des déficits moteurs et posturaux décrits comme caractéristiques de la maladie de Parkinson pour certains auteurs [Lapointe N. 2004].

De plus, plusieurs mécanismes de toxicité peuvent être dus à la roténone. En effet, lors de l'utilisation de roténone une augmentation du stress oxydatif, une accumulation d'ubiquitine, une inhibition du protéasome et des phénomènes inflammatoires sont visibles (Figure 37) [Hatcher J.-H. 2008, Höglinger G.U. 2006].

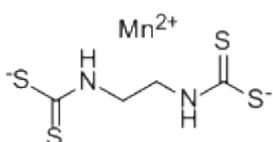
Chez l'animal, de nombreuses lésions non dopaminergiques larges ont été visibles. L'intoxication chronique par la roténone est donc actuellement proposée comme modèle expérimental de la PSP.

2.4.3 Paraquat et Manèbe

Le paraquat est un pesticide de contact non sélectif produit depuis 1961. En Europe, depuis 2007, il est interdit d'utilisation car il est considéré par la commission européenne comme pouvant avoir un lien avec la maladie de Parkinson. Cependant, il est encore très utilisé dans le monde car bien que très toxique, il est peu coûteux et facile d'utilisation. Il a été souvent étudié en raison de sa toxicité de contact et pulmonaire et de sa structure proche du MPP⁺ (Figure 36, Photo 16).



Paraquat



Manèbe



Photo 16 : Agriculteur asiatique utilisant du paraquat

Figure 36 : Structure du Paraquat et du Manèbe

Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté une association positive entre l'exposition au paraquat et le développement de la maladie de Parkinson. Chez la souris, le paraquat a la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, *via* des transporteurs d'acides aminés neutres et de s'accumuler dans certaines régions du cerveau des souris. En exposition systémique il a montré qu'il cause une mort des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire et une augmentation de l'agrégation d' α -synucléine. Une dégénérescence des terminaisons striatales et une perte d'activité locomotrices des animaux ont été montrées [Hatcher J.-M. 2008]. Cependant, bien que le paraquat soit structurellement similaire au MPP⁺, il ne semble pas exercer sa toxicité d'une manière semblable. Son mécanisme est sujet à de nombreuses controverses, il semblerait moins spécifique des neurones dopaminergiques et il pourrait être un inhibiteur du complexe I de la mitochondrie. Son mécanisme principal serait de type oxydatif en provoquant des réactifs de type NOS et il provoquerait des agrégations de protéines (Figure 37) [Derek A. 2009, Berry C. 2010].

D'autres études ont suggéré que sa toxicité serait due à une combinaison avec un fongicide, le Manèbe (éthylène-bis-dithiocarbamate de manganèse). Ce dernier est connu pour être un inhibiteur sélectif du complexe III de la mitochondrie. Le recouvrement géographique dans l'utilisation de ces composés est notable. *In vivo*, les études ont montré qu'une exposition simultanée causait une diminution de l'activité motrice des animaux, altérait la métabolisation de la dopamine striatale et l'accumulation de dopamine dans les synaptosomes. Toutefois, les composés ne sont pas utilisés simultanément et, bien que le paraquat persiste dans l'environnement, en raison de sa haute affinité pour le sol, il serait difficilement sous forme libre, ce qui rend ces expositions simultanées peu probables chez l'Homme [Hatcher J.-M. 2008].

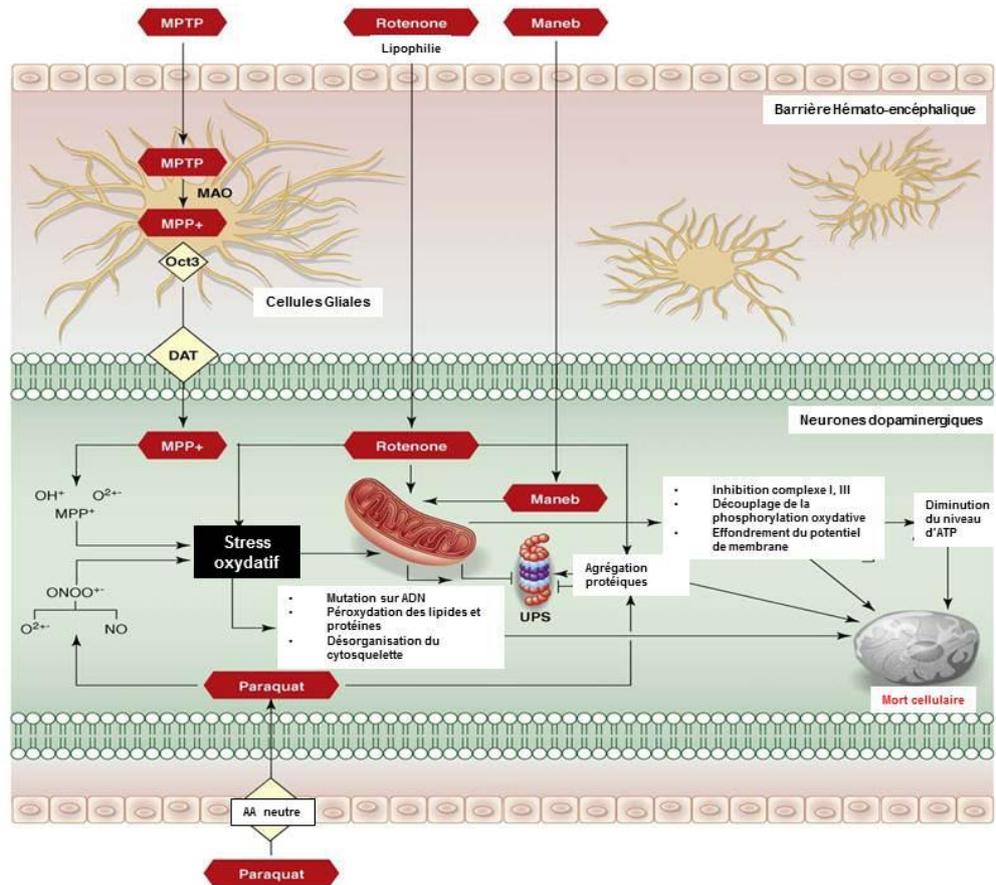


Figure 37 : Mécanisme d'action de différents pesticides pouvant être impliqués dans la maladie de Parkinson [Cicchetti F. 2009]

En conclusion, la plupart des études rétrospectives faites à ce sujet montrent clairement une association positive entre l'exposition à des facteurs environnementaux (pesticides, herbicides) et le risque de développer la maladie de Parkinson. Les syndromes parkinsoniens guadeloupéens étant des tauopathies et ayant des symptômes comparable à la PSP, des facteurs environnementaux et particulièrement des inhibiteurs du complexe I pourraient être mis en cause.

Des études phytochimique et biologique ont donc été entreprises au sein de la famille des Annonaceae et plus particulièrement *Annona muricata* pour infirmer ou affirmer ce phénomène. Deux types de molécules contenues dans la famille des Annonaceae ont suscité plus amplement l'intérêt des chercheurs : les alcaloïdes isoquinoléiques et les acétogénines.

2.5 Études antérieures du lien entre *Annona muricata* et les syndromes parkinsoniens guadeloupéens

2.5.1 Mise en cause des alcaloïdes

2.5.1.1 Composition et études quantitatives

La majorité des malades atteints de parkinsonismes atypiques consommaient des fruits et des infusions ou décoctions de feuilles d'*Annona muricata*. Les études phytochimiques ont indiqué que les isoquinoléïnes et les aporphines représentent une proportion majoritaire des totum alcaloïdiques de ces drogues. La réticuline semble être le composant majoritaire des fruits et des feuilles [Champy P. 2004b, Champy P. 2005, Kotake Y. 2004].

Feuilles	Alcaloïdes totaux (AT)		
	Concentration	Dose /tasse	Dose/an (mg/kg)
Infusion	840 +/- 40 mg/kg	2,1 +/- 0,1 mg/250 ml	10,9
Décoction	840 +/- 40 mg/kg	2,1 +/- 0,1 mg/250ml	10,9
Extraits MeOH	884,0 mg/kg	-	-

Tableau 16 : Quantité d'alcaloïdes totaux pour les préparations médicinales d'*Annona muricata* [Champy P. 2004b]

Des études quantitatives des alcaloïdes au sein de ces différentes utilisations ont été effectués (feuilles, fruits et nectar). Les rendements d'extraction obtenus ont permis d'évaluer l'exposition humaine aux alcaloïdes d'un point de vue quantitatif. Un consommateur de tisanes de feuilles d'*A. muricata* ingère 2 mg d'alcaloïdes isoquinoléïques par tasse par jour, soit une dose cumulée supérieure à 700 mg par an (soit 11 mg/kg/an pour un adulte) (Tableau 16).

Produit	Alcaloïdes totaux		
	Concentration de l'extrait	Dose/unité	Dose /an (mg/kg)
Nectar	15 mg/L	7,2 mg/canette	37,5
Pulpe lyophilisée	1000 mg/kg	30 mg/fruit	156,4

Tableau 17 : Quantité d'alcaloïdes totaux dans la pulpe et le nectar d'*Annona muricata*

L'exposition des consommateurs de la pulpe ou du nectar est beaucoup plus importante (près de 15 mg d'alcaloïdes pour un litre de nectar et 30 mg pour un fruit moyen, soit pour une personne adulte buvant une bouteille par jour, environ 37,5 mg/kg d'alcaloïdes en un an (Tableau 17). Un homme ingérant un fruit par jour consommerait environ 156 mg/kg en un an [Champy P. 2005].

Par conséquent, la consommation d'*A. muricata* à des fins alimentaires est susceptible d'avoir des conséquences toxicologiques non négligeables, supérieures à celles liées à l'utilisation médicinale de feuilles.

2.5.1.2 Biodisponibilité

Aucune étude précise de biodisponibilité n'a été pour l'instant publiée. Des études sur différentes benzyl-tétrahydroisoquinoléines montreraient un passage de la barrière intestinale et de la barrière-hémato-encéphalique [Antkiewicz-Michaluk L. 2000a, 2000b, Cashaw J.-L. 1991]. L'activité au niveau central des alcaloïdes d'*A. muricata* (réticuline, coclaurine) a été mise en évidence *in vivo* [Banning J.-W. 1980, Morais L.-C.-S.-L. 1998, Watanabe H. 1981, 1983].

2.5.1.3 Neurotoxicité

2.5.1.3.1 *in vitro*

Les alcaloïdes de type isoquinoléïque et benzyl-isoquinoléïque exercent une toxicité dans plusieurs modèles de neurones dopaminergiques *in vitro* (lignées cancéreuses transfectées stables exprimant le DAT : HEK 293, neuroblastomes humains : SH-SY5Y, phéochromocytomes de rats : PC12) et sur cultures primaires mésencéphaliques de rats.

Une étude plus spécifique des alcaloïdes d'*A. muricata* (totum et alcaloïdes majoritaires extraits des feuilles) a été effectuée sur culture mésencéphalique de rat [Lannuzel A. 2002]. Comme cela a été vu précédemment, le mésencéphale correspond à la localisation de la substance noire. Cette région dégénère préférentiellement dans la maladie de Parkinson idiopathique mais est également touchée dans les parkinsonismes atypiques. Ce modèle est donc un modèle de choix pour comprendre la neurotoxicité et le lien des alcaloïdes avec la survenue du syndrome parkinsonien.

Le totum alcaloïdique a induit une perte des neurones dopaminergiques dose dépendante après une incubation de 24 h avec une CI_{50} de 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'exposition des neurones dopaminergiques en culture des deux alcaloïdes les plus abondants, la réticuline (benzyl-tétra-hydroisoquinoléine) et la coreximine (tétrahydroprotoberbérine) génèrent une perte des neurones à de faibles doses. La coreximine semble être la plus active avec des CI_{50} et C_{100} environ 10 fois plus faibles que la réticuline. Ces composés affectaient aussi une autre population neuronale présente dans les cultures : les neurones GABA-ergiques (Tableau 18). Cette non sélectivité de mort neuronale est en adéquation avec ce l'on sait de la pathologie d'un point vue clinique et histopathologique.

	Totum	Coreximine		Réticuline	
CI_{50} , TH ⁺ à 24 h	18 $\mu\text{g}/\text{mL}$	13 μM	39 μM	300 μM	924 μM
CI_{100} , TH ⁺ à 24 h	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30 μM	92 μM	912 μM	2,8 mM
CI_{50} , GABA ⁺ à 24 h	33 $\mu\text{g}/\text{mL}$	n.d.		n.d.	
CI_{50} , Uptake DA à 24 h	\approx 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	\approx 31 μM	\approx 92 μM	\approx 42 μM	\approx 92 μM
CI_{50} , Uptake GABA à 24 h	26 $\mu\text{g}/\text{mL}$	n.d.		n.d.	

Tableau 18 : Toxicité des alcaloïdes d'*A. muricata* sur cultures primaires mésencéphaliques d'embryons de rats

TH⁺ : neurones dopaminergiques ; GABA⁺ : neurones GABAergiques ; n.d. : non déterminé Valeurs en $\mu\text{g}/\text{mL}$: exprimées sous forme de base. L'uptake de neurotransmetteurs est considéré comme étant un témoin de la viabilité cellulaire.

De plus, la plupart des neurones dégénérés dopaminergiques et non-dopaminergiques présentaient une chromatine condensée et fragmentée indicative d'une apoptose.

2.5.1.3.2 *In vivo*

La neurotoxicité *in vivo* des alcaloïdes isoquinoléïques a été étudiée sur de nombreuses espèces de mammifères et par des modes d'intoxication variables, menant à des résultats contradictoires.

En ce qui concerne en particulier les isoquinoléïnes benzylées en voie i.p. (intra-péritonéale) chez la souris et en voie s.c. (sous cutanée) chez le macaque la 1-Benzyl-tétrahydroisoquinoléïne entraîne des troubles moteurs à très forte dose (400 mg.kg⁻¹ en 5 jours et 1,4 g.kg⁻¹ en 66 jours) [Kotake Y. 1996]. La réticuline est un antagoniste dopaminergiques *in vivo* [Banning J.-W. 1980, Kawai H. 2000].

La tétrahydropapavérine, injectée unilatéralement dans le striatum de rats (10 mg/kg sur 7 jours en continu), entraîne une diminution de dopamine importante au niveau de l'injection et modérée au niveau de l'hémisphère opposé. Le traitement engendre une perte non nécrotique des neurones dopaminergiques (≈ 20 %). La molécule est moins toxique que le MPP⁺ [Koshimura I. 1997].

2.5.1.3.3 Étude du mécanisme d'action des benzyl-tétrahydroisoquinoléïnes

La réticuline (≈ 30 μM) et la coreximine (≈ 30 μM) induisent une inhibition spécifique du transporteur présynaptique de la dopamine (DAT) et non du transporteur GABA-ergique. L'action de ces alcaloïdes est réversible. Cependant leur cytotoxicité ne serait pas dépendante d'un phénomène de recapture, et leur diffusion passive vers le milieu intracellulaire est possible [Lannuzel A. 2002]. Ce qui expliquerait la non-sélectivité des alcaloïdes pour les neurones dopaminergique.

D'après de nombreux auteurs, la neurotoxicité exercée par les alcaloïdes isoquinoléïques serait due à une inhibition de la respiration mitochondriale, plus précisément au niveau du complexe I. Le glucose exerce une action protectrice vis-à-vis des deux alcaloïdes réticuline et coreximine ce qui suggère que ces toxines pourraient agir en inhibant le fonctionnement de la chaîne respiratoire et que cette inhibition pourrait être compensée par stimulation de la glycolyse anaérobie.

Cependant, les études d'inhibition du complexe I par la réticuline montrent très faiblement une activité inhibitrice de l'enzyme : seulement 20 % d'inhibition à 65 μM. Une aporphine, l'annonaine, est cependant plus puissante (3,4 μM) (Tableau 19).

	CI ₅₀	SEM
A.T. feuilles (exprimé en réticuline)	2,75 μM	0,06 μM
Réticuline	20 % d'inhibition à 65 μM	
Annonaine	3,40 μM	0,17 μM

Tableau 19 : Activité inhibitrice du complexe I de la mitochondrie par des alcaloïdes d'*A. muricata*

SEM : Écart type de la distribution des moyennes

L'inhibition du complexe I par les alcaloïdes pourrait donc être l'une des voies de la mort cellulaire visible *in vitro*.

2.5.1.4 Conclusion

Les alcaloïdes d'*A. muricata* peuvent altérer la transmission dopaminergique et provoquer la mort cellulaire dans des cultures mésencéphalique. Cependant, il n'y a pas encore d'étude complète de leur biodisponibilité. Les études sur animaux seront donc déterminantes. De plus, les métabolites neurotoxiques identifiés ne semblent pas susceptibles d'engendrer à eux seuls les neurodégénérescences sévères observées chez l'humain [Caparros-Lefèbre D. 2002, Collins M.A. 1999].

C'est la raison pour laquelle une autre piste de neurotoxines environnementales a été explorée : les acétogénines, molécules abondantes et spécifiques de la famille des Annonaceae.

2.5.2 Mise en cause des acétogénines2.5.2.1 Étude qualitative et quantitative

Les acétogénines des feuilles d'*A. muricata* ont été désignées par criblage bioguidé comme des neurotoxines potentielles, de puissance supérieure à celle des alcaloïdes. Les acétogénines sont présentes dans les fruits, les nectars et en faible quantité dans les feuilles et dans les infusions et décoctions. Les études qualitatives antérieures à notre travail ont montré une forte diversité des acétogénines. L'annonacine et les ACGs de même masse ont fait l'objet d'une étude quantitative par MALDI-TOF, dans des produits de consommation humaine à base d'*A. muricata* [Champy P. 2008, Champy P. 2009, Champy P. 2011].

	Annonacine		
Feuilles	Concentration de l'extrait	Dose /tasse	Dose/an (mg/kg)
Infusion	56 +/- 22 mg/kg	0,14 +/- 0,05 mg/250 ml	0,73
Décoction	56 +/- 14 mg/kg	0,14 +/- 0,05 mg/250 ml	0,73
Extrait MeOH	318 +/- 88 mg/kg	-	-

Tableau 20 : Quantité d'annonacine dans les feuilles et préparation à base de feuilles d'*Annona muricata*

Les feuilles d'*A. muricata* utilisées (récoltées en Guadeloupe au mois d'août) étaient très riches en annonacine (environ 0,03 %). Un usager ingère environ 0,1 mg d'annonacine par tasse (Tableau 20). En estimant la consommation quotidienne à 1 tasse, pour les consommateurs réguliers [Caparros-Lefèbre D. 1999], la dose cumulée sur un an est donc de l'ordre de 40 mg d'annonacine (pour une consommation équivalente à environ 900 g de feuilles séchées). Un usager de gélules de poudres de feuilles d'*A. muricata* ingère quant à lui environ 0,2 mg d'annonacine par gélule « standard ».

	Annonacine		
Produit	Concentration de l'extrait	Dose/unité	Dose /an (mg/kg)
Nectar	109 +/- 30 mg/L	36 mg/ canette (330 mL)	188
Pulpe lyophilisée	525 mg/kg	15 mg/fruit	78

Tableau 21 : Quantité d'annonacine dans la pulpe et le nectar d'*Annona muricata*

La consommation d'un litre de nectar ou d'un fruit entrainerait une ingestion d'annonacine deux fois supérieure à la dose cumulée en un an pour un consommateur régulier de tisanes, soit environ 15 mg pour un fruit de taille moyenne et 36 mg par bouteille de nectar d'environ 330 ml [Champy P. 2005] (Tableau 21).

L'ensemble de ces données indique que la consommation du fruit d'*A. muricata* constitue un mode d'exposition important aux acétogénines. L'usage alimentaire de la plante est une source potentielle d'intoxication chronique, supérieure par rapport aux préparations médicinales.

2.5.2.2 Biodisponibilité

L'annonacine et la roténone sont des molécules lipophiles, qui traversent aisément les membranes biologiques [Betarbet R ; 2002, Shimada H. 1998, Derbré S. 2005 , Kojima N. 2010, Barachinna I. 2007]. Les différentes études chez le rat en i.p et i.v. ont montré des dégénérescences au niveau neuronal ce qui porterait à croire que l'annonacine traverserait la barrière hémato-encéphalique.

Le passage de la barrière intestinale par les acétogénines, n'a été démontré que de manière indirecte lors d'une étude d'intoxication aiguë par voie orale de souris avec la rolliniastatine-1, l'isorolliniastatine-1, l'annonacine et la squamocine [Laugel T. 1996, Duret P. 1997, voir aussi Cuendet M. 2008.].

Dose (mg/kg) p.o.	10	30	100	200	400
Annonacine	0/3	0/3	3/3 (1,5h)	3/3 (0,5 h)	-
Rolliniastatine-1	0/3	0/3	3/3 (1,5h)	3/3 (0,5 h)	-
Isorolliniastatine-1	-	-	0/3		1/3
Squamocine	-	-	2/3	3/3 (1h)	

Tableau 22 : Toxicité aiguë de différentes acétogénines chez la souris par voie orale

n_m/n_t : Nombre d'animaux morts sur nombre d'animaux testés

Les valeurs de DL₅₀ ont montré des différences en ce qui concerne la voie d'administration. Ainsi, la rolliniastatine-1 possède une DL₅₀ de 85 mg/kg par voie orale contrairement à sa DL₅₀ de 5 mg/kg en voie intrapéritonéale. Ces différences sont sûrement liées aux propriétés pharmacocinétiques des acétogénines. La molécule pourrait avoir des difficultés pour traverser les barrières biologiques, avoir une distribution diffuse ou avoir une forte métabolisation.

Ce passage et les conséquences d'un effet de premier passage hépatique n'ont jamais été quantifiés.

2.5.2.3 Étude du mécanisme d'action de l'annonacine

Depuis longtemps, les acétogénines dont l'annonacine sont connues pour être des inhibiteurs très puissants du complexe I. Certaines constituent les plus puissants inhibiteurs connus de cette enzyme (CI₅₀ ≤ 1nM pour la rolliniastatine-1) [Cavé A. 1997, Degli-Esposti M. 1998] (Figure 38).

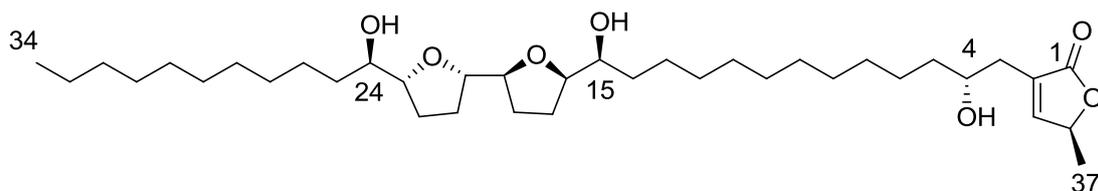


Figure 38 : Rolliniastatine-1

Leurs sites d'action ne sont que partiellement identifiés à l'heure actuelle et il semblerait qu'il soit identique ou proche de la roténone, au niveau du site de liaison de l'ubiquinone ou l'ubisemiquinone non prosthétique (sous unité ND1). C'est le site préférentiel pour de nombreux inhibiteurs de l'enzyme [Estornell E. 1999, Tormo J.-R. 1999a, 1999b, 1999c, Nakanishi N. 2011].

Les ACGs en raison de leur hétérogénéité structurale et de leur différence d'inhibition ont été classées en trois classes d'inhibiteurs de la mitochondrie (Figure 39) :

- Non compétitives vis-à-vis de benzoquinones telle que la n-décylubiquinone et déplacées par la roténone : annonacine, corossoline, squamocine et beaucoup d'ACGs mono-THF.
- Incompétitives vis-à-vis de la n-décylubiquinone, déplacées par la roténone. Elles agissent sur deux sites d'affinité comme la piéricidine A et la rolliniastatine-1.
- Incompétitives vis-à-vis de la n-décylubiquinone, non déplacées par la roténone mais déplacées par la piéricidine-A, agissent au niveau du site de liaison de la piéricidine A non commun avec celui de la roténone : rolliniastatine-2 et chérimoline.

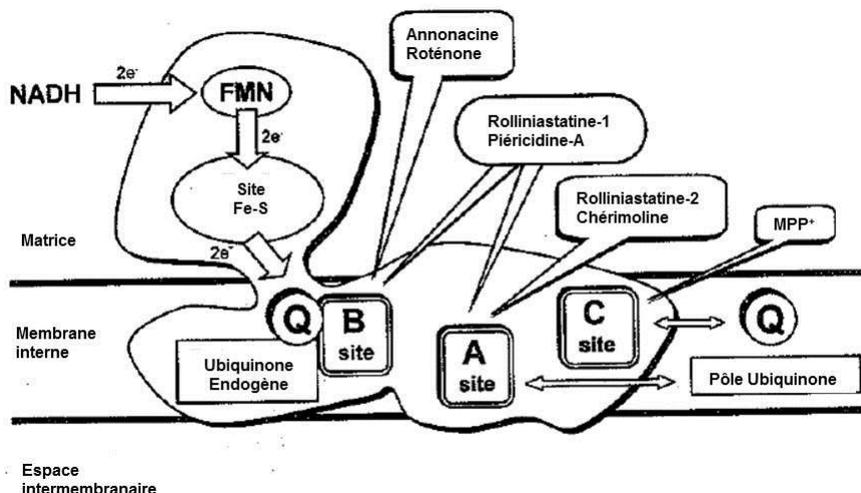


Figure 39 : Différents sites d'action des ACGs au niveau du complexe I

Les relations structure activité des acétogénines d'Annonaceae comme agents cytotoxiques ont été très étudiées, sur des modèles variés : mesures de l'inhibition du complexe I ; activité cytotoxique sur cellules cancéreuses ou non ; activité pesticide, et travaux d'hémisynthèses [Takada 2000, Motoyama T. 2002, Derbré S. 2005, Derbré S. 2006a, Duval R. 2006, Liaw C.-C.2010].

Les résultats sont hétérogènes mais il ressort quelques règles générales (Figure 40) :

- la lactone serait le pharmacophore des ACGs au niveau du site d'action ;
- les cycles tétrahydrofuraniques semblent être un point d'ancrage lipophile dans la membrane ;
- la position et le nombre de THF semble être importants. Les ACGs les plus actives appartiennent au type B (bis-THF adjacents), puis aux types C (bis-THF non-adjacents) ou D (tris THF à cycles adjacents), celles de type A (mono-THF) étant généralement les moins actives. Les ACGs de type E (sans cycle THF) présentent de faibles activités ;
- les ACGs de sous type 1b (lactone α,β -insaturée, OH en 4) sont les plus actives, cependant certaines acétogénines de sous type 1a ont des puissances comparables ;
- la stéréochimie du groupement THF n'a qu'une influence modérée par rapport au nombre de THF ;
- l'espacement entre la lactone terminale et le ou les THF est généralement peu ou pas substitué chez les ACGs bioactives. Un espaceur de 13 atomes de carbone non substitué ou substitué par un hydroxyle en C-4 est optimal.

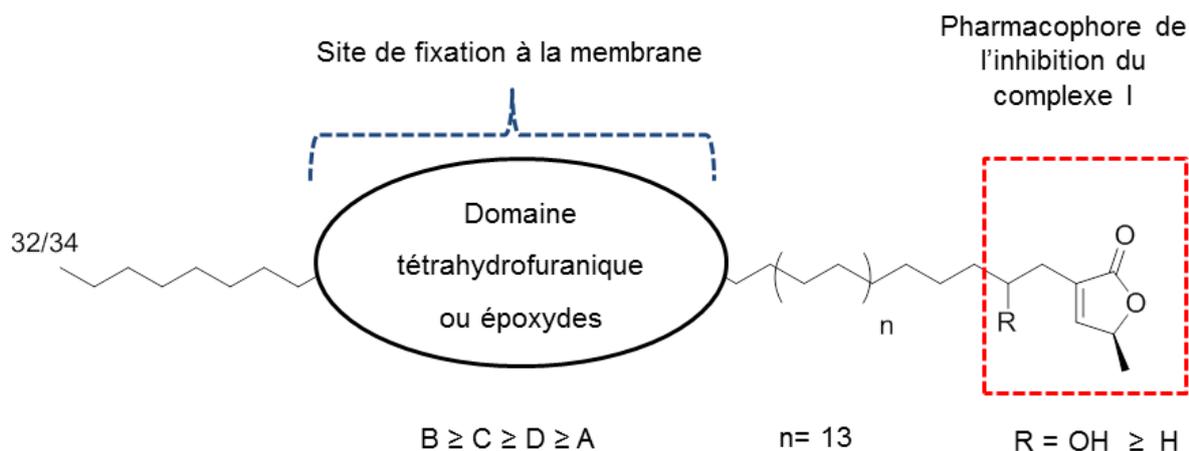


Figure 40 : Relation structure activité des ACGs pour l'inhibition du complexe I

De plus, l'annonacine pénétrerait de manière passive dans les neurones [Höllerhage M. 2009]. Elle provoquerait une mort non excitotoxique, et indépendante des astrocytes.

Si la production de radicaux libres est augmentée (+60% par rapport au témoin) dans les cultures neuronales, la forte protection exercée par le glucose ou par le mannose, supprimée par des inhibiteurs directs ou indirects de la glycolyse, désigne la déplétion énergétique cellulaire comme origine de la mort [Lannuzel A. 2003]. Tous ces arguments mettent en faveur un mécanisme d'action de l'annonacine par inhibition du complexe I de la mitochondrie provoquant la mort par apoptose *via* la déplétion énergétique.

D'autres ACGs ont montré un lien avec l'apparition des parkinsonismes atypiques par l'apparition d'agrégats protéiques de tau dans des cultures neuronales, la déplétion en ATP et leur inhibition du complexe I de la mitochondrie [Höllerhage M. 2009]. De plus, des analogues fluorescents de la squamocine (Figure 41), acétogénine majoritaire d'*A. squamosa* ont montré un tropisme pour la

mitochondrie (cellules Jurkat T) et une rapide internalisation (5 à 10 minutes) au niveau de la cellule puis une localisation au niveau de la mitochondrie entre 15 et 25 minutes (Figure 42).

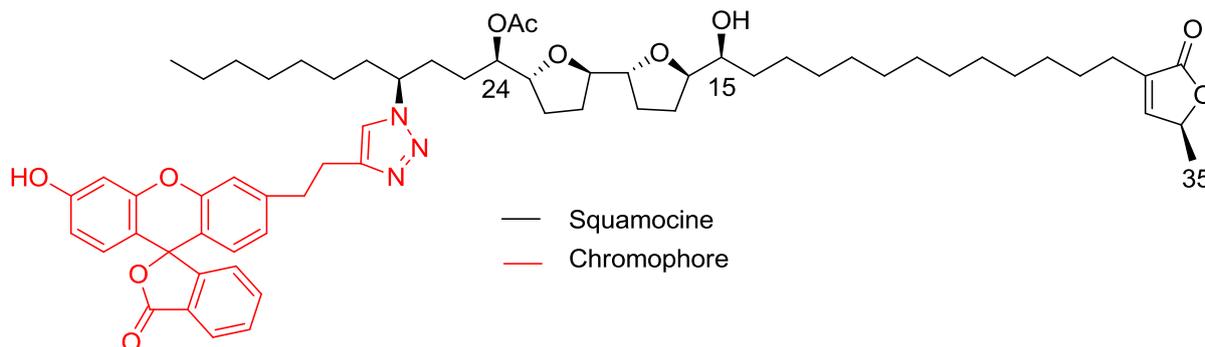


Figure 41 : Squamocine fluorescente

Au sein de la cellule, la localisation au niveau de la mitochondrie n'est pas totale (71 %) et on retrouve cette sonde au niveau cytosolique.

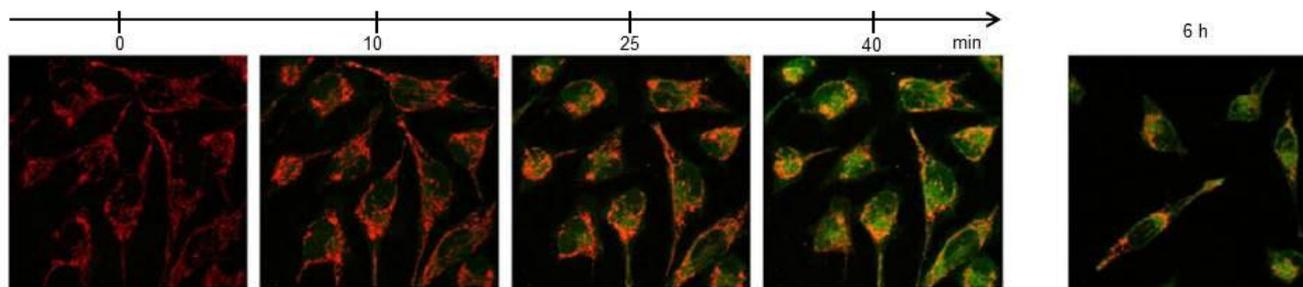


Figure 42 : Étude cinétique de la distribution cellulaire de la squamocine fluorescente

Cette étude a montré que les ACGs avaient un tropisme mitochondrial élevés. Cependant, cette famille de molécules pourraient avoir d'autres cibles : enzymes cytosoliques, ou au niveau du réticulum endoplasmique [Derbré S. 2008, Kojima N. 2010, Liaw C.-C. 2011].

2.5.2.4 Propriétés biologiques et neurotoxicité des acétogénines2.5.2.4.1 Neurotoxicité *In vitro*

Les acétogénines sont des molécules très cytotoxiques sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses. De plus, elles ont montré une neurotoxicité *in vitro* sur différentes lignées cellulaires à phénotypes neuronal (neuroblastomes humains : SH-SY5Y, phéochromocytomes de rats : PC12) et sur cultures primaires mésencéphaliques de rats.

	CI₅₀ +/- SEM (nM)	
	Neurones dopaminergiques	Neurones
Annonacine	18 +/- 4	27 +/- 5
Roténone	34 +/- 9	41 +/- 1
MPP⁺	1,9.10 ³ +/- 0,3.10 ³	72.10 ³ +/- 11.10 ³

Tableau 23 : Toxicité d'inhibiteurs du complexe I sur culture primaire mésencéphalique à 24 h

L'annonacine, acétogénine majoritaire d'*A. muricata* s'était révélée extrêmement toxique sur différents types de cellules neuronales, avec une concentration efficace EC₅₀ estimé à 18 nM sur les cellules dopaminergiques et 27 nM sur les autres types neuronaux, au bout de 24 h de traitement. La molécule était presque deux fois plus toxique que la roténone pour l'ensemble des neurones, et cent fois plus que le MPP⁺ pour les neurones dopaminergiques [Lannuzel A. 2003] (Tableau 23). Les effets de l'annonacine sont réversibles lorsque le temps d'incubation n'excède pas 6 heures mais s'observent à des concentrations encore plus faibles lorsque le traitement se prolonge sur plusieurs jours (EC₅₀ 5 nM).

L'annonacine et la roténone exercent des effets délétères sur d'autres types neuronaux, contrairement au MPP⁺. Ceci s'explique par le fait qu'à la différence du MPP⁺, ni l'annonacine ni la roténone ne sont des substrats du transporteur de la dopamine. La mort neuronale serait due à une inhibition du complexe I de la mitochondrie car on observe une baisse significative des taux d'ATP et la perte neuronale peut être totalement prévenue en augmentant les concentrations extracellulaires de glucose ou de mannose [Lannuzel A. 2003].

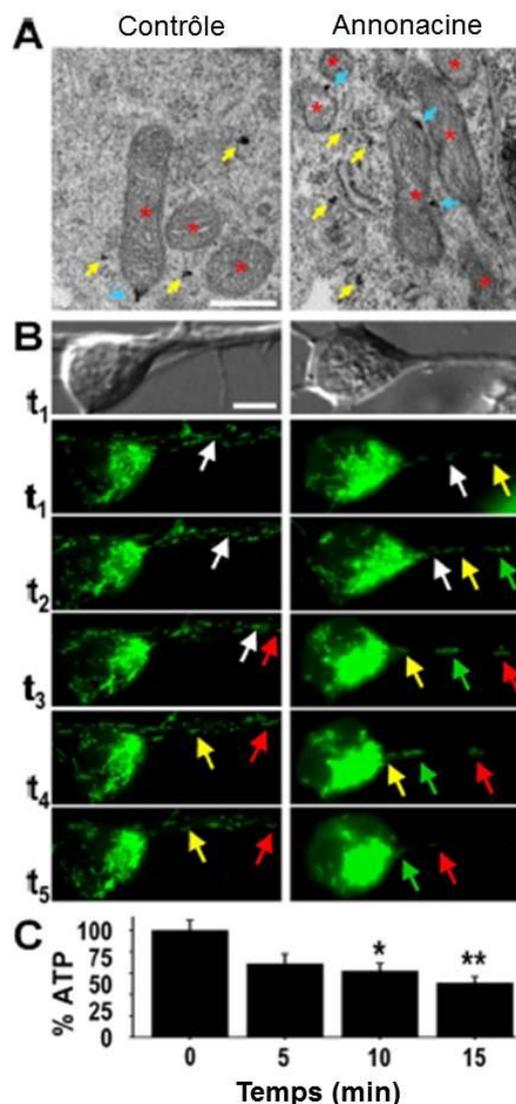


Figure 43 : Accumulation de tau au niveau des mitochondries après incubation par de l'Annonacine

(A) Immunomarquage → Redistribution du nombre de mitochondries, culture traitée pendant 48 h avec 50 nM annonacine → tau attachés à leur membrane externe (flèches bleues). → tau libre. (B), Neuron. t₁, 1 min; t₂, 10 min; t₃, 50 min; t₄, 80 min; t₅, 140 min.

De plus, l'annonacine induit la mort cellulaire des neurones dans des cultures striatales ainsi qu'une augmentation et une redistribution de la protéine tau pour des concentrations comprises entre 25 et 100 nM (Figure 43) [Escobar-Khondiker M. 2007, Höllerhage M. 2009]. Des résultats identiques sont obtenus sur cultures corticales [Potts L. 2011]. Ces effets peuvent être rapprochés aux observations faites après examens anatomo-pathologiques de sujets guadeloupéens décédés de syndromes parkinsoniens atypiques [Caparros-Lefèvre D. 2002, Höllerhage M. 2009].

2.5.2.4.2 *In vivo*

Différentes études *in vivo* ont été effectuées chez le rat et la souris. Le traitement sub-chronique continu en voie i.v. par l'annonacine pendant 4 semaines pour des doses cumulées de 10 à 60 mg n'avait occasionné aucune altération observable de l'état de santé, du comportement ou des troubles locomoteurs des animaux, contrairement aux animaux traités par la roténone à une dose

équimolaire ou à des doses supérieures [Betarbet R. 2000, Höglinger G.U. 2003a, Sherer T.B. 2003, Champy P. 2004a].

Par contre, l'analyse histologique du cerveau des animaux traités a mis en évidence une neurodégénérescence étendue, touchant majoritairement les noyaux de la base, le thalamus et les noyaux mésencéphaliques. Une perte significative des neurones dopaminergiques est enregistrée au niveau de la substance noire. Une dégénérescence des neurones cholinergiques et des neurones GABA-ergiques est observée au niveau du striatum. Enfin, une astrogliose est visible dans plusieurs aires lésées.

Ces observations démontrent que l'administration d'annonacine par voie systémique chez l'animal reproduit de façon expérimentale certaines des lésions histologiques que l'on retrouve dans le cerveau des patients atteints d'un syndrome parkinsonien atypique.

De plus, des souris mutées par des gènes impliqués dans la survenue du parkinsonisme FTDP-17 (tauopathies génétiques) intoxiquées par de l'annonacine ont montré une augmentation de l'hyperphosphorylation de tau dans plusieurs aires cérébrales. Une synergie entre un facteur génétique et un facteur environnemental pourrait donc expliquer l'apparition de syndromes parkinsoniens guadeloupéens [Rottscholl R. 2011].

2.5.2.5 Conclusion

D'après les études, l'annonacine par inhibition du complexe I de la mitochondrie provoque une redistribution des protéines Tau *in vitro*. De plus elle provoque la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* de cellules neuronales. L'annonacine serait une bonne candidate comme neurotoxine environnementale impliquée dans la survenue de parkinsonisme atypique. Cependant, il n'y a pas d'informations sur la biodisponibilité de l'annonacine et des acétogénines. Il est donc déterminant de l'étudier pour comprendre la réelle toxicité et le lien des ACGs avec l'apparition des syndromes parkinsoniens.

3. Saisine de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments)

La direction générale de la santé a eu recours le 2 juin 2008 à l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), pour une demande d'appui scientifique et technique relative au risque lié à la consommation de corossol (*A. muricata*) et de ses préparations.

L'AFSSA a donc publié une saisine suivant des recommandations fondées sur l'avis du Comité d'experts spécialisé « Nutrition humaine » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

Lien entre syndromes parkinsoniens atypiques et consommations d'annonacées

Malgré les études épidémiologiques du Dr Caparros-Lefèvre et du Dr Lannuzel, l'AFSSA considère qu'un manque de données précises sur les habitudes de consommation des patients atteints de syndromes parkinsoniens ne permet pas d'infirmier la responsabilité d'autres causes aussi bien environnementales que génétiques.

Caractéristiques chimiques et effets biologiques des alcaloïdes et acétogénines

La cytotoxicité des alcaloïdes isoquinoléiques a été démontrée *in vitro*. Cependant, les études de toxicité des alcaloïdes isoquinoléiques *in vivo* fournissent des résultats contradictoires. Le mode d'administration le plus souvent employé (injections sous-cutanées ou intra-péritonéales), n'est pas adapté pour tester l'hypothèse d'une toxicité *per os* des alcaloïdes. L'AFSSA estime que ces modèles, très ciblés, ne peuvent refléter les conditions d'exposition d'Annonaceae dans ses usages traditionnels et alimentaires.

Les données *in vitro* sur les acétogénines confirment le mécanisme d'action de l'annonacine et sa neurotoxicité *in vivo*. Cependant, ces modèles très ciblés ne peuvent pas être extrapolés aux conditions d'exposition de la population. Comme pour les alcaloïdes, la voie d'administration choisie (intraveineuse) diffère de la voie d'exposition humaine et les données de cinétique (biodisponibilité, métabolisme de la molécule) sont absentes. De plus, l'absence de mise en évidence chez l'animal d'un effet dose et de définition d'une dose non toxique rend très difficile l'interprétation de cette neurotoxicité. Au niveau des études quantitatives sur l'exposition à l'annonacine, leur estimation mériterait d'être précisée par des enquêtes rigoureuses de consommation, tenant compte des teneurs présentés dans les différentes parties du végétal et dans les préparations consommées.

Conclusion

Selon l'AFSSA, il n'est pas possible d'affirmer que le cas de syndromes parkinsoniens atypiques observés en Guadeloupe est lié à la consommation d'Annonaceae telles qu'*A. muricata*. Il n'est donc pas possible de proposer des recommandations quantitatives précises de consommation du corossol dans la population, mais les préparations à base de corossol devraient faire l'objet d'une attention particulière.

Les risques neurologiques potentiels de ces composés végétaux chez l'Homme sont vraisemblables. Des recherches sur l'annonacine sont nécessaires pour mieux caractériser le risque lié à la consommation de corossol portant notamment sur :

- Les propriétés cinétiques de la molécule (biodisponibilité orale, métabolisme...);

- Sa toxicité à long terme afin de pouvoir évaluer le risque de l'exposition du consommateur à ces composés végétaux ;
- Une quantification précise des apports quotidiens en annonacine ;

Enfin, l'AFSSA recommande de poursuivre la surveillance épidémiologique des syndromes parkinsoniens atypiques en Guadeloupe, déjà engagée, et de mettre en place, dès à présent, un suivi de toxicovigilance relatif à la consommation de corossol et d'extraits de corossol.

4. Conclusion

D'après les données de la littérature et la saisine de l'AFSSA, il semble que l'exposition répétée, prolongée et cumulative aux Annonaceae engendre des phénomènes neurodégénératifs. Les acétogénines sembleraient être une cause de ces maladies et leur action pourrait être aggravée par les effets neurotoxiques synergiques suspectés pour les alcaloïdes isoquinoléïques ou encore par une hypersensibilité génétique.

Pour mieux comprendre cette toxicité et la réelle implication des acétogénines, des études quantitatives des fruits et de leurs dérivés et l'étude de biodisponibilité de l'annonacine doivent être effectuées. Cependant, ces études ne doivent pas être restreintes à l'annonacine seule contrairement aux recommandations de l'AFSSA et des études sur des modèles d'ACGs devront être aussi effectuées.

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux études quantitatives et qualitatives des extraits de différents produits puis dans une seconde partie biologique, nous nous intéresserons aux différentes études pharmacocinétiques effectuées au cours de cette thèse.

Chapitre 3 : Généralités sur la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) est la technique d'analyse structurale et quantitative majoritairement utilisée au cours de cette thèse. Durant ce chapitre, nous verrons succinctement les principes et les avantages des spectromètres utilisés historiquement dans l'analyse des acétogénines ainsi que les spectromètres utilisés au cours de cette thèse.

La grande majorité de ces études a été effectuée au sein de l'équipe de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) au CNRS à Gif-sur-Yvette.

1. Généralités

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de mesurer le rapport masse-sur-charge (m/z) d'espèces ioniques en phase gazeuse. Cette technique est une méthode destructrice. L'échantillon ne peut être retrouvé après l'analyse. Elle s'adresse, non pas aux espèces moléculaires, mais aux entités ioniques qui en proviennent. Il en résulte la nécessité d'une étape préliminaire d'ionisation avant toute analyse.

Un spectromètre de masse est composé de quatre parties : la source d'ionisation permettant le passage en phase gazeuse de l'échantillon (s'il ne l'est pas déjà) ainsi que son ionisation ; un ou plusieurs analyseur(s) permettant la séparation des ions issus de la source, selon leur rapport (m/z) ; le détecteur mesurant l'intensité de chaque espèce, enfin un matériel informatique permettant le traitement du signal et l'obtention d'un spectre de masse (Figure 44). Ce spectre représente l'intensité du signal en fonction du rapport m/z .

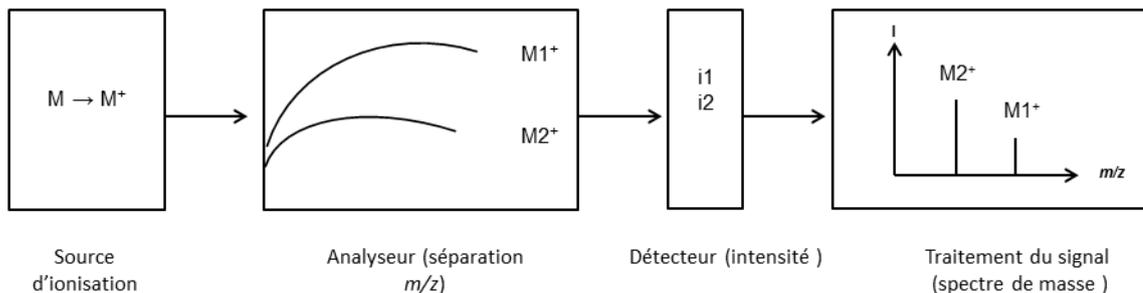


Figure 44 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse

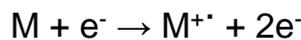
2. Source d'ionisation

Les méthodes de transformation des molécules de leur état naturel en ions à l'état gazeux constituent un axe de recherche important pour permettre l'analyse d'un grand nombre de composés.

2.1 Ionisation électronique

Historiquement, la première source d'ionisation est l'ionisation électronique (IE) [Bleakney W. 1929, Nier A.O. 1947]. Elle est toujours très répandue et elle est l'interface de choix pour le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse.

Les molécules en phase gazeuse composant l'échantillon sont bombardées par des électrons possédant une énergie cinétique relativement élevée (généralement 70 eV), émis par un filament chauffé. Au contact de la molécule, ces électrons produisent un radical cation, nommé ion moléculaire en mode d'ionisation positif (Équation 1). Cette technique peut être aussi utilisée en mode d'ionisation négative.



Équation 1: Formation d'ion moléculaire par IE en mode positif

M : molécule à analyser ; M⁺ Ion moléculaire°

Cette technique d'ionisation procure d'excellents résultats pour un grand nombre de molécules volatiles, certains produits peu volatils devant être chauffés pour permettre la vaporisation. L'IE induit une fragmentation intense de telle sorte que l'ion moléculaire n'est pas toujours observé. Les ruptures de liaison sont fréquentes, reproductibles et caractéristiques du composé.

2.2 Bombardement d'atomes rapides

La technique FAB (*Fast-Atom Bombardement*) utilise des particules d'argon (ou de xénon) précédemment ionisées et accélérées de 2 à 10 keV pour bombarder les échantillons dissouts dans une solution de faible tension de vapeur [Barber M. 1981]. L'impact de ce faisceau primaire de particules accélérées sur la solution cible conduit à la désorption d'ions secondaires caractéristiques du mélange solution/substrat (Figure 45). Les solutions typiquement utilisées sont le glycérol, le thioglycérol ou l'alcool *mé*ta-nitrobenzylique (NBA).

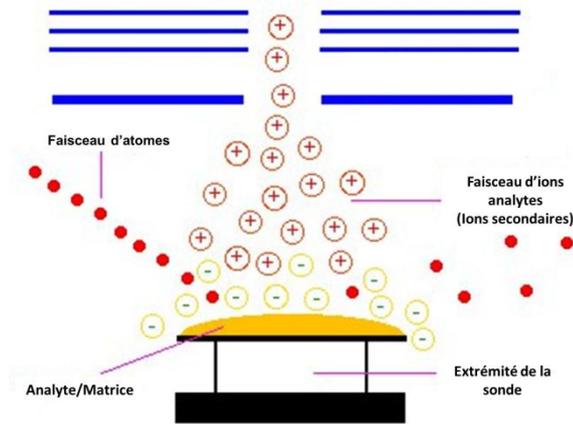
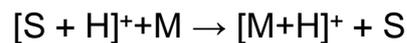


Figure 45 : Ionisation par FAB

Les ions secondaires formés sont issus de l'analyte aussi bien que de la matrice. Il s'agit de recombinaisons ion/ion ou ion/électron, et de réactions ion/molécule, parmi lesquelles la réaction de transfert de proton de matrice (S) à la molécule M (Équation 2).



Équation 2 : Transfert du proton de la matrice (S) à la molécule à analyser (M)

Cette technique produit des ions principalement monochargés, de type $[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$ en mode d'ionisation positif et de type $[M-H]^-$ en mode d'ionisation négatif. L'addition de sels alcalins permet souvent d'améliorer le rendement d'ionisation grâce à la formation de complexes stables, dénommés molécules cationisées, par exemple : $[M+Li]^+$.

Du fait de la physicochimie des matrices, le FAB ne s'applique pas efficacement aux substances polaires. Il est habituellement utilisé pour l'analyse de grosses molécules non volatiles, en particulier pour déterminer leur masse moléculaire. L'inconvénient majeur du FAB est la présence d'un taux élevé d'ions générés par la matrice, qui limitent la sensibilité et peuvent masquer les signaux des ions.

Les ions formés ont souvent très peu d'excès d'énergie interne, faisant du FAB une méthode d'ionisation douce. Les réactions de fragmentation sont alors très limitées contrairement à l'IE. Les pics des molécules intactes sont généralement les pics visibles sur le spectre de masse.

2.3 Désorption/Ionisation laser assistée par matrice MALDI

Le MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), est une technique initialement inventée par Tanaka en 1987 utilisant des matrices de type sels métalliques pour l'analyse de molécules à haut poids moléculaires [Tanaka K. 1987]. Cette technique a été améliorée par Karas et Hillenkamp en 1987 en utilisant des matrices organiques [Karas M. 1987]. Le développement de cette technologie a permis à ces trois inventeurs de partager le prix Nobel de chimie en 2002.

Le MALDI utilise un faisceau laser pulsé qui irradie l'échantillon co-cristallisé avec une matrice organique. Un large excès de matrice (acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique, acide 2,5-

dihydroxybenzoïque ou d'acide sinapinique) est mélangé à l'échantillon. Ce mélange est déposé sur une cible métallique sur laquelle il co-cristallise avant son analyse. Cette étape comme le choix de la matrice et le protocole de préparation de l'échantillon sont les plus importantes lors d'une analyse MALDI. En effet, ces facteurs influencent la bonne formation des cristaux constitués de la matrice et des molécules analysées et conditionnent par conséquent la formation des ions.

L'échantillon est ensuite soumis à un tir laser néodyme/yttrium-aluminium-grenat (Nd/YAG) émettant à $\lambda = 355$ nm (spectromètre utilisé lors de nos études). La matrice absorbe l'énergie transmise par le laser et subit une excitation électronique et thermique provoquant son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'analyte.

Le mécanisme d'ionisation n'est pas complètement connu. Celui le plus largement admis impliquerait la formation des ions soit avant désorption en phase solide, soit dans le panache d'expansion en phase gazeuse entre la matrice photoexcitée et la substance analysée formant des ions mono ou multichargés de type $[M+nH]^{n+}$. Néanmoins, la majorité des ions observés en MALDI sont des ions mono-chargés de type $[M+H]^+$ [Knochenmuss R. 2000, Karas M. 2000].

C'est une méthode d'ionisation douce : la matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident. Généralement, les spectres obtenus en MALDI présentent majoritairement des espèces moléculaires monochargées $[M+H]^+$. Quelques ions multi-chargés $[M+nH]^{n+}$, quelques multimères et une faible fragmentation peuvent aussi être observés. Des molécules cationisées par le sodium ($[M+Na]^+$) ou le lithium ($[M+Li]^+$) peuvent également être formées. En raison de la simplicité des spectres, des mélanges complexes peuvent être facilement analysés. Cependant, les isomères (composés de même formule brute) de polarités différentes ne peuvent pas être distingués.

Cette source permet l'analyse de molécules de hauts poids moléculaire comme les biopolymères (peptides, protéines, oligonucléotides...) et les polymères synthétiques mais aussi les petites molécules avec une préparation d'échantillon rapide et une mise en œuvre simple.

De plus, l'ionisation MALDI étant de type pulsée, elle produit des paquets d'ions successifs dans de très courts laps de temps. Elle est très souvent couplée à un analyseur à temps de vol (TOF pour *Time-of-Flight*).

2.4 Electrospray

L'électronébullisation ou « *ElectroSpray ionization* » (ESI) est la technique d'ionisation la plus répandue depuis la fin des années 90. Elle a été développée par John Bennett Fenn qui a publié la première description en 1984 [Fenn J.B 1989]. Il a partagé le prix Nobel de Chimie en 2002 avec Tanaka K. et K. Wüthrich.

L'ESI repose sur l'application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique (3 à 6 kV) sur une solution du composé à analyser traversant un tube capillaire à faible débit (souvent de 1 à 100 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). Le champ électrique est obtenu par une différence de potentiel entre le capillaire et la contre-électrode. Cette différence de potentiel provoque une accumulation des charges à la surface du liquide à l'extrémité du capillaire, formant des gouttelettes naissantes, constituées de molécules de solvant et d'analytes. Le liquide à l'extrémité du capillaire s'allonge sous la pression des charges accumulées et forment le « cône de Taylor ».

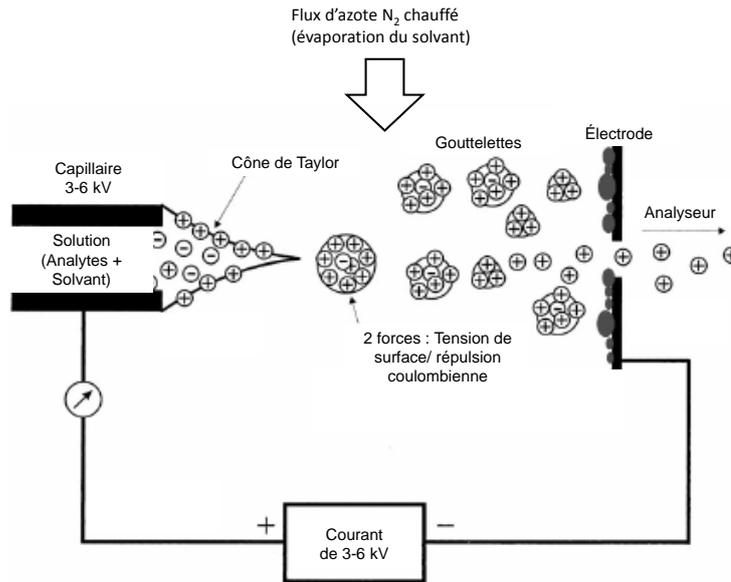


Figure 46: Principe d'ionisation par électrospray

L'évaporation du solvant dans la source, par un flux d'azote chauffé, conduit à une diminution de la taille des gouttelettes et donc à l'augmentation de la densité de charges au sein de celles-ci. Lorsque la force de répulsion coulombienne devient supérieure à la tension de surface de la gouttelette, celle-ci explose et forme des gouttelettes de seconde génération ayant un diamètre plus faible (Figure 46).

Le mécanisme d'ionisation n'est pas totalement résolu et deux modèles semblent intéressants pour expliquer ces phénomènes :

- le modèle de la charge résiduelle plus spécifique à la production de macromolécules chargées : les explosions coulombiennes se poursuivent jusqu'à élimination complète du solvant. L'ion se retrouve alors totalement désolvaté en phase gazeuse [Dole M. 1968].
- Le modèle d'évaporation ionique plus spécifique aux petites molécules : après une série d'explosions coulombiennes, la taille des gouttelettes est suffisamment faible pour que des ions puissent être directement émis par désorption de champ [Iribarne J.V. 1976].

Cette technique peut être utilisée dans les deux polarités d'ionisation. Les molécules vont ainsi se charger en fonction de leur affinité pour les protons et les métaux alcalins. Les ions rencontrés sont le plus souvent de type $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ en mode d'ionisation positive et $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ en mode d'ionisation négatif. En outre, l'ESI permet également de former des ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$.

Les solvants les plus utilisés sont l'eau, le méthanol ou l'acétonitrile, purs ou en mélange. Plus la tension de surface du solvant est élevée, plus le champ électrique nécessaire pour initier les processus est important. L'utilisation de solvant procure un avantage majeur à l'ESI : sa compatibilité avec les méthodes séparatives que sont la CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) et l'UPLC (Chromatographie Liquide Ultra Performance). Ce couplage peut être très intéressant pour travailler sur des mélanges complexes car il permet de séparer au préalable les différentes molécules voire les différents isomères en fonction de leur hydrophobicité.

Initialement, l'ESI a été appliquée à l'analyse des protéines puis à d'autres polymères et biopolymères mais également aux petites molécules polaires ou fragiles.

L'ESI une technique d'ionisation douce : la désolvatation est progressive et la plupart du temps, peu de fragments sont détectés. Au cours de cette thèse, l'ESI a été couplée à de nombreux analyseurs tels que le simple quadripôle, le triple quadripôle, l'Orbitrap® et le piège à ions.

2.5 Résumé des sources d'ionisation

Les différentes sources d'ionisation permettent de travailler sur un large éventail de molécules. Avant toute analyse, il faut cependant choisir la source adaptée aux molécules d'intérêt. Dans le tableau ci-dessous (Tableau 24) est présenté un résumé des méthodes détaillées précédemment.

Source	Type d'ionisation	Aspect des spectres	Application
IE	forte	fragments ; peu ou pas de pics moléculaires $[M]^{+}$	produits volatils
FAB	douce	$[M+H]^+$; $[M+Na]^+$; $[M+Li]^+$; $[M-H]^-$ + ions générés par la matrice	haut poids moléculaire; apolaires
MALDI	douce	$[M+H]^+$; $[M+Na]^+$; $[M+Li]^+$; $[M-H]^-$ minoritaire $[M+nH]^{n+}$ multimères ; faibles fragmentations	haut poids moléculaire; apolaires
ESI	douce	$[M+H]^+$; $[M+Na]^+$; $[M+Li]^+$; $[M-H]^-$; $[M+nH]^{n+}$; $[M-nH]^{n-}$	haut poids moléculaire; polaires et apolaires, couplage CLHP, UPLC

Tableau 24 : Source d'ionisation et application

3. Analyseurs

Les analyseurs permettent de séparer les ions obtenus en phase gazeuse, selon leur rapport masse-sur-charge (m/z).

À l'intérieur de la source, les molécules sont converties en ions qui possèdent z charges positives ou négatives ($z \geq 1$). Le faisceau ionique est ensuite dirigé vers l'analyseur de masse. Dans cette région, il est focalisé par des champs électrostatiques et/ou magnétiques, puis les ions sont séparés selon leur rapport m/z .

Les cinq principales qualités d'un analyseur en masse sont :

- la gamme de masse qui détermine les valeurs m/z minimum et maximum mesurables. Elle est exprimée en Thomson (Th), ou en unités de masse (u) pour un ion monochargé ($z = 1$).
- la vitesse d'analyse ou vitesse de balayage, correspond au domaine de masse mesurable par unité de temps. Elle est exprimée en unité de masse par seconde ou milliseconde ($u.s^{-1}$ ou $u.ms^{-1}$). Pour l'analyseur TOF, elle est exprimée en spectre. s^{-1} .
- la transmission est le rapport entre le nombre d'ion arrivant au détecteur et celui entrant dans l'analyseur
- l'exactitude en masse qui détermine la précision des rapports m/z mesurés. Elle dépend de la stabilité et du pouvoir de résolution de l'analyseur et est exprimée en pour cent (%) ou le plus souvent en partie par million (ppm), ce qui, au sens strict, correspond à un rapport de 10^{-6} entre la masse théorique et la masse calculée.

- la résolution en masse est la capacité d'un analyseur de distinguer des signaux voisins et aussi à obtenir des pics fins. Elle est décrite par la formule $R = M/\Delta M$, et se définit donc pour une valeur de M donnée et un ΔM défini par la largeur à mi-hauteur du pic de masse, et est exprimée en ppm.

3.1 Hybrides magnétiques et électrostatiques

Dans un spectromètre de masse à secteur magnétique, le champ magnétique dévie circulairement la trajectoire des ions et sépare les ions sur la base de leur moment cinétique, soit le produit de la masse par la vitesse. En conséquence, des ions de même masse mais d'énergies différentes seront focalisés en des points différents. Pour améliorer cette analyse, un analyseur électrostatique peut être associé à l'analyseur magnétique. Celui-ci peut considérablement réduire la distribution d'énergie du faisceau d'ions en forçant les ions de même charge (z) et d'énergie cinétique différentes à suivre la même trajectoire.

En conclusion, la combinaison d'un secteur magnétique et d'un analyseur électrostatique, appelée double focalisation, contrecarrent les effets dispersifs de chacun sur la direction et la vitesse et améliore les performances du spectromètre.

La résolution d'un appareil à secteur magnétique à double focalisation peut atteindre 100 000. Cette résolution permet la mesure de « masses exactes ».

3.2 Quadripôle

Le quadripôle est un analyseur de masse très employé et moins encombrant qu'un appareil à secteur magnétique.

Le quadripôle peut se présenter comme un filtre de masse réglable. Il se compose de quatre barres de section hyperbolique, parallèles entre elles. Les barres opposées sont connectées entre elles et une tension continue, modulée en radiofréquence (RF) est appliquée à chaque couple de barres avec un décalage de phase de 180°.

Les ions sont introduits au centre d'une extrémité du tunnel formé par les quatre barres et se déplacent le long de l'axe. La tension RF fait alors osciller les ions perpendiculairement à l'axe du quadripôle. Les ions se déplacent dans le champ quadripolaire selon une trajectoire définie par les équations différentielles de Mathieu (Figure 47).

$\frac{d^2 u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0$ <p>Avec</p> $u = x \text{ ou } z ; \quad \xi = \frac{\omega t}{2}$ $a = \frac{8zeU}{mr_0^2 \omega^2} ; \quad q = \frac{4zeV}{mr_0^2 \omega^2}$	a_u et q_u sont les solutions de l'équation différentielle m est la masse de l'ion ze est la charge électronique de l'ion r_0 est le rayon du cercle inscrit entre les 4 barres ω est la fréquence de la composante angulaire RF U est la valeur de la composante continue V est l'amplitude de la composante RF
---	---

Figure 47 : Équations différentielles de Mathieu

Pour chaque combinaison de tension continue et de fréquence appropriée, seuls les ions d'un m/z donné ont une trajectoire stable et donc traversent le quadripôle pour atteindre le détecteur. Les autres ions ayant des m/z différents ont des trajectoires instables et percutent alors un des barreaux ou sortent du quadripôle (Figure 48).

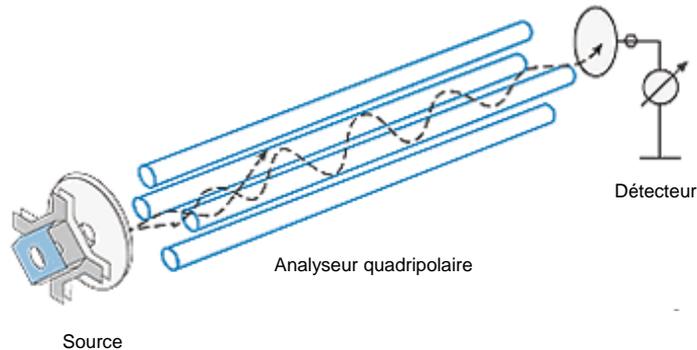


Figure 48 : Principe de l'analyseur quadripolaire

En pratique trois modes de balayage sont utilisés :

- un mode de type *scan* : les tensions continue et alternatives sont augmentées progressivement en maintenant leur rapport constant. Le filtrage est réalisé très rapidement permettant d'obtenir l'intégralité de la gamme de masse en moins d'une seconde.
- un mode « *RF only* », la tension continue est nulle. Tous les ions sont alors transmis et permet d'utiliser le quadripôle comme un simple guide d'ion.
- un mode *SIM* « *Single Ion Monitoring* » : la tension et la radiofréquence sont constantes, un seul rapport m/z peut être transmis, permettant d'analyser une seule masse.

Les performances d'un quadripôle en termes d'analyse structurale sont assez limitées. Du point de vue de la résolution et de la précision en masse, le quadripôle est inférieur au secteur magnétique. La précision en masse demeure insuffisante (50 à 100 ppm) pour déterminer des compositions élémentaires. En revanche, la sensibilité est généralement très élevée en mode SIM.

3.3 Piège ionique quadripolaire

Les aspects et les fonctionnements du piège ionique quadripolaire et du quadripôle sont liés, permettant de considérer le piège à ions comme une variante du quadripôle. Il existe deux types de pièges ioniques : les pièges à ions (3D) et les pièges linéaires (2D).

3.3.1 Piège à ions 3D

Il se compose généralement de trois électrodes, l'une annulaire de face interne hyperbolique et les deux autres en forme de calotte sphérique couvrant la première appelée électrodes chapeaux.

La superposition de tensions continues et alternatives permet d'obtenir une sorte de « quadripôle à trois dimensions » dans lequel les ions sont gardés captifs sur une trajectoire très complexe appelée courbe de Lissajous (Figure 49).

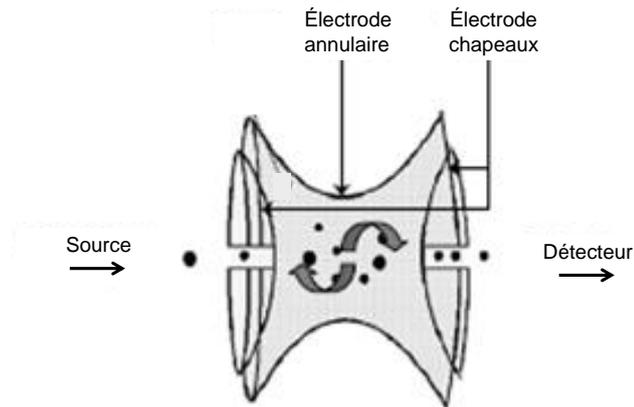


Figure 49 : Principe du piège ionique 3D

Les deux modes de type *scan* et *SIM* sont aussi utilisés pour l'analyse des échantillons. Cependant, le principe est différent du quadripôle car ici les ions des différentes masses sont présents simultanément dans le piège et ils seront expulsés en fonction de leur masse pour obtenir le spectre.

Les avantages du piège 3D est son coût modéré, sa haute sensibilité ; cependant la résolution est limitée. Le plus souvent, ces analyseurs sont utilisés à une résolution unitaire ; cela signifie que les rapports m/z des ions sont donnés sans chiffre après la virgule.

3.3.2 Pièges linéaires (piège 2D)

Le piège linéaire associe les deux principes du piège 3D et du quadripôle. En effet, l'analyseur est composé de quatre barres d'un quadripôle fermé par des électrodes d'entrée et de sortie permettant de repousser les ions vers l'intérieur du quadripôle, en appliquant des tensions positives pour piéger les ions positifs et inversement en appliquant des tensions continues négatives pour piéger les ions négatifs. Si les tensions appliquées sont symétriques, les ions seront comprimés en centre du piège. Un voltage asymétrique permet de les accumuler à l'une ou l'autre des extrémités du piège.

Un grand avantage du piège linéaire est d'accepter beaucoup plus d'ions que le piège 3D, permettant une augmentation nette de la sensibilité.

Deux modes d'éjection des ions existent : l'éjection axiale et l'éjection radiale. Ces deux types d'éjection sont très intéressants lorsque ce piège est associé en tandem avec un Orbitrap® (Figure 50).

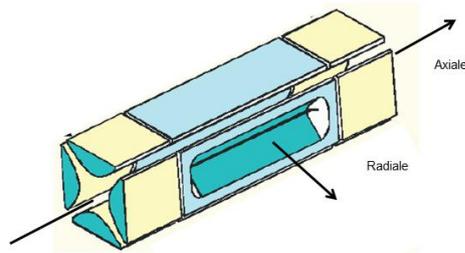


Figure 50 : Modes d'éjections par un piège 2D

L'éjection axiale couplée à un Orbitrap[®] permet des analyses longues mais à haute résolution. L'éjection radiale permet des temps d'analyses plus courts mais de basse résolution car les ions seront soumis au détecteur du piège linéaire.

3.4 Orbitrap[®]

Le piège électrostatique Orbitrap[®] est constitué de deux électrodes. La première extérieure est en forme de tonneau, coupée en deux parties égales et séparées par un espace étroit. La seconde électrode centrale a la forme d'un fuseau. Les molécules ionisées sont injectées tangentiellement, à une énergie cinétique de quelques keV, par l'espace séparant les deux moitiés de l'électrode externe. Sous l'effet des tensions continues appliquées aux électrodes, les ions se mettent à tourner autour de l'électrode centrale tout en oscillant latéralement dans un mouvement périodique de va et vient suivant l'axe z (Figure 51). Cette oscillation dépend seulement du rapport m/z en amplitude et en fréquence.

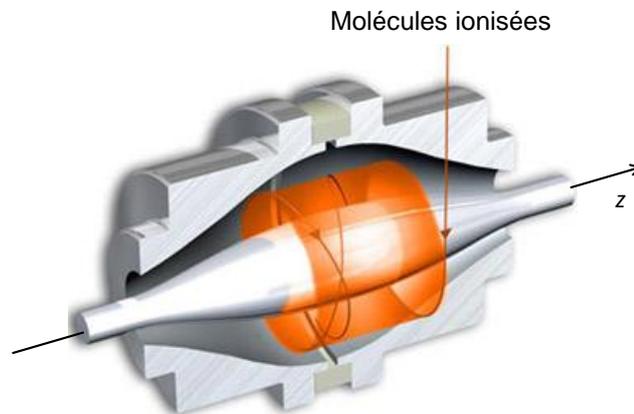


Figure 51 : Orbitrap[®]

Le courant large bande induit par ces ions est mesuré de manière différentielle entre les deux moitiés de l'électrode externe. Celui-ci est amplifié et converti par la méthode de la transformée de Fourier en fréquences et en intensités permettant d'obtenir le spectre de masse.

La précision des mesures de m/z est particulièrement bonne (1-2 ppm) et la résolution peut atteindre 100 000.

3.5 Temps de vol

L'analyseur à temps de vol (TOF : *Time-of-Flight*) est un analyseur séparant les ions en fonction de leur vitesse. Le temps mis par un ion pour parcourir une distance donnée dans un tube sous vide poussé est directement dépendant du rapport m/z .

Les ions sont expulsés de la source par paquets puis sont accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction (tension accélératrice 10-25 kV). Une fois accélérés, les ions entrent dans le tube de vol (de longueur 1 à 3 m en général), sous aucun champ électrique ni magnétique. Les ions se séparent dans ce tube en fonction de la vitesse acquise dans la zone d'accélération, avant d'atteindre le détecteur placé à son autre extrémité. Le rapport m/z est donné pour une longueur de vol dans le tube et une tension accélératrice. Les ions de faible rapport m/z arriveront les premiers.

$$\frac{1}{2} m v^2 = zeV \quad v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \quad t = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \times L$$

Équation 3 : Temps de vol

Le spectre est obtenu en mesurant le signal enregistré par le détecteur comme une fonction temps/intensité pour chaque paquet d'ions détecté. Cependant, le pouvoir de résolution des analyseurs TOF est limité par différents facteurs : distribution d'énergie initiale, localisation des ions avant accélération, durée et distance d'accélération.

Le MALDI entraîne une forte dispersion en énergie initiale. Ceci a pour conséquence une dispersion du temps de départ des ions au niveau de la source et donc une diminution de la résolution en masse. Pour compenser cette dispersion, il a été imaginé de retarder l'extraction des ions de la source vers l'analyseur de quelques centaines de nanosecondes à quelques microsecondes (grille d'extraction). Un certain laps de temps après la formation des ions, une tension de quelques kilovolts sous forme d'une impulsion est appliquée pour extraire les ions et les envoyer vers la zone d'accélération. Les ions seront accélérés en deux temps : ils le seront d'abord faiblement permettant de réduire la dispersion spatiale, puis ils seront fortement accélérés avant d'être éjectés dans la région libre de champs. Plus cette vitesse d'éjection sera élevée, moins ils seront soumis à un fort potentiel. Ainsi, plus les ions auront une vitesse initiale élevée, moins ils seront accélérés, d'où un regroupement en temps à l'arrivée au détecteur.

En outre, l'utilisation d'un miroir électrostatique (réflectron) permet aussi de refocaliser des ions de même m/z mais d'énergie cinétique initiale différente afin d'améliorer la résolution (Figure 52).

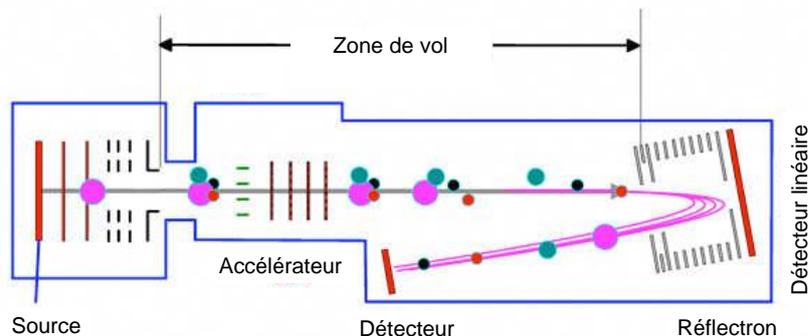


Figure 52 : TOF avec réflectron

Cet équipement est constitué d'un empilement d'électrodes circulaires portées à des potentiels croissants et de même polarité que les ions à analyser afin d'exercer un effet répulsif. Les ions possédant la plus grande vitesse pénètrent plus profondément dans le réflectron et leur trajet en sera rallongé par rapport à un ion de même m/z mais plus lent. Le paquet d'ions se trouve alors concentré et arrive dans un même plan sur le détecteur, ce qui améliore la résolution en masse.

3.6 Résumé des analyseurs

Comme pour les sources d'ionisation, le choix de l'analyseur dépend des analytes et du type d'analyse souhaitée (étude structurale, quantitative). Dans le tableau ci-dessous est présenté un résumé des avantages et inconvénients des différents analyseurs (Tableau 25).

Analyseur	Limite en masse (m/z)	Résolution à m/z 1000	Sensibilité en scan
Hybrides magnétiques/électrostatiques	15 000	100 000	Sensible
Quadripôle	5000	2000	Faible
Piège à ions 3D	5000	4000	Moyenne
Piège à ion 2D	5000	4000	Moyenne
Orbitrap®	4000	100 000	Grande
TOF-réflectron	Théoriquement illimité	20 000	Grande

Tableau 25 : Caractéristiques des analyseurs

4. Spectrométrie de masse en Tandem ou SM/SM

La spectrométrie de masse en tandem SM/SM, consiste le plus souvent en l'association de deux analyseurs au sein d'un même spectromètre de masse. Elle permet par des expériences de fragmentations d'obtenir des informations structurales plus détaillées que par la simple mesure d'un rapport m/z . L'utilisation d'un deuxième analyseur augmente également la sélectivité et la sensibilité de la détection.

Fondamentalement, un spectromètre de masse en tandem peut être conçu de deux manières : dans l'espace par couplage de deux instruments physiquement distincts (ex : TOF-TOF ; triple Quadripôle ou ZabSpec/T) ou au cours du temps en exécutant une séquence d'opérations appropriée dans un dispositif de stockage d'ions (ex : piège à ions).

La spectrométrie de masse tandem nécessite la fragmentation des ions précurseurs sélectionnés par le premier analyseur pour permettre au second analyseur d'analyser les ions produits. La réussite d'une expérience SM/SM nécessite qu'une partie significative de la population des ions précurseurs fragmente entre les deux étapes d'analyse.

Deux modes de dissociation ionique ont été utilisés lors de cette thèse :

- une décomposition induite par le processus d'ionisation lui-même : la décomposition spontanée métastable.

- une décomposition stimulée par excitation du précurseur : la dissociation par activation collisionnelle (CID/CAD).

4.1 Décompositions d'ions métastables

Selon le diagramme de Warhaftig et selon le temps de résidence des ions dans la source et leur temps de vol, les ions sortant de la source peuvent être scindés en trois catégories :

- les ions stables possédant un temps de vie supérieur à 10^{-6} s qui arriveront sans aucune fragmentation au détecteur.

- les ions instables possédant un temps de vie inférieur à 10^{-7} s qui en raison de leur énergie interne élevée, se fragmenteront avant de quitter la source et seuls les ions fragments seront détectés.

- les ions métastables possédant un temps de vie intermédiaire. Ces ions seront suffisamment stables pour être sélectionnés par le premier analyseur. Cependant, ils contiennent également un excès d'énergie suffisant pour permettre leur fragmentation avant d'être analysés par un second analyseur.

Les ions métastables peuvent être détectés dans un premier analyseur puis ceux-ci se fragmenteront. Des analyses des ions fragments pourront être effectuées dans un second analyseur. Malheureusement, ces ions sont souvent très peu nombreux et dépendant de l'énergie interne du précurseur. La plupart des méthodes d'ionisation présentées, ne communique pas assez d'énergie interne aux ions pour causer leur fragmentation.

L'apport d'une quantité d'énergie par collision avec un gaz neutre peut être un bon moyen de provoquer les réactions de dissociation.

4.2 Décomposition induite par collision (CID)

La technique d'activation la plus couramment utilisée est basée sur les collisions des ions à fragmenter avec un gaz neutre (He, Ar ou N_2). Cette technique de décomposition permet d'augmenter le nombre d'ions précurseurs se fragmentant dans la région de réaction ainsi que le nombre de voies de fragmentation. L'analyse structurale devient donc plus facile.

La technique la plus courante consiste à faire entrer en contact les ions accélérés à basse énergie (≤ 200 eV) ou haute énergie (1 à 10 keV) avec des molécules de gaz.

Les études à haute énergie permettent d'obtenir des spectres très reproductibles dus à des processus de fragmentation très spécifiques : les mécanismes de fragmentation à charges piégées. Celles-ci se produisent à distance de l'endroit où la charge est maintenue. Ces réactions se manifestent sur les spectres de collision d'acides gras par une série de pics séparés deux à deux de quatorze unités de masse. La basse énergie de collision permet en faisant varier l'énergie, d'obtenir différents processus de décomposition des ions et peut donc être intéressante en chimie structurale.

Pour obtenir une activation par collision dans les spectromètres de masse en tandem basés sur une séparation spatiale, une cellule de collision est disposée entre les deux analyseurs. Cette

cellule est constituée d'une simple chambre avec deux orifices pour l'entrée et la sortie des ions. Elle contient un gaz inerte à une pression suffisante pour permettre les collisions avec les analytes ionisés. Il existe aussi des spectromètres de masse en tandem basés sur une séparation temporelle, l'analyse des ions parents et l'étude des ions fragments sont effectuées dans la même enceinte (piège à ions).

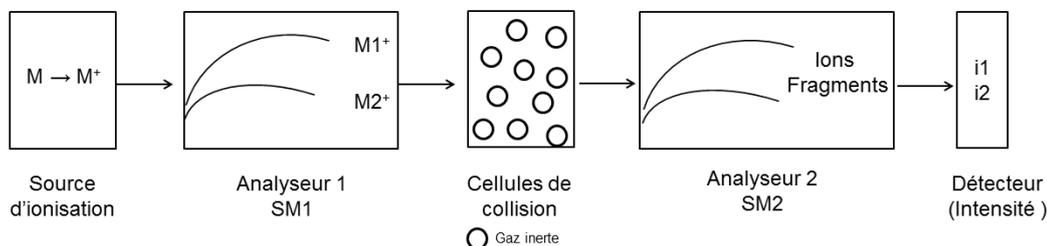


Figure 53 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse en tandem constitué de deux analyseurs

Plusieurs spectromètres ont été utilisés au cours de cette thèse en fonction des avantages et des inconvénients et de leurs disponibilités. Seront présentés ci-dessous chaque appareil avec l'utilisation qui en a été effectuée.

5. Appareils utilisés historiquement pour l'étude des acétogénines et appareils utilisés au cours de cette thèse

5.1 FAB ZabSpec/T

L'association source d'ionisation FAB avec un analyseur ZabSpec/T n'a pas été utilisée au cours de cette thèse. Cependant, cet appareil a été longtemps le spectromètre idéal pour permettre l'identification structurale des acétogénines.

Le ZabSpec/T était un instrument dit « à secteur » car il était constitué d'une alternance de secteurs électrostatiques et magnétiques. Plus précisément c'était un appareil tandem, c'est-à-dire résultant du couplage de deux spectromètres de masse. Le premier spectromètre (MS1) comportait trois champs : un électrostatique (E1), un magnétique (B1) et de nouveau un électrostatique (E2). Le second spectromètre (SM/SM) était constitué de deux secteurs : un secteur magnétique (B2) puis électrostatique (E3). Il a été souvent associé à l'ionisation par FAB. Ces deux secteurs étaient connectés par une cellule de collision.

Il permettait des fragmentations haute énergie et à charge piégée permettant d'obtenir une quantité non négligeable d'ions fragments. Cependant, la longueur du trajet dans de tels instruments constituent un paramètre limitant de la sensibilité. De plus, les appareils magnétiques sont de taille importante et d'utilisation très complexe. Ils ont été rapidement supplantés par de nouveaux analyseurs comme l'Orbitrap® et le TOF-TOF.

5.2 MALDI TOF-TOF

Les analyseurs TOF-TOF permettent des analyses SM/SM à haute énergie (≥ 1 keV). En pratique, ces analyseurs sont le plus souvent constitués d'un premier temps-de-vol permettant de

sélectionner une valeur de m/z , d'une cellule de collision et d'un second temps-de-vol permettant d'analyser les ions fragments.

Au cours de cette thèse, un MALDI TOF-TOF 4800 Plus (AB Sciex) a été utilisé pour des études structurales de produits purs. En effet, la source MALDI étant pulsée, un couplage en ligne avec un appareil chromatographique était impossible ou peu pratique.

5.3 CLHP-ESI-MSD

L'analyseur MSD1846D d'Agilent® est un simple quadripôle. Son association à une source electrospray permet de le coupler à une chaîne chromatographique et donc de séparer des mélanges complexes. Les analyses ont été effectuées en analyse « Full scan » et en recherchant sur le chromatogramme des ions d'intérêts. De plus, un quadripôle seul ne permet pas d'étude en tandem. Ce spectromètre a donc été utilisé pour effectuer les analyses nécessaires aux développements méthodologiques en catalyse biomimétique.

5.4 CLHP-ESI-piège ionique

L'analyseur Esquire-LC-Bruker® est un piège à ions 3D. Le manque de résolution de ce spectromètre a limité son utilisation. Grâce à son coupage CLHP-ESI, elle nous a néanmoins permis de mettre au point les études de métabolisation.

5.5 UPLC-ESI-TSQ Vantage

L'analyseur TSQ Vantage EMR de Thermo Electron® est un triple quadripôle (TQ). Il est constitué d'un assemblage de deux analyseurs de masse quadripolaires (Q1 et Q2) séparés par un autre quadripôle (Figure 54) fonctionnant en mode RF et étant utilisé seulement comme cellule de collision (Figure 54). Celle-ci peut en fonction des besoins, être remplie d'Ar à une pression de l'ordre de 1 mTorr.

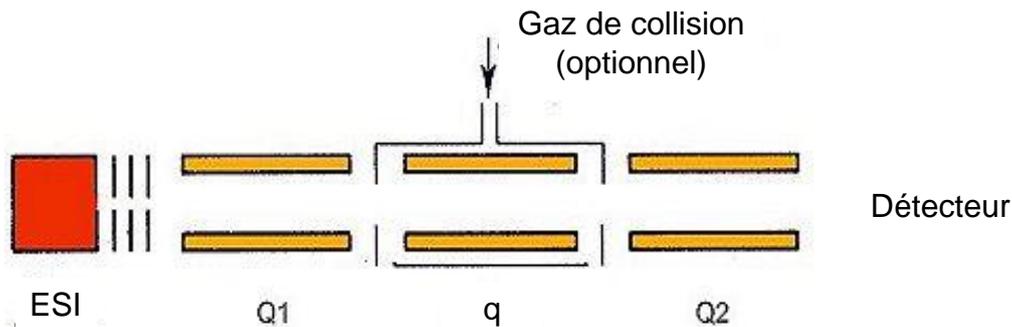


Figure 54 : Schéma d'un triple quadripôle

Un triple quadripôle permet différents modes d'étude des ions précurseurs et fragments.

Il peut bien sûr être utilisé en tant que simple quadripôle, afin d'analyser tous les ions de l'échantillon (Scan) ou de rechercher les masses des ions d'intérêt (SIM). Il peut également mettre en œuvre ses 3 quadripôles afin d'effectuer des analyses en spectrométrie de masse tandem. Il est alors principalement utilisé en mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*) à des fins de quantification. Néanmoins, d'autres modes de balayages sont disponibles tels que les modes de recherche de

précurseurs (*PIS : Precursor Ion Scan*) ou de pertes de neutres (*NLS : Neutral Loss Scan*) (Figure 55).

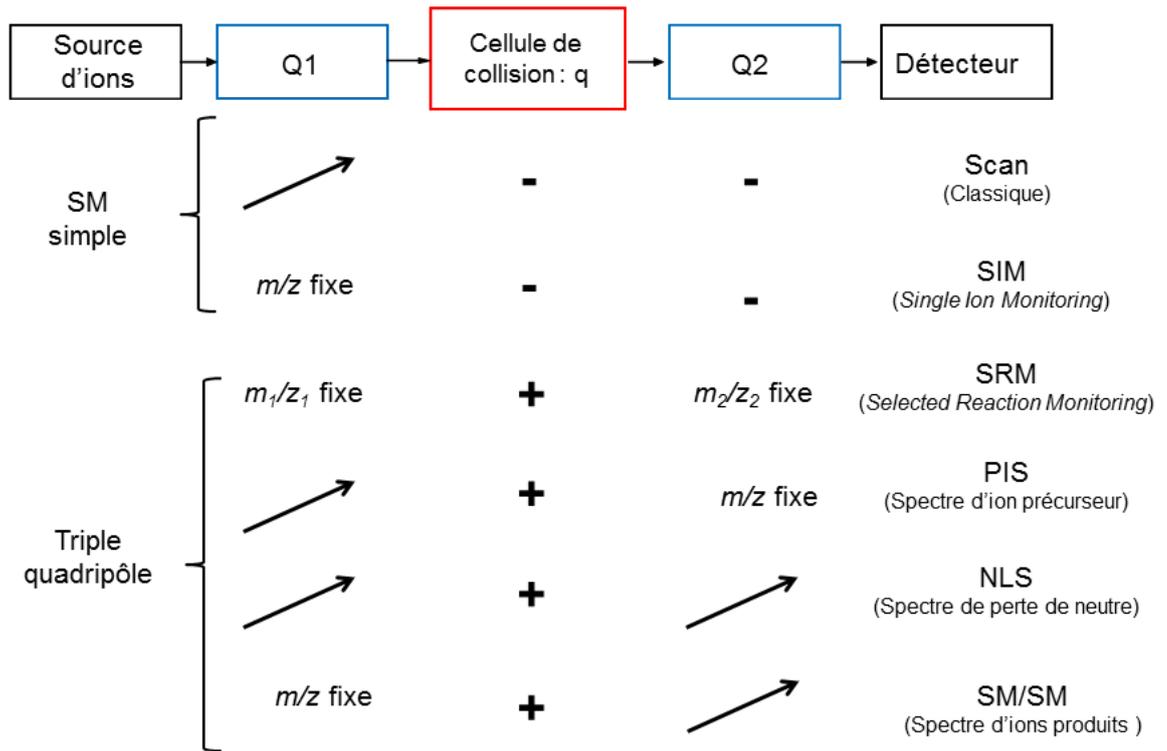


Figure 55 : Différents modes d'utilisations d'un triple quadripôle

Les fragmentations obtenus avec un TQ sont de type de basse énergie de collision. De plus, même s'il possède une gamme de masse relativement étendue pour un quadripôle (m/z 10 à 3000), la résolution reste faible.

Au cours de nos études, ce spectromètre a été couplé à une chaîne UPLC et une source ESI. Ce couplage permet des analyses très rapides de mélange complexe grâce à l'utilisation de colonne à faible diamètre de particules, avec une forte pression appliquée au cours de la séparation chromatographique. Les mélanges sont séparés plus efficacement et les temps d'analyses sont plus courts. De plus, en associant la vitesse d'analyse UPLC et la robustesse des TQ, ce couplage est l'instrument de choix pour la quantification de petites molécules.

Ainsi toutes les études quantitatives de passage de barrières, les études de bioconversion et les études de détermination de K_m et V_i ont-elles été effectuées grâce à cet appareil.

5.6 CLHP-ESI-LTQ- Orbitrap®

L'analyseur tandem LTQ-Orbitrap® est composé d'un piège linéaire; d'une C-trappe et un Orbitrap®. La C-trappe permet de focaliser les ions avant leur introduction dans l'Orbitrap® (Figure 56).

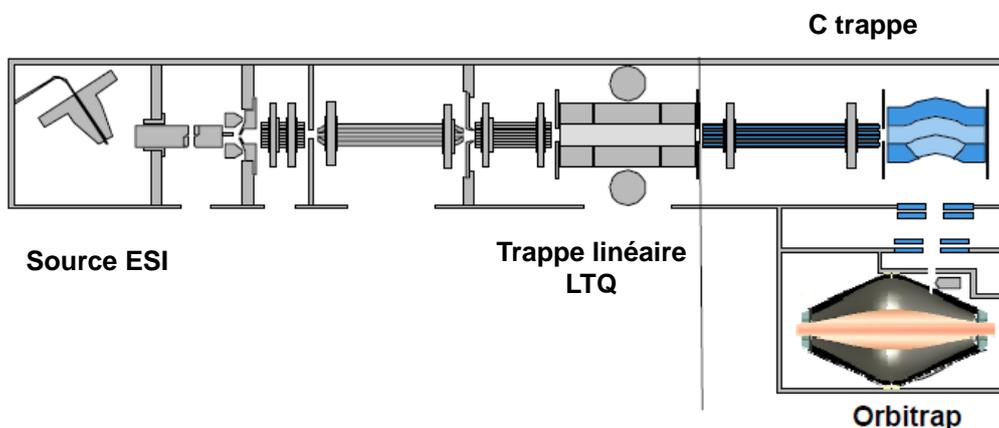


Figure 56 : ESI-LTQ-Orbitrap®

Le piège linéaire est très intéressant pour les études structurales à basse énergie de collision (1 à 100 eV). Il peut être utilisé pour obtenir des spectres de fragmentation d'ions sélectionnés sur plusieurs générations (SMⁿ). Ces fragmentations se font au sein même du piège SM/SM.

En effet, on peut expulser les ions sans intérêt et laisser se fragmenter les ions sélectionnés avec ou sans excitation. Les ions produits sont soit directement analysés, soit les fragmentations peuvent être réitérées permettant d'obtenir des fragments de générations ultérieures (SMⁿ). Après, ces fragmentations, les ions sont soit éjectés de façon radiale soit de façon axiale (Figure 50).

Si le mode d'éjection est axial, les ions sélectionnés arrivent au niveau de l'Orbitrap® en passant par la C-trappe. L'analyse de ces ions par l'Orbitrap® permet d'obtenir une mesure de masse avec une haute résolution et par conséquent une détermination de la formule brute avec une précision inférieure à 2 ppm.

L'éjection radiale se fait au travers des fentes creusées dans deux barres opposées. Elle permet d'éviter une perte de sensibilité en diminuant le trajet des ions au détecteur ou de diminuer le temps d'analyse lors des études de scan n'ayant pas besoin de haute résolution. En effet, le temps de balayage sur un piège linéaire est plus rapide que le temps de balayage d'un Orbitrap®.

Lors de nos études, ce spectromètre a été utilisé en couplage avec une CLHP permettant l'étude structurale de mélanges complexes en vue de la déréplication de nombreux extraits de produits commerciaux d'*A. muricata* ainsi que des extraits issus des expériences de métabolisation de l'annonacine.

Résumé

Plusieurs spectromètres ont donc été utilisés au cours de cette thèse. Dans le tableau ci-dessous est présenté un résumé de leurs utilisations permettant de plus facilement suivre les différentes études effectuées au cours de cette thèse (Tableau 26). Les conditions de chromatographie et d'analyse employées avec ces différents appareils sont désignés dans la partie matériel et méthodes par des chiffres romains.

Spectromètre	Avantages	Inconvénient	Utilisation	Situation
FAB-ZabSpec/T	Fragmentation haute énergie	Indisponible	Études structurales	-
MALDI-TOF-TOF (III)	Fragmentation haute énergie	Couplage impossible	Études structurales sur produit purs	Équipe de spectrométrie de masse, ICSN, Gif-sur-Yvette
CLHP-ESI-MSD (IV)	Couplage SIM SCAN	Pas de SM/SM	Méthodologie de synthèse catalyse biomimétique	Laboratoire de pharmacognosie
CLHP-ESI-piège-ionique (V)	Couplage SIM SCAN	Manque de robustesse Pas de haute résolution	Mise au point en métabolisation	Service d'analyse des médicaments et métabolites (SAMB), Châtenay Malabry
UPLC-ESI-TQ-Vantage (VI)	Robustesse Analyse SRM	Pas de haute résolution	Étude quantitative (km, Vi, Passage de barrières)	Équipe de spectrométrie de masse, ICSN, Gif-sur-Yvette
CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap (VII)	Haute résolution Fragmentation SM ⁿ	Analyse longue : difficulté de couplage en UPLC	Déréplication Analyse structurale des métabolites	Équipe de spectrométrie de masse, ICSN, Gif-sur-Yvette

Tableau 26 : Spectromètres utilisés dans cette thèse

Chapitre 4 : Étude phytochimique et dérégulation

1. Obtention de l'annonacine : extraction et purification d'annonacine à partir d'un nectar

Pour permettre les études biologiques et phytochimiques de cette thèse, un lot de 30 kg de pulpe d'*Annona muricata* a été extrait et purifié pour obtenir une quantité suffisante d'annonacine. Après vérification du fait que l'acétogénine majoritaire du nectar était l'annonacine, des études préliminaires permettant l'optimisation de son extraction ont été effectuées : choix des solvants (condition de lavage, dégraissage et d'extraction). Après chaque extraction de mise au point une analyse en CLPH-UV analytique a été effectuée pour vérifier la perte potentielle d'annonacine.

1.1 Extraction sur le nectar

Yazid KHALED KHODJA, stagiaire de master 1, que j'ai encadré, a traité les 30 kg de pulpe de corossol provenant du Brésil produite industriellement (Figure 57). Elle était composée de 68 % d'eau. Elle a donc été centrifugée. Le culot a subi une extraction solide-liquide par le cyclohexane. Le marc obtenu par filtration a subi une deuxième extraction à l'acétate d'éthyle suivie d'une filtration et d'une évaporation. L'extrait acétate d'éthyle a été dissout dans un mélange et soumis à une partition liquide-liquide H₂O / MeOH / cyclohexane. Après évaporation de la phase polaire, on obtient 67,63 g d'un extrait brun, présentant une réaction de Kedde positive.

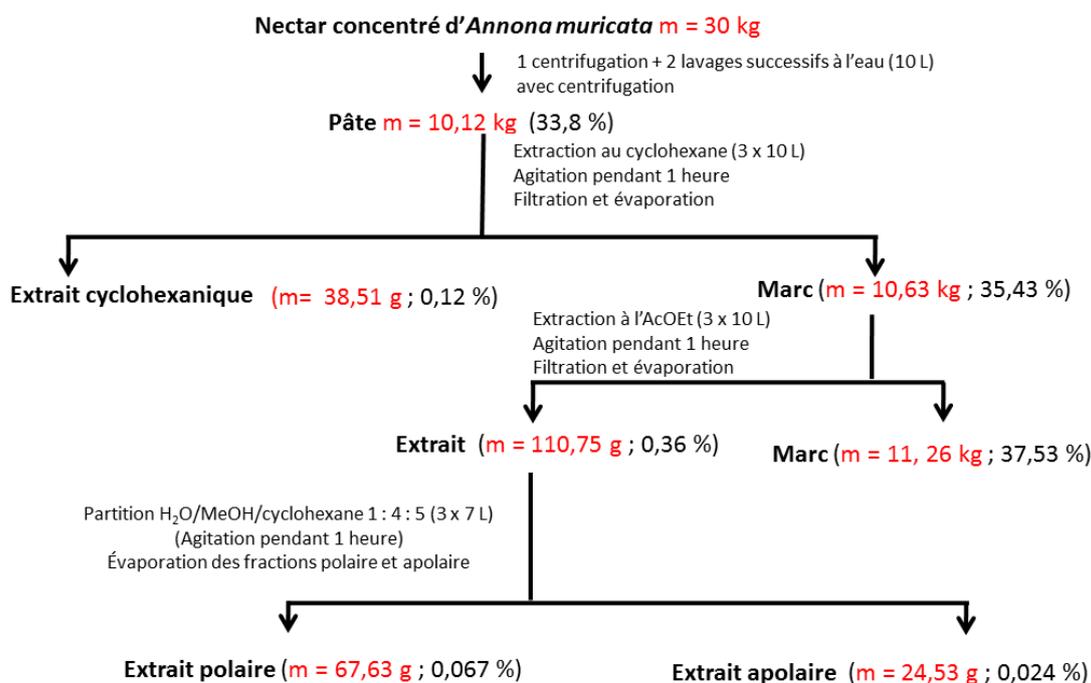


Figure 57 : Extraction d'annonacine à partir d'un nectar commercial

1.2 Purification de l'extrait polaire

Le contre-extrait polaire obtenu est chromatographié sur colonne (CC) "flash" de gel de silice en utilisant comme phase mobile le système de gradient suivant : CH₂Cl₂ / MeOH 97 : 3, CH₂Cl₂ / MeOH 95 : 5, CH₂Cl₂/MeOH 93 : 7, CH₂Cl₂ / MeOH 90 : 10 (Figure 58). Après analyse des éluats et rassemblement selon leur profil en CCM, les deux avant-dernières fractions (F₆ et F₇) sont rassemblées et purifiées sur CC flash de gel de silice en mode isocratique CH₂Cl₂ / MeOH / Isopropanol 80 : 17 : 3. Seulement deux fractions Kedde positive (F_{6-7/6} et F_{6-7/7}) de masses respectives 1,8 et de 4,7 g ont été obtenues. L'analyse CLHP-UV, montre qu'elles contenaient toutes les deux de l'annonacine.

La fraction F_{6-7/7} a été chromatographiée sur CC de gel de silice flash, avec un gradient acétate d'éthyle / MeOH. Deux fractions F_{6-7/7/7} et F_{6-7/7/8} (1,6 mg et 760 mg) contenant de l'annonacine ont été collectées. Ces 2 fractions et la fraction obtenue F_{6-7/6} ont été purifiées par CLHP préparative. Une première élution isocratique (MeOH / H₂O) 82 : 18 a permis de dégrossir l'extrait. Une seconde CLHP préparative (isocratique ACN / H₂O) 70 : 30, nous a permis d'obtenir 421 mg d'annonacine (R = 1,4.10⁻³ % par rapport au nectar).

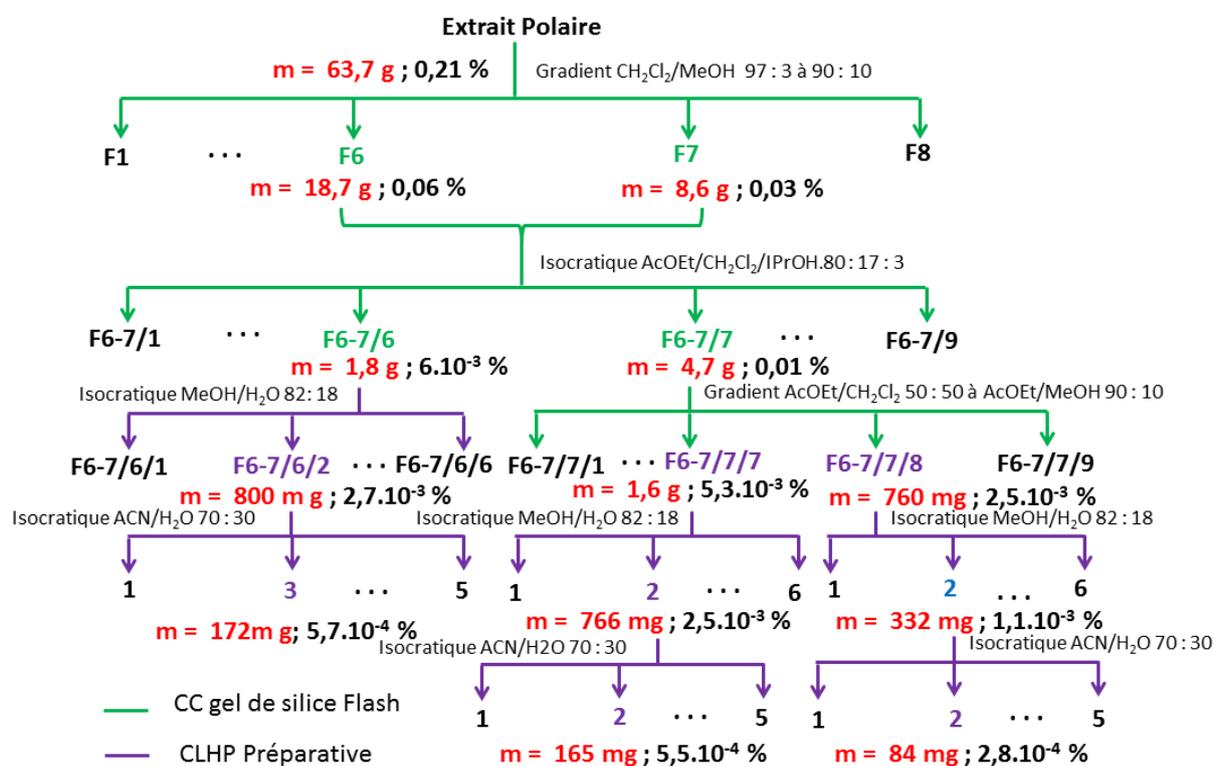


Figure 58 : Purification de l'annonacine à partir de l'extrait polaire

1.3 Identification structurale de l'annonacine

L'identification de l'annonacine a été effectuée par les analyses spectrales habituelles. On observe un pic maximum d'absorption $\lambda = 210$ nm en UV. Le spectre de masse haute résolution en électrospray (HRESI) montre un pic moléculaire à m/z 619,4537 donnant pour formule brute $C_{35}H_{64}O_7Na$ ($\Delta ppm = 1,2$).

La présence d'une γ -méthyl- γ -lactone α,β -insaturée est mise en évidence par une réaction de Kedde positive et par une absorption IR à 1740 cm^{-1} , correspondant au groupement carbonyle conjugué.

La structure de l'annonacine est confirmée par les spectres RMN 1H , RMN ^{13}C , ainsi que les spectres de RMN bidimensionnelle COSY (corrélations 1H - 1H), HMQC (corrélation 1H - ^{13}C via la constante de couplage 1J) et HMBC (corrélation 1H - ^{13}C via les constantes de couplage 2J et 3J). En effet, les spectres montrent une présence d'une lactone α,β insaturée, un hydroxyle positionné en C-4 et un isolé, un THF flanqué de deux hydroxyles avec une configuration *thréo/trans/thréo*, sur la base d'une comparaison des déplacements décrits dans la littérature. Les déplacements chimiques sont donnés dans le chapitre 7 partie 2.1.1.3.

L'étude de la configuration absolue des carbones C-4, C-10, C-15 et C-20 de cette acétogénine a été effectuée par la méthode des esters de Mosher, par dérivatisation de la molécule avec les acides (*R*)- et (*S*)- α -méthoxy- α -(trifluorométhyl)-phénylacétiques (MTPA). Le signe des différences de déplacement chimique en RMN 1H des protons en α des centres asymétriques pour chacun des esters formés ($\Delta\delta_H = \delta_S - \delta_R$) a permis de donner les conformations absolues suivantes : *4R*, *15R* et *20R* [Cavé A. 1997, Rieser M.J. 1992]. Les auteurs ont montré que la valeur absolue de la différence $|\Delta\delta_H| = |\delta_S - \delta_R|$ dépend de la configuration relative entre C-4 et C-34. Des modèles de lactone, qualifiés selon leur stéréochimie de « semblables » *SS* (*4S*, *34S*) ou *RR* (*4R*, *34R*) ou de « dissemblables » *RS* (*4R*, *34S*), ont été synthétisés puis dérivatisés en esters (*S*)- ou (*R*)-MTPA. Parmi les valeurs absolues $|\Delta\delta_H|$ des protons de ces esters, celles du H-33 et du H-34 sont nettement différentes selon le caractère « semblable » ou « dissemblable » de la lactone. D'après les études de Hoye les diastéréoisomères « semblables » ont une valeur absolue de H de 0,17 ppm pour le proton H-34, tandis qu'elle est de 0,06 ppm dans le cas des diastéréoisomères « dissemblables » [Hoye T.R. 1994]. D'après la configuration absolue obtenue pour le C-4, celle du C-34 apparaît *R*. Enfin la stéréochimie *10R* a été proposée pour l'annonacine par Gu *et al.* par la méthode des ester de Mosher après translatonisation en isoannonacine [Gu Z.M. 1994] et déterminée par le Dr Duret [Duret P. 1997].

Enfin, l'identité de l'acétogénine a été vérifiée par co-injection en CLHP/SM/SM avec un échantillon authentique d'annonacine disponible en laboratoire, les fragments sont décrits dans le chapitre 4 partie 2.2. Nous avons donc bien purifié 421 mg d'annonacine.

2. Détermination structurale des acétogénines par SM/SM

Comme il a été vu au chapitre 2, les relations structure activité des acétogénines comme inhibiteurs du complexe I montrent l'importance de certaines caractéristiques structurales (nombre de THF, lactone 1a ou 1b, espacement entre le THF et la lactone). La plante, les fruits ou les produits dérivés d'*A. muricata* contiennent des dizaines d'acétogénines différentes. Cependant aucune étude n'a permis d'identifier rapidement toutes ces molécules. Il semble important de trouver une méthode permettant de définir le profil de la composition en acétogénines et des éléments structuraux principaux de ces molécules, conditionnant leur activité biologique.

2.1 Identification structurale des acétogénines : état de l'art

L'identification structurale des acétogénines isolées est réalisée essentiellement par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par spectrométrie de masse. La RMN permet la détermination des groupements fonctionnels de la molécule et d'une partie de sa stéréochimie relative (pour exemple voir chapitre 4 partie 1.2). Cependant pour l'obtention de données RMN complètes, une grande quantité d'échantillon (quelques mg) est obligatoire et est parfois difficile à obtenir pour des composés de cette classe. En outre, en utilisant la RMN, la localisation des groupes fonctionnels sur la longue chaîne alkyle reste ambiguë. La spectrométrie de masse, par fragmentation en source ou par analyse en masse tandem permet de placer les différents groupes fonctionnels. L'ionisation par impact électronique (IE) a été longtemps utilisée pour localiser les cycles THF et les autres groupements fonctionnels positionnés sur la chaîne alkyle. Néanmoins, cette technique avait certaines limites, notamment, dans le cas des acétogénines bis-époxydes et insaturées. Pour ce premier type structural, seul l'époxyde le plus proche de la lactone était visible *via* des clivages en α et β (Figure 59) [Brown P. 1966]. Pour les ACGs insaturées, les ions formés par clivage d'une double liaison ne sont pas suffisamment stables pour être observés (Figure 59). Du fait de ces limitations la détermination de la structure des acétogénines, notamment la position exacte des groupements fonctionnels devait être complétée par une analyse RMN à deux dimensions. Cette méthode ne permettait donc pas à elle seule de déterminer la structure des acétogénines.

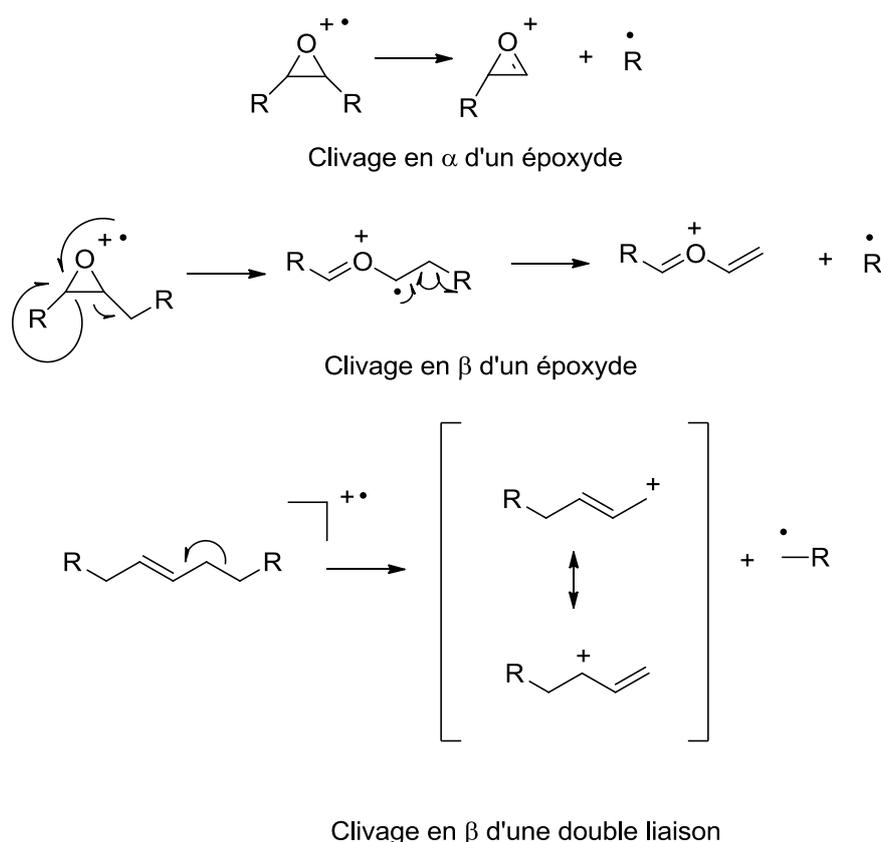


Figure 59 : Fragmentation d'un époxyde et d'une double liaison par IE

L'utilisation d'un spectromètre pourvu d'une source FAB et d'un analyseur magnétique et électrostatique ZabSpec/T était employée. La fragmentation des molécules était effectuée sous haute énergie permettant le mécanisme de fragmentation à charge piégée. Ce spectromètre montrait une bonne sensibilité pour les acétogénines. L'ajout de sel de lithium aux matrices du FAB générait une molécule cationisée par le lithium $[M+Li]^+$, augmentait ainsi la sensibilité de ce composé et permettait une meilleure fragmentation et donc une élucidation structurale plus facile [Laprévote O. 1992, 1993, 1994]. Cependant, au cours des 20 dernières années, le FAB a été progressivement supplanté par l'ionisation *electrospray* (ESI) et l'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI). De plus, les analyseurs magnétiques, volumineux, ont eux aussi été remplacés par des spectromètres électrostatiques tel que les TOF ou les pièges à ions. Il est donc apparu nécessaire de développer des méthodes alternatives en spectrométrie de masse tandem (SM/SM) pour l'élucidation structurale des acétogénines d'Annonaceae.

Des études de méthodologie, réalisées par Julie Allegrand au sein du laboratoire de spectrométrie de masse à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, ont été effectuées sur différents spectromètres : le MALDI-TOF-TOF (haute énergie de collision) et l'ESI-LTQ-Orbitrap® (basse énergie de collision) [Allegrand J. 2010]. L'objectif principal de ses études était de trouver des alternatives au FAB-SM/SM présentant une haute sensibilité et pouvant fournir les informations structurales nécessaires permettant d'identifier et de placer les éléments caractéristiques des acétogénines.

Au cours de ces travaux et au cours de cette thèse, nous avons utilisé la nomenclature, proposée par O. Laprévote, pour désigner les fragments permettant de positionner les groupements caractéristiques (Figure 60) [Laprévote O. 1994].

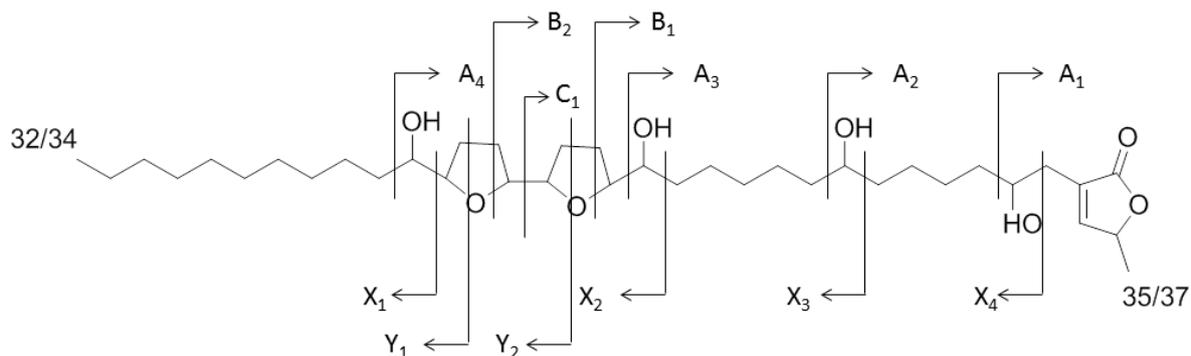
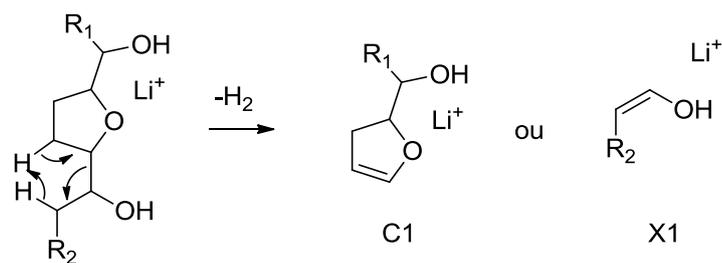
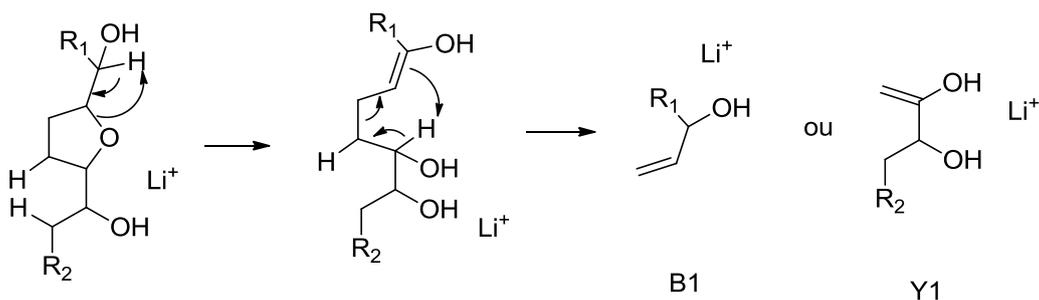


Figure 60 : Nomenclature des fragments obtenus par SM/SM proposée par Laprévotte *et al.*

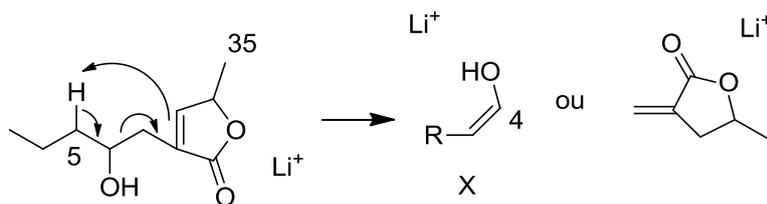
Les ions A, B et C contiennent la γ -méthyl- γ -lactone alors que les ions X, Y et Z contiennent le méthyl-terminal. Les fragments A et X sont les ions obtenus par un clivage en α des groupements hydroxyles et contenant l'atome d'oxygène de cette fonction. Les ions B et Y sont générés par une fragmentation au niveau du THF conservant une partie de celui-ci (Figure 59). Les ions C sont produits par un clivage en α du noyau THF. Des numéros sont utilisés en complément de ces lettres permettant de distinguer les différents ions appartenant à la même série (par exemple X₁ correspond au fragment produit par le clivage en α du premier groupe hydroxyle, commençant par l'extrémité méthyle).



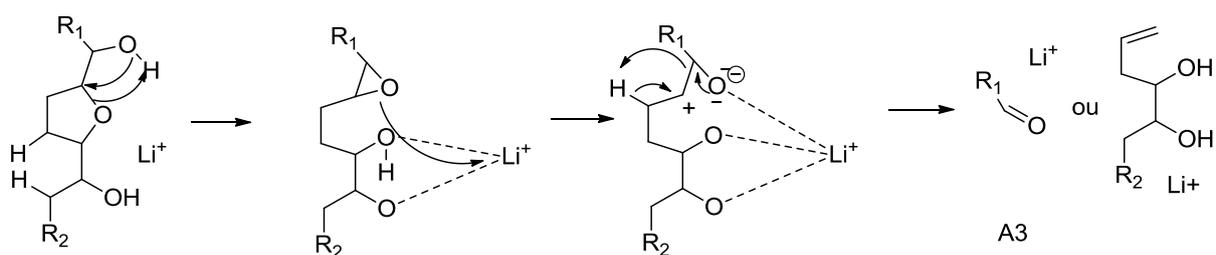
Mécanisme de fragmentation permettant d'obtenir des fragments de type C et X



Mécanisme de fragmentation permettant d'obtenir les fragments B et Y



Mécanisme de fragmentation permettant d'obtenir le fragment X de la perte de la lactone



Mécanisme de fragmentation permettant d'obtenir les fragments de type A

Figure 61 : Mécanismes de fragmentation des fragments caractéristiques des acétogénines [Laprévôte O. 1994]

R₁ : contient la γ-méthyl-γ-lactone ; R₂ : contient le méthyle terminal

En ce qui concerne les acétogénines époxydiques, la nomenclature proposée par Laprévotte O. a également été utilisée avec les ions c, c-2H et d, formés respectivement par les clivages autour du deuxième atome de carbone du cycle époxyde contenant la lactone et en α de l'époxyde (Figure 62, Figure 63).

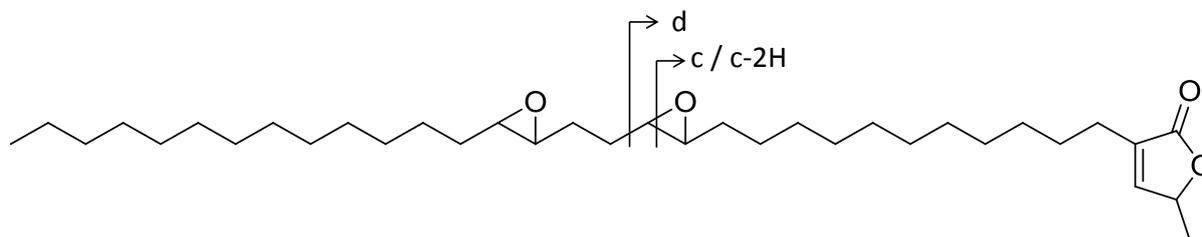


Figure 62 : Nomenclature des fragments obtenus par SM/SM proposée par Laprévotte et al.

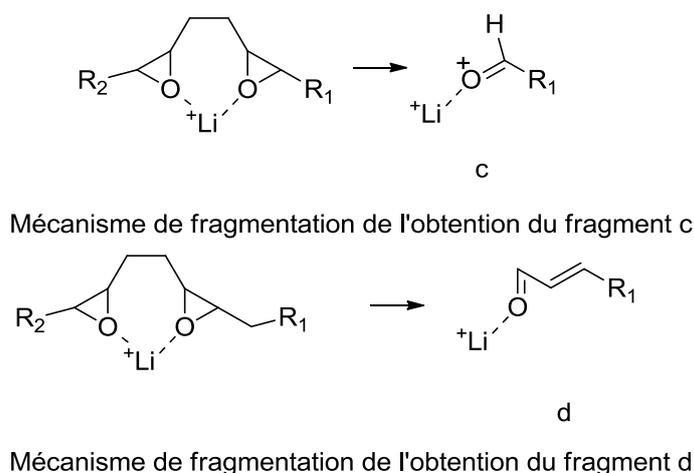


Figure 63 : Mécanismes de fragmentation caractéristiques des acétogénines des ACGs porteuses d'époxydes

R₁ : contient la γ -méthyl- γ -lactone ; R₂ : contient le méthyle terminal

Les composés ont été étudiés dans les deux modes d'ionisation. Le mode d'ionisation négatif permet d'observer des espèces déprotonées [M-H]⁻. Le mode d'ionisation positif conduit à des espèces protonées [M+H]⁺ et des espèces cationisées par le sodium [M+Na]⁺. La cationisation par le lithium a été aussi employée. Pour les études par MALDI-TOF-TOF, la solution de Lil solubilisée dans le MeOH était directement incorporée à la matrice. En Orbitrap[®], les études de mise au point par infusion directe ont été faites par une solution de Lil dans le MeOH en mélange direct avec les acétogénines étudiées. Tandis que pour les études par couplage CLHP, la solution était injectée par infusion post-colonne juste avant introduction dans la sonde électrospray.

2.1.1 MALDI-TOF-TOF

Les expériences à haute énergie de collisions (CID) ont été réalisées à l'aide d'un MALDI TOF-TOF. Des ACGs caractéristiques, représentant les diverses fonctions structurales : une ACG dihydroxylée ayant deux doubles liaisons (type E) (6), 3 mono-THF (1-3) (Type A) et 3 bis-THF adjacent (Type B) (4, 5, 7) (Figure 64) ont été étudiées. Lors de ces études la présence (1, 3) ou l'absence (2, 4, 6) d'un groupe hydroxyle en C-4 et la présence d'un hydroxyle en C-5 (7), d'une cétone (3) ou de doubles liaisons (6) à diverses positions sur la chaîne alkyle, ainsi qu'une lactone de type 2 ont aussi été analysées.

L'analyse des espèces lithiées a apporté les meilleurs résultats en raison de l'augmentation de l'intensité des pics et d'une plus grande richesse des spectres SM/SM. Pour chaque spectre, des pertes d'eau témoignent de la présence d'hydroxyles sur la chaîne aliphatique. Cependant leur nombre est inférieur au nombre d'hydroxyles et ne permet pas de déterminer leur nombre exact. La présence de la lactone est caractérisée par des pertes de CO et de CO₂. De plus, quatre points principaux ont pu être mis en évidence en ce qui concerne les études des molécules cationisées par le lithium. De plus, les ions fragments à m/z 118 ([C₆H₈O₂Li]⁺) et/ou à m/z 119 ([C₆H₈O₂Li]⁺) montrent la présence de lactone de sous-type 1 alors que leur absence est corrélée à une lactone de sous-type 2 (isoacétogénine). Une perte de 112 u.m.a (C₆H₈O₂) de l'espèce lithiée indique un groupement hydroxyle en position C-4. Le nombre de groupements hydroxyles ou cétoniques au sein des molécules peut-être déterminé. Cependant, leurs positions précises ne peuvent pas être totalement définies. En effet, les fragments permettant le positionnement des hydroxyles (X et A) ne sont pas visibles lorsque l'hydroxyle est placé après le THF. Enfin, la localisation des insaturations n'a pas été possible. Toutes ces données sont regroupées dans une figure récapitulative (Figure 64).

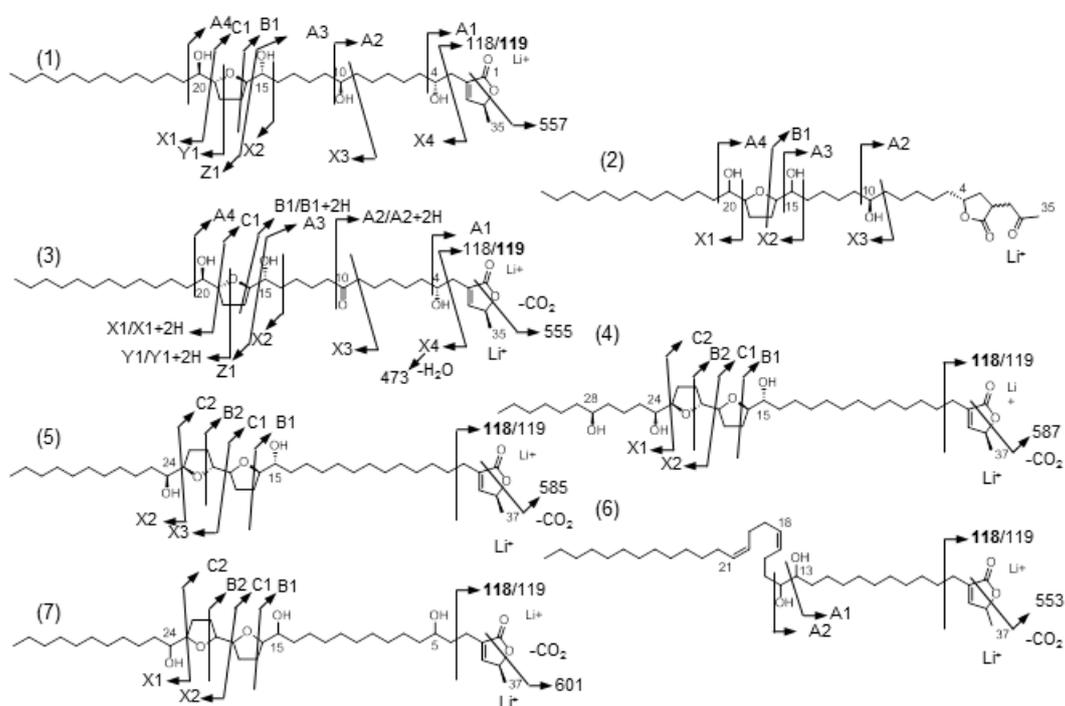


Figure 64 : Principaux fragments caractéristiques d'acétogénines « cationisées » par le lithium obtenus en MALDI-TOF-TOF

(1) annonacine, (2) cis et trans isoannonacine, (3) annonacinone, (4) squamacine, (5) désacétyl-uvaricine, (6) montecristine, (7) narumicine-2, (Intensité laser 4500 ; CID argon 6mbar ; 2 keV).

De plus, Le MALDI étant une méthode d'ionisation par désorption laser assistée par matrice, il n'était pas possible de coupler ce spectromètre à une chaîne CLHP. La distinction des différents isomères dans des échantillons complexes est donc impossible.

Il était intéressant pour notre étude de pouvoir distinguer ces différentes molécules. Des études sur ESI-LTQ-Orbitrap® ont donc été initiées par Julie Allegrand en infusion directe. Ces résultats ont été mis en pratique et vérifiés par un couplage CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® avec infusion de lithium post-colonne pour permettre des études structurales de mélanges complexes d'ACGs.

2.1.2 CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®

La dissociation induite par collision de l'espèce protonée m/z 597,4715 ($\Delta m/z = 1,9$ ppm) conduit seulement à 4 pertes d'eau et n'est donc pas intéressante pour des études structurales.

La fragmentation de l'annonacine (1) cationisée par le sodium [$C_{35}H_{64}O_7Na$]⁺ m/z 619,4526 ($\Delta m/z = 1,0$) montre seulement deux pertes d'eau ([$M+Na-H_2O$]⁺ ; m/z 601,44) et [$M+Na-2H_2O$]⁺ ; m/z 583,43), une perte de monoxyde de carbone à m/z 591,45 ([$M+Na-CO$]⁺), une perte de dioxyde de carbone à m/z 579,47 ([$M+Na-CO_2$]⁺) suivie d'une perte d'eau (m/z 557,45 ; ([$M+Na-CO_2-H_2O$]⁺), le fragment X4 (m/z 507,40), et l'ion X3 (m/z 407,31). La fragmentation de la molécule cationisée par le sodium ne permet pas de placer le THF et les hydroxyles adjacents.

En mode négatif, le signal de l'annonacine déprotonée m/z 595,4550 ($\Delta m/z = 4,8$ ppm) donne un faible rapport signal-sur-bruit comparé au mode d'ionisation positif. Le spectre SM/SM de l'ion [$M-H$]⁻ montre une perte d'eau m/z 577,45 ([$M-H-H_2O$]⁻) une perte de dioxyde de carbone m/z 551,46 ([$M-H-CO_2$]⁻) suivie d'une perte d' H_2O (m/z 533,44 ([$M-H-CO_2-H_2O$]⁻)). La perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène (X4) à m/z 583,41 est faiblement détectée (1 % abondance relative). Deux ruptures du cycle THF ([$C_{14}H_{27}O_2$]⁻ : m/z 227,20 et [$C_{15}H_{27}O_2$]⁻ : m/z 239,20) sont également présentes sur le spectre. De plus, le spectre de masse SM/SM montrent des pics caractéristiques du positionnement des hydroxyles en C-4 (X4 : m/z 483,4029 ; $\Delta m/z = 1,9$ ppm) et C-10 (X3 : m/z 383,3124 ; $\Delta m/z = 5,7$ ppm) et C-20 (X1 : m/z 197,1902 ; m/z 4,0 ppm). Cependant, le mode d'ionisation négatif est moins sensible que l'ionisation en mode positif et il semble difficile de l'utiliser pour l'étude d'ACGs minoritaires dans des extraits complexes.

Le spectre SM/SM de l'ion [$M+Li$]⁺ à m/z 603,4795 ($\Delta m/z = 1,9$ ppm) montre le signal des ions fragments cationisés par le lithium : deux pertes d'eau ([$M+Li-H_2O$]⁺ ; m/z 585,44 et [$M+Li-2H_2O$]⁺ ; m/z 567,43), la perte de monoxyde de carbone à m/z 575,49 ([$M+Li-CO$]⁺), une perte de dioxyde de carbone m/z 559,49 ([$M+Li-CO_2$]⁺) suivie de trois pertes d' H_2O (m/z 541,47 ; [$M+Li-CO_2-H_2O$]⁺) ; (m/z 523,46 [$M+Li-CO_2-2H_2O$]⁺) ; m/z 505,45 [$M+Li-CO_2-3H_2O$]⁺) et une perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène (X4) à m/z 491,42 [$M+Li-C_8H_6O_2$]⁺ suivie d'une perte d' H_2O (m/z 473,41 [$M+Li-C_8H_6O_2-H_2O$]⁺).

De plus, les fragments X2, X3 et X4 respectivement à m/z 305,27, m/z 391,34 et m/z 491,43 permettant de placer les hydroxyles et les ions B1, B1-2H, B1-H₂O et B1-2H-H₂O respectivement à m/z 361,26, m/z 359,24, m/z 343,24 et m/z 341,23, permettant de placer le THF, sont identifiés sur le spectre. Cependant, l'ion fragment X₁ attendu à partir du clivage autour de la position C-20 n'a pas été détecté (Figure 65, Tableau 27). La fragmentation de l'annonacine en mode positif sous forme d'une molécule cationisée par le lithium est donc la méthode apportant le plus grand nombre d'informations, et a été retenue.

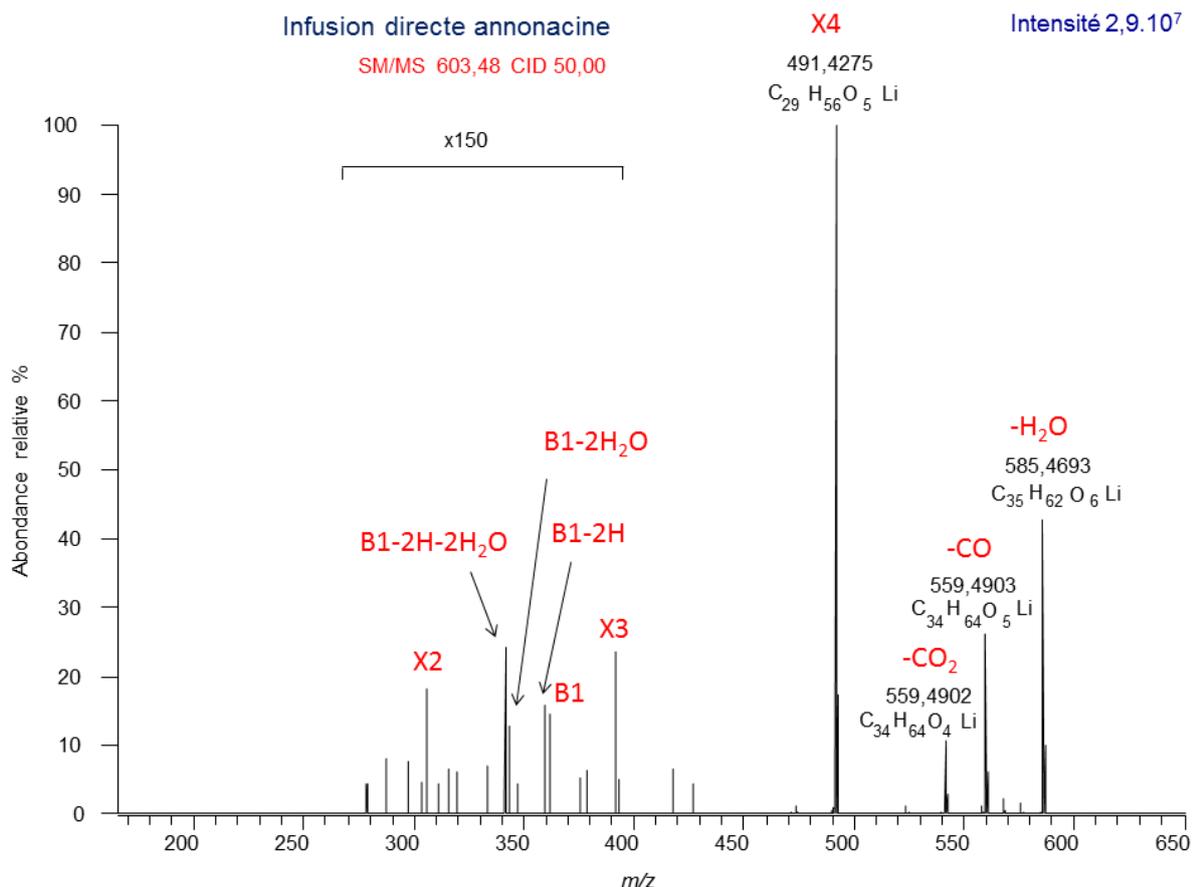


Figure 65 : Spectre SM/SM de l'adduit de $[M+Li]^+$ de l'annonacine par ESI-LTQ-Orbitrap[®]

Annonacine			
Fragment	Formule brute	Masse exacte	Δ ppm
X2	$[C_{18}H_{34}O_3Li]^+$	305,2662	0,6
X3	$[C_{23}H_{44}O_4Li]^+$	391,3439	0,6
X4	$[C_{29}H_{56}O_5Li]^+$	491,4282	0,8
B1-2H	$[C_{20}H_{30}O_5Li]^+$	359,2404	1,0
B1	$[C_{20}H_{32}O_5Li]^+$	361,2561	2,0
B1-H ₂ O	$[C_{20}H_{30}O_4Li]^+$	343,2453	0,5
B1-2H-H ₂ O	$[C_{20}H_{28}O_4Li]^+$	341,2297	0,4

Tableau 27 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de l'annonacine

Les fragments de l'annonacine (**1**) obtenus par couplage du spectromètre ESI-LTQ-Orbitrap[®] avec la CLHP en infusion de lithium post-colonne, sont identiques à ceux retrouvés en infusion directe.

D'autres étalons ont été analysés ayant les diverses fonctions structurales observées au sein des acétogénines : une ACG bis époxyde (type E) (**6**), 3 mono-THF (**1-3**) (Type A), une bis-THF adjacent (Type B) (**4**) et une bis-THF-non adjacent (type C) (**5**) (Figure 71).

La gonionénine (**2**) est une acétogénine en C₃₇ ayant une fonctionnalisation quasi-identique à celle de l'annonacine. Une différence réside dans le positionnement du THF, plus proche de la lactone (C-14 à C-17) et d'une double liaison en C-21 soit une formule brute C₃₇H₆₆O₇. Le spectre SM/SM de l'ion [M+Li]⁺ (*m/z* 629,4748 ; $\Delta m/z = -1,9$ ppm) a montré les fragments caractéristiques suivants : B1 : *m/z* 333,2245 ($\Delta m/z = 0,7$ ppm), B1-2H : *m/z* 331,2090 ($\Delta m/z = 0,4$ ppm), X2 : *m/z* 359,3131 ($\Delta m/z = 0,2$ ppm), X3 : *m/z* 417,3549 ($\Delta m/z = 0,3$ ppm) et X4 : *m/z* 517,4432 ($\Delta m/z = 1,3$ ppm) (Figure 66, Tableau 28). Ce dernier fragment apparaît toujours à une intensité relative de 100 % typique d'un groupe hydroxyle en C-4, c'est-à-dire en position β de la lactone, comme pour l'annonacine.

Cependant, aucun fragment caractéristique de la double liaison n'a été visible et son positionnement n'a pas été possible. Sa présence peut être déduite par une différence de 2 u.m.a pour les fragments X4, X3 et X2, par rapport à un analogue saturé.

L'intensité de l'ion X2 est beaucoup plus importante pour cette molécule que pour l'annonacine. La proximité de la lactone de l'hydroxyle en C-13 par rapport à l'hydroxyle en C-15 pour l'annonacine pourrait favoriser cette fragmentation.

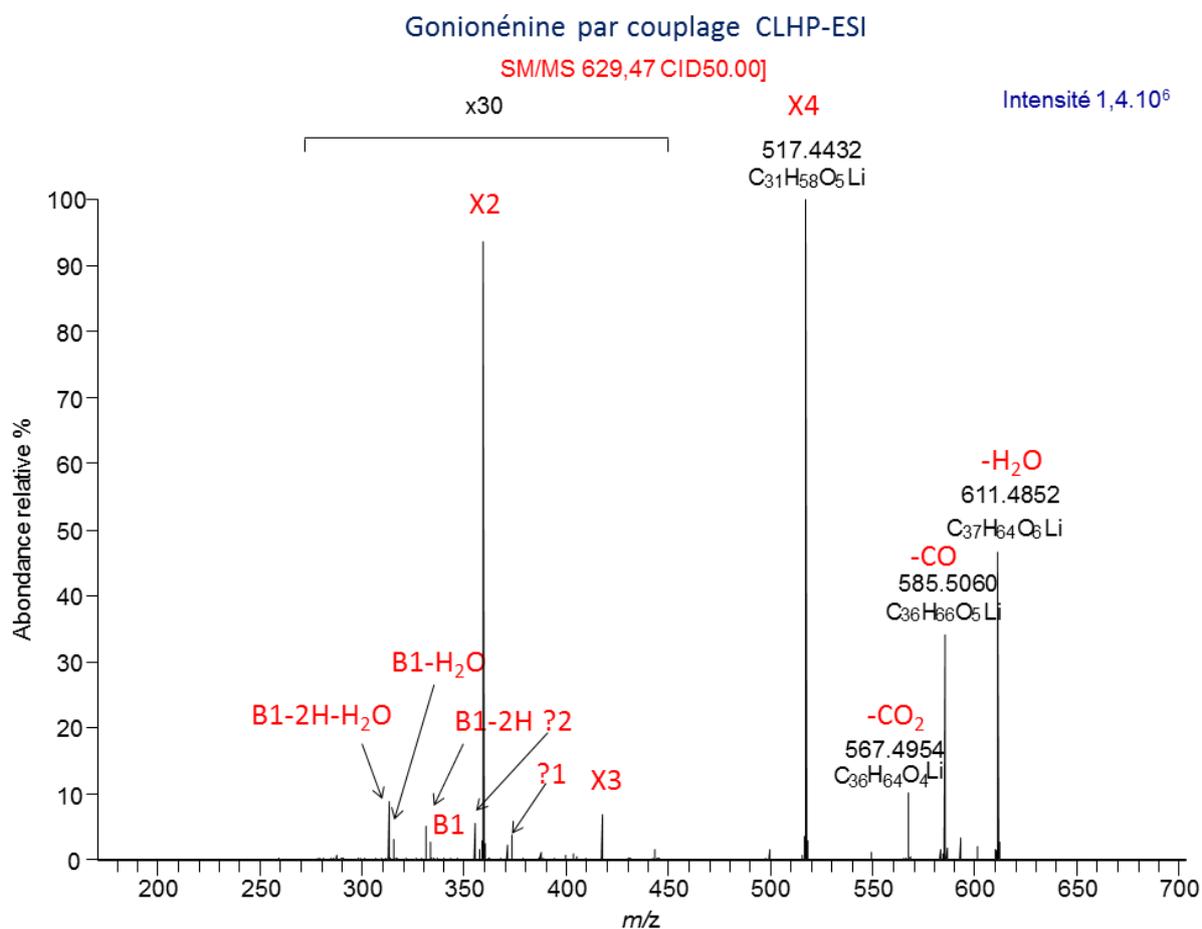


Figure 66: Spectre SM/SM de l'adduit [M+Li]⁺ de la gonionénine par ESI-LTQ-Orbitrap®

Gonionénine			
Fragment	Formule brute	Masse Exacte	Δppm
X2	[C ₂₂ H ₄₀ O ₃ Li] ⁺	359,2245	0,2
X3	[C ₂₅ H ₄₆ O ₄ Li] ⁺	417,3549	0,3
X4	[C ₃₁ H ₅₈ O ₅ Li] ⁺	517,4432	1,3
B1-2H	[C ₁₈ H ₂₈ O ₅ Li] ⁺	331,2090	0,4
B1	[C ₁₈ H ₃₀ O ₅ Li] ⁺	333,2245	0,7
B1-2H-H ₂ O	[C ₁₈ H ₂₆ O ₄ Li] ⁺	313,1986	0,2
B1-H ₂ O	[C ₁₈ H ₂₈ O ₄ Li] ⁺	315,2141	0,4

Tableau 28: Fragments permettant le positionnement des fonctions de la gonionénine

Deux autres fragments sont visibles sur le spectre (Tableau 29). La fragmentation de la liaison C-C en β de l'hydroxyle en C-13 a été détectée avec et sans perte d'eau. Ce type de fragmentation n'a pas été observée sur les spectres de l'annonacine. Ces fragments ne sont pas considérés comme fragments typiques.

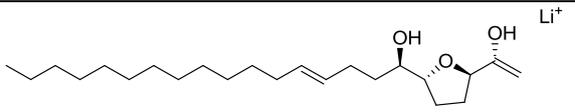
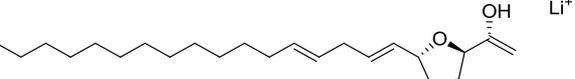
Fragments	Formule brute	Masse Exacte	Δ ppm	hypothèse de fragment
?-1	[C ₂₃ H ₄₂ O ₃ Li] ⁺	373,3285	0,8	
?-2	[C ₂₃ H ₄₀ O ₂ Li] ⁺	355,3183	0,1	

Tableau 29 : Autres fragments visibles sur le spectre de la gonionénine

L'annonacinone (**3**) $C_{35}H_{62}O_7$ est quasiment identique à l'annonacine (**1**), leur différence résidant dans la présence d'un groupe carbonyle en C-10 au lieu d'un hydroxyle. Le spectre SM/SM de l'ion $[M+Li]^+$ (m/z 601,4644 ($\Delta m/z = 1.1$ ppm) montre les fragments lithiés B1, B1-2H, X2, X3 respectivement m/z 359,2404 ($\Delta m/z = 0,2$) ; m/z 357,2247 ($\Delta m/z = 0,2$) ; m/z 305,2666 ($\Delta m/z = 1,0$) ; m/z 489,4119 ($\Delta m/z = 1,5$) (Figure 67, Tableau 30).

Aucun fragment caractéristique de fragmentation en α de la cétone n'a été visible et son positionnement ne peut être effectué. Sa présence peut être déduite par une différence de 2 u.m.a au niveau des fragments B1 et B1-2H par rapport à un analogue hydroxylé comme l'annonacine.

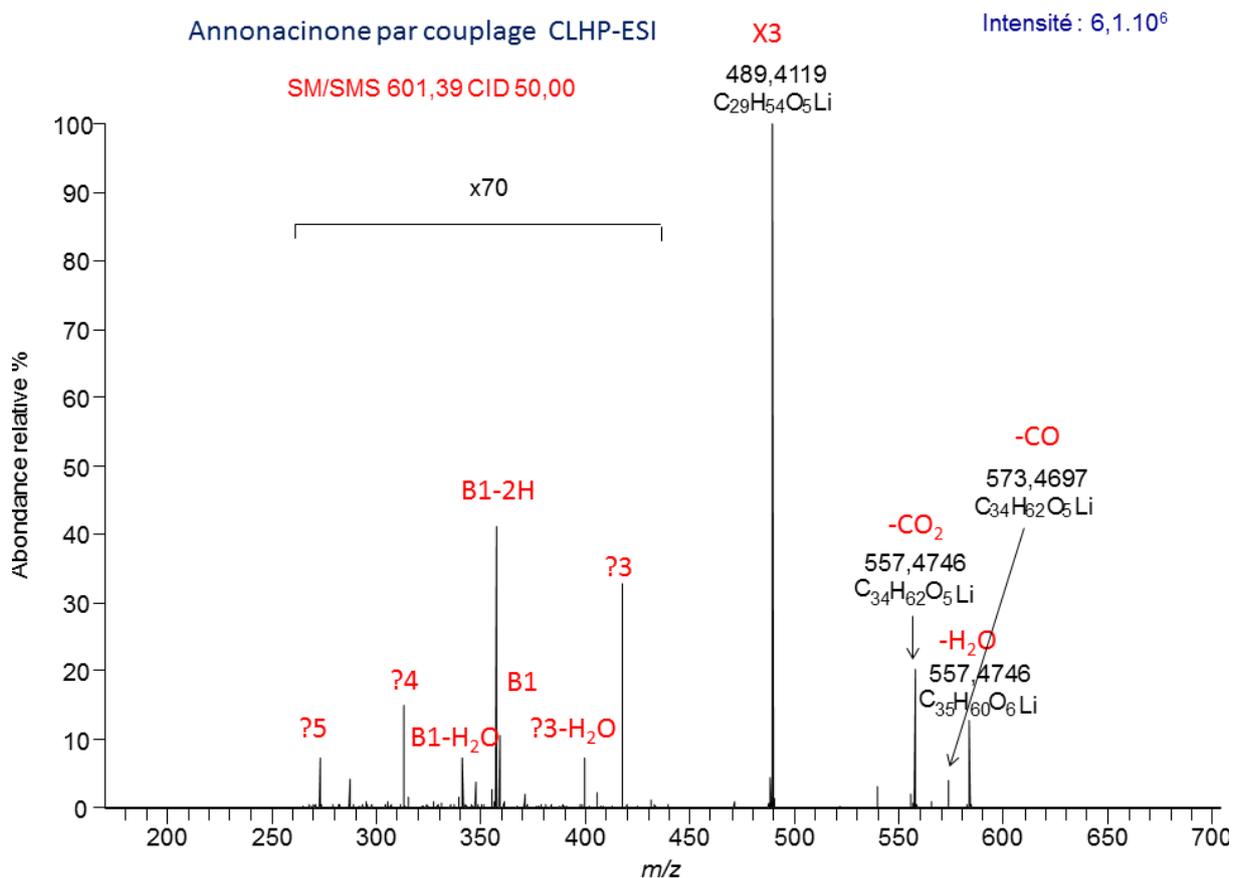


Figure 67 : Spectre SM/SM de l'adduit $[M+Li]^+$ de l'annonacinone par ESI-LTQ-Orbitrap®

Annonacinone			
Fragment	Formule brute	Masse Exacte	Δ ppm
X2	$[C_{18}H_{34}O_3Li]^+$	305,2666	1,0
X3	$[C_{29}H_{54}O_5Li]^+$	489,4119	1,5
B1-2H	$[C_{20}H_{30}O_5Li]^+$	357,2247	0,2
B1	$[C_{20}H_{32}O_5Li]^+$	359,2404	0,2
B1-H ₂ O	$[C_{20}H_{30}O_4Li]^+$	341,2299	0,0

Tableau 30 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de l'annonacinone

D'autres fragments sont visibles sur le spectre. Des hypothèses de structure ont été données dans le tableau ci-dessous (Tableau 31). Les ions m/z 273.1673 et m/z 417.3549 proviendraient d'une rupture de la liaison en γ de chaque côté du groupement carbonyle, le mécanisme de fragmentation est à élucider. Ces différents fragments, peu caractéristiques, n'ont pas été considérés comme des fragments typiques.

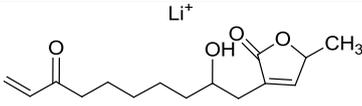
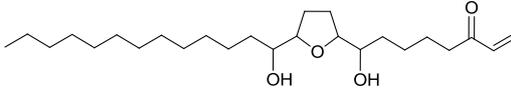
Fragments	Formule brute	Masse exacte	Δ ppm	Fragments théorique
?-5	$[C_{15}H_{22}O_4Li]^+$	273,1673	0,2	
?-4	$[C_{19}H_{30}O_3Li]^+$	313,2349	0,3	B1-2H-CO ₂
?-3	$[C_{25}H_{46}O_4Li]^+$	417,3549	0,3	

Tableau 31 : Autres fragments et hypothèses de structure

La squamocine (**4**) $C_{37}H_{66}O_7$ est une acétogénine à système bis-THF-adjacents α - α' -dihydroxylés-, sans hydroxyle en C-4. Elle porte un hydroxyle en C-28 au niveau de la partie méthyle terminal.

Le spectre SM/SM de l'ion $[M+Li]^+$ montre les ions fragments cationisés par le lithium caractéristiques B2, B2-2H, B1, B1-2H, X3 respectivement à m/z 399,2921 ($\Delta m/z = 0,8$) ; 397,2921 ($\Delta m/z = 0,2$) ; 329,2669 ($\Delta m/z = 0,1$) 327,2505 ($\Delta m/z = 0,1$) ; 363,2712 ($\Delta m/z = 1,5$) permettant le placement des deux THF et de l'hydroxyle en α des THF adjacents (Figure 68, Tableau 32).

De plus, contrairement aux autres molécules précédemment décrites (**1,2** et **3**), le fragment de la perte de lactone est peu visible (intensité relative de 1,0 %). Le fragment majoritaire sur ce spectre correspond à la perte du CO₂. L'hydroxyle en C-4 favorisant la fragmentation en β de la lactone donnerait des fragments de type X à une intensité de 100 %. La présence ou l'absence de cet hydroxyle, définissant les acétogénines de sous-type 1a et 1b, peut ainsi être clairement distinguée, comme cela a été proposé lors d'études utilisant le MALDI-TOF-TOF [Allegrand J. 2010] ou l'ESI-APCI-TQ [Gu Z.-M. 1997a].

De plus, aucun fragment permettant de positionner le groupement hydroxyle sur la chaîne alkyle terminale n'a été observé.

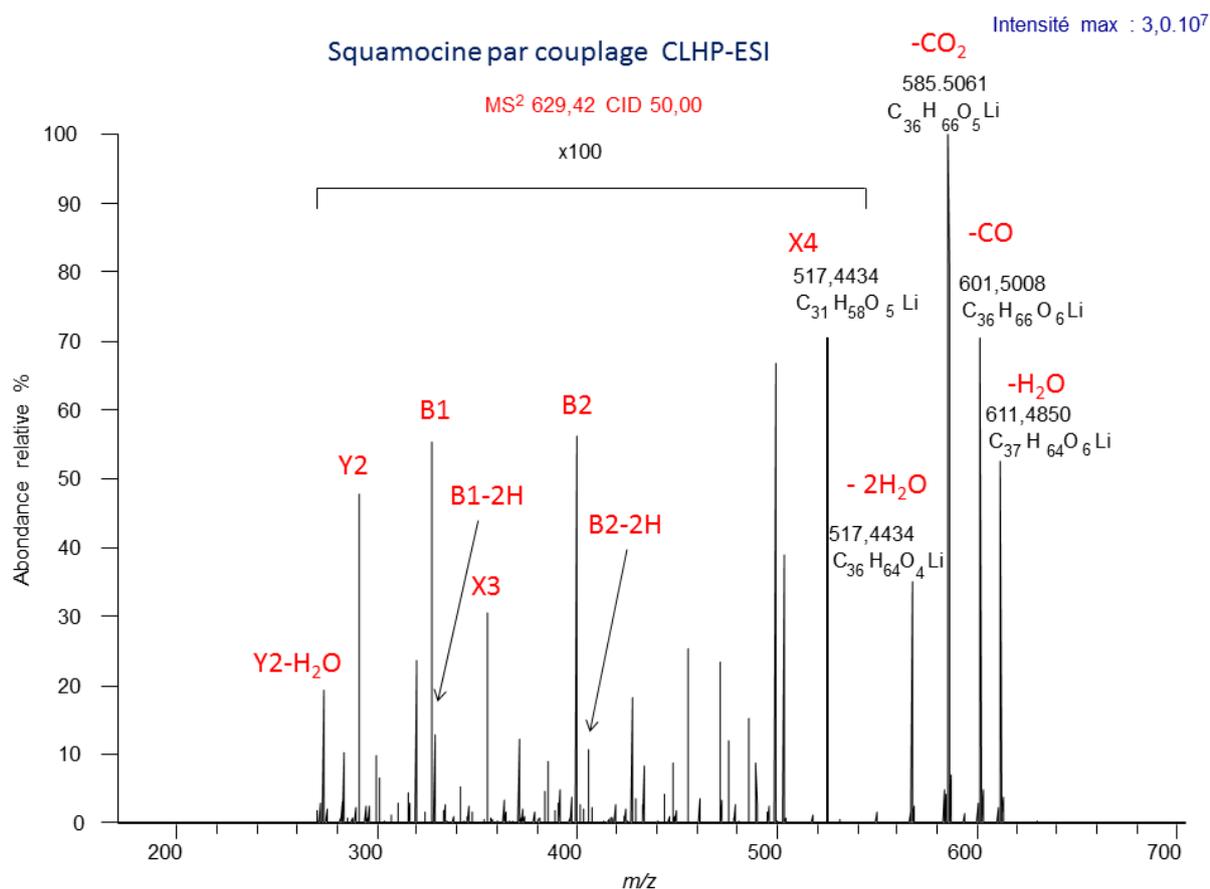


Figure 68 : Spectre SM/SM de l'adduit $[M+Li]^+$ de la squamocine par ESI-LTQ-Orbitrap[®]

Squamocine			
Fragment	Formule	Masse	Δ ppm
	Brute	Exacte	
X3	$[C_{20}H_{36}O_5Li]^+$	363,2712	1,5
B1-2H	$[C_{20}H_{32}O_3Li]^+$	327,2505	0,4
B1	$[C_{20}H_{34}O_3Li]^+$	329,2669	0,1
B2-2H	$[C_{24}H_{38}O_4Li]^+$	397,2921	1,0
B2	$[C_{24}H_{40}O_4Li]^+$	399,2921	0,8
Y2	$[C_{17}H_{32}O_3Li]^+$	291,2505	0,3
Y2-H ₂ O	$[C_{17}H_{30}O_2Li]^+$	273,2409	0,3

Tableau 32 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de la squamocine

La gigantécine (**5**) $C_{37}H_{66}O_8$ est une acétogénine possédant un système bis-THF-non-adjacent à 37 carbones. Le premier THF est α' -hydroxylé, tandis que le deuxième est α,α' -dihydroxylé.

La fragmentation de la molécule cationisée par le lithium $[M+Li]^+$ montre un fragment de perte de la lactone à une abondance relative de 0,1 % comme pour le composé **4**. Cette molécule est de sous-type 1a.

Les THF et les groupes hydroxyles peuvent être placés sans ambiguïté ; on retrouve en effet, les fragments caractéristiques : B2 (m/z 403,2664 ; $\Delta m/z = 0,7$ ppm), B2-2H : m/z 401,251; ($\Delta m/z = 0,4$ ppm), X2 : (m/z 305,2662; $\Delta m/z = 0,2$ ppm), X4 (m/z 533,4380; $\Delta m/z = 1,4$ ppm), Y1 (m/z 391,3392; $\Delta m/z = 0,4$ ppm) et Y1-2H (m/z 389,3236; $\Delta m/z = 0,5$ ppm) (Figure 69, Tableau 33).

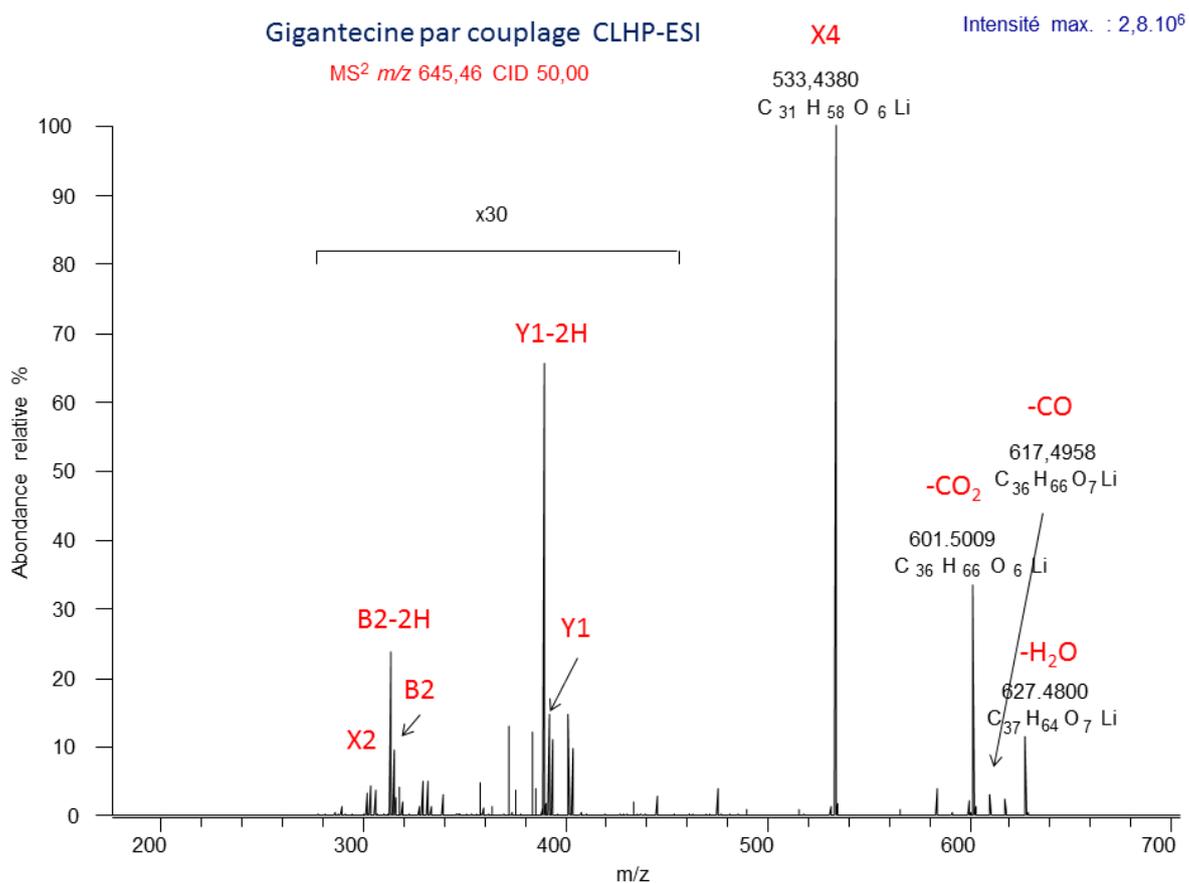


Figure 69: Spectre SM/SM de l'ion $[M+Li]^+$ de la gigantécine et ses fragments caractéristiques

Gigantécine			
Fragment	Formule brute	Masse exacte	Δ ppm
X2	$C_{18}H_{34}O_3Li$	305,2662	0,2
X4	$C_{31}H_{58}O_6Li$	533,4381	1,4
Y1-2H	$C_{23}H_{40}O_4Li$	389,3236	0,5
Y1	$C_{23}H_{42}O_4Li$	391,3236	0,5
B2-2H	$C_{22}H_{34}O_6Li$	403,2664	0,7
B2	$C_{22}H_{36}O_6Li$	401,2508	0,4

Tableau 33 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de la gigantécine

Enfin, la diépomuricanine-A (6) est une acétogénine C35 bis-époxydique (C-15 / C-16, C-19 / C-20). Le spectre SM/SM de l'ion $[M+Li]^+$ a montré plusieurs fragments typiques d'un époxyde : c (m/z 301,2348; $\Delta m/z = -0,6$ ppm), c-2H (m/z 299,2192; $\Delta m/z = -0,5$ ppm), et d (m/z 313,2348; $\Delta m/z = -0,4$ ppm), comme décrit par Laprévotte 1992 (Figure 70, Tableau 34) . Malheureusement, par notre méthode, nous ne voyons aucun fragment caractéristique pour le deuxième époxyde.

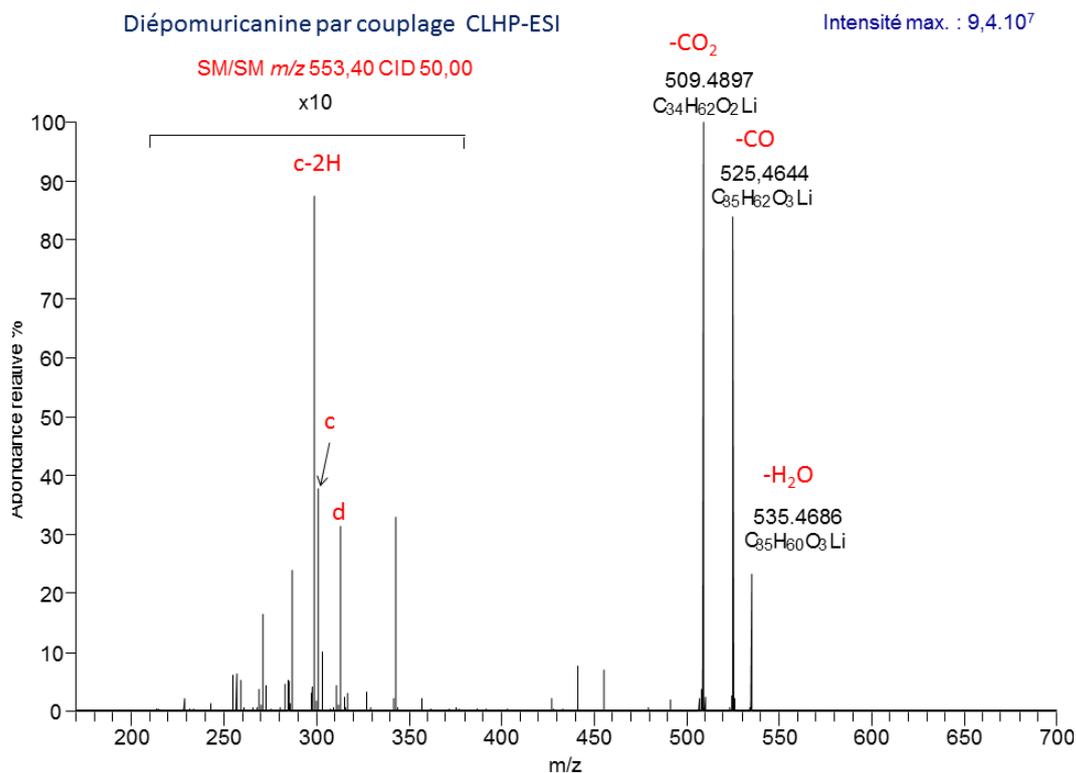


Figure 70 : Spectre SM/SM de l'ion $[M+Li]^+$ de la diépomuricanine et ses fragments caractéristiques

Diépomuricanine			
Fragment	Formule brute	Masse exacte	Δ ppm
c-2H	$[C_{18}H_{30}O_3Li]^+$	299,2192	0,5
c	$[C_{18}H_{28}O_3Li]^+$	301,2193	0,6
d	$[C_{19}H_{30}O_3Li]^+$	313,2348	0,4

Tableau 34 : Fragments permettant le positionnement des fonctions de la diépomuricanine

Comme pour les autres composés d'autres fragments sont visibles sur le spectre. Ces fragments n'ont pas été considérés comme pratiques pour être utilisés au cours de la déréplication et non pas été déterminés.

En bref, notre méthode permet la détermination sans équivoque des formules brutes des acétogénines, et de leurs fragments en SM/SM. Des fragments typiques des acétogénines sont observés pour chacune d'entre elles : pertes de CO (- 27,9949 u.m.a.), de CO₂ (- 43,9898 u.m.a.) et de la lactone. Ces caractéristiques spectrales et la formule brute des ions nous permettront de différencier les acétogénines des autres molécules de l'extrait. L'intensité du fragment correspondant à la perte de la lactone permet de différencier le sous-type 1a et 1b. Les pertes d'eau et leur intensité ne sont pas spécifiques ni caractéristiques du nombre d'hydroxyle (Tableau 35).

	Lactone	1 ^{ère} perte d'eau	CO	CO ₂	Nb d'hydroxyles	nb perte d'eau
Annonacine (1)	100 %	50 %	2 %	30 %	4	3
Gonionénine (2)	100 %	50 %	2 %	40 %	4	3
Annonacinone (3)	100 %	15 %	4 %	20 %	3	3
Squamocine (4)	1.5 %	50 %	70 %	100 %	3	3
Gigantécine (5)	100 %	15 %	8 %	40 %	4	4
Diépomuricanine (6)	1 %	20 %	75 %	100 %	0	1

Tableau 35 : Intensité des ions permettant d'identifier les acétogénines

De plus, grâce à cette technique nous pouvons positionner les THF, les groupes hydroxyles voisins de ces derniers et certains hydroxyles situés entre la lactone et les THF grâce à la présence des ions de type B, Y et X.

Cependant, les fragments permettant de caractériser la partie entre le THF et le CH₃-terminal ne sont pas visibles et la structure ne peut être qu'hypothétique.

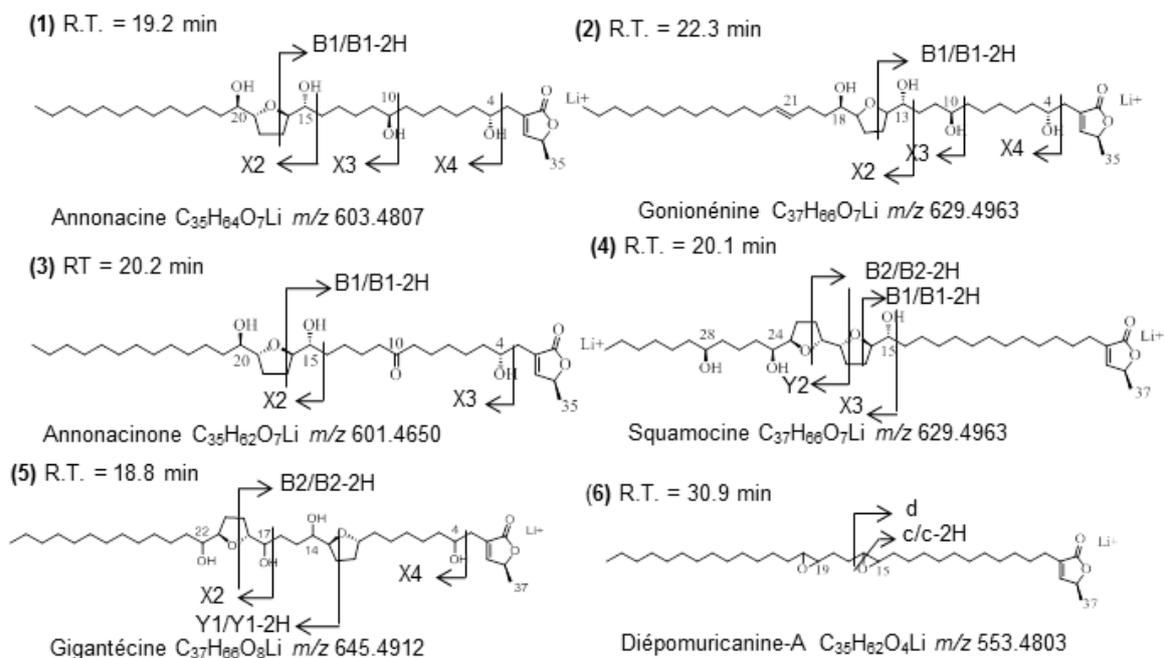


Figure 71 : Résumé des fragments caractéristiques des étalons

Les pertes de lactone en bleu correspondent au sous-type 1a (intensité $\approx 1\%$)

2.2 Études de déréplication

2.2.1 État de l'art

La déréplication est le processus permettant d'analyser structurellement des mélanges complexes avec peu ou sans purification au préalable. C'est un domaine peu développé pour les ACGs présentes dans des extraits bruts, en raison des limites des techniques analytiques. Ces limites sont souvent dues à un manque de sensibilité et de spécificité. De plus, ces molécules sont difficiles à séparer par les techniques analytiques actuelles et sont souvent co-éluées : la résolution des pics chromatographiques n'est souvent pas concluante [Martin J.-M. 1999].

La première technique utilisée a été la CLHP-DAD en phase inverse. Le seul chromophore des ACGs est la lactone insaturée ayant un maximum d'absorption à λ 210 nm, donnant une faible sensibilité et spécificité à cette technique. De plus, cette technique ne permet pas d'étude structurale. Enfin, le manque de résolution chromatographique pour identifier les composés présents exige l'utilisation de standards et des analyses avec co-injection de témoins [Gromek D. 1994, Yang H.-J. 2009].

De même, aucun auteur n'a proposé une méthode de CLHP-SM/SM efficace pour détecter et définir structurellement les ACGs dans des échantillons bruts. Des premières tentatives utilisant la CLHP-ESI(+)-APCI-SM ont été effectuées, cependant la multiplicité d'ions primaires $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ et des adduits supplémentaires $[M+NH_4]^+$ selon la phase mobile (acide formique, tampon acétate d'ammonium...) sont observés (Figure 72) [Gu Z.M.1997,1997b, Martin J.M. 1999, Pomper K.W. 2009]. Ces analyses n'étaient que peu sensibles. Un manque de résolution sur la mesure de masse du pic moléculaire ne permettait pas de déterminer spécifiquement les formules brutes des composés, et rendait les résultats ambigus. Des études de fragmentation de basse énergie ont été réalisées sur les ions $[M+H]^+$ avec un ESI-triple-quadripôle en mode positif. Les spectres obtenus sont

peu informatifs. Les fragments exploitables ont seulement permis la détermination du nombre d'hydroxyles et la distinction entre la présence et l'absence d'un hydroxyle en position C-4 (lactone 1a ou 1b) avec une perte de la lactone de 112 u.m.a.

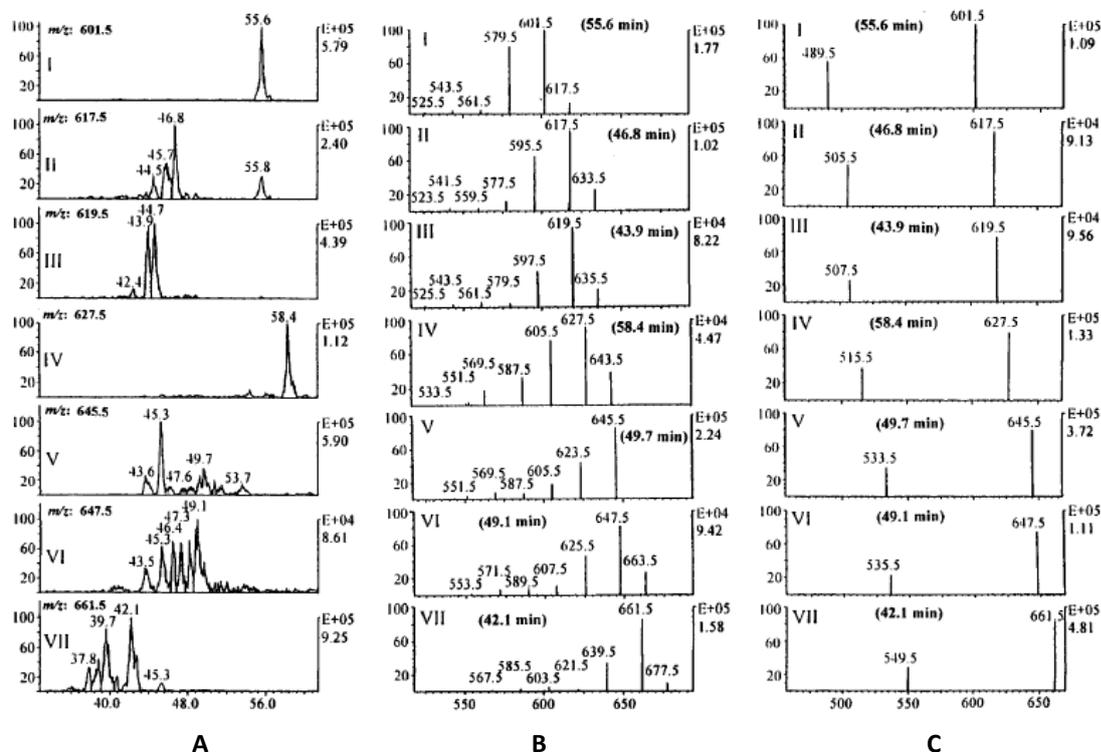


Figure 72 : Étude de déréplication par LC/(+)ESI-APCI-SM d'un extrait d'une fraction méthanolique de *Rollinia mucosa* [Gu Z.-M 1997]

(A) Ions extraits $[M+Na]^+$ à m/z 601 (I), 617 (II), 619 (III), 627 (IV), 645 (V), 647 (VI) et 661 (VII). (B) Spectres SM des différents ions correspondant aux temps de rétention indiqués. (C) Spectre SM/SM des ions sélectionnés.

L'absence de haute résolution et donc le manque de précision sur les mesures de masse des fragments est un inconvénient majeur dans l'identification des pics chromatographiques. Cela handicape la distinction des acétogénines entre elles et par rapport aux autres composés de l'extrait.

De plus, il est difficile de distinguer les composés minoritaires du bruit de fond. Des études d'extraits d'écorce de *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. utilisant cette technique ont permis d'identifier 3 à 24 acétogénines majoritaires et leur nombre total dans un extrait a été évalué à environ 40 [Gu Z.-M 1997a, 1997b].

Lors de cette thèse, une méthodologie innovante a été établie par CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® avec infusion d'une solution de lithium post-colonne. La technologie de l'Orbitrap® a permis la détermination sans équivoque des formules brutes aux environs de 600 avec une variation d'erreur sur la masse (Δ ppm) inférieure à 2 ppm pour les différentes acétogénines en présence.

Cette méthode grâce à sa haute sensibilité a permis une évaluation très poussée de deux extraits à l'acétate d'éthyle obtenus à partir de deux produits dérivés d'*Annona* : un extrait d'un alcool d'*A. cherimolia* et un nectar guyanais d'*A. muricata*.

2.2.2 Méthodologie de l'analyse2.2.2.1 Mise au point analytique

Une mise au point analytique a été préalablement effectuée. Un des problèmes rencontrés, lorsque l'on utilise une infusion de lithium post-colonne est la formation de cristaux de sels de lithium à la sortie du capillaire si la solution est trop concentrée ou si le débit est trop faible. Ces conditions d'analyses et les paramètres du spectromètre de masse ont donc été validés. Un gradient par CLHP-UV a été mis en place permettant de séparer les molécules majoritaires. Ce gradient a ensuite été utilisé lors des études en CLHP-UV-ESI-LTQ-Orbitrap®.

2.2.2.2 Avantages du lithium

Pour valider notre méthode un extrait à l'acétate d'éthyle de nectar d'*A. muricata* a été utilisé et injecté en CLHP à polarité de phase inverse sur colonne C18, avec un gradient linéaire (eau/acétonitrile).

Des analyses préliminaires ont été exécutées sans utilisation de lithium. Le chromatogramme obtenu (TIC) était particulièrement complexe. Les spectres des pics attribuables à des ACGs montraient trois ions correspondant à la molécule protonée $[M+H]^+$, et aux molécules cationisées par le sodium $[M+Na]^+$ et par le potassium $[M+K]^+$ (Figure 73). Ces faits induisent une ambiguïté, sur l'identité et le nombre des ACGs, ainsi que sur leur masse, comme cela a été illustré dans d'autres travaux [Champy P. 2009, Gu Z.M. 1997, Pomper K.W. 2009].

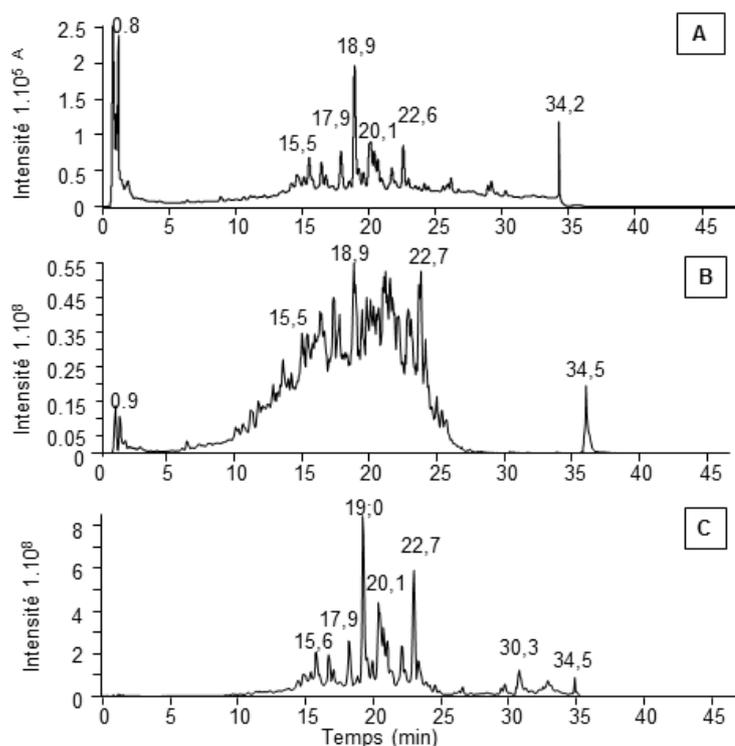


Figure 73 : Chromatogrammes de l'extrait de nectar d'*A. muricata*

(A) UV $\lambda = 210$ nm (B) Chromatogramme ionique total (C) Chromatogramme ionique total avec infusion de lithium post-colonne

De plus, la présence de métabolites secondaires d'autres classes complique le chromatogramme et rend difficile l'identification des ACGs.

L'affinité préférentielle des ACGs pour le lithium est particulièrement utile dans ce contexte. L'infusion post-colonne de Lil a résolument simplifié le chromatogramme. En effet, lors de son addition le TIC apparait semblable au chromatogramme UV obtenu à $\lambda = 210 \text{ nm}$ (Figure 73). De plus, l'augmentation de l'intensité des pics chromatographiques des ACGs est considérable (intensités 15 fois supérieures au chromatogramme sans Lil).

On notera que l'abondance relative des ACGs peut être évaluée en UV, ces molécules présentant un chromophore sensiblement identique. On remarquera qu'ici, le TIC apporte des informations similaires, ces modes de détection permettant potentiellement une analyse semi-quantitative.

2.2.2.3 Analyse des données

L'analyse des données, très abondantes, a été simplifiée par la forte homogénéité structurale au sein de la classe des acétogénines, permettant la prédiction des formules brutes théoriques. En effet, les acétogénines présentent une variabilité limitée de leurs lactones, qui sont majoritairement α,β insaturées, portées par une chaîne en C30 ou C32. Les substitutions sont homogènes (époxydes, THF, THP, cétone ou hydroxyles). Leurs formules brutes théoriques peuvent être générées ainsi :

Dans un premier temps, les formules brutes des molécules « nues » (chaîne aliphatique seulement associée à une lactone insaturée), $C_{35}H_{66}O_2$ soit $m/z_{th} 525,5217$ pour l'ion $[M+Li]^+$ et $C_{37}H_{70}O_2$ soit $m/z_{th} 553,5530$ pour l'ion $[M+Li]^+$, sont recherchées au sein du TIC. Un incrément de + 15,9949 u.m.a, soit un oxygène en plus correspond à des acétogénines avec un hydroxyle. Cette nouvelle formule sera aussi recherchée au sein du TIC. Ensuite, un décrétement de 2,0157 u.m.a soit une diminution de 2 H, dans notre nouvelle formule brute correspond à des structures de type mono-THF, mono-THP, cétone ou hydroxyles isolés et une double liaison. Chaque décrétement pour chaque formule brute sera désigné « insaturation » dans la suite du manuscrit. Chaque masse théorique peut être recherchée au sein du chromatogramme ionique total. Cette soustraction d'une insaturation sera réitérée jusqu'à qu'aucun pic ne puisse être identifié au sein du chromatogramme.

Lorsque toutes les masses donnant une formule brute exacte correspondant à une acétogénine sont obtenues pour un certain nombre d'oxygènes et d'insaturations, la méthode est réitérée avec l'addition d'un oxygène à la formule brute précédente jusqu'à ne plus retrouver aucune masse, ni pic éligible (Figure 74).

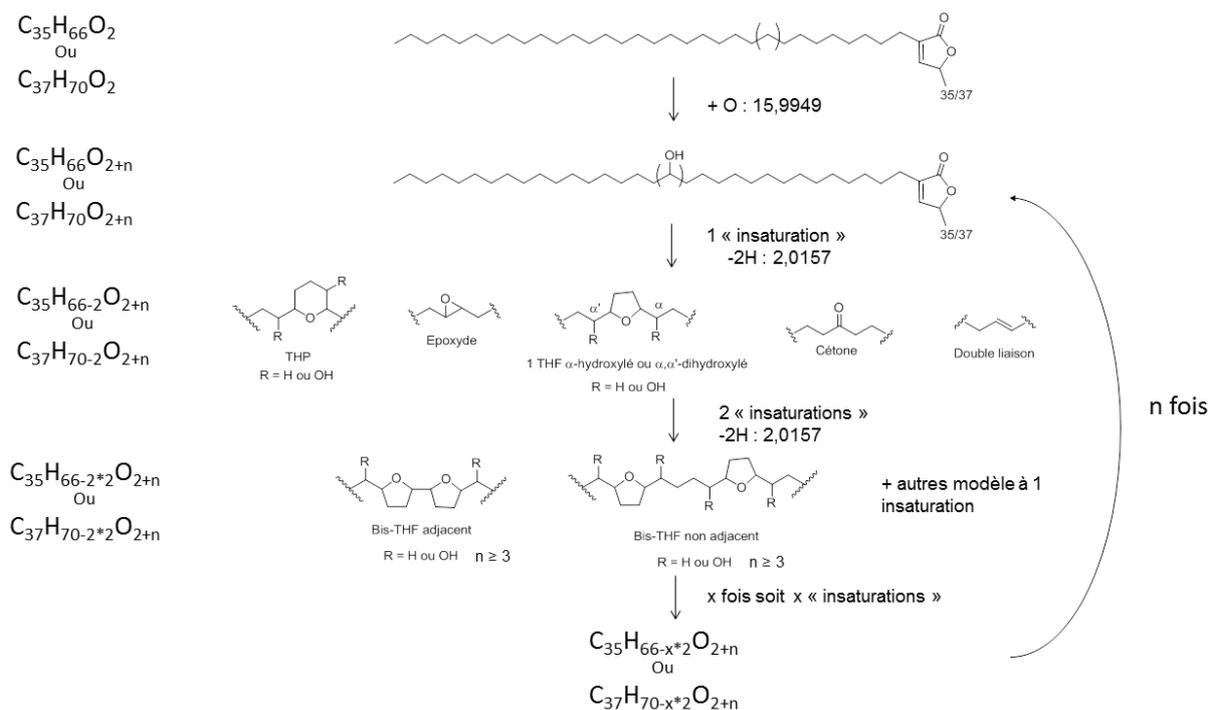


Figure 74 : Résumé de la méthodologie employée pour la déréplication d'extraits bruts

Des masses d'acétogénines originales ont été aussi recherchées comme par exemple des acétogénines en C33.

De plus, les molécules correspondant aux différentes masses identifiées par cette méthode ont été soumises à une étude SM/SM. Les fragments typiques de perte de lactone, perte de CO, CO₂ et pertes d'H₂O ont été systématiquement recherchés permettant de différencier les acétogénines des différentes molécules de l'extrait. Les fragments typiques A, B, C, X, Y, c et d ont ensuite été recherchés pour permettre une identification structurale des acétogénines.

Les fragments envisageables pour des acétogénines atypiques ont été recherchés en SM/SM, par exemple, des pertes de lactones type L-D (hydroxyle en C-34) équivalentes à une perte de 128,0473 u.m.a par rapport au fragment de rupture en β de la lactone.

Les pics sont attribués à des acétogénines précises, ou à des « types d'acétogénines », au sens d'ACGs de fonctionnalisation identique à celles d'acétogénines connues, avec des positions comparables pour les fonctions présentes.

Les attributions ne peuvent tenir compte des stéréochimies, qui ont été volontairement omises dans les figures.

L'ensemble des attributions est présenté sous forme de tableaux, par formules brutes, organisés de la manière suivante (Figure 75):

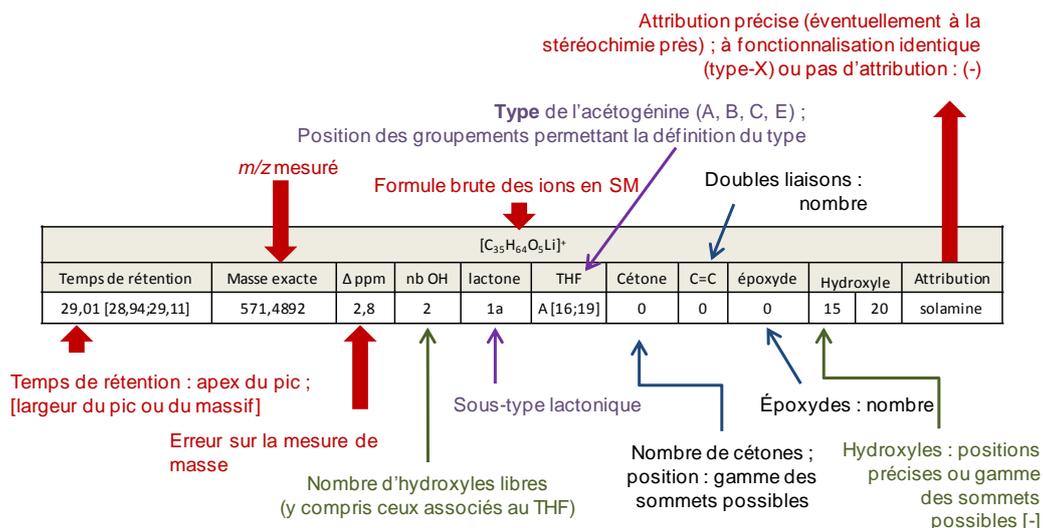


Figure 75 : Attribution des structures des ACGs identifiées

3. Déréplication sur un nectar d'*Annona muricata*

3.1 Matière première et extraction



Photo 17 : Nectar de corossol guyanais

Le nectar étudié a été acheté à Cayenne en Guyane Française par Claire Largier, en Juin 2009, dans un petit magasin d'alimentation générale. Ce nectar est de production industrielle locale.

Un extrait total a été obtenu avec l'AcOEt, suivant la méthodologie décrite dans la partie 5.2 de ce chapitre. L'échantillon obtenu est de 25,3 mg soit un rendement de $5 \cdot 10^{-3} \% m/v$.

3.2 Résultats

3.2.1 Aspects des chromatogrammes

Le TIC est similaire au chromatogramme UV. La plupart des pics chromatographiques est visible entre 12 min et 29 min avec environ 20 composés majoritaires fortement co-élus (Figure 73). L'intensité du pic maximal du TIC est de $1,1 \cdot 10^9$ et correspondrait à l'annonacine, au temps de rétention de 19,1 min. Cette hypothèse sera vérifiée au cours de ce travail.

Un examen complet des différentes acétogénines a été effectué masse par masse selon la technique explicitée auparavant, avec une extraction des chromatogrammes SIM correspondant. 54 masses ont été analysées et considérées comme pouvant être des acétogénines (perte de CO, perte de CO₂, perte de lactone, perte d'eau) : 19 ont pour formule brute C₃₇H_xO_xLi et 35 ont pour formule brute C₃₅H_xO_xLi. Aucune acétogénine en C-33 n'a été détectée.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur les structures attribuables à la classe des acétogénines de sous-type 1 mono ou polyhydroxylées, de formules brutes $C_{35}H_{66}O_x$ et $C_{37}H_{70}O_x$ (sans « insaturation » sur la chaîne aliphatique) (Figure 76).

3.2.2 ACGs sans « insaturation » : $C_{35}H_{66}O_x$ et $C_{37}H_{70}O_x$

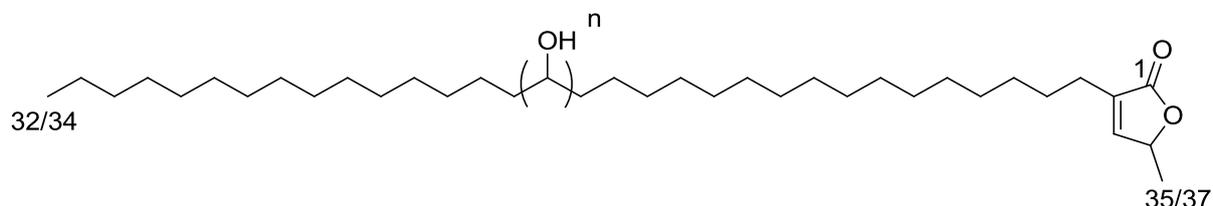


Figure 76 : Acétogénines mono ou polyhydroxylées (sans « insaturation »)

Les structures des acétogénines mono et poly-hydroxylées sont difficiles à définir : les intensités de ces ions sont tous aux environs de 1.10^6 . Cette intensité sera définie comme limite de détection pour les études structurales. En effet, au-dessous de cette limite, les ions X, A et B ne sont pas ou peu détectés.

De plus, au vu du chromatogramme TIC et UV, ces composés semblent très minoritaires (Figure 77).

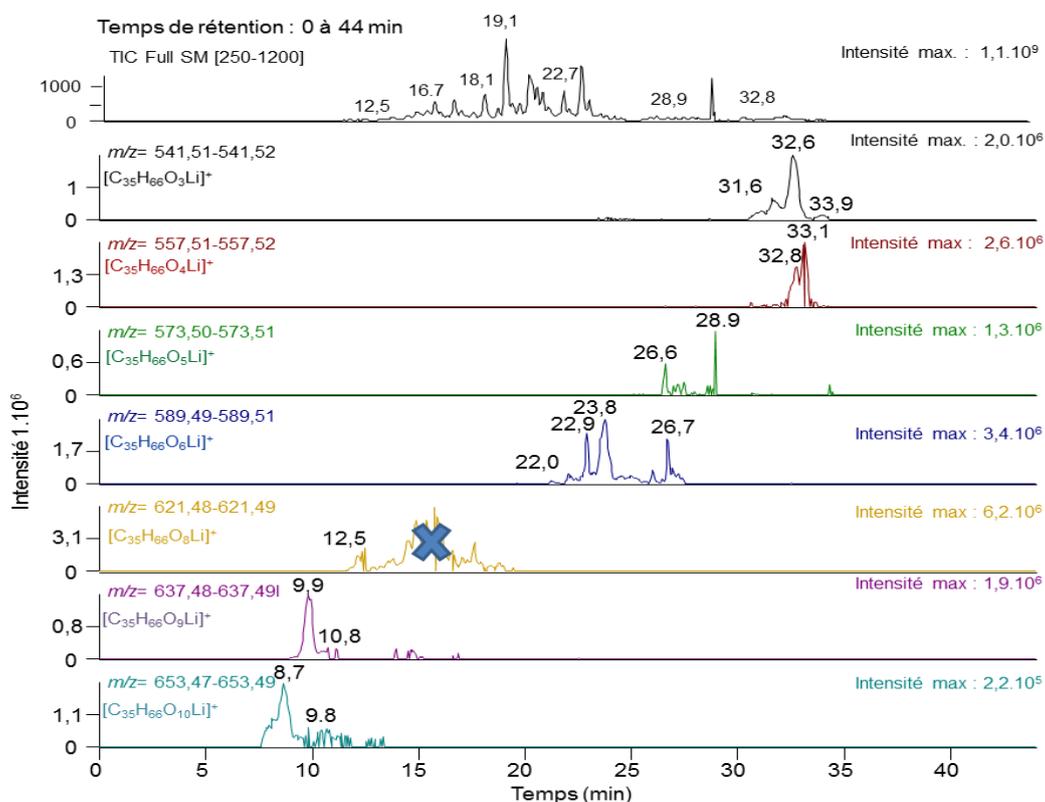


Figure 77 : Chromatogramme des acétogénines en C35 sans « insaturation »

Après études SM/SM, des pics à la masse m/z 621 ne correspondent pas à des acétogénines.

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules	Intensité
541,51-541,52	$[C_{35}H_{66}O_3Li]^+$	31 à 34 min	m(4)	$2,0 \cdot 10^6$
557,51-557,52	$[C_{35}H_{66}O_4Li]^+$	32 à 34 min	3	$2,6 \cdot 10^6$
573,50-573,51	$[C_{35}H_{66}O_5Li]^+$	26 à 29 min	6	$1,3 \cdot 10^6$
589,49-589,51	$[C_{35}H_{66}O_6Li]^+$	22 à 28 min	m(4)	$3,4 \cdot 10^6$
621,48-621,50	$[C_{35}H_{66}O_8Li]^+$	12 à 13,5 min	m(4)	$6,2 \cdot 10^6$
637,48-637,49	$[C_{35}H_{66}O_9Li]^+$	9,5 à 10,6 min	1 (2)	$1,9 \cdot 10^6$
653,47-653,49	$[C_{35}H_{66}O_{10}Li]^+$	10 à 15 min	m (trace)	$2,2 \cdot 10^5$

Tableau 36 : Récapitulatif des acétogénines en C35 sans insaturation

x: nombre de molécules majoritaire ; m : massif m ; (x) nombre de molécules majoritaires co-éluées dans un massif

❖ L'éventail des formules brutes s'étend des ACGs mono-hydroxylées ($C_{35}H_{66}O_3$) à octahydroxylées ($C_{35}H_{66}O_{10}$) (Tableau 36, Figure 77). Étrangement, le groupe de $C_{35}H_{66}O_7$, n'est pas visualisé, les ions extraits à la masse 605,48-605,49 correspondant manifestement aux isotopes de l'annonacine et de ses analogues avec un chromatogramme identique à celui obtenu à 603,47-603,49. Un écrasement des ions correspondant à des ACGs sans « insaturation » de même masse est possible.

❖ Seulement deux masses ont été observées pour les ACGs en C37 (Tableau 37 Figure 78). Au vu des intensités extrêmement faibles il a été difficile de dénombrer précisément ces ACGs. D'après les spectres SM/SM de ces ions, toutes ces acétogénines seraient 6 à 7 hydroxylées et de sous-type 1b (hydroxyle en C-4).

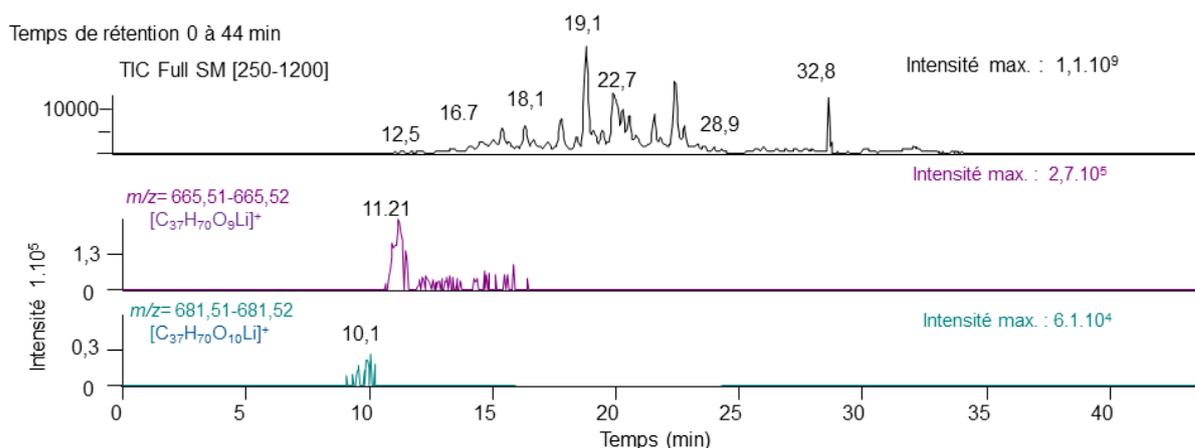


Figure 78: Chromatogramme des acétogénines en C37 « sans insaturation »

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules	Intensité
665,51-665,52	$[C_{37}H_{70}O_9Li]^+$	14 à 15,50 min	m	$2,7 \cdot 10^5$
681,51-681,52	$[C_{37}H_{70}O_{10}Li]^+$	10,3 à 12,50 min	m (trace)	$6,1 \cdot 10^4$

Tableau 37 : Récapitulatif des acétogénines en C37 sans insaturation

x: nombre de molécules majoritaire ; m : massif m ; (x) nombre de molécules majoritaires co-éluées dans un massif

L'analyse des spectres SM/SM en C35 permet d'obtenir certains renseignements sur la structure des ACGs polyhydroxylées présentées ci-dessous.

○ $[C_{35}H_{66}O_3Li]^+$ m/z 541,5

Au moins 4 ACGs mono-hydroxylées sont visibles et regroupées dans un massif de molécules entre 31 et 35 min sur ce chromatogramme (Figure 77). Aucune d'entre elles n'a d'hydroxyle positionné en C-4 (Tableau 38). En raison d'une faible intensité des fragments, l'hydroxyle n'a pas pu être positionné. Au niveau de la littérature, aucune acétogénine de cette formule brute n'a été isolée au sein d'*A. muricata*. Seule une acétogénine de ce type est connue : le reticulatamol ayant un hydroxyle en C-15, extrait de *A. reticulata*.

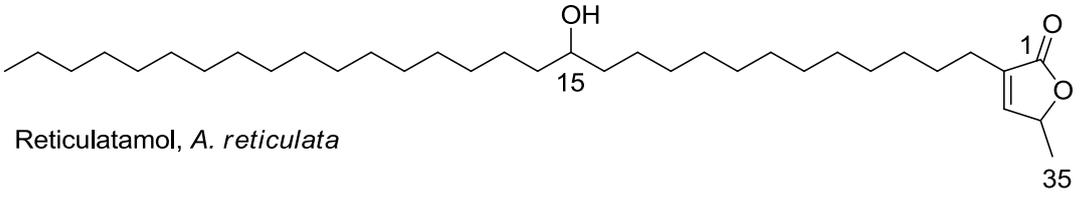
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;">32</div>  </div> <p>Reticulatamol, <i>A. reticulata</i></p>					
$[C_{35}H_{66}O_3Li]^+$					
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	Attribution
31,23 [31,08;31,27]	541,5155	2,2	1	1a	Type-reticulatamol
32,25 [32,04;32,38]	541,5156	1,9	1	1a	Type-reticulatamol
33,06 [32,91;33,20]	541,5158	1,6	1	1a	Type-reticulatamol
34,32 [34,22;34,36]	541,5172	1,0	1	1a	Type-reticulatamol

Tableau 38 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_3$

○ $[C_{35}H_{66}O_4Li]^+$ m/z 557,5

L'extrait contient 3 ACGs di-hydroxylées. Ce type de molécules n'a jamais été isolée au sein de cette espèce (Tableau 39). Seules 4 acétogénines similaires ont été isolées, à partir d'*A. atemoya* : les artemoines A, B, C et D ayant un système diol respectivement en 19/20 ou 17/18.

<p>Artemoin A +B, <i>A. atemoya</i></p>					
$[C_{35}H_{66}O_4Li]^+$					
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	Attribution
32,42 [32,32;32,56]	557,5108	1,4	2	1a	Type-artemoine
32,71 [32,54;32,88]	557,5110	1,0	2	1a	Type-artemoine
33,09 [32,98;33,26]	557,5110	1,1	2	1a	Type-artemoine

Tableau 39 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_4$

- $[C_{35}H_{66}O_5Li]^+$ m/z 573,5

Une multitude de composés tri-hydroxylés est visible au sein du nectar (Tableau 40, Figure 77). L'acétogénine la plus apolaire (tr = 28,9 min) semble être de sous-type 1b. Aucune d'entre elles n'a été extraite d'*A. muricata*, Et une seule de ce type est connue : la longanine d'*Asimina longifolia*. Cette ACGs est de sous type 1b et ressemblerait donc à la plus apolaire.

<p>Longanine, <i>As. longifolia</i></p>					
$[C_{35}H_{66}O_5Li]^+$					
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	Identification
26,50 [26,41;26,58]	573,5052	2,2	3	1a	Type-longanine
27,11 [26,93;27,15]	573,5051	2,3	3	1a	Type-longanine
27,39 [27,21;27,56]	573,5051	2,3	3	1a	Type-longanine
27,84 [27,73;27,95]	573,5058	1,2	3	1a	Type-longanine
28,29 [28,13;28,35]	573,5054	1,8	3	1a	Type-longanine
28,89 [28,53;28,93]	573,5054	1,8	3	1b	-

Tableau 40 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_5$

- $[C_{35}H_{66}O_6Li]^+$ m/z 589,5

Le nombre exact de molécules a été difficile à identifier dû à de nombreuses co-élutions (Figure 77, Tableau 41). Deux grands pics sont identifiés à 22 et 22,9 min. Une molécule de ce type a été isolée de *Goniothalamus gardneri* : la gardneriline, de sous-type 1b. Ici, aucune n'est similaire, car aucune n'est de sous-type 1b, leur structure n'a donc pas été déterminée.

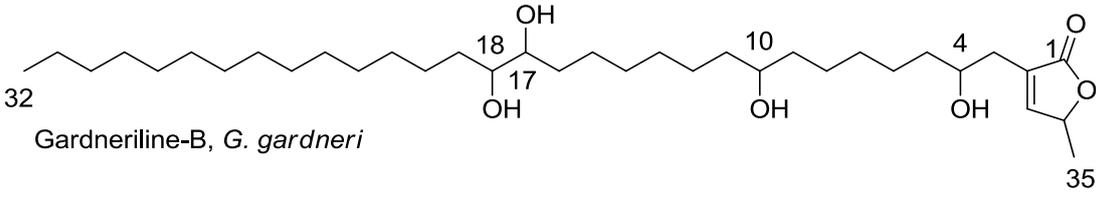
 Gardneriline-B, <i>G. gardneri</i>					
[C ₃₅ H ₆₆ O ₆ Li] ⁺					
Temps de rétention	Masse exacte	Δppm	nb OH	lactone	Identification
23,19 [23,08;23,25]	589,5003	1,8	4	1a	Type-gardneriline
23,76 ; 24,04 ; 23,93 [23,70;24,21]	589,4997	0,6	4	1a	Type-gardneriline

Tableau 41 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₆O₇

- $[C_{35}H_{66}O_8Li]^+$ m/z 621,49

Une multiplicité de molécules dont quatre composés majoritaires sont observée sur le chromatogramme entre 12 min et 18 min (Tableau 42, Figure 77). Ces acétogénines sont toutes de sous-type 1b. Deux acétogénines de ce type ont été isolées d'*A. muricata* : la donhexocine et le murihexol, qui pourraient correspondre à deux des molécules visibles. Les deux autres correspondraient à des isomères de position.

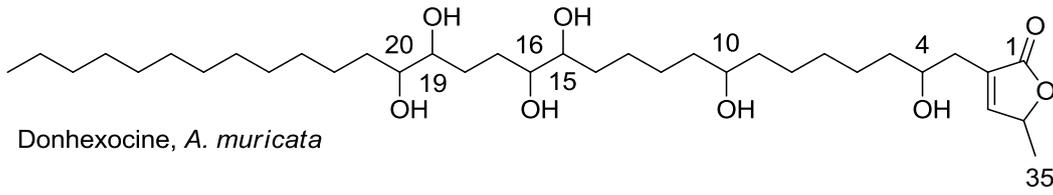
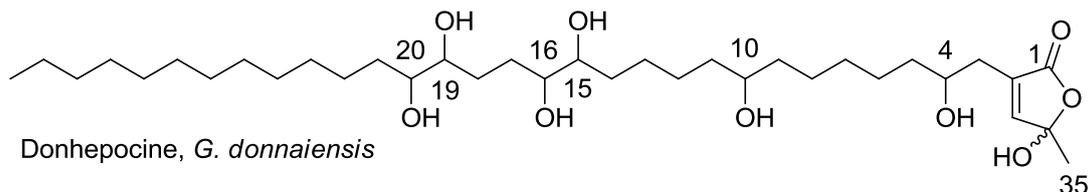
 Donhexocine, <i>A. muricata</i>					
[C ₃₅ H ₆₆ O ₈ Li] ⁺					
Temps de rétention	Masse exacte	Δppm	nb OH	lactone	Attribution
12,14 [12,01;12,25]	621,4895	2,8	6	1b	Type-donhexocine
12,47 [12,39;12,54]	621,4902	1,6	6	1b	Type-donhexocine
12,71 [12,63;12,87]	621,4906	1,0	6	1b	Type-donhexocine
13,05 [12,97;13,21]	621,4906	1,0	6	1b	Type-donhexocine

Tableau 42 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₆O₈

- $[C_{35}H_{66}O_9Li]^+$ m/z 637,48

Seulement 1 large pic chromatographique est visible à cette masse. Il correspond à un mélange d'acétogénine de sous-type 1b (Figure 76, Tableau 43.). On remarquera que la seule acétogénine possédant cette formule brute a été isolée de *Goniothalamus donnaiensis*: la donhepocine qui porte un hydroxyle en C-34, ce qui ne correspond à aucune molécule détectée ici (Figure 79).

Figure 79 : Donhepocine

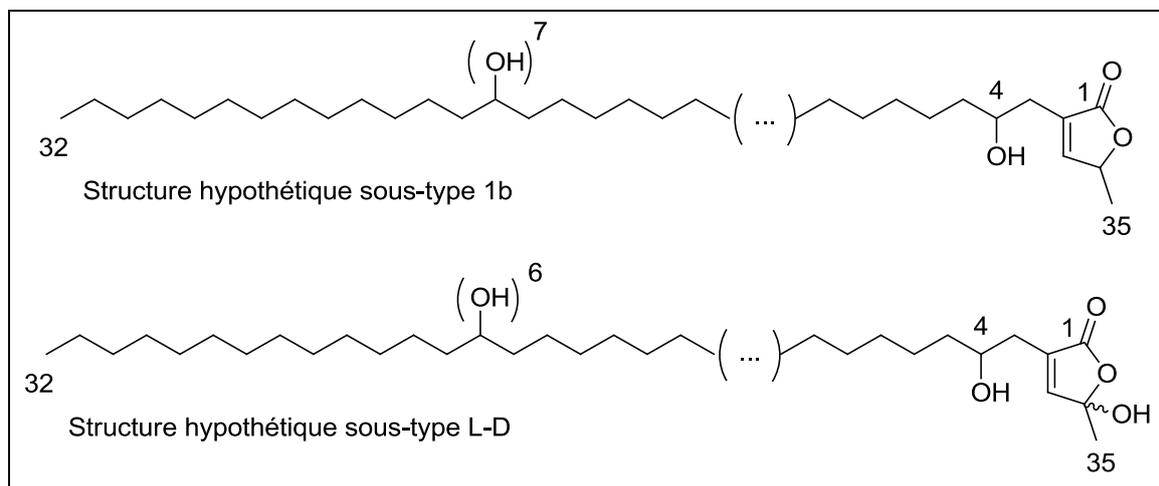


$[C_{35}H_{66}O_9Li]^+$					
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	Attribution
10,22 [9,83;10,51]	637,4855	0,7	7	1b	-

Tableau 43 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{66}O_9$

- $[C_{35}H_{66}O_{10}Li]^+$ m/z 653,48

Aucune acétogénine porteuse de 8 hydroxyles n'a été référencée. Un groupe d'ACGs de cette masse apparaît dans un massif avec au moins 3 composés co-élus (8,2-8,9 min) (Figure 77). Les intensités des ions sont faibles, reflétant une très faible quantité de ces molécules dans l'extrait. Le début du massif équivaut à des ACGs de sous-type 1b. Le pic majoritaire à 8,7 min possède un hydroxyle en C-4 et un hydroxyle sur la lactone, probablement en C-34 (Tableau 44).



C ₃₅ H ₆₆ O ₁₀ Li					
Temps de rétention	Masse exacte	ppm	nb OH	lactone	Attribution
m [8,22;8,67]	653,4797	2,1	8	1b	Masse inconnue
8,73 [8,69;9,16]	653,4804	1,0	8	1a	Masse inconnue

Tableau 44 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₆O₁₀

Un nombre et une quantité largement supérieure d'acétogénines détectées ici présentent des degrés de 1 à 4 insaturations différentes. La présentation des attributions se fera par nombre d'insaturations croissant et d'oxygénations croissant.

Un certain nombre des ACGs qui seront présentées correspondraient à des représentants de type E, portant un (des) époxyde(s) et/ou une (des) double (s) liaison(s). Ces molécules sont difficiles à caractériser par notre méthode : elles n'offrent que peu de fragments caractéristiques.

Celles de type E possédant des époxydes comportent 1 (comme l'époxymurine, Figure 80) à 3 atomes d'oxygènes sur la chaîne aliphatique, avec 2 à 3 insaturations (comme la triproxyrolline C₃₇H₆₄O₅, porteuse de 3 époxydes isolés de *Rollinia membranaceae*, Figure 81).

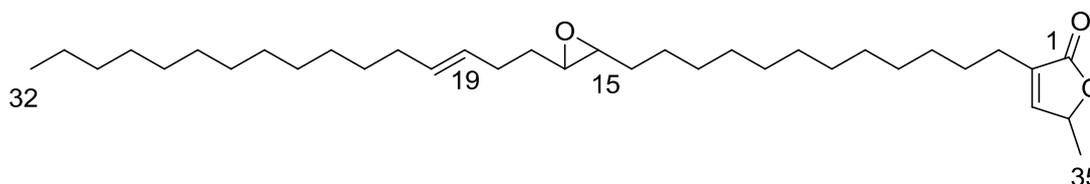


Figure 80 : Époxymurine-A, *A. muricata*

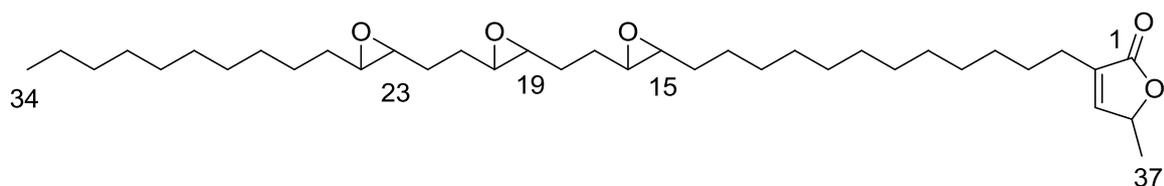


Figure 81 : Tripoxyrolline, *R. mebranaceae*

Pour ces composés, les fragments c et c-2H, issus du premier époxyde, sont généralement observés sur les spectres obtenus. Dans la littérature, et d'après des études de biogénèse [Gleye C. 1997, Bermejo A. 2005], l'écart typique entre deux époxydes est de deux atomes de carbone. De plus, des isomères de position sont sous forme de mélanges par CLHP.

Les acétogénines de type E ayant des hydroxyles et des doubles liaisons sont plus difficiles à caractériser. En effet, l'absence de fragmentation des doubles liaisons empêche leur positionnement. Les spectres que nous avons obtenu ne permettent pas de visualiser de manière non ambiguë l'ensemble des fragments en α des groupements hydroxyle (fragments X et A). De plus, ces composés décrits dans la littérature sont variés. Ici, ils possèdent entre 2 et 9 atomes d'oxygène, soit entre 0 et 7 hydroxyles sur la chaîne aliphatique. Il est donc difficile de prévoir ce type de structure lors de notre déréplication.

Dans la littérature, les acétogénines de type cétonique sont peu nombreuses. Celles-ci sont le plus souvent associées à un motif THF.

Les acétogénines de type mono-THF ont au minimum 4 oxygènes. La fragmentation du THF α,α' -dihydroxylé est permise par l'hydroxyle en α . Aucune étude des ACGs mono-THF de type α' -mono-hydroxylée en basse énergie n'a été publiée. Théoriquement, la formation des fragments B et B-2H est donc impossible, d'après le mécanisme présumé (Figure 61).

3.2.3 Acétogénines à 1 « insaturation » : $C_{35}H_{64}O_xLi$ et $C_{37}H_{68}O_xLi$

Les ACGs de ce type de formule brute présentes dans notre extrait sont en majorité en C35, avec 1 à 7 oxygènes sur leur chaîne aliphatique.

Elles peuvent potentiellement appartenir au type E (1 époxyde) ou au type A (1 groupement THF), ou éventuellement ne porter que des hydroxyles et une double liaison ou une cétone (Figure 82). La présence de fragments B, B-2H, X ou c et c-2H a été recherchée dans les spectres. On remarquera enfin que l'hypothèse d'ACGs mono-THP, jamais décrites, semble peu probable.

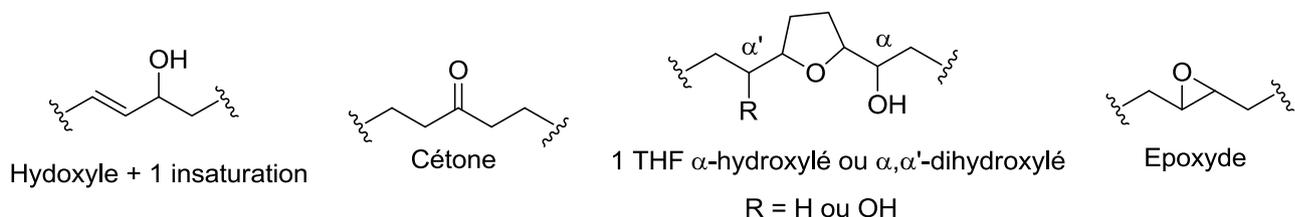


Figure 82 : Hypothèse de structure d'acétogénines ayant 1 « insaturation »

❖ La plupart des intensités de ces masses sont plus élevées que celles précédemment décrites (Figure 83, Tableau 45). L'intensité des ions m/z 603,47 est largement majoritaire des autres ions. Cet ion correspond à l'annonacine, l'ACG majoritaire du nectar. Ces résultats sont en adéquation avec le chromatogramme UV. Ces ACGs seraient donc majoritaires par rapport aux acétogénines sans insaturation. En outre, les ACGs ayant entre 6 et 9 oxygènes semblent très majoritaires par rapport aux autres molécules.

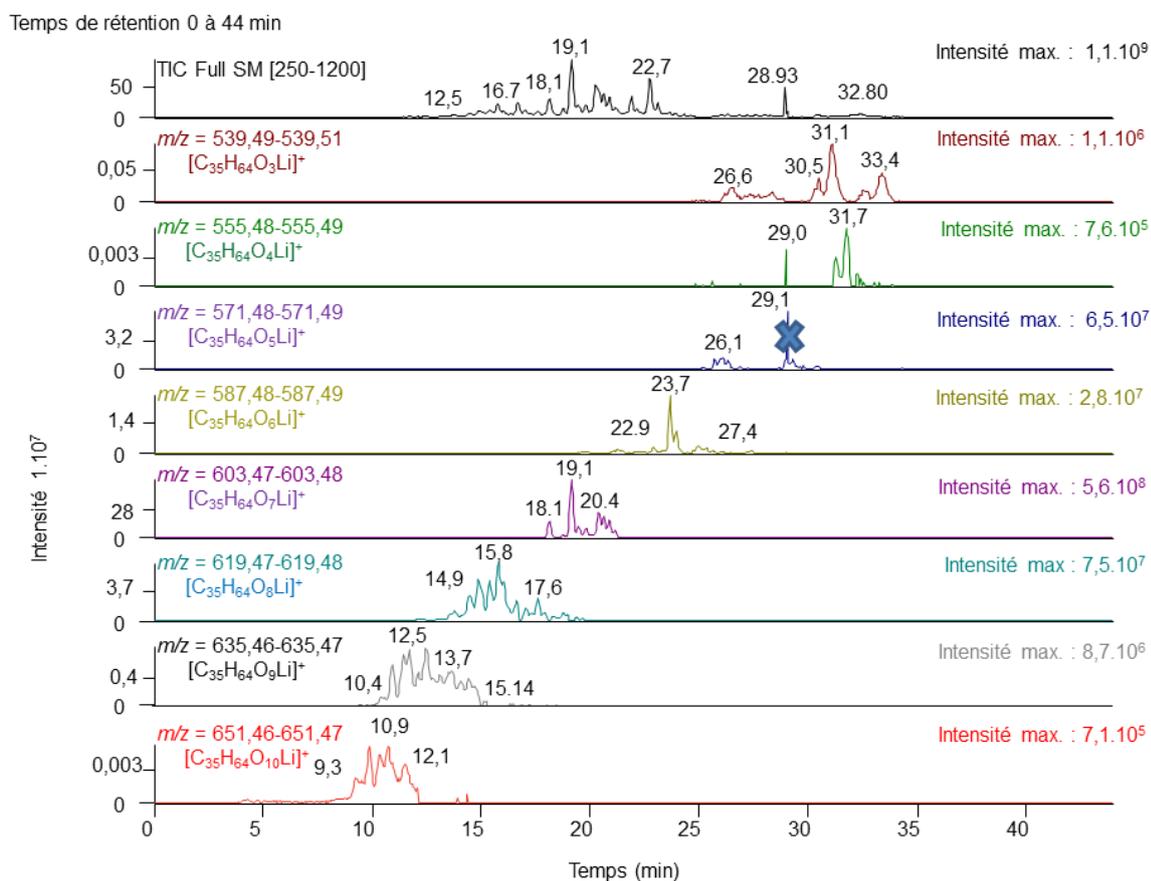


Figure 83 : Chromatogrammes des acétogénines en C35 à « 1 insaturation »

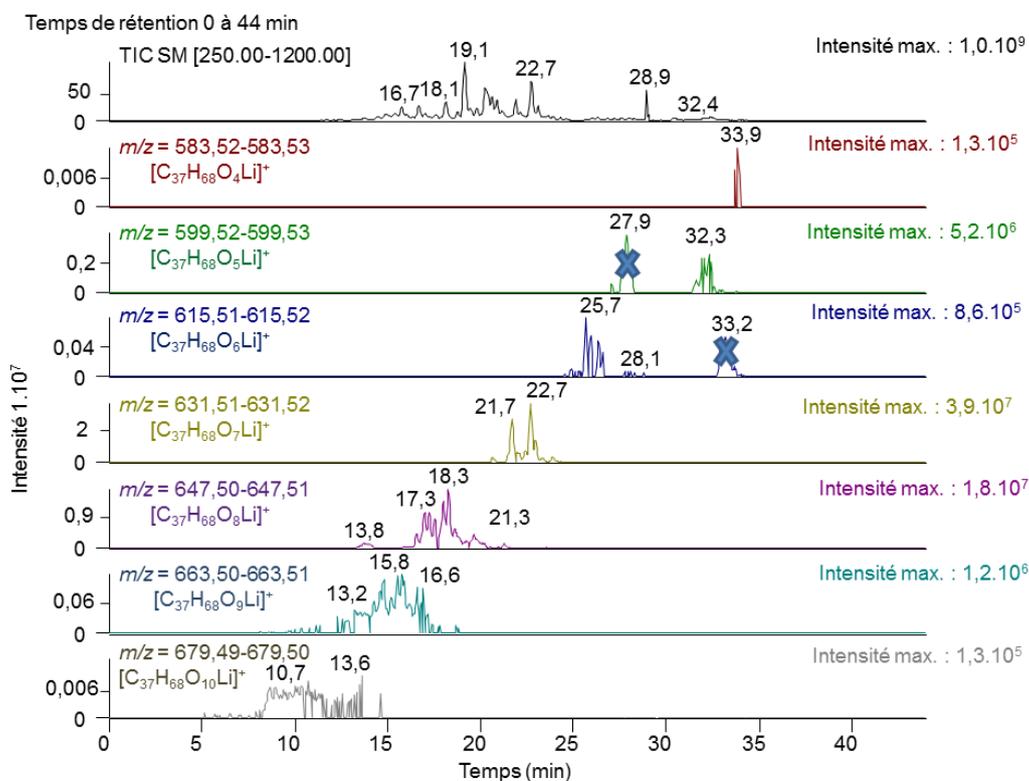
*Après étude SM/SM, le pic à 29 min de la masse 555,48 de formule brute $C_{37}H_{64}O_5Li$ ne correspond pas à des structures d'acétogénines.

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules	Intensité
539,49-539,51	$[C_{35}H_{64}O_3Li]^+$	25 à 35 min	8	$1,1 \cdot 10^6$
555,48-555,49	$[C_{35}H_{64}O_4Li]^+$	32 à 35 min	2	$7,6 \cdot 10^5$
571,48-571,49	$[C_{35}H_{64}O_5Li]^+$	28 à 30 min	3	$6,5 \cdot 10^7$
587,48-587,49	$[C_{35}H_{64}O_6Li]^+$	21 à 28 min	8	$2,8 \cdot 10^7$
603,47-603,48	$[C_{35}H_{64}O_7Li]^+$	14 à 25 min	9	$5,6 \cdot 10^8$
619,47-619,48	$[C_{35}H_{64}O_8Li]^+$	13 à 17,5 min	m (8)	$7,5 \cdot 10^7$
635,46-635,47	$[C_{35}H_{64}O_9Li]^+$	9 à 15 min	m (4)	$8,7 \cdot 10^6$
651,46-651,47	$[C_{35}H_{64}O_{10}Li]^+$	9 à 13 min	m (5)	$7,1 \cdot 10^5$

Tableau 45 : Tableau récapitulatif des acétogénines en C35 à 1 « insaturation »

m : multiplet m(trace) : multiplet indéfini

❖ L'analyse des chromatogrammes extraits montre également la présence d'ACGs en C37 porteuses d'1 « insaturation » (soit H_{68}) (Figure 84). Elles comportent entre 3 et 7 atomes d'oxygènes sur leur chaîne aliphatique. Les hypothèses de fonctionnalisation sont identiques à celles des ACGs en C35. L'abondance des pics chromatographiques de ces masses est surprenante au vue du peu de molécules de ce type publiées : seulement 7 molécules de ce type ont été isolées d'*A. muricata*. Les intensités de ces pics sont faibles et ce qui concluerait à une faible quantité de ces molécules. Les ACGs à 7 oxygènes ont une intensité majoritaire comme pour les C35.


Figure 84 : Chromatogrammes des acétogénines en C37 à 1 « insaturation »

*Après étude SM/SM, le massif entre 26 et 28 min de l'ion m/z 599,52 de formule brute $[C_{37}H_{68}O_5Li]^+$ et le massif entre 31 et 34 min de l'ion m/z 615,51 de formule brute $[C_{37}H_{68}O_6Li]^+$ ne correspondent pas à des structures d'acétogénines.

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules majoritaires	Intensité
583,52-583,53	[C ₃₇ H ₆₈ O ₄ Li] ⁺	32 à 35 min	2	1,3.10 ⁵
599,52-599,53	[C ₃₇ H ₆₈ O ₅ Li] ⁺	31 à 33 min*	4	5,2.10 ⁶
615,51-615,52	[C ₃₇ H ₆₈ O ₆ Li] ⁺	25 à 28,5 min	4	8,6.10 ⁵
631,51-631,52	[C ₃₇ H ₆₈ O ₇ Li] ⁺	20,5 à 25 min	3	1,8.10 ⁷
647,50-647,51	[C ₃₇ H ₆₈ O ₈ Li] ⁺	15,5 à 20,5 min	7	3,9.10 ⁷
663,50-663,51	[C ₃₇ H ₆₈ O ₉ Li] ⁺	13 à 19 min	m (9-13)	1,2.10 ⁶
679,49-679,50	[C ₃₇ H ₆₈ O ₁₀ Li] ⁺	8 à 16 min	traces	1,3.10 ⁵

Tableau 46: Récapitulatif des acétogénines en C37 et une insaturation

m : multiplet m(trace) : multiplet indéfini

Pour l'ensemble de ces composés des hypothèses plus ou moins complètes ont pu être formulées, et sont présentées ci-dessous.

○ $[C_{35}H_{64}O_3Li]^+$ m/z 583,52

La biogenèse proposée pour les acétogénines implique qu'un cycle THF est forcément flanqué d'au moins un hydroxyle. Pour cette formule brute seule les ACGs dont la chaîne aliphatique est fonctionnalisée par un époxyde, une cétone, ou enfin un hydroxyle et une double liaison peuvent exister. Une grande multitude d'acétogénines différentes dont 8 acétogénines majoritaires sont détectées sur le chromatogramme. La plupart d'entre elles sont séparées en deux groupes de polarités distincts de $t_r = 26$ min à 29 min et de $t_r = 30$ min à 34 min (Figure 83, Tableau 47).

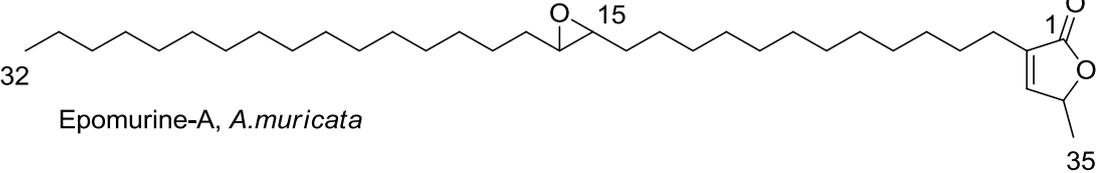
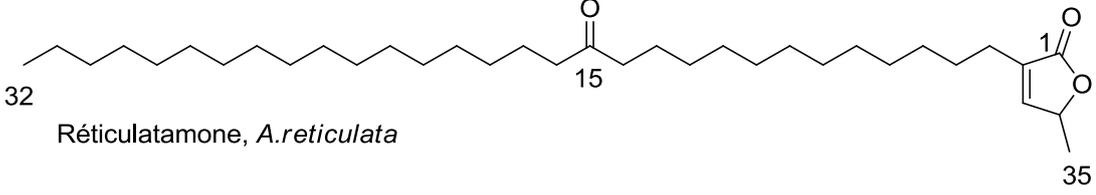
 <p>Epomurine-A, <i>A. muricata</i></p>									
 <p>Réticulatamone, <i>A. reticulata</i></p>									
$[C_{35}H_{64}O_3Li]^+$									
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	époxyde	Attribution
26,95 [26,69;27,22]	539,5017	1,2	≤ 1	1a	0	-	-	-	Type-épomurine ou type-réticulatamone
27,72 [27,37;27,85]	539,5014	0,7	≤ 1	1a	0	-	-		
28,54 [28,38;28,91]	539,5011	0,2	≤ 1	1a	0	-	-		
29,94 [29,53;30,26]	539,5004	1,2	≤ 1	1a	0	-	-		
30,66 [30,55;30,98]	539,5002	1,5	≤ 1	1a	0	-	-		
31,63 [31,32;31,80]	539,5001	1,7	≤ 1	1a	0	-	-		
32,98 [32,86;33,39]	539,4998	2,1	≤ 1	1a	0	-	-		
33,80 [33,68;34,22]	539,5000	1,9	≤ 1	1a	0	-	-		

Tableau 47: Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_3$

Au niveau des spectres, on ne retrouve pas de fragments caractéristiques (c, c-2H, X) hormis les pertes de CO, de CO₂, de lactone et les pertes d'eau. Le fragment de la lactone est faible permettant de dire qu'aucune des ACGs n'a d'hydroxyle en C-4. Lors de la fragmentation de la diépomuricanine, la fragmentation de l'époxyde le plus proche de la lactone est seulement visible.

Pour cette masse, au sein d'*A. reticulata*, la réticulatamone, une acétogénine ayant une cétone en C-15 a été isolée et au sein d'*A. muricata* deux acétogénines ont été isolées, ayant un époxyde en 15,16 ou 17,18 respectivement l'épomurine-A et l'épomurine-B (Tableau 47).

Les fragments d'un époxyde ne pourraient pas être visibles dû soit à une trop faible intensité des fragments ou au manque d'un second époxyde favorisant la fragmentation du premier époxyde. Les différentes hypothèses pourront donc être des acétogénines cétonique ou mono-époxydique (Tableau 47).

- $[C_{35}H_{64}O_4Li]^+$ m/z 555,50 et $[C_{37}H_{68}O_4Li]^+$ m/z 583,53

❖ Pour cette formule brute deux pics sont visibles au temps de rétention $t_r = 30,08$ min et $t_r = 31,7$ min à de faible intensité ($1 \cdot 10^5$) (Figure 83). Les ACGs isolées au sein d'*A. muricata* ayant cette formule brute sont les cohibine-A et la cohibine-B. Elles ont pour structure une ACGs di-hydroxylée ayant une double liaison (Tableau 48).

De multiples fragments sont observés sur le spectre SM/SM ne permettant pas d'identifier les différentes molécules. En recherchant spécifiquement les fragments A1 et A2 de ces deux molécules, la cohibine-A a été retrouvée au sein du nectar à un temps de rétention de 30,8 min. Les fragments de la cohibine-B n'ont pas été visibles (Tableau 48).

La seconde molécule plus apolaire à $t_r = 31,70$ min ne montre aucun fragment caractéristique. Au vue de la littérature, seules les ACGs de type cohibine ont été isolées. Cette molécule pourrait donc être de ce type.

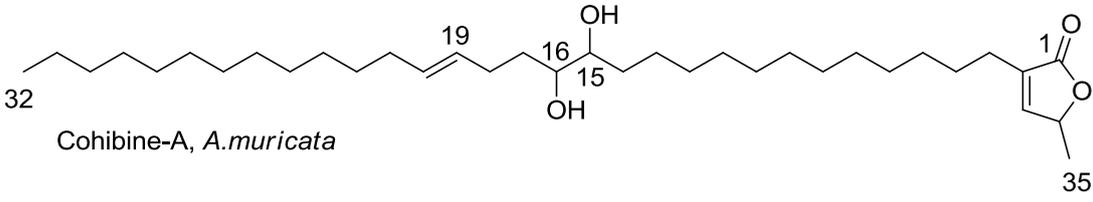
									
[C ₃₅ H ₆₄ O ₄ Li] ⁺									
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyle	Identification
31,08 [29,80;30,13]	555,4948	1,9	0	1a	0	0	0	15,16	Cohibine A
31,70 [30,32;30,81]	555,4948	0,9	≤ 2	1a	-	-	-	-	-

Tableau 48 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₄O₄

❖ Deux pics majoritaires sont visibles sur le spectre SM/SM de l'ion m/z 583,53 à des temps de rétention de $t_r = 33,32$ min et $t_r = 33,71$ min. De plus, les ACGs isolées au sein d'*A. muricata* de formule brute C₃₇H₆₈O₄ sont les cohibine-C et la cohibine-D (Figure 84). Malgré, une faible intensité des pics ($1 \cdot 10^5$), les fragments A1 et A2 ont été retrouvés au sein du spectre SM/SM permettant de placer des hydroxyles et de considérer que ces deux molécules sont la cohibine-C et D.

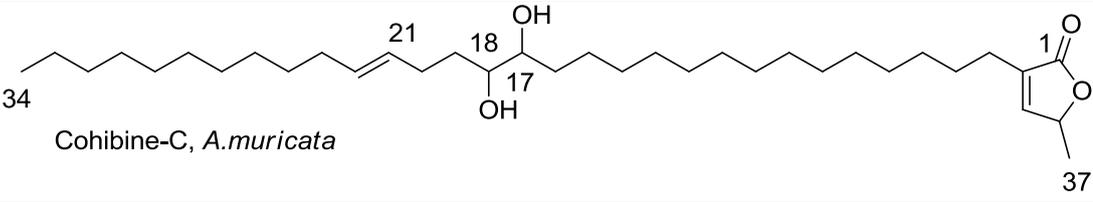
											
[C ₃₇ H ₆₈ O ₄ Li] ⁺											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	THF	Hydroxyles	Attribution	
33,32 [33,04;33,43]	583,5262	-1,7	2	1a	0	0	1	0	17	18	Cohibine-D
33,71 [33,54;33,99]	583,5260	-2,0	2	1a	0	0	1	0	15	16	Cohibine-C

Tableau 49 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₈O₄

- $[C_{35}H_{64}O_5Li]^+$ m/z 571,49 et $[C_{37}H_{68}O_5Li]^+$ m/z 599,52

❖ De nombreuses ACGs en C35 (C37) de cette formule brute sont connues : elles sont porteuses d'un système THF α,α' -dihydroxylé. Au niveau des fragmentations on obtient les fragments typiques B1 et B1-2H et le fragment X1 nous permettant de placer les fonctions THF et leur deux hydroxyles en α et α' . Ici, 3 pics ont été identifiés ayant ces trois fragments caractéristiques. Ces ACGs sont donc de type A.

Au sein des molécules en C35, deux composés ont leur THF placés au niveau des carbones C-16 et C-19. Leur temps de rétention, étant proche $t_r = 29,01$ min et $t_r = 29,27$ min, ces deux molécules pourraient correspondre à deux isomères de conformation (*cis* et *trans*) au niveau du THF de la solamine (Figure 83). La troisième molécule de temps de rétention $t_r = 29,72$ min a son THF placé entre les carbones C-14 et C-17 et correspondrait à la panatelline (Tableau 50).

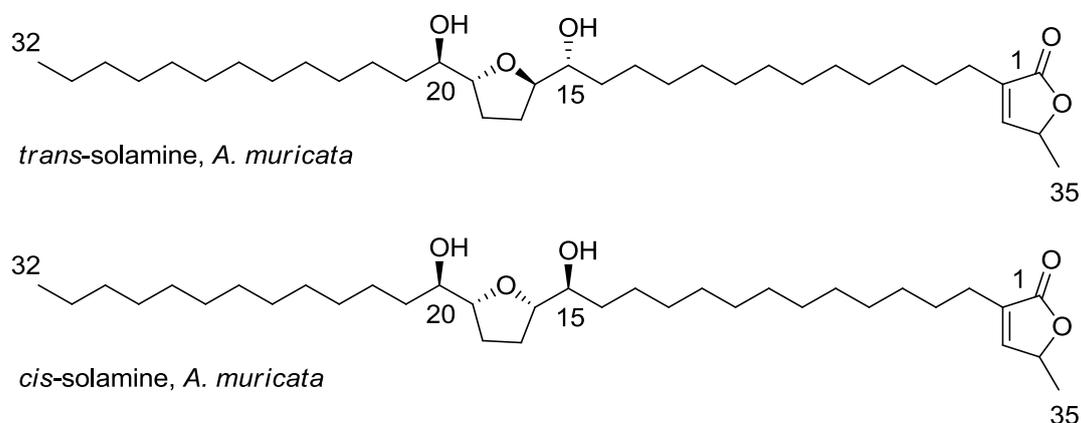


Figure 85 : Comparaison *cis* et *trans* solamine

Une augmentation de la polarité lorsque le THF est plus proche de la lactone est observée par cette étude de masse.

[C ₃₅ H ₆₄ O ₅ Li] ⁺										
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	époxyde	Hydroxyle	Attribution
29,01 [28,94;29,11]	571,4892	2,8	2	1a	A [16;19]	0	0	0	15 20	solamine
29,27 [29,15;29,46]	571,4892	2,8	2	1a	A [16;19]	0	0	0	15 20	solamine
29,72 [29,60;29,87]	571,4884	4,2	2	1a	A [14;17]	0	0	0	13 18	panatelline

Tableau 50 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₄O₅

❖ Pour les acétogénines en $C_{37}H_{68}O_5$, 4 molécules majoritaires sont visibles (Figure 84). Sur le spectre SM/SM, les fragments caractéristique B1 et B1-2H permettent de placer les THF et de caractériser des acétogénines mono-THF : la réticulacine (*cis* et *trans*) au temps de rétention de $tr = 31,67$ et $tr = 32,01$ min ayant son THF placé en C-16 et C-19 et l'uvariamicine (*cis* et *trans*) à $tr = 32,0$ min et $32,4$ min ayant son THF placé en C-18 ;C-21 (Tableau 51).

Uvariamicine-I, *A. muricata*

[$C_{37}H_{68}O_5Li$] ⁺										
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyle		Attribution
31,67 [32.50;31.74]	599,52023	3,2	2	1a	A [18;21]	0	0	17	22	Reticulacine
32,01 [31.93;32.12]	599,52020	3,2	2	1a	A [18;21]	0	0	17	22	Reticulacine
32,01 [31.93;32.12]	599,52020	3,2	2	1a	A [16;19]	0	0	15	20	Uvariamicine I
32,39 [32.17;32.56]	599,52013	3,3	2	1a	A [16;19]	0	0	15	20	Uvariamicine I

Tableau 51 : Acétogénines en $C_{37}H_{68}O_5$

- $[C_{35}H_{64}O_6Li]^+$ m/z 571,49 et $[C_{37}H_{68}O_6Li]^+$ m/z 599,52

❖ Huit composés majoritaires sont observés sur le chromatogramme extrait des acétogénines en C35 (Tableau 52). Deux molécules peuvent être totalement élucidées par attribution des fragments B1, B1-2H et X3 : la corossoline (*cis* et *trans*) (Tableau 52). En raison d'un trop grand nombre de fragments, il a été impossible de trouver le fragment X3 ne permettant pas de placer l'hydroxyle des deux molécules aux temps de rétentions $tr = 24,9$ et $27,2$ min. Les structures de ces acétogénines sont tout de même partiellement élucidées. Elles ont toutes les deux leur THF placés entre le C-14 et le C-17 et leur hydroxyle placé entre le THF et la lactone. Ces dernières sont donc de type logifolicine une acétogénines isolée d' *Asimina longifolia* (Figure 86). Les trois autres composés les plus polaires ($tr = 21,18$; $21,65$ et $22,82$ min) n'ont aucun fragment caractéristique sur les spectres SM/SM ne permettant pas de donner d'hypothèse de structure. Les temps de rétention étant peu différents des autres molécules, les structures pourraient être elles aussi structurellement proches. Le positionnement d'un hydroxyle en α étant obligatoire pour le fragment du THF, l'hypothèse la plus probable serait pour ces molécules une acétogénine α -mono-hydroxylés comme la muricine-H isolée d'*A. muricata* (Figure 87).

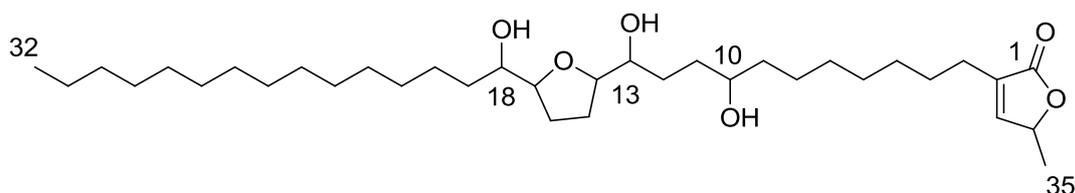


Figure 86 : Longifolicine *Asimina longifolia*

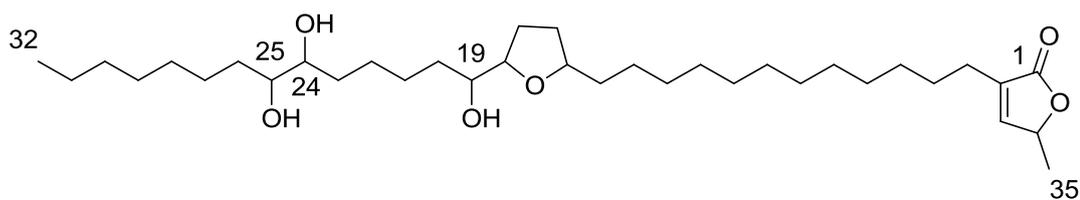


Figure 87 : muricine-H *A. muricata*

[C ₃₅ H ₆₄ O ₆ Li] ⁺											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyle			Identification
21,18 [21,02;21,44]	587,4851	1,2	≤ 4	1a	-	-	-	-	-	-	-
21,65 [21,55;21,70]	587,485	1,2	≤ 4	1a	-	-	-	-	-	-	-
22,82 [22,67;22,98]	587,485	1,4	3	1a	A [16 ;19]	0	0	[4;14]	15	20	-
23,51 [23,42;23,66]	587,4849	1,5	3	1a	A [16 ;19]	0	0	10	15	20	Corossoline
23,84 [23,76;24,02]	587,4852	0,9	3	1a	A [16 ;19]	0	0	10	15	20	Corossoline
24,85 [24,74;24,96]	587,485	1,3	3	1a	A [14 ;17]	0	0	[4;12]	13	18	Type-longifolicine
25,24 [24,19-25,50]	587,4846	1,9	3	1a	A [16 ;19]	0	0	10	15	20	Corossoline
27,25 [27,14;27,36]	587,4849	1,4	3	1a	A [14 ;17]	0	0	[4;12]	13	18	Type-longifolicine

Tableau 52 : Acétogénines C₃₅H₆₄O₆

❖ Deux massifs distincts de deux fois deux composés majoritaires sont visibles sur le spectre des ACGs en C37 (Figure 84). Les spectres des deux acétogénines les plus apolaires de temps de rétention $t_r = 26,36$ et $26,60$ min montrent des fragments de type B1 et B1-2H nous permettant de placer leur THF entre le C-16 et le C-19 avec un hydroxyle entre le THF et la lactone. Le fragment X3 permettant de positionner l'hydroxyle n'a pas pu être déterminé. Ces acétogénines sont de type longicoricine extraite d'*Asimina longifolia* (Tableau 53).

[C ₃₇ H ₆₈ O ₆ Li] ⁺											
Temps de rétention	Masse exacte	Δppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyle			Attribution
25,69 [25,56;25,80]	615,5161	1,6	≤ 4	1a	-	-	-	-	-	-	-
25,93 [25,85;26,14]	615,5191	3,3	≤ 4	1a	-	-	-	-	-	-	-
26,36 [26,28;26,47]	615,5179	1,5	3	A 1a	[16;19]	0	0	4;14	15	20	Type-longicoricine
26,60 [26,52;26,71]	615,5151	3,1	3	A 1a	[16;19]	0	0	4;14	15	20	Type-longicoricine

Tableau 53 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₈O₆

Les spectres SM/SM de deux autres acétogénines les plus polaires n'ont aucun fragment caractéristique. Seulement une acétogénine de formule brute C₃₅H₆₄O₆ a été isolée d'*A. muricata* : le muricatenol (Figure 88). Celle-ci est de type E et polyhydroxylée en C-4, C-10, C-18 et C-19 avec une double liaison en C-14. Cependant, aucune des molécules visibles sur le chromatogramme n'a de fragment en X4 d'une intensité de 100 % permettant de positionner un hydroxyle en C-4.

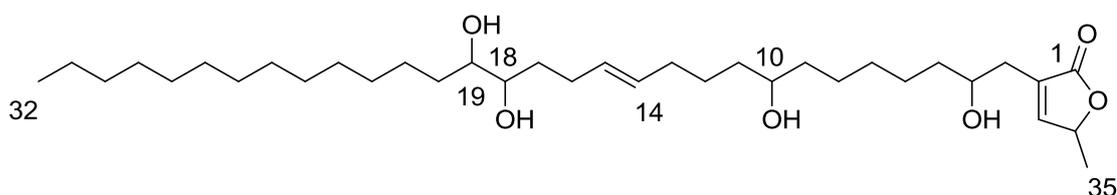


Figure 88 : Muricatenol, *A. muricata*

- [C₃₅H₆₄O₇Li]⁺ m/z 603,48 et [C₃₇H₆₈O₇Li]⁺ m/z 631,51

❖ Les pics correspondant à la formule brute C₃₅H₆₄O₇ sont ceux ayant un maximum d'intensité en masse (1.10⁸) et aussi en UV. Ces molécules seraient les composés majoritaires du nectar (Figure 73, Figure 82).

Principalement, neuf molécules sont visibles ayant toutes des fragments X4 d'intensité relative à 100 % et permettant de placer l'un de leur hydroxyle en C-4 (Tableau 54). En outre, des fragments B1, B1-2H permettent de placer les THF et un hydroxyle entre le THF et la lactone. Les 5 molécules les plus polaires, d'entre elles, ont toutes des THF α,α'-dihydroxylés et placés entre le C-16 et C-19. Trois d'entre-elles ($t_r = 17,99$; $18,97$ et $19,33$ min) ont un fragment X3 permettant de positionner le dernier hydroxyle en C-10. Ces molécules ont donc la même structure que l'annonacine. Plusieurs

stéréoisomères de l'annonacine ont été isolés au sein des Annonaceae (exemple : l'annonacine-A isolée d'*A. squamosa* de configuration *thréo/trans/érythro* contrairement à l'annonacine ayant pour configuration (*thréo/trans/thréo*). En comparant ces molécules avec les standards, ces composés sont donc l'annonacine à tr = 18,97 min, la *cis*-annonacine à tr = 19,33 min et un épimère non défini à tr = 17,99 min. Les deux autres molécules ayant un THF placé entre C-16 et C-19 ont un hydroxyle en position C-8 et ils correspondraient à la xylopianine (*X. aromatica*) ou à l'un de ces épimères (Figure 89).

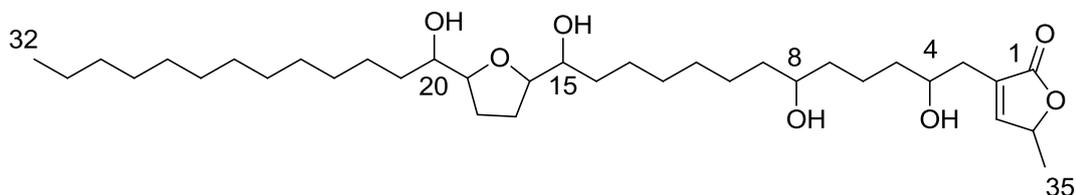


Figure 89 : Xylopianine, *Xylopiaceae*

Les quatre molécules les plus apolaires sont toutes des ACGs α,α' -dihydroxylées avec un THF placé entre le C-14 et C-17. L'étude des spectres SM/SM des deux molécules les plus apolaires (tr = 20,73 et 20,98 min) a permis de placer leur hydroxyle en C-10. Ces molécules correspondent à la goniotalamicine déjà isolée d'*A. muricata* (Figure 90).

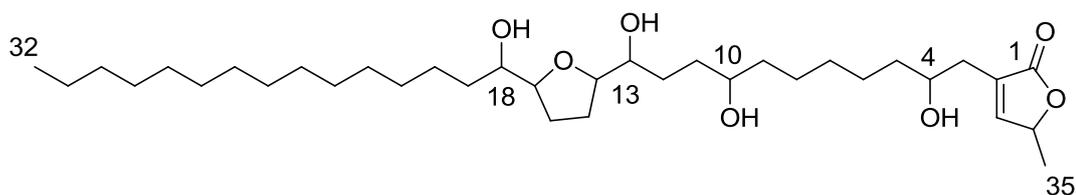


Figure 90 : Goniotalamicine, *Annonaceae*

L'emplacement de l'hydroxyle placé entre le THF et la lactone des deux dernières ACGs mono-THF α,α' -dihydroxylés de temps de rétention $t_r = 20,26$ min et $20,47$ min n'a pas pu être déterminé.

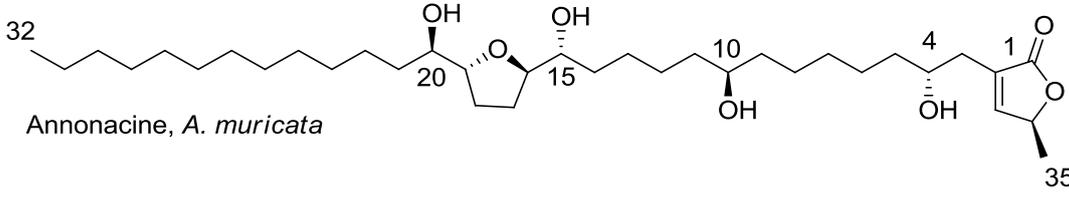
											
[C ₃₅ H ₆₄ O ₇ Li] ⁺											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	hydroxyles				Identification
18,00 [17,84;18,09]	603,4798	1,5	4	1b	A [16;19]	0	4	10	15	20	Annonacine
18,60 [18,5;18,71]	603,4798	1,5	4	1b	A [16;19]	0	4	8	15	20	Xylopianine
19,10 [18,81;19,07]	603,4798	1,5	4	1b	A [16;19]	0	4	10	15	20	Annonacine
19,33 [19,22;19,43]	603,4796	1,7	4	1b	A [16;19]	0	4	10	15	20	Annonacine
19,64 [19,53;19,79]	603,4797	1,6	4	1b	A [16;19]	0	4	8	15	20	Xylopianine
20,26 [20,16;20,36]	603,4797	-0,6	4	1b	A [14;17]	0	4	-	13	18	-
20,47 [20,42;20,57]	603,4792	2,4	4	1b	A [14;17]	0	4	-	13	18	-
20,73 [20,63; 20,83]	603,4794	2,2	4	1b	A [14;17]	0	4	10	13	18	Goniothalamine
20,98 [20,88;21,14]	603,4795	1,8	4	1b	A [14;17]	0	4	10	13	18	Goniothalamine

Tableau 54 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₄O₇

❖ Trois molécules majoritaires sont visibles sur le TIC des ACGs en C37 (Figure 84). D'après les spectres SM/SM, toutes les molécules ont un hydroxyle en C-4 (Tableau 55). Seule la molécule la plus apolaire à $t_r = 23,17$ min a pu être totalement identifiée. Le spectre SM/SM a montré les fragments B1, B1-2H, X3 et X4 permettant d'identifier la xylomatatine isolée de *Xylopiia aromatica* (Tableau 55).

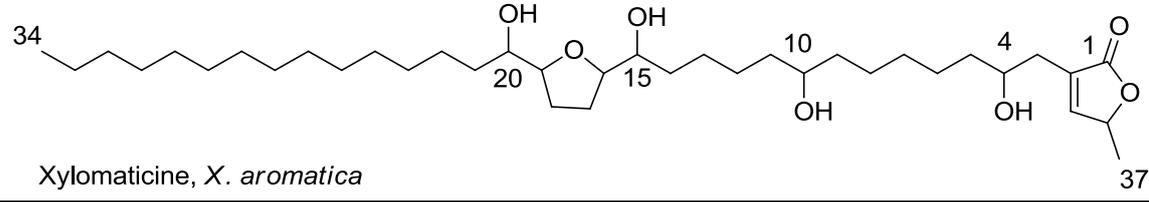
												
[C ₃₇ H ₆₈ O ₇ Li] ⁺												
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyles			Attribution	
21,96 [21,77;22,12]	631,5135	2,4	≤ 5	1b	A [18;21]	-	-	4	-	-	-	-
22,72 [22,68 ; 22,96]	631,5118	0,3	≤ 5	1b	A [18;21]	-	-	4	-	-	-	-
23,17 [23,11;23,29]	631,5123	0,6	3	1b	A [16;19]	0	0	4	10	15	20	Xylomaticine

Tableau 55 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₈O₇

L'annomutacine, une mono-THF porté par les carbones C-18 et C-21, a été extraite d'*A. muricata* et pourrait correspondre à l'une des molécules polaires (tr = 21,96 ; 22,72 min) par rapport à sa polarité et à son temps de rétention (Figure 91). Cependant, leurs spectres SM/SM n'ont montré aucun fragment caractéristique de THF. Nous ne pouvons donc pas attribuer leur structure.

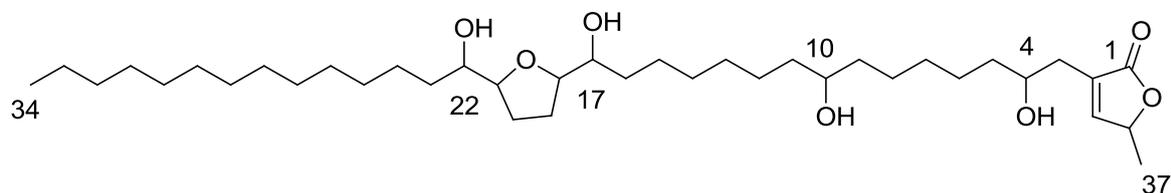


Figure 91 : Annomutacine, *A. muricata*

- $C_{35}H_{64}O_8Li$ m/z 619,42 et $C_{37}H_{68}O_8Li$ m/z 647,51

❖ Des acétogénines en C35 avec 8 oxygènes et une insaturation sont souvent isolées d'*A. muricata*. Un large massif (tr = 12 à 18 min) est visible sur le spectre de masse comportant au minimum 15 ACGs dont 6 produits abondants (Figure 83, Tableau 56).

 Annomuricine, <i>A. muricata</i>												
[C ₃₅ H ₆₄ O ₈ Li] ⁺												
Temps de rétention	Masse exacte	Δppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	hydroxyles				Attribution	
13,52 [13,37;13,60]	619,475	1,0	5	1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	15	20	20+	-
13,70 [13,64;13,91]	619,4748	1,3	5	1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	15	20	20+	-
14,42 [14,28;14,58]	619,4747	1,3	5	1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	[5;14]	15	20	Type-annomuricine-A
14,80 [14,67;15,10]	619,4745	1,3	5	1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	[5;14]	15	20	Type-annomuricine-A
15,36 [15,19;15,49]	619,4745	1,8	5	1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	[5;14]	15	20	Type-annomuricine-A
15,79 [15,62;15,87]	619,4737	3,0	5	1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	[5;14]	15	20	Type-annomuricine-A
15,92 [15,83;16,16]	619,4742	2,2	5	1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	[5;14]	15	20	Type-annomuricine-A
17,52 [17,42; 17,73]	619,474	2,5	5	L-D 1b	A [16;19]	0	4	[5;14]	15	15	34	Type-goniodonine

Tableau 56 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₄O₈

Les spectres SM/SM montrent que toutes les ACGs majoritaires de cette formule brute sont de type A ayant leur THF placé entre les carbones C-16 et C-19. Elles peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur polarité et de leur différences structurales. D'après les fragments B1 et B1-2H, les ACGs les plus polaires de temps de rétention tr = 13,52 et 13,70 min ont 3 hydroxyles

entre la lactone et le THF (C-4 et C-15) et deux hydroxyles en bout de chaîne aliphatique en C-20 et un dernier ne pouvant pas être déterminé. Aucune ACGs de ce type n'a été décrite auparavant.

Le spectre montre un second groupe de polarité intermédiaire. Ces ACGs sont de type α,α' -dihydroxylées à mono-THF avec 4 hydroxyles entre le THF et la lactone. Les molécules étant très co-éluées les fragments X3 et X4, n'ont pas été détectés et les hydroxyles n'ont pas pu être placés. Plusieurs acétogénines de ce type ont été isolées d'*A. muricata*. L'une d'entre elles, l'annonmuricine existe sous différents stéréoisomères (A, B, C et E) et pourrait correspondre à plusieurs de ces pics (Tableau 56).

Enfin, l'acétogénine la plus apolaire a une perte de lactone perdant 3 atomes d'oxygène. Cette acétogénine serait hydroxylée au niveau du C-34 comme la goniodonine isolée de *Goniothalamus donnaiensis* (Figure 92).

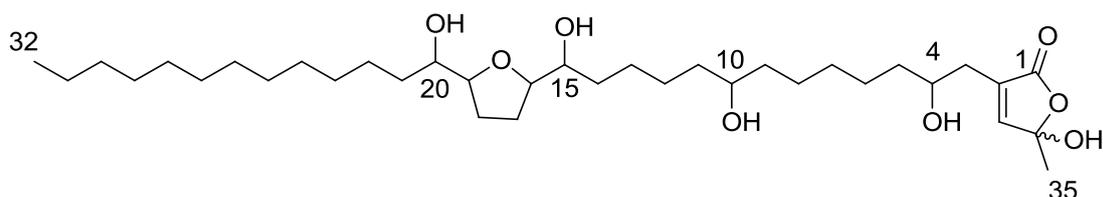


Figure 92 : Goniodonine, *G. donnaiensis*

❖ Un massif est observé sur les chromatogrammes des ACGs en C37 entre 14 et 22 min. Malgré une forte co-élution, sept composés majoritaires sont visibles. Sur les spectres SM/SM aucun fragment caractéristique n'a permis d'identifier ces molécules hormis la présence d'un fragment X de rupture en β de la lactone permettant de déterminer leur sous-type 1b. De plus, ces acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_8Li$ n'ont jamais été isolées au sein d'*A. muricata* et seulement 3 (toutes de type A dont 2 de sous-type 1b) de cette formule brute ont été décelées au sein des Annonaceae. L'une d'entre elles est la montanacine isolée d'*A. montana* (Tableau 57).

[C ₃₇ H ₆₈ O ₈ Li] ⁺									
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyles	Attribution
16,66 [16,63;16,82]	647,5074	0,8	5	1b	-	-	-	5	Type-montanacine
17,08 [16,90;17,17]	647,5069	0,0	5	1b	-	-	-	5	Type-montanacine
17,31 [17,22;17,40]	647,5069	0,0	5	1b	-	-	-	5	Type-montanacine
17,63 [17,49;17,76]	647,5066	0,4	5	1b	-	-	-	5	Type-montanacine
18,09 [17,95;18,18]	647,5065	0,6	5	1b	-	-	-	5	Type-montanacine
18,36 [18,27;18,53]	647,5065	0,6	5	1b	-	-	-	5	Type-montanacine

Tableau 57 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₈O₈

- $[C_{35}H_{64}O_9Li]^+$ m/z 635,47 et $[C_{37}H_{68}O_9Li]^+$ m/z 663,50

❖ Le chromatogramme des ACGs de formule brute $C_{35}H_{64}O_9$ montre un large massif de 10 à 15,5 min dont quatre molécules majoritaires.

Sur le spectre SM/SM, tout au long du massif, le fragment de rupture en β de la lactone est observé avec une intensité relative de 100 %. Toutes les ACGs de cette formule brute sont donc de sous-type 1b.

De plus, sur le chromatogramme des ACGs les plus polaires ($tr = 10,73$ et $11,22$ min) des fragments B1 et B1-2H sont visibles. Celles-ci sont toutes les deux mono-THF avec leur THF entre C-16 et C-19. Le nombre d'hydroxyles est de 6. Deux sont placés en α, α' du THF, un autre au niveau du C-4, deux autres sont placés entre le THF et le l'hydroxyle en C-4 et le dernier entre l'hydroxyle en C-20 et le méthyl terminal (Figure 93). Aucune acétogénine de ce type n'a été isolée.

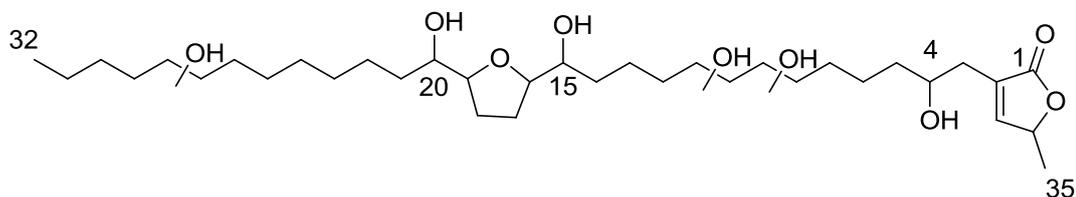


Figure 93 : Hypothèse de structure des acétogénines de formule $C_{35}H_{64}O_9$ à $tr = 10,73$ et $tr = 11,22$ min

Aucun fragment caractéristique n'a été identifié sur les spectres SM/SM des deux autres molécules majoritaires ($tr = 11,47$ et $12,30$ min). Cinq molécules ont été isolées d'*A. muricata* pouvant correspondre à leur formule brute. Deux types ont été extraits : une mono-THF α, α' -dihydroxylés possédant cinq hydroxyles entre le THF et la lactone (l'annohexocine) ou une ACG α' -hydroxylée (la murihexocine A) (Figure 94, Tableau 58). Un encombrement de la partie entre le THF et la lactone par un fort nombre d'hydroxyles pourrait défavoriser la fragmentation du THF et aucun fragment B1 et B1-2H ne pourrait être visible, ou comme il a été vu auparavant, il ne semble pas que la fragmentation des ACGs de type α' -hydroxylés permette d'obtenir des fragments caractéristiques. Les deux hypothèses peuvent donc être envisagées.

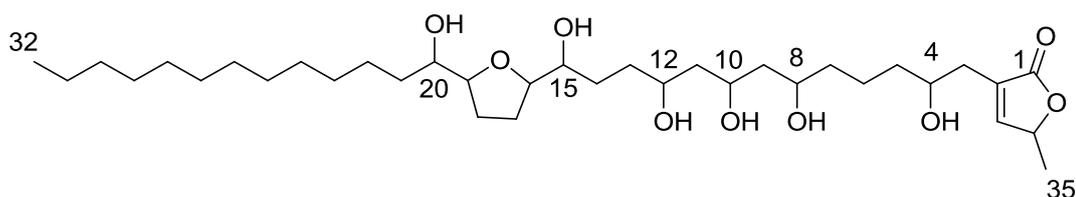


Figure 94 : Annohexocine, *A. muricata*

Le fragment de rupture en β de lactone permet d'identifier un groupe d'acétogénines atypiques entre 12,61 et 14,84 min. En effet, ce fragment a une différence de 16 u.m.a par rapport aux autres molécules et correspondrait à des acétogénines portant un hydroxyle en C-34. Différentes intensités du fragment de rupture de la lactone sont identifiées ce qui correspondrait à différentes molécules portant toutes un hydroxyle en C-34 mais pas systématiquement des hydroxyles en C-4.

Murihexocine, *A. muricata*

C ₃₅ H ₆₄ O ₉ Li													
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	hydroxyles				THF	Attribution	
10,73 [10,50;10,90]	635,4700	0,7	6	1b	1	0	4	[5;14]	[5;14]	15	20	20+	Type-annonhexocine
11,22 [10,96;11,36]	635,4703	0,7	6	1b	1	0	4	[5;14]	[5;14]	15	20	20+	Type-annonhexocine
11,47 [11,36;11,64]	635,4699	1,0	6	1b	1	0	4	-	-	-	-	-	Type-murihexocine
12,30 [12,04;12,44]	635,4698	1,1	6	1b	1	0	4	-	-	-	-	-	Type-murihexocine
[12,61;14,84]	635,4698	1,0	6	L-D 1a	1	0	4	-	-	-	-	34	-

Tableau 58 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₄O₉

❖ Un large massif est observé entre 10 et 14 min correspondant aux acétogénines en C37. Aucune information structurale n'a pu être visible sur les spectres SM/SM hormis le fragment de rupture en β de la lactone. Trois groupes d'acétogénines ont pu être séparées en fonction de ce fragment et de son intensité : les plus polaires de 14 min à 15,9 min de sous-type 1b ; les acétogénines intermédiaires de sous type L-D 1a entre 15,3 à 16,3 min et les plus apolaires de sous type L-D 1b entre 16,6 et 17,1 min (Tableau 59).

[C ₃₇ H ₆₈ O ₉ Li] ⁺										
Temps de rétention	Masse exacte	ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyle		Attribution
[14,0;15,90]	663,5027	1,3	≥ 6	1b	-	-	-	4	-	-
[15,30;16,30]	663,5030	1,8	≥ 6	1a	-	-	-	-	34	-
[16,60;17,10]	663,5003	2,3	≥ 6	1b	-	-	-	-	34	-

Tableau 59 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₈O₉

- $[C_{35}H_{64}O_{10}Li]^+$ m/z 651,46 et $[C_{37}H_{68}O_{10}Li]^+$ m/z 679,49

❖ Des massifs d'acétogénines ayant 10 atomes d'oxygènes et une insaturation sont identifiés pour les deux séries (C35 et C37) dans ce nectar. Les deux groupes de molécules, sont visibles au même temps de rétention (entre 9 et 12 min). Cependant, il semblerait que ces molécules soient minoritaires en raison de l'intensité faible de leurs ions. Les spectres SM/SM ne montrent aucune information structurale intéressante.

Les acétogénines en C37 peuvent être séparés en deux groupes en fonction de leur sous type comme pour la série de formule brute $C_{37}H_{68}O_9$: les polaires entre 7 et 14 min de sous-type 1b et les apolaires de sous L-D 1a (Tableau 60).

$[C_{37}H_{68}O_{10}Li]^+$										
Temps de rétention	Masse exacte	ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyle	Attribution	
[7,33;13,61]	679,4976	1,3	≥ 7	1b	-	-	-	4	-	-
[12,70;15,25]	679,4978	1,6	≥ 7	1a	-	-	-	-	34	-

Tableau 60 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{68}O_{10}$

3.2.4 Acétogénines à 2 « insaturations » $C_{35}H_{62}O_xLi$ et $C_{37}H_{66}O_xLi$

Les ACGs de ce type de formule brute présentes dans notre extrait sont en majorité en C35, comme pour les ACGs à 1 insaturation, avec 2 à 7 oxygènes sur leur chaîne aliphatique.

Elles peuvent potentiellement appartenir au type E (bis-époxydes, mono époxyde et une double liaison ou 2 doubles liaisons), au type A (1 groupement THF) avec une double liaison, ou éventuellement une cétone, au type B (bis-THF adjacents), au type C (bis-THF non adjacents) (Figure 95). La présence de 2 cétones isolées est possible, mais n'est pas décrite dans la classe.

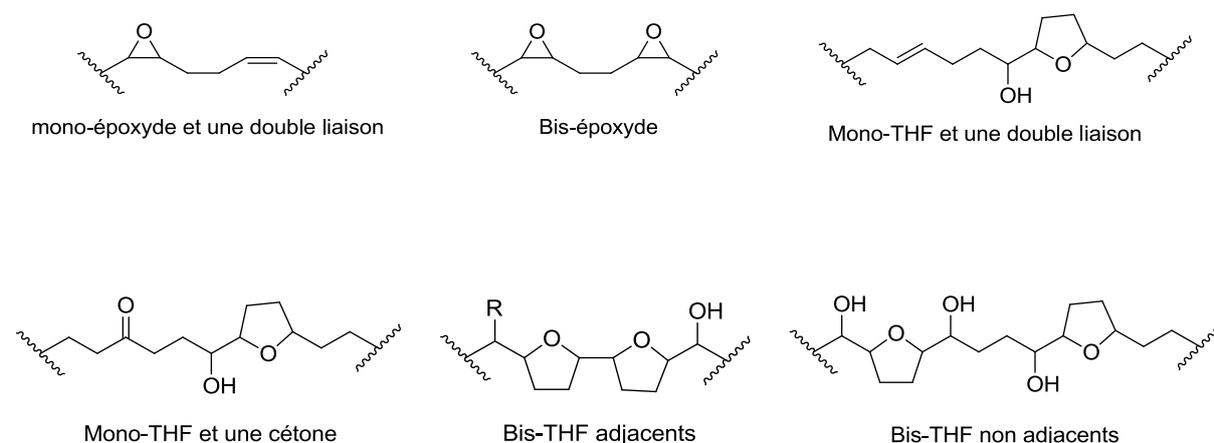


Figure 95 : Hypothèses de structure d'acétogénines ayant 2 « insaturations »

❖ La plupart des intensités des pics de ces masses sont élevées : ces ACGs seraient majoritaires par rapport aux acétogénines sans insaturation, mais en quantité inférieure aux acétogénines à une insaturation (Figure 96, Tableau 61). Les profils chromatographiques sont beaucoup plus distincts que ceux des deux autres classes (sans et une insaturation). En outre, les ACGs ayant entre 5 et 8 oxygènes semblent très abondantes par rapport aux autres molécules, en particulier les ACG comportant 7 oxygènes, largement majoritaires.

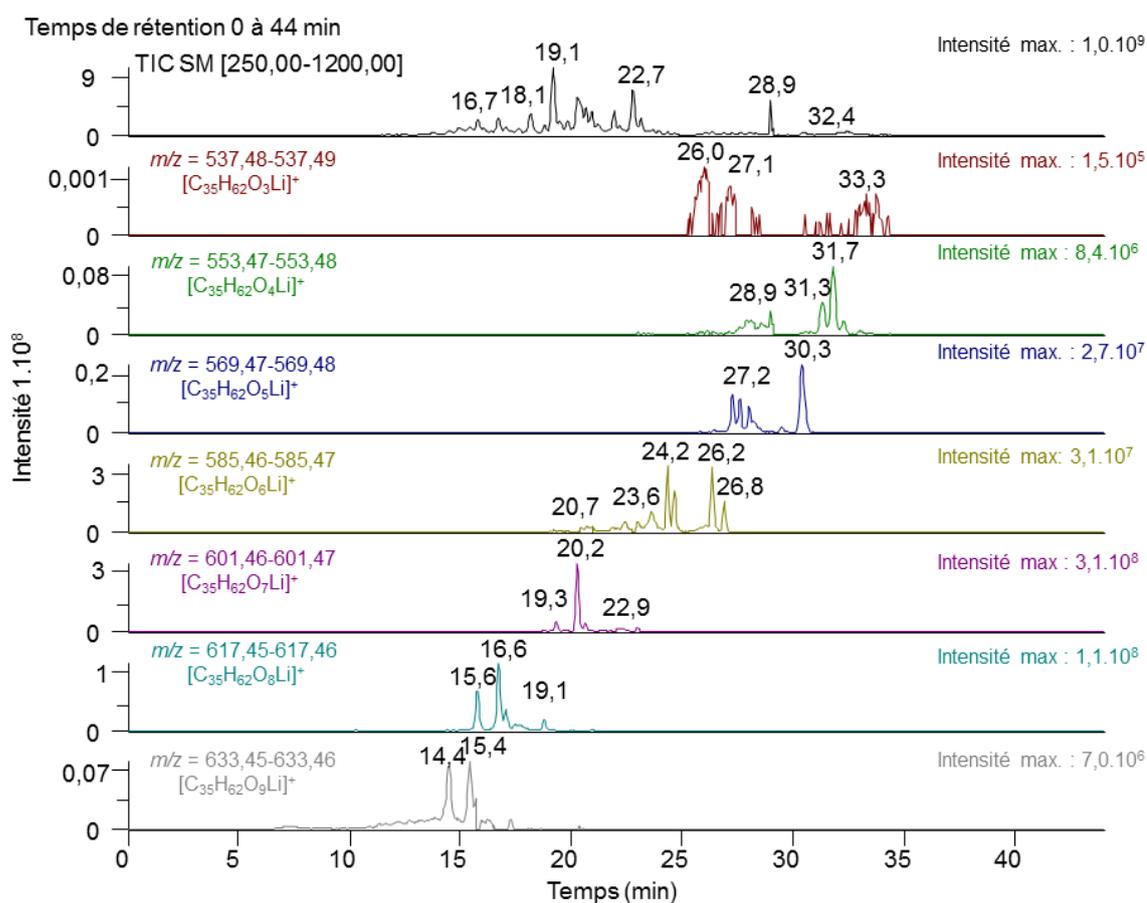


Figure 96 : Chromatogrammes des acétogénines en C35 à 2 « insaturations » $C_{35}H_{62}O_xLi$

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules majoritaires	Intensité
537,48-537,49	[C ₃₅ H ₆₂ O ₃ Li] ⁺	25 à 35 min	2 (25 à 27,5 min) + m (32 à 34 min)	1,5.10 ⁵
553,47-553,48	[C ₃₅ H ₆₂ O ₄ Li] ⁺	27 à 33 min	4 + m (27,3 à 29,20)	8,4.10 ⁶
569,47-569,48	[C ₃₅ H ₆₂ O ₅ Li] ⁺	27 à 31 min	5	2,7.10 ⁷
585,47-585,48	[C ₃₅ H ₆₂ O ₆ Li] ⁺	19 à 27 min	m (4)	3,1.10 ⁷
601,46-601,47	[C ₃₅ H ₆₂ O ₇ Li] ⁺	16 à 24 min	m (3)	3,1.10 ⁸
617,45-617,46	[C ₃₅ H ₆₂ O ₈ Li] ⁺	15 à 20 min	4	1,1.10 ⁸
633,45-633,46	[C ₃₅ H ₆₂ O ₉ Li] ⁺	10 à 18 min	2	7,0.10 ⁶

Tableau 61 : Récapitulatif des acétogénines en C35 à 2 « insaturations »

x: nombre de molécules majoritaire ; m : massif m ; (x) nombre de molécules majoritaires co-éluées dans un massif

❖ L'analyse des chromatogrammes extraits montre la présence d'ACGs en C37 porteuses de deux « insaturations » (soit H₆₆) (Figure 96, Tableau 61). Elles comportent entre 5 et 10 atomes d'oxygènes sur leur chaîne aliphatique. Les hypothèses de fonctionnalisation sont identiques à celles des ACGs en C35. Comme pour les formules brutes à une insaturation, l'abondance des pics chromatographiques de ces masses est impressionnante au vue du peu de molécules de ce type publiées : seulement 8 molécules de ce type ont été isolées d'*A. muricata*. Contrairement aux acétogénines à 1 insaturation en C37, les intensités de ces pics sont importantes et plaident pour une quantité plus importante de ces molécules. Les ACGs à 7 et 8 oxygènes sont majoritaires comme pour les C35.

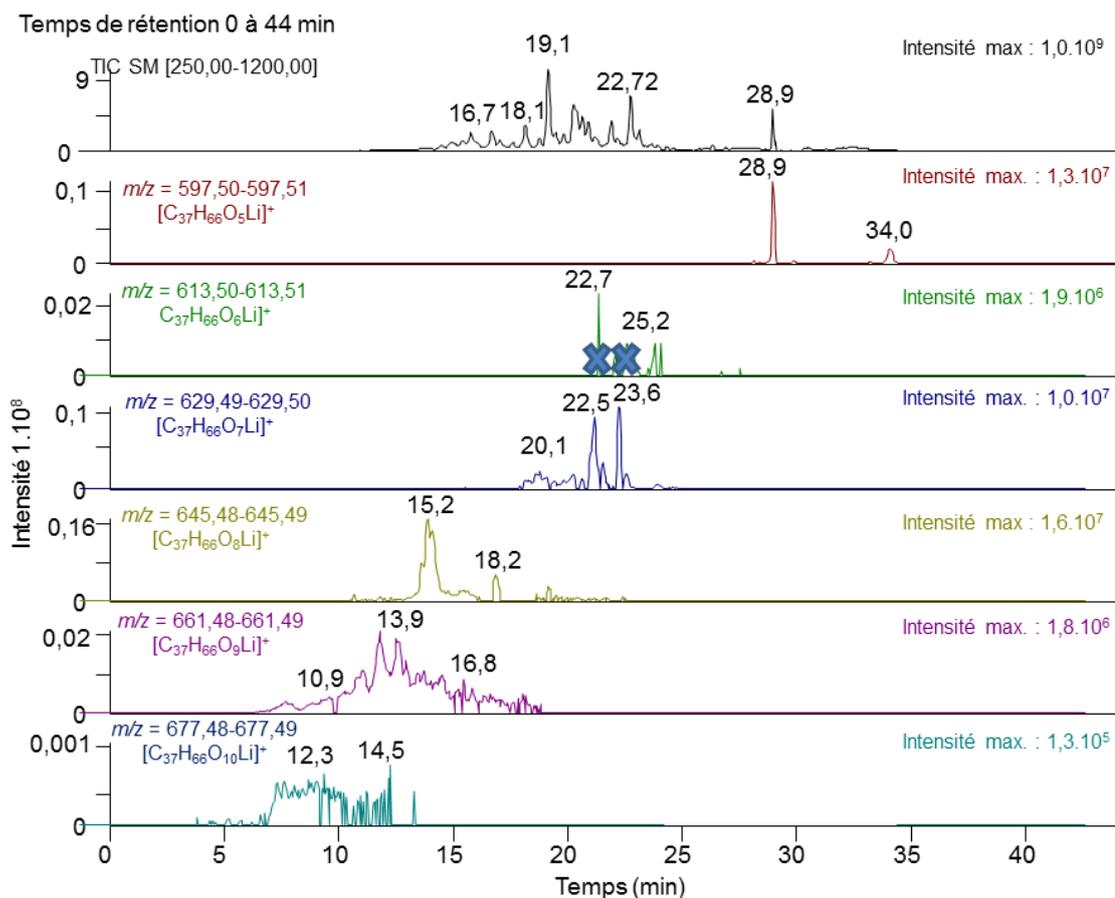


Figure 97 : Chromatogrammes des acétogénines en C37 à 2 « insaturations » $C_{37}H_{66}O_xLi$

Après étude SM/SM, l'ion m/z 613,50 à 22,7 min et le massif entre 23 et 25 min de formule brute $C_{37}H_{66}O_6Li$ ne correspond pas à des structures d'acétogénines.

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules majoritaires	Intensité
597,50-597,51	$[C_{37}H_{66}O_5Li]^+$	28 à 35 min	2	$1,3 \cdot 10^7$
613,50-613,51	$[C_{37}H_{66}O_6Li]^+$	24 à 30 min	2	$1,9 \cdot 10^6$
629,49-629,50	$[C_{37}H_{66}O_7Li]^+$	19 à 26 min	m (4)	$1,0 \cdot 10^7$
645,48-645,49	$[C_{37}H_{66}O_8Li]^+$	12 à 24 min	m (3)	$1,6 \cdot 10^7$
661,48-661,49	$[C_{37}H_{66}O_9Li]^+$	5 à 21 min	m (19)	$1,8 \cdot 10^6$
679,48-679,49	$[C_{37}H_{66}O_{10}Li]^+$	8 à 14,5 min	m (trace)	$1,3 \cdot 10^5$

Tableau 62 : récapitulatif des acétogénines en C37 à 2 « insaturations »

x: nombre de molécules majoritaire ; m : massif m ; (x) nombre de molécules majoritaires co-éluées dans un massif

○ $[C_{35}H_{62}O_3Li]^+$ m/z 537,48

Deux molécules majoritaires sont visibles aux temps de rétention de 26,0 et 27,1 min et un massif entre 32 à 34 min (Figure 96). L'intensité des ions est faible, les molécules semblent donc être minoritaires dans cet extrait et aucun fragment caractéristique n'a été détecté. D'après le fragment de rupture en β de la lactone toutes ces molécules sont de sous-type 1a. Pour cette masse, un seul type de molécules a été isolé au sein des Annonaceae, chez *A. muricata* : des acétogénines de type E à mono-époxyde séparé de 4 atomes de carbone d'une double liaison, comme l'époxymurine-A (Tableau 63). En raison d'un manque de fragment, les structures du massif et des deux composés ne peuvent pas être décrites.

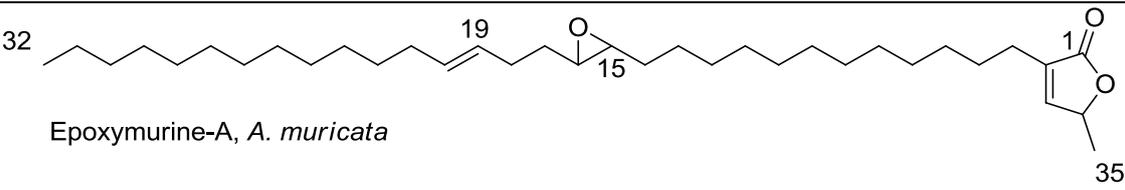
 <p>Epoxymurine-A, <i>A. muricata</i></p>									
$[C_{35}H_{62}O_3Li]^+$									
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	époxyde	Attribution
26,00 [25,90;27,11]	537,4857	0,5	≤ 1	1a	0	-	-	-	Type-époxymurine
27,10 [27,02;27,68]	537,4856	0,4	≤ 1	1a	0	-	-	-	Type-époxymurine

Tableau 63 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_3$

 ○ $[C_{35}H_{62}O_4Li]^+$ m/z 553,47

Un massif situé entre 27,30 et 29,20 min et 4 molécules majoritaires entre 31 et 32,5 min est visible sur le chromatogramme (Figure 96, Tableau 64). Les spectres SM/SM montrent les fragments caractéristiques c, c-2H (fragmentation d'un époxyde) pour les 4 molécules majoritaires. Les deux molécules aux temps de rétention 31, 28 et 31,76 min ont un époxyde en C17/18 et correspondent *a priori* à la diépomuricanine-B ou à un stéréoisomère. Les deux autres molécules aux temps de rétention 31,76 et 32,24 min ont un époxyde en C15/16 et correspondent à la diépomuricanine-A ou à un stéréoisomère (Tableau 64). Ces deux molécules ont été extraites d'*A. muricata*. Les spectres SM/SM du groupe d'acétogénines plus polaires ne présentent aucun fragment caractéristique, l'attribution des structures n'a donc pas pu être réalisée.

Diépomuricanine-A, *A. muricata*

[C ₃₅ H ₆₂ O ₄ Li] ⁺									
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	époxyde	Attribution
[27,30;29,20]	553,4788	2,6	≤ 2	1a	-	-	-	-	-
31,28 [31,08;31,46]	553,4794	1,6	0	1a	0	0	0	[17;18]	Type-diépomuricanine B
31,76 [31,56;31,84]	553,4795	1,5	0	1a	0	0	0	[17;18]	
31,76 [31,56;31,84]	553,4795	1,5	0	1a	0	0	0	[15;16]	Type-diépomuricanine A
32,24 [32,13;32,52]	553,4796	1,2	0	1a	0	0	0	[15;16]	

Tableau 64 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₂O₄

- [C₃₅H₆₂O₅Li]⁺ m/z 569,47 et [C₃₇H₆₆O₅Li]⁺ m/z 597,50

❖ Le chromatogramme des acétogénines en C35 montre un massif contenant 4 molécules majoritaires de 27 à 29 minutes et un pic plus apolaire à tr = 30,3 min (Figure 96). Malgré une intensité de 1.10⁷ aucun fragment caractéristique sur les spectres SM/SM n'est visible. Seule une molécule de cette masse a été isolée des Annonaceae (*A. muricata*), il s'agit de la robustocine, une acétogénine bis-THF-adjacents avec un hydroxyle (Tableau 65). Les deux pics ayant des temps de rétention bien distincts, deux types de structures d'acétogénines pourraient exister : des acétogénines mono-THF avec une cétone ou des acétogénines de type C (Bis-THF non adjacent). Cependant, l'élucidation structurale n'a pas pu être effectuée.

Robustocine, *A. muricata*

[C ₃₅ H ₆₂ O ₅ Li] ⁺									
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Époxyde	Identification
27,25 [27,09;27,32]	569,4741	2,0	≤ 3	1a	-	-	-	-	Type-robustocine
27,58 [27,47;27,65]	569,4742	1,8	≤ 3	1a	-	-	-	-	
28,00 [27,84;28,12]	569,4740	2,0	≤ 3	1a	-	-	-	-	
28,28 [28,17;28,50]	569,4737	2,7	≤ 3	1a	-	-	-	-	
29,48 [29,32;29,75]	569,4741	1,9	≤ 3	1a	-	-	-	-	
30,37 [30,18;30,53]	569,4740	2,0	≤ 3	1a	-	-	-	-	

Tableau 65: Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₂O₅

Seuls deux pics isolés sont visibles sur les chromatogrammes correspondant aux acétogénines en C37, à $t_r = 28,94$ et $34,06$ min (). Aucun fragment caractéristique n'est visible sur les spectres SM/SM, hormis la rupture en β de la lactone permettant d'attribuer le sous-type 1a aux deux pics. Aucune acétogénine de cette formule brute n'a été isolée d'*A. muricata*. Les seules ACGs connues sont soit de type E ayant une cétone, un diol et une double liaison comme l'annojahnine (*A. jahonii*), soit des mono-THF tel que la bullatencine (*A. bullata*) (Figure 98, Figure 99). Compte tenu de la grande différence des temps de rétention des deux pics, les deux types de molécules pourraient être contenus dans ce nectar.

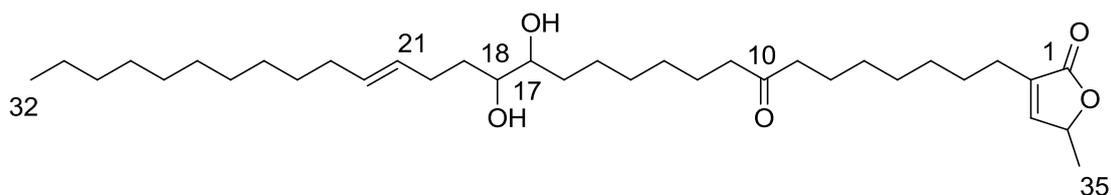


Figure 98 : Annojahnine, *A. jahonii*

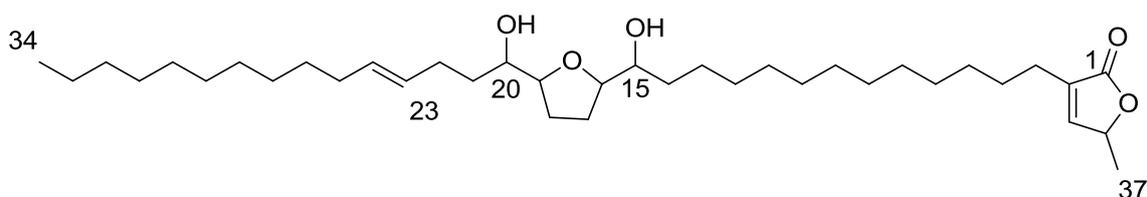


Figure 99 : Bullatencine, *A. bullata*

- $[C_{35}H_{62}O_6Li]^+$ m/z 585,46 et $[C_{37}H_{66}O_6Li]^+$ m/z 613,50

❖ Le chromatogramme des acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_6$ s'étend de 20 min à 27 minutes avec une dizaine de composés apparents. Quatre molécules sont très bien définies entre 24 et 27 min (). Les spectres SM/SM des deux molécules les plus polaires à 24,15 et 24,46 min montrent des fragments B1, B1-2H et X1 permettant de placer le THF entre les carbones C-16 et C-19 et d'attribuer le sous-type 1a à ces deux molécules. De plus, une différence de 2 u.m.a. est visible pour les fragments B1 et B1-2H par rapport à la corossoline. La corossolone (*cis* et *trans*) extraite d'*A. muricata* correspondrait donc à ces deux composés (Tableau 66).

[C ₃₅ H ₆₂ O ₆ Li] ⁺										
Temps de rétention	Masse exacte	Δppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	THF	Hydroxyles	Attribution
24,15 [24,03;24,30]	585,4694	0,7	2	1a	1	[4;15]	0	A 16,19	15 20	Type-corossolone
24,46 [24,34;24,54]	585,4694	0,7	2	1a	1	[4;15]	0	A 16,19	15 20	
26,17 [26,05;26,28]	585,4693	0,8	≤ 3	1b	-	-	-	-	4 -	Type-annocatacine-A
26,74 [26,58;26,86]	585,4692	0,9	≤ 3	1b	-	-	-	-	4 -	

Tableau 66 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₂O₆

Les deux molécules les plus apolaires de temps de rétention 26,17 et 26,74 min n'ont aucun fragment caractéristique sur leur spectre hormis la rupture en β de la perte de lactone indiquant un sous-type 1b. Seules deux acétogénines bis-THF mono-hydroxylées ont été isolées au sein d'*A. muricata* : l'annocatacine-A et B (Figure 100) ; elles pourraient être attribuées à ces deux molécules.

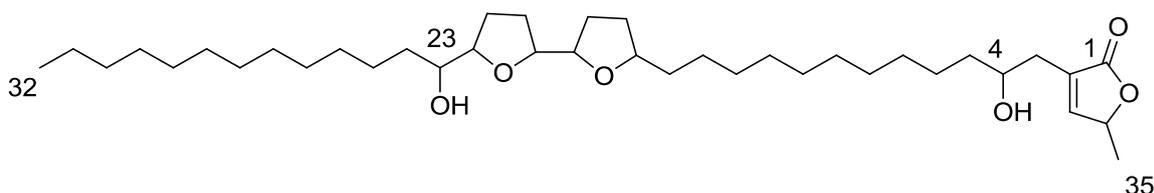
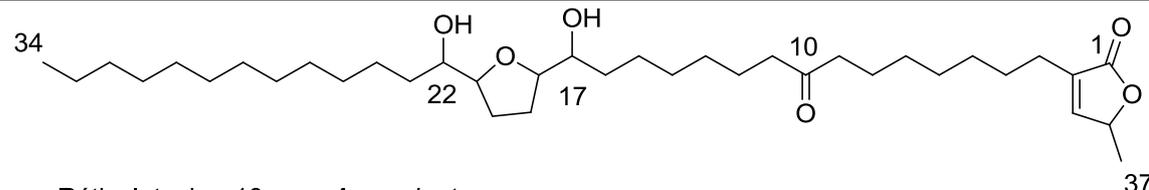


Figure 100 : Annocatacine-A, *A. muricata*

❖ Un massif entre 19 et 27 min de plusieurs molécules co-éluées est visible pour les acétogénines en C37 (Figure 97). Deux molécules majoritaires sont détectées à $t_R = 26,05$ et $26,69$ min (Tableau 67). D'après l'intensité du fragment de rupture en β de la lactone toutes les molécules sont de sous-type 1a. La réticulacine-10-one est la seule acétogénine isolée d'*A. muricata* de cette formule brute et pourrait donc correspondre à l'une des deux molécules majoritaires (Tableau 67).

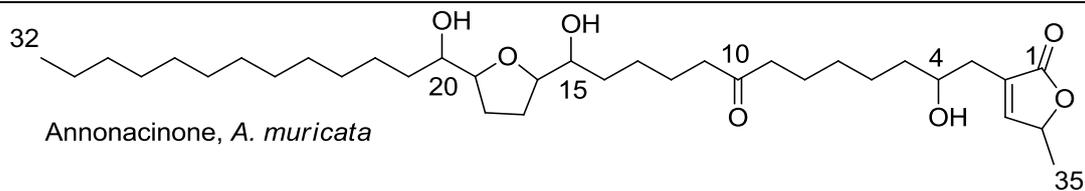


Réticulatacine-10-one, *A. muricata*

[C ₃₇ H ₆₆ O ₆ Li] ⁺										
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyles		Attribution
26,05 [25,85;26,24]	613,5013	0,3	2	1a	A [18;21]	1	0	17	22	Type-reticulatacin-10-one
26,29 [26,14;26,43]	613,5010	0,7	2	1a	A [18;21]	1	0	17	22	

Tableau 67 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₆O₆

❖ Pour les ACGs de formule brute C₃₅H₆₂O₇, trois molécules majoritaires sont visibles entre 19 et 20,5 min dont une très majoritaire au temps de rétention tr = 20,20 min (Figure 96). Cette dernière est définie de la même manière, bien visible sur le chromatogramme UV et serait donc une acétogénine majoritaire du nectar. Les spectres SM/SM montrent des fragments B1, B1-2H avec une différence de 2 u.m.a. par rapport à l'annonacine. Ces molécules correspondraient à des acétogénines mono-THF (C-16 ; C-19) de sous-type 1b avec une cétone entre le THF et la lactone. De plus, la molécule très majoritaire a les mêmes fragments et le même temps de rétention que l'étalon de l'annonacinone (*A. muricata*) et correspondrait donc à cette molécule (Tableau 68).



Annonacinone, *A. muricata*

[C ₃₅ H ₆₂ O ₇ Li] ⁺											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	hydroxyles			THF	Attribution
19,11 [19,04;19,22]	601,4644	1,0	3	A1b	1	1 [5;14]	4	15	20	A[18;21]	Type-annonacinone
20,20 [20,3;20,49]	601,4641	1,6	3	A1b	1	1 [5;14]	4	15	20	A[18;21]	Annonacinone
20,42 [19,86;20,23]	601,4642	1,4	3	A1b	1	1 [5;14]	4	15	20	A[18;21]	Type-annonacinone

Tableau 68 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₂O₇

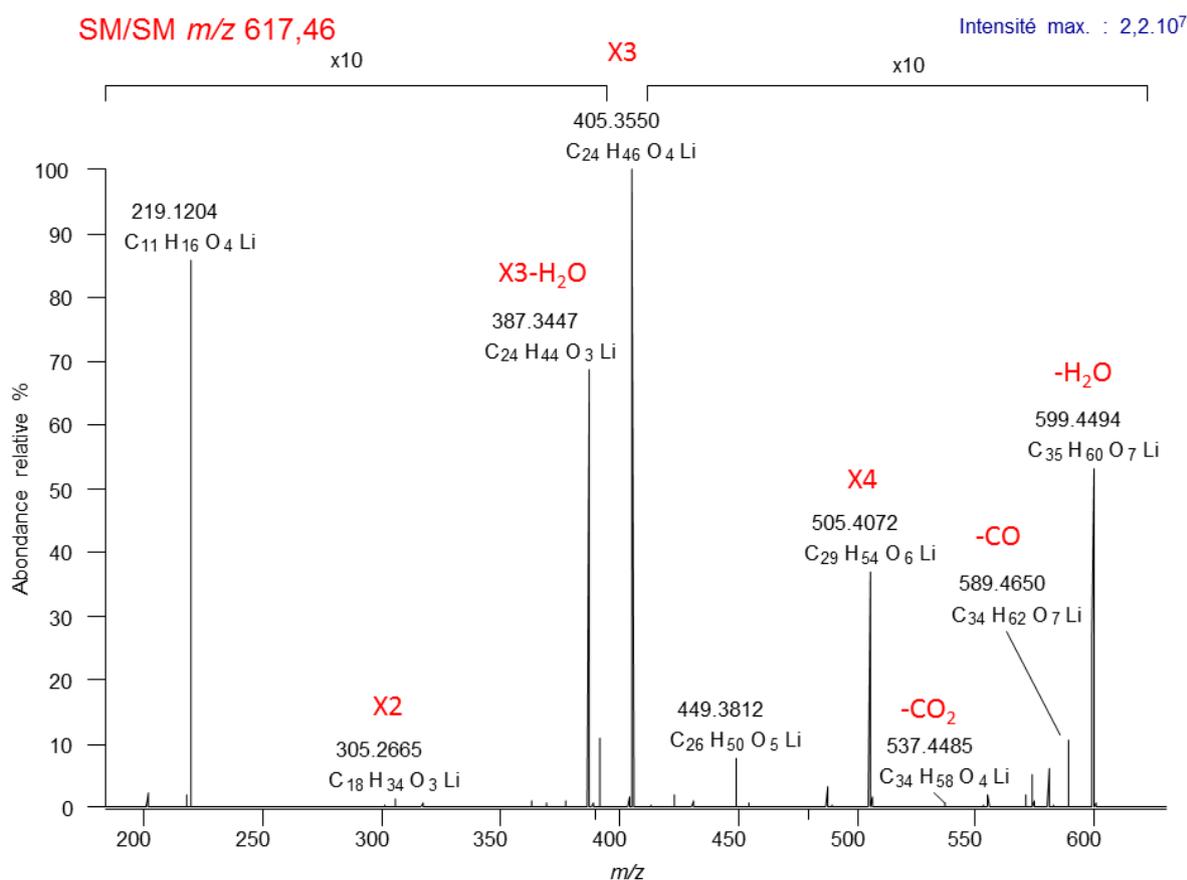
❖ Le même profil chromatographique est visible pour les acétogénines en C37. Ces molécules s'entendent de 19 à 26 min avec quatre composés majoritaires plus apolaires entre 22,5 à 24 min (Figure 97). D'après les spectres SM/SM, les quatre acétogénines sont de type A et de sous-type 1b avec une cétone entre le THF et la lactone. Le THF est placé entre les carbones C-18 et C-21 pour les deux plus polaires (tr = 22,55 et 22,98 min) tandis qu'il est placé entre C-16 et C-19 pour les deux autres (tr = 23,64 et 23,96 min) (Tableau 69). Aucun analogue n'a été retrouvé dans la littérature.

[C ₃₇ H ₆₆ O ₇ Li] ⁺										
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyyles		Attribution
22,55 [22,50;22,69]	629,4951	1,9	3	1b	A [18;21]	1	0	4	17	22
22,98 [22,87;23,06]	629,4977	2,3	3	1b	A [18;21]	1	0	4	17	22
23,64 [23,49;23,82]	629,4964	0,2	3	1b	A [16;19]	1	0	4	15	20
23,96 [23,87;24,15]	629,4958	0,9	3	1b	A [16;19]	1	0	4	15	20

Tableau 69 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₆O₇

- [C₃₅H₆₂O₈Li]⁺ *m/z* 617,45 et [C₃₇H₆₆O₈Li]⁺ *m/z* 645,48

❖ Plusieurs acétogénines co-éluées sont visibles sur le chromatogramme des molécules en C35 entre les temps de rétention de 15 à 19,5 min dont quatre acétogénines majoritaires (Figure 96). Celles-ci ont des intensités élevées et sont visibles sur le chromatogramme UV. Elles représentent donc des composés majoritaires du nectar. Les spectres SM/SM des trois molécules majoritaires les plus polaires (tr = 15,8 ; 16,7 et 16,82 min) sont différents des autres spectres des acétogénines. En effet, les fragments de perte de CO, CO₂ et de la lactone sont faibles et un fragment d'une intensité relative de 100 % est visible, pour une formule brute C₂₄H₄₆O₄Li (Figure 101).


Figure 101 : Spectre SM/SM *m/z* 617,46 des molécules majoritaires

Ce fragment très favorisé pourrait être dû à une cétone favorisant la rupture en α de l'hydroxyle par un mécanisme semblable à la fragmentation de la rupture en β de la lactone (Figure 102). Des études en SM/SM/SM du fragment X3 ont permis de valider notre hypothèse.

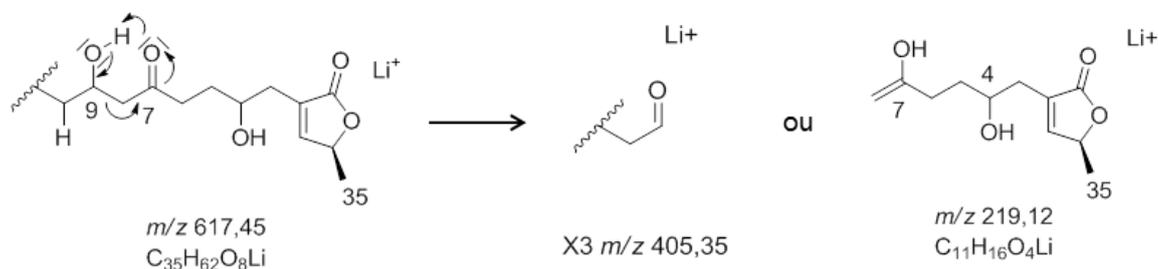


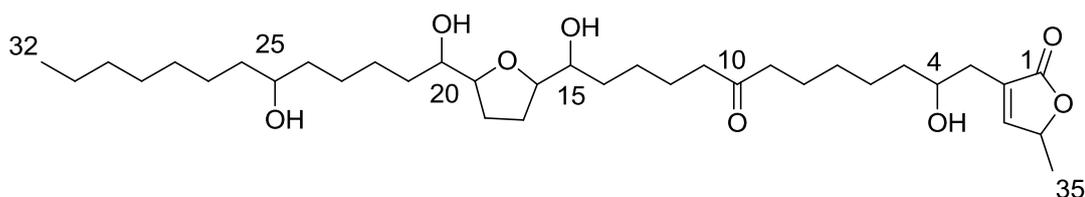
Figure 102 : Mécanisme de formation de l'ion $[C_{24}H_{46}O_4Li]^+$ à m/z 405,35

L'obtention du fragment de formule brute $C_{24}H_{46}O_4Li$ ne serait permise que si l'hydroxyle est placé en C-9 et la cétone en C-7. La montacine (*A. montana*), correspondant à cette structure. Elle n'a jamais été isolée d'*A. muricata* (Tableau 70).

Montacine, <i>A. montana</i>											
$[C_{35}H_{62}O_8Li]^+$											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	Cétone	hydroxyles			THF	Attribution	
15,57 [15,38;15,71]	617,4596	0,6	4	1b	7	4	9	15	20	A [16;19]	Type-montacine
16,52 [16,38;16,67]	617,4593	1	4	1b	7]	4	9	15	20	A [16;19]	
16,82 [16,77;17,01]	617,4593	1	4	1b	7	4	9	15	20	A [16;19]	
17,36 [17,16;17,57]	617,4592	1,2	4	1b	-	4	-	-	-	-	

Tableau 70 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{62}O_8$

Aucune hypothèse de structure n'a pu être donnée pour la molécule à $tr = 17,36$ min, aucun fragment caractéristique n'ayant été détecté sur le spectre SM/SM. Une seule ACG, la muricatine-C a été isolée d'*A. muricata* ; cependant le temps de rétention ne corrèle pas avec la structure de cette molécule. Un tel composé donnerait un spectre facilement interprétable car cette molécule par son hydroxyle en C-25 est plus polaire que la montacine. Elle ne serait donc pas présente dans ce nectar (Figure 103).


Figure 103 : Muricatin-C, *A. muricata*

❖ Les acétogénines de formule brute $C_{37}H_{66}O_8Li$ sont visibles de 12 à 24 min (). Trois groupes de molécules sont visibles sur ce chromatogramme : un massif polaire situé entre 14,7 et 16,1 min : deux molécules bien visibles aux temps de rétention de 18,20 et 18,77 min puis une dernière molécule plus apolaire à 19,09 min.

Les spectres SM/SM des deux molécules à 18,20 min et 18,77 min montrent des fragments B1, B1-2H, Y1, Y1-2H et X4 correspondant à des ACGs de type C (bis-THF non adjacents) et plus particulièrement à la gigantécine (Tableau 71). De plus, le temps de rétention de la gigantécine est identique au deuxième composé. Le nectar contient donc de la gigantécine et l'un de ces isomères.

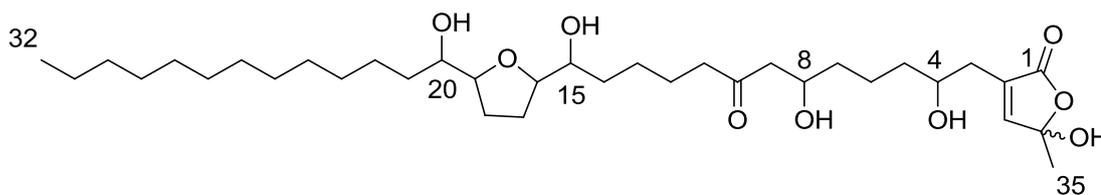
Le massif polaire et la molécule apolaire n'ont pas pu être identifiés structurellement.

[$C_{37}H_{66}O_8Li$] ⁺												
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyles			Attribution	
[14,74;16,08]	645,4896	2,6	≤ 6	1a	-	-	-	4	-	-	-	-
18,20 [18,04;18,28]	645,4894	2,9	4	1b	C [14;21]	0	0	4	14	17	22	Gigantécine
18,77 [18,66;18,94]	645,4911	0,2	4	1b	C [14;21]	0	0	4	14	17	22	
19,09 [18,95;19,28]	645,4896	0,3	≤ 6	1b	-	-	-	4	-	-	-	-

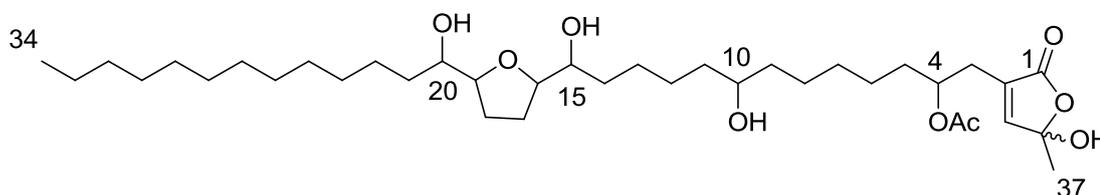
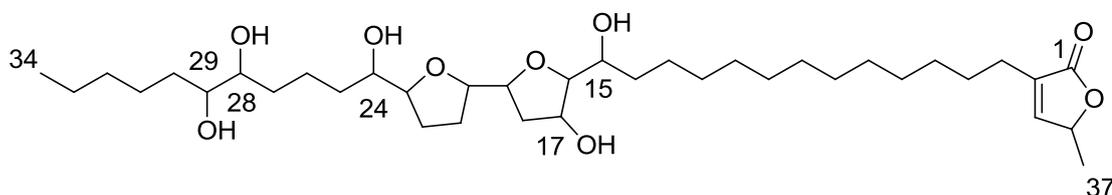
Tableau 71 : Acétogénines de formule brute $C_{37}H_{66}O_8$

- [$C_{35}H_{62}O_9Li$]⁺ m/z 633,45 et [$C_{37}H_{66}O_9Li$]⁺ m/z 661,48

❖ L'intensité des ions extraits pour les acétogénines à 9 atomes d'oxygène est faible. Deux molécules majoritaires (tr = 14,4 et 15,4 min) sont visibles dans le massif entre 10 à 17 min correspondant aux acétogénines en C35. Seule la montanacine-H (*A. montana*) de sous-type L-D 1b a la même formule brute (Figure 104). Cependant, aucun fragment caractéristique n'est visible sur les spectres SM/SM et le fragment de rupture en β de la lactone montre un sous-type 1b. Aucune des deux acétogénines majoritaires n'est donc la montanacine-H.


Figure 104 : Montanacine-H, *A. montana*

❖ De nombreuses acétogénines en C37 co-éluées (environ 19) sont détectées sur le chromatogramme entre 5 min et 21 min (Figure 97). Ces résultats sont très intéressants, seules deux acétogénines de cette formule brute sont décrites dans la littérature: la donnaiénine (*Goniothalamus donnaiensis*) une acétogénine mono-THF acétylée (Figure 105) et la salzmanoline (*A. salzmanii*) de type B (Figure 106).


Figure 105 : Donnaiénine, *G. donnaiensis*

Figure 106 : Salzmanoline, *A. salzmanii*

L'intensité des fragments étant trop faible, l'étude structurale n'a pas pu être réalisée. Cependant, les acétogénines peuvent être classées en 3 groupes homogènes par le fragment X de rupture en β de la lactone (Tableau 72). Les molécules les plus polaires entre 9 min et 12,6 min sont de sous-type 1a, les intermédiaires (entre 12,4 et 16,1 min) de sous-type 1b et les plus apolaires (15,5 et 20 min) de sous-type L-D.

[C ₃₇ H ₆₆ O ₉ Li] ⁺										
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	Hydroxyles	Attribution	
[9,99;12,56]	661,4842	2,9	≤ 9	1a	1 [9;12]	-	-	-	-	-
[12,47;16,03]	661,4851	1,6	≤ 8	1b	1 [9;12]	-	-	4	-	
[15,99;19,95]	661,4837	3,7	≤ 8	L-D	1 [9;12]	-	-	-	34	

Tableau 72 : Acétogénines de formule brute C₃₇H₆₆O₉

○ $[C_{37}H_{66}O_{10}Li]^+$ m/z 677,48

Le chromatogramme des acétogénines de formule brute $C_{37}H_{66}O_{10}$ a une intensité maximale très faible (1.10^5). Cependant, il est intéressant de voir l'étendue (7 à 14 min) du massif correspondant à ces molécules. De nombreux composés minoritaires existent dans ce nectar. Néanmoins, aucun pic bien défini n'est visible et aucune attribution structurale n'a pu être effective hormis le sous-type 1b de tous ces composés.

3.2.5 Acétogénines à 3 « insaturations » $C_{35}H_{60}O_xLi$ et $C_{37}H_{64}O_xLi$

❖ La plupart des intensités sont faibles pour ces masses. Les pics chromatographiques sont parfois peu distincts. Les ACGs avec 7 oxygènes ont une intensité très importante par rapport aux autres molécules de cette classe mais aussi des autres classes. Ces résultats sont très encourageants car seulement quatre acétogénines à 3 « insaturations » ont été extraites des Annonaceae (Figure 107, Tableau 73).

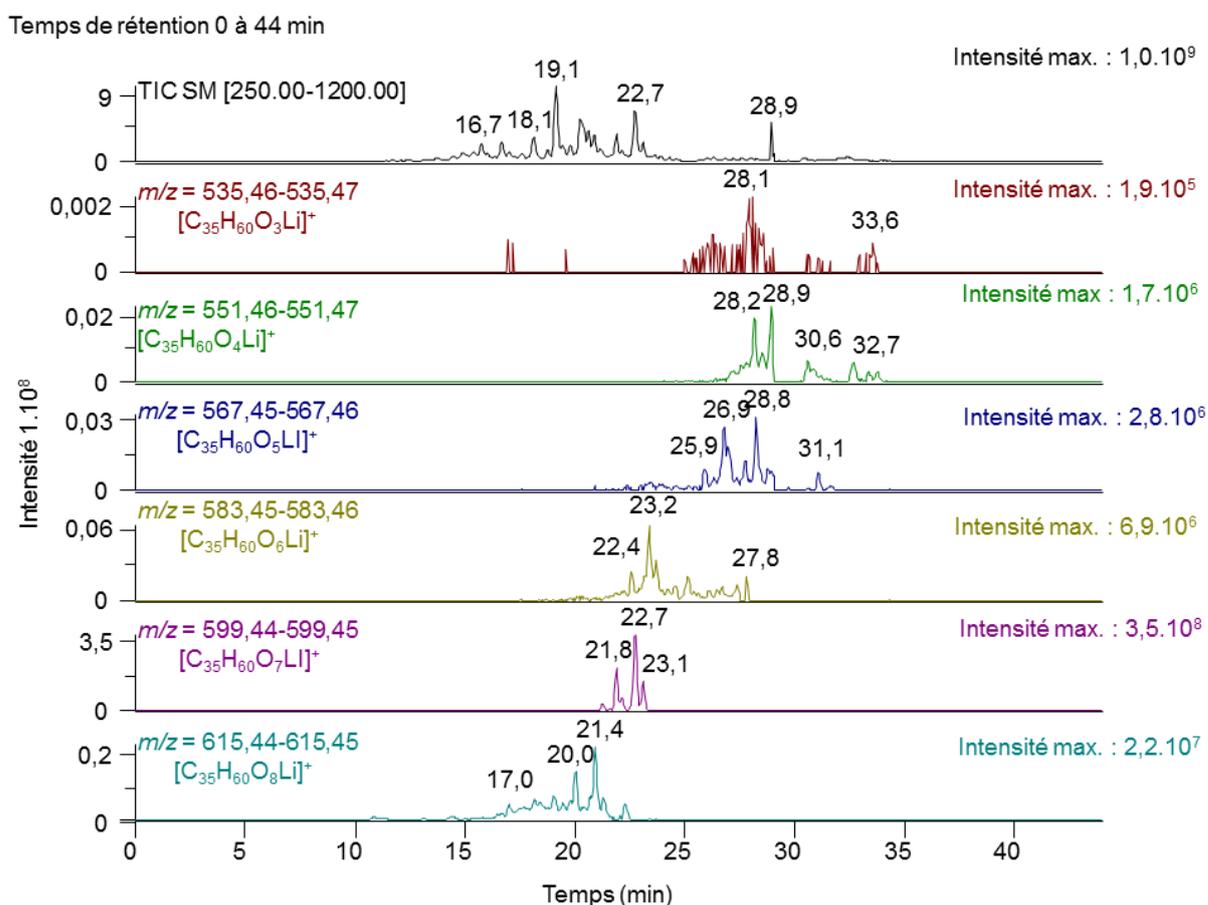


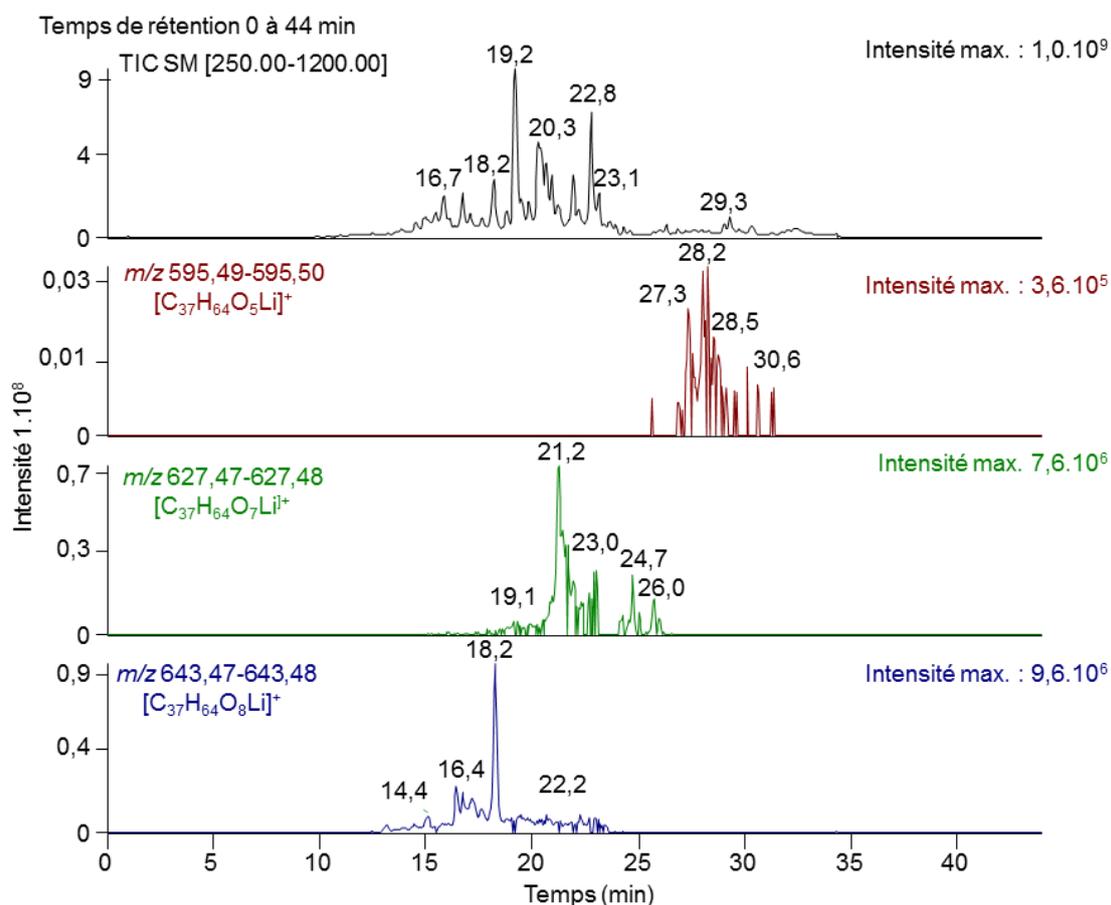
Figure 107: Chromatogrammes des acétogénines en C35 à 3 "insaturations" $C_{35}H_{60}O_xLi$

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules majoritaires	Intensité
535,46-535,47	$[C_{35}H_{60}O_3Li]^+$	25-34 min	2 m (24-29 min) ; (31-34 min)	$1,9 \cdot 10^5$
551,46-551,47	$[C_{35}H_{60}O_4Li]^+$	27-34 min	m (12)	$1,7 \cdot 10^6$
567,45-567,46	$[C_{35}H_{60}O_5Li]^+$	22-32 min	m (8)	$2,8 \cdot 10^6$
583,45-583,46	$[C_{35}H_{60}O_6Li]^+$	18-30 min	m (3)	$6,9 \cdot 10^6$
599,44-599,45	$[C_{35}H_{60}O_7Li]^+$	21-24 min	5	$3,5 \cdot 10^8$
615,44-615,45	$[C_{35}H_{60}O_8Li]^+$	16-23,5 min	3	$2,2 \cdot 10^7$

Tableau 73 : Récapitulatif des acétogénines en C35 à 3 « insaturations »

x: nombre de molécules majoritaire ; m : massif m ; (x) nombre de molécules majoritaires co-éluées dans un massif

❖ Seulement trois masses ont été visibles pour les ACGs en C37 (Figure 108, Tableau 74). Les intensités correspondant à ces masses sont faibles et leur pics chromatographiques sont peu distincts et forment des massifs avec souvent un composé majoritaire. Ces acétogénines ont 5, 7 ou 8 oxygènes.


Figure 108 : Chromatogrammes des acétogénines en C37 à 3 "insaturations" $C_{35}H_{64}O_xLi$

Masse extraite	Formule brute	Temps de rétention	Molécules majoritaires	Intensité
595,49-595,50	$[C_{37}H_{64}O_5Li]^+$	27-32 min	7	$4,4 \cdot 10^5$
627,47-627,48	$[C_{37}H_{64}O_7Li]^+$	20-25 min	m (1)	$8,0 \cdot 10^6$
643,47-643,48	$[C_{37}H_{64}O_8Li]^+$	12-24 min	1	$1,0 \cdot 10^7$

Tableau 74 : Récapitulatif des acétogénines en C37 à 3 « insaturations »

x: nombre de molécules majoritaire ; m : massif m ; (x) nombre de molécules majoritaires co-éluées dans un massif

○ $[C_{35}H_{60}O_3Li]^+$ m/z 535,46

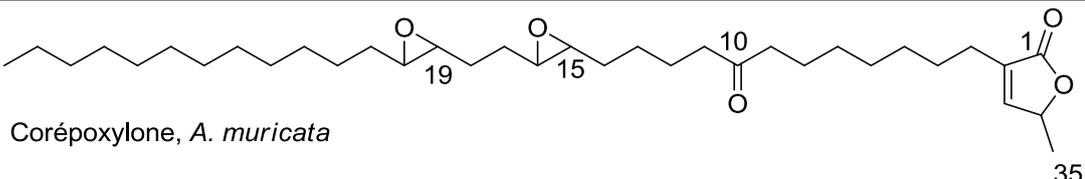
Le chromatogramme des acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_3$ montre deux massifs (24 à 29 min et 31 à 34 min) d'intensité très faible ($1 \cdot 10^5$) et mal définis (Figure 107). Pour cette formule brute l'hypothèse la plus probable serait des acétogénines de type E aliphatiques formées par des doubles liaisons et 1 hydroxyle, 1 époxyde ou 1 cétone. Aucune acétogénine de ce type n'a été décrite dans la littérature, il est donc intéressant de voir l'étendue (7 à 14 min) du massif correspondant à ces composés. Cependant, aucune information structurale n'a été visible, hormis le sous-type 1a de toutes ces molécules.

○ $[C_{35}H_{60}O_4Li]^+$ m/z 551,46

Après extraction de cette masse, trois massifs sont visibles entre 27 et 34 min (27 à 29 ; 30 à 32 et 32 à 35 min) avec au minimum 12 molécules co-éluées toutes de sous-type 1a (Figure 107). Ce résultat est lui aussi très intéressant car aucune ACGs de cette formule brute n'a été isolée des Annonaceae à ce jour.

○ $[C_{35}H_{60}O_5Li]^+$ m/z 567,45 $[C_{37}H_{60}O_5Li]^+$ m/z 595,49

❖ Un massif situé entre 25 et 32 min, avec 8 molécules majoritaires est détecté sur le chromatogramme des acétogénines en C35 (Figure 107). Les spectres SM/SM montrent les fragments caractéristiques c, c-2H d'une fragmentation d'un époxyde pour 3 molécules majoritaires (26,79 ; 26,93 et 28,79 min). Celles-ci ont un époxyde en C17/18 avec une différence de 14 u.m.a. par rapport à la diépomuricanine-B. Elles correspondraient à la corepoxylone isolée d'*A. muricata* (Tableau 75). Les 5 autres composés majoritaires ont trop peu de fragments caractéristiques pour permettre une attribution structurale. Aucune autre ACG de cette formule brute n'est décrite.

32 

Corépoxyllone, *A. muricata*

[C₃₅H₆₀O₅Li]⁺

Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	époxyde	Identification
26,79 [26,64;26,88]	567,4598	0,5	0	1a	0	1 [4; 16]	0	2 [15,16]	Type-corépoxyllone
26,93 [26,88;27,12]	567,4592	0,6	0	1a	0	1 [4; 16]	0	2 [15,16]	Type-corépoxyllone
27,74 [27,55;27,84]	567,4579	3,0	≥ 0	1a	0	-	-	-	-
28,26 [28,17;28,36]	567,4572	4,0	≥ 0	1a	0	-	-	-	-
28,79 [28,69;28,79]	567,4572	4,0	≥ 0	1a	0	1 [4; 16]	0	2 [15,16]	Type-corépoxyllone
28,94 [28,84;29,03]	567,4581	3,6	≥ 0	1a	0	-	-	-	-
29,71 [29,51;29,90]	567,4581	2,5	≥ 0	1a	0	-	-	-	-
31,06 [30,86;31,20]	567,4581	2,5	≥ 0	1a	0	-	-	-	-

Tableau 75 : Acétogénines de formule brute C₃₅H₆₀O₅

❖ Un massif peu défini entre 27,5 min et 32 min ayant une molécule majoritaire à tr = 21,2 min est visible sur le chromatogramme des acétogénines en C37 (Figure 108). Aucun fragment caractéristique n'a été visible sur les spectres SM/SM, outre le fragment en β de la lactone montrant le sous-type 1a de ces acétogénines. Deux molécules de cette formule brute ont été isolées des Annonaceae : l'annondienine (*A. jahnii*) (Figure 109) et la tripoxyrolline (*R. membranaceae*) (Figure 110). Comme aucun fragment d'époxyde n'a été visible, l'hypothèse de structure de type annondienine semble plus probable. Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur la structure de ces molécules.

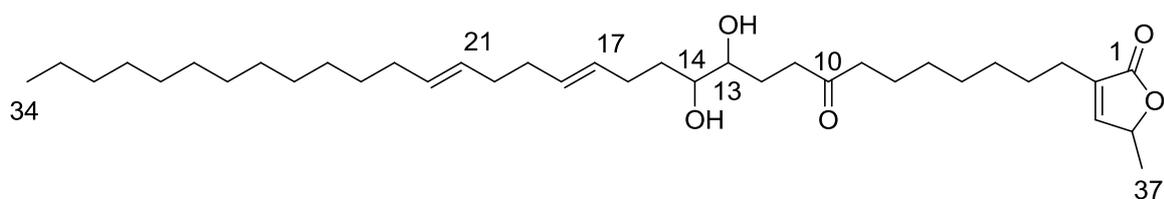


Figure 109 : Annondienine, *A. jahnii*

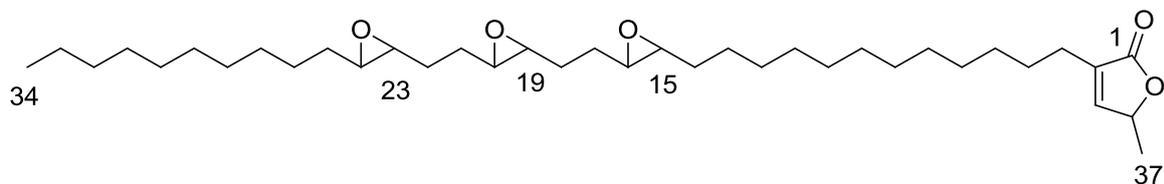


Figure 110 : Tripoxyrolline, *R. membranaceae*

○ $[C_{35}H_{60}O_6Li]^+$ m/z 583,45

Trois composés majoritaires sont visibles dans un massif entre 18 et 30 min pour ces acétogénines en C35, de formule brute jusqu'alors inconnue (Figure 107, Tableau 76). Des fragments B1, B1-2H sont identifiés sur le spectre SM/SM des trois molécules majoritaires (tr = 22,41 ; 23,24 et 23,61 min) permettant de positionner leur THF entre C-16 et C-19. Étonnamment, les fragments B1 et B1-2H ont une différence de 12 u.m.a par rapport à la corossoline (Tableau 52). Ces molécules auraient donc un oxygène et deux « insaturations » entre le THF et la lactone. Aucune acétogénine de ce type ni de cette formule brute n'a été isolée, il est donc difficile de caractériser cette structure originale, pour laquelle on pourrait proposer une cétone et une double liaison entre la lactone et le THF. Un caractère artefactuel semble improbable (i.e. $C_{35}H_{62}O_6-2H$; non observé par ailleurs ; $C_{35}H_{62}O_8-H_2O$: non concordance des temps de rétention).

$[C_{35}H_{60}O_6Li]^+$											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	THF	Hydroxyyles		Identification
22,41 [21,93;22,89]	583,4538	1,2	2	1a	≥ 1	≥ 0	1	A [16,19]	15	20	Masse non publiée
23,24 [22,94;23,51]	583,4540	0,8	2	1a	≥ 1	≥ 0	1	A [16,19]	15	20	Masse non publiée
23,61 [23,22;23,96]	583,4530	0,8	2	1a	≥ 1	≥ 0	1	A [16,19]	15	20	Masse non publiée

Tableau 76: Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_6$

○ $[C_{35}H_{60}O_7Li]^+$ m/z 599,44 et $[C_{37}H_{64}O_7Li]^+$ m/z 627,47

❖ Le chromatogramme des acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_7$ a l'intensité la plus importante pour les acétogénines à 3 insaturations (Figure 107). Cinq molécules majoritaires sont visibles entre 21 et 23,5 min dont une très majoritaire par rapport aux autres, à 22,65 min (Tableau 77).

Les spectres SM/SM des cinq molécules majoritaires sont différents des autres spectres des acétogénines. En effet, le fragment correspondant à la perte de la lactone a une intensité relative de 70 % et un nouveau fragment de formule brute $C_{26}H_{48}O_4Li$ a une intensité relative de 100 % (Figure 111). Il semble correspondre à un fragment de type Y1 particulier.

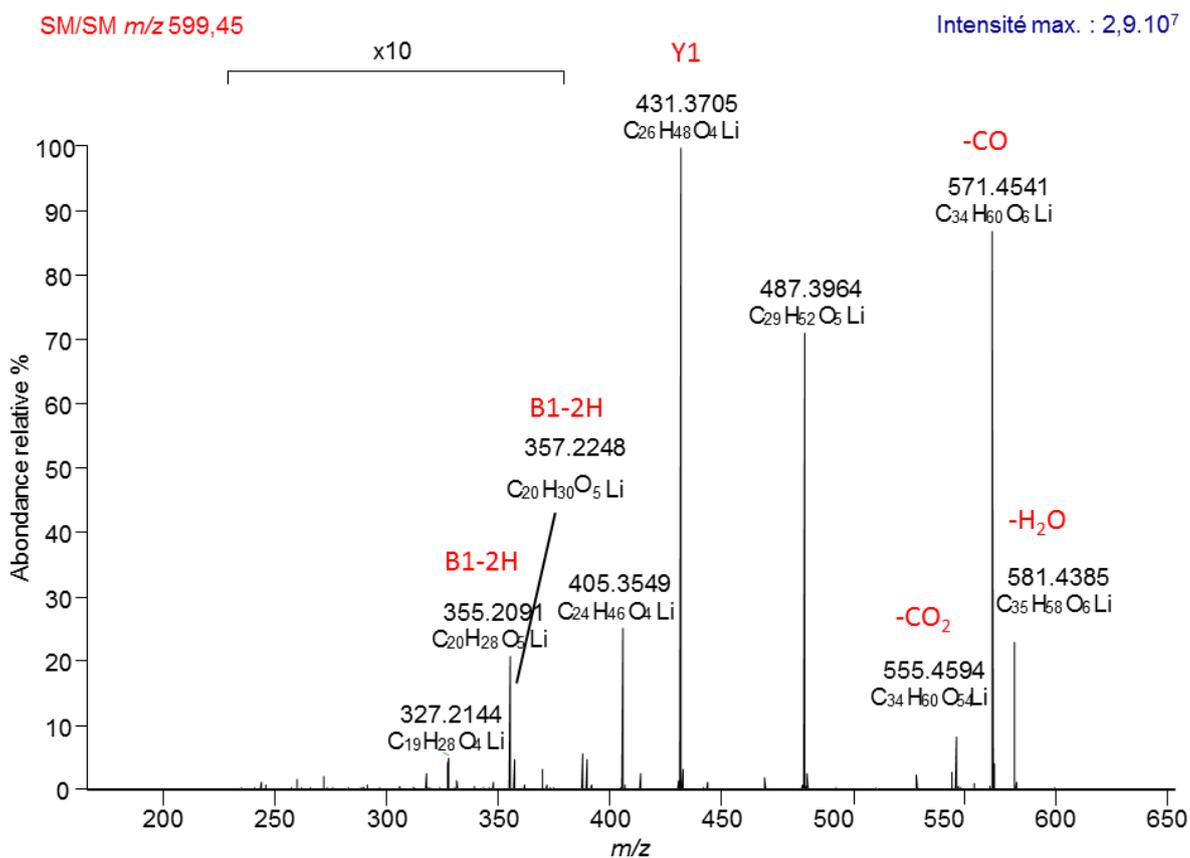


Figure 111 : Spectre SM/SM m/z 599,44 des molécules majoritaires

Ce fragment très favorisé pourrait être dû à la fragmentation d'un THP situé en C-4 et C-8 (Figure 112). Le mécanisme semble être une fragmentation de type THF.

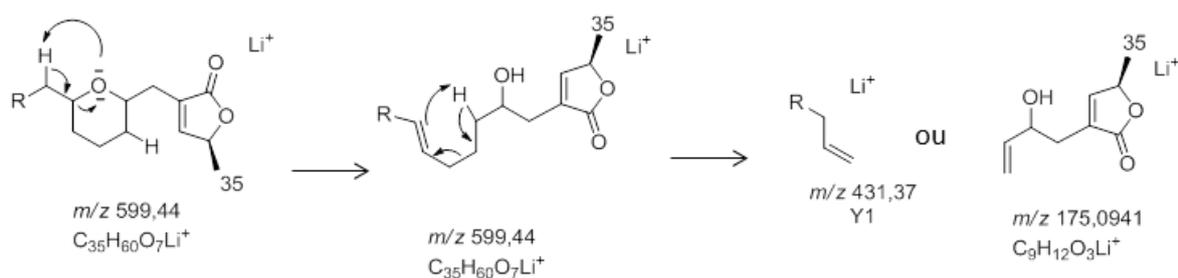


Figure 112 : Mécanisme de formation du fragment Y1 : $C_{26}H_{48}O_4Li$ à m/z 431,37

De plus, un mécanisme similaire au mécanisme de fragmentation en β de la lactone permet d'obtenir le fragment $C_{29}H_{52}O_5Li$ à m/z 487,39 (Figure 113).

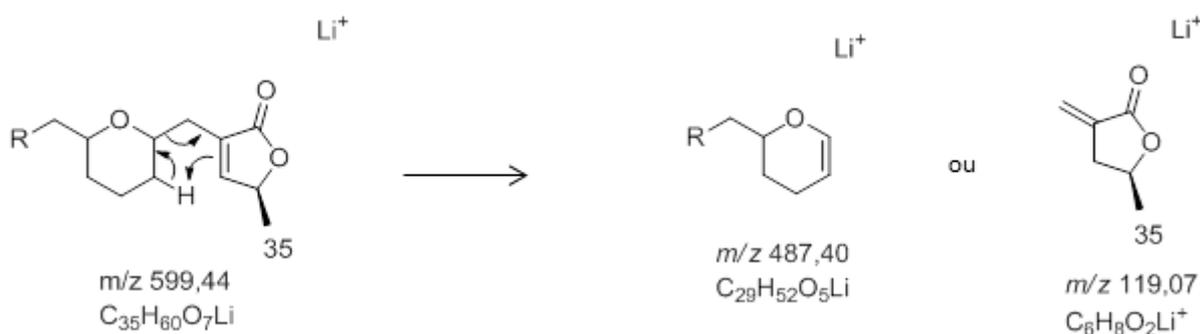


Figure 113 : Mécanisme de formation du fragment $C_{29}H_{52}O_5Li$ à m/z 487,40

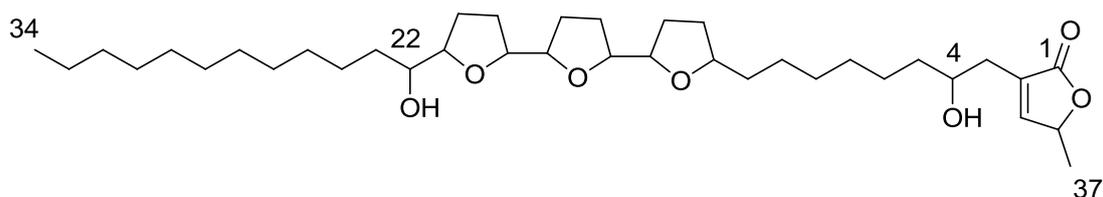
Les fragments caractéristiques B1 et B1-2H sont visibles sur le spectre SM/SM de ces molécules. Un THF serait donc placé entre les carbones C-16 et C-19. Une différence de 14 uma par rapport à une chaîne aliphatique simple, soit 2H et un hydroxyle, est visible entre le THF et le THP, différence qui suggérerait une cétone. Une molécule correspond à cette structure la montanacine-D (*A. montana*), jamais extraite d'*A. muricata* (Tableau 77). Des études en SM/SM/SM du fragment X3 ont permis de retrouver les fragments de rupture du THF et de valider notre hypothèse.

Montanacine-D, *A. montana*

[$C_{35}H_{60}O_7Li$] ⁺											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	THF	THP	Hydroxyles	Identification
21,19 [21,09;21,29]	599,4485	-1,50	2	1b	1	1 [8;15]	0	16;19	1 [4;8]	15 20	Type-Montanacine-D
21,82 [21,72;21,92]	599,4482	-1,87	2	1b	1	1 [8;15]	0	16;19	1 [4;8]	15 20	Type-Montanacine-D
22,08 [22,03;22,13]	599,4484	-1,55	2	1b	1	1 [8;15]	0	16;19	1 [4;8]	15 20	Type-Montanacine-D
22,65 [22,60;22,80]	599,4481	-2,12	2	1b	1	1 [8;15]	0	16;19	1 [4;8]	15 20	Type-Montanacine-D
23,06 [22,95;23,21]	599,4482	-1,87	2	1b	1	1 [8;15]	0	16;19	1 [4;8]	15 20	Type-Montanacine-D

Tableau 77 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_7$

❖ Pour les acétogénines en C37, un massif est visible entre 20 et 25 min avec seulement un composé majoritaire à $t_r = 21,20$ min, de sous-type 1b. Quelques molécules ont été isolées ayant la même formule brute. Deux d'entre elles sont de type B et de sous-type 1a, et une seule acétogénine originale de sous-type 1b a été extraite de *Goniothalamus giganteus* : la goniocine (Figure 114). Le spectre SM/SM ne montre aucun fragment caractéristique pouvant nous faire penser à une structure de type THF α -monohydroxylé, excluant cette hypothèse.


Figure 114 : Goniocine, *G. giganteus*

- $[C_{35}H_{60}O_8Li]^+$ m/z 615,44 $[C_{37}H_{64}O_8Li]^+$ m/z 643,47

❖ Un massif est visible sur les chromatogrammes des ACGs en C35 entre 16 et 23,5 min. Malgré une forte co-élution, au moins trois composés majoritaires sont remarqués. Sur les spectres SM/SM les fragments B1, B1-2H, et de rupture en β de la lactone sont visibles. Cependant, aucune acétogénine de cette formule brute n'a été isolée des Annonaceae. Ces molécules semblent être de type A avec un THF entre C-16 et C-19, de sous-type 1b. Au vu des différences de 14 u.m.a et de 2 u.m.a. par rapport à une chaîne aliphatique nue, une cétone pourrait être positionnée entre le THF et la lactone et une double liaison pourrait être positionnée entre le THF et le méthyl terminal (Tableau 78).

Structure hypothétique												
$[C_{35}H_{60}O_8Li]^+$												
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	C=C	Cétone	hydroxyles			THF	Attribution	
20,08 [19,91;20,18]	615,4423	3,20	≥ 3	1b	20+	[5;14]	4	[5;14]	15	20+	A [16;19]	Masse inconnue
20,99 [20,96;21,28]	615,4423	3,20	≥ 3	1b	20+	[5;14]	4	[5;14]	15	20+	A [16;19]	Masse inconnue
21,36 [21,28;21,56]	615,4427	2,60	≥ 3	1b	20+	[5;14]	4	[5;14]	15	20+	A [16;19]	Masse inconnue

Tableau 78 : Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_8$

❖ Les acétogénines de formules brutes $C_{37}H_{64}O_8$ sont visibles de 12 à 24 min (Figure 108), avec une molécule majoritaire à $tr = 18,18$ min. Seulement deux molécules de cette formule brute ont été extraites des Annonaceae : la microcarpacine-B (*Uvaria microcarpa*) de type B et de sous type 1a avec une cétone en 33, et la goniotriocine (*Goniothalamus giganteus*) de type C et de sous type 1b avec une cétone en 22. Le spectre SM/SM de la molécule ne montre que la fragmentation en β de la rupture de la lactone. Cette molécule est de sous-type 1b.

3.2.6 Acétogénines à 4 « insaturations » $C_{35}H_{58}O_xLi$

❖ Seule la masse $C_{35}H_{58}O_7$ correspondant à des acétogénines à 4 « insaturations » est visible au sein du TIC (Figure 115). L'intensité est relativement élevée et ce résultat est très intéressant car aucune acétogénine à 4 « insaturations » en C35 et C37 n'a jamais été isolée des Annonaceae. Deux molécules (23,28 et 23,88 min) très distinctes avec une intensité élevée sont visibles au sein d'un massif étendu entre 17 et 26 min.

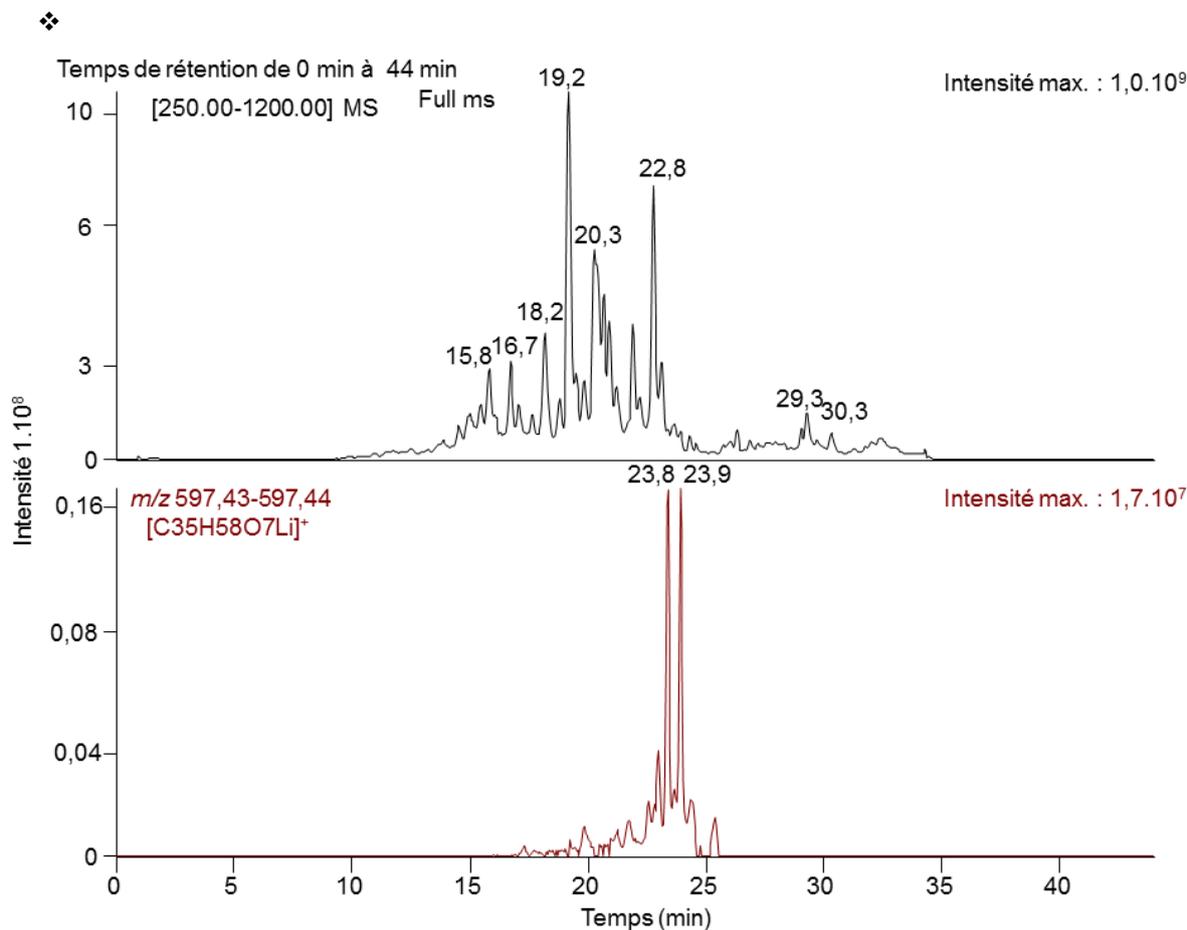


Figure 115 : Chromatogramme des acétogénines en C35 à 4 "insaturations", $C_{35}H_{58}O_7Li$

Les spectres SM/SM des deux molécules majoritaires sont proches des spectres obtenus pour les acétogénines de formule brute $C_{35}H_{60}O_7$ (Tableau 79). Étrangement, la différence de 2 u.m.a des fragments se trouve entre le THF et la lactone et ne pourrait être qu'une double liaison (Tableau 79). L'hypothèse structurale est peu probable et l'isolement de ces deux molécules pourrait être très intéressant.

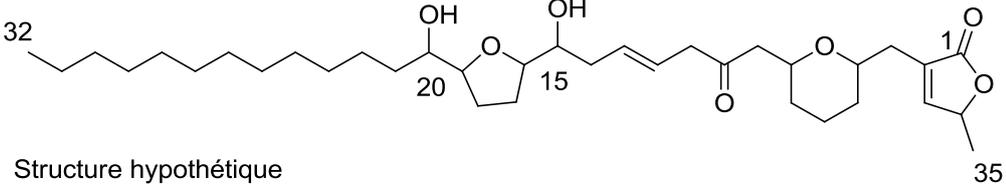
 <p style="text-align: center;">Structure hypothétique</p>											
$C_{35}H_{58}O_7Li$											
Temps de rétention	Masse exacte	Δ ppm	nb OH	lactone	THF	Cétone	C=C	THF	THP	Hydroxyles	Attribution
23,28 [23.23;23.47]	597,4331	1,1	2	1b	1	[8;15]	1	[16;19]	[4;8]	15 20	Type-montanacine-D-2H
23,88 [23.73;24.10]	597,4329	1,3	2	1b	1	[8;15]	1	[16;19]	[4;8]	15 20	Type-montanacine-D-2H

Tableau 79: Acétogénines de formule brute $C_{35}H_{58}O_7$

3.3 Conclusion

Par cette méthode de déréplication plus de 188 acétogénines ont été détectées sur les différents chromatogrammes. Ce chiffre est à comparer aux 80 acétogénines déjà identifiées au sein d'*A. muricata*, et aux études précédentes de déréplication (voir partie Chapitre 4 2.1.1).

Au moins 133 acétogénines en C35 ont été visibles lors de cette étude de déréplication. Des acétogénines de formule brute allant de 0 à 4 « insaturations » et de 3 à 10 oxygènes ont été détectées (Figure 116). Celles à 1 et 2 insaturations sont les plus nombreuses et les plus intenses. Elles correspondent majoritairement à des ACGs mono-THF, porteuses ou non d'un OH en position 4. Ceci corrèle tout à fait avec la littérature. De plus, les acétogénines les plus nombreuses sont les acétogénines ayant 7 oxygènes. Les composés majoritaires correspondent aux acétogénines de formule brute $C_{35}H_{64}O_7$ et surtout à l'annonacine, l'acétogénine majoritaire d'*A. muricata*. Les groupes d'ACGs décrits montre la figure suivante (Figure 116)

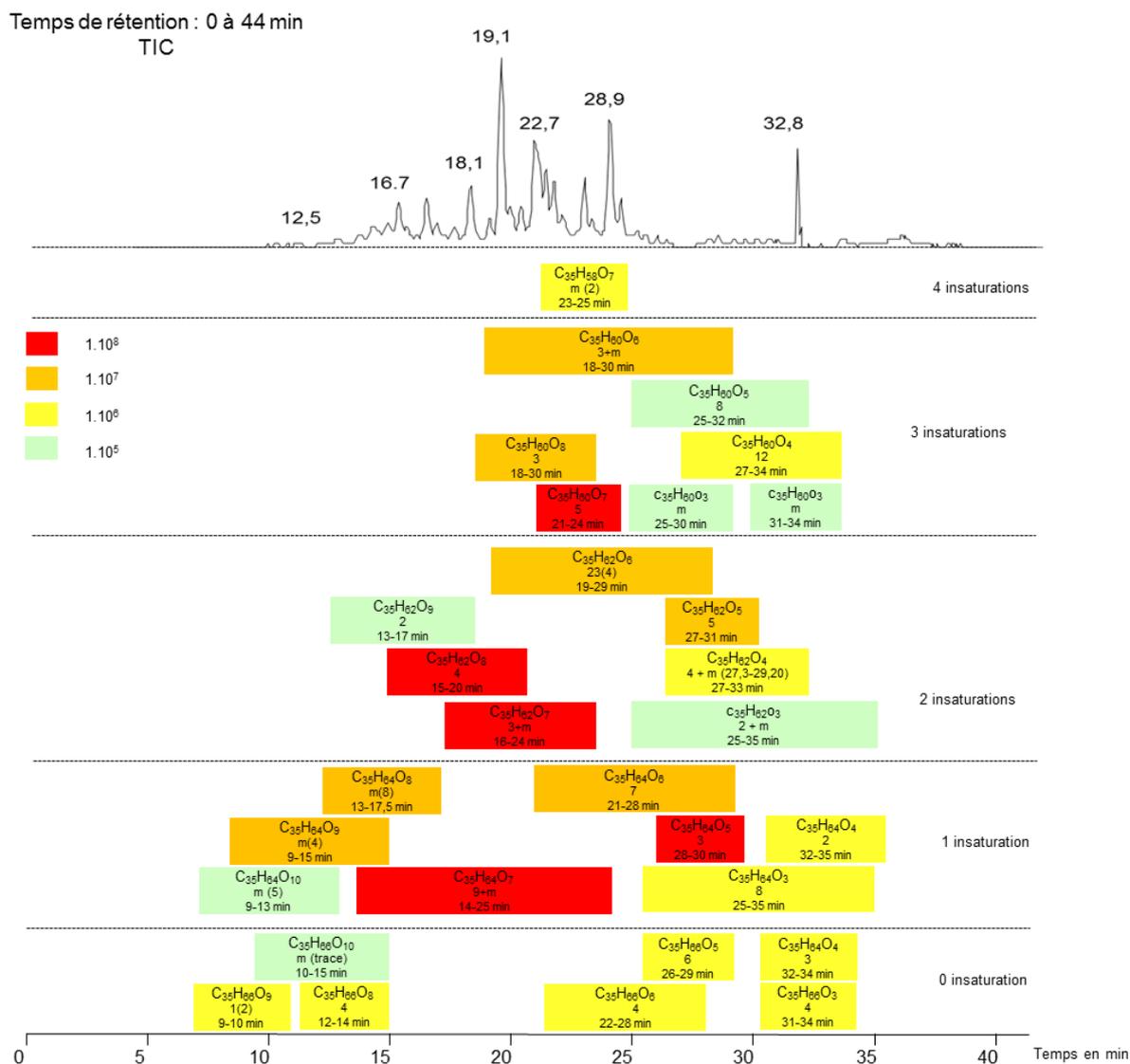


Figure 116: Résumé de différentes formules brutes en C₃₅ retrouvées dans le nectar d'*A. muricata* lors de la déréplication

Douze acétogénines en C₃₅ ont été identifiées. Trois de type E sur 18 déjà publiées ont été visibles au sein de ce nectar : la cohibine-A et la diépomuricanine-A déjà isolées d'*A. muricata*, mais aussi la diépomuricanine-B jamais isolée de cette espèce (Tableau 80, Annexes 1). Plusieurs hypothèses très plausibles correspondant à d'autres acétogénines isolées de cette plante ont pu être émises.

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	Époxydes	C=C	Temps de rétention	Isolée d' <i>A. muricata</i>
Cohibine-A	E1a	548	C ₃₅ H ₆₄ O ₄	15;16	0	n = 1	30,08 min	OUI
Diépomuricanine-B	E1a	546	C ₃₅ H ₆₂ O ₄	0	[17,18]; [21,22]	0	31,28 ; 31,76 min	NON
Diépomuricanine-A	E1a	546	C ₃₅ H ₆₂ O ₄	0	[15,16]; [19,20]	0	31,76 ; 32,24 min	OUI

Tableau 80: Acétogénines de type E en C₃₅ identifiées par la déréplication

Dix-huit acétogénines de type A identifiées ici, ont déjà été extraites d'*A. muricata*. Une dernière, a été la xylopianine était isolée de *Xylopiia aromatica* (Tableau 81). On rappellera que 57 acétogénines de type A ont déjà été isolées d'*A. muricata* (Annexe 3). Cependant, beaucoup d'hypothèses ont pu être établies et de nombreuses attributions de structure ont été présentées. Les ACGs identifiées de manière non ambiguë (i.e. stéréochimie connue) sont indiquées par une astérisque.

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	Temps rétention	Isolée d' <i>A. muricata</i>
Solamine	A1a	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	10,15,20	[16;19]	0	29,01 ; 29,27 min	OUI
Panatelline	A1a	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	13,18	[14;17]	0	29,72 min	OUI
Corossoline	A1a	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	10,15,20	[16;19]	0	23,51 ; 23,84 min	OUI
Murisoline	A1a	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	13,18	[14;17]	0	25,24 min	OUI
Annonacine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,15,20	[16;19]	0	17,99 ; 18,97* ; 19,33* min	OUI
Xylopianine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,8,15,20	[16;19]	0	18,60 ; 19,64 min	NON
Goniothalamicine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,13,18	[14;17]	0	20,73 ; 20,98 min	OUI
Corossolone	A1a	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	15,20	[16;19]	n = 1	24,15 ; 24,46 min	OUI
Annonacinone	A1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,15,20	[16;19]	n = 1	19,11 ; 20,20* ; 20,42 min	OUI

Tableau 81 : Acétogénines en C35 de type A identifiées par la déréplication

Aucune structure d'acétogénine de type B et C n'a été attribuée au sein de ce nectar. Cependant les trois acétogénines de type B présentées dans la littérature (Annexe 5) sont toutes α -hydroxylée et théoriquement les fragmentations des THF ne sont pas possibles. Nos résultats n'excluent pas la présence de ces molécules qui pourraient être présentes dans notre nectar. Nous n'avons malheureusement pas la possibilité de le valider.

Au moins 55 acétogénines en C37 ont été visibles. Les intensités de ces molécules sont plus faibles et montreraient qu'elles sont minoritaires par rapport aux acétogénines en C35 (Figure 117). Des formules brutes d'acétogénines entre 0 et 3 insaturations et de 4 à 10 oxygènes sont visibles. Aucune acétogénine à 4 insaturations n'a été détectée. Comme pour les acétogénines en C35, les composés les plus intenses ont 1 ou 2 insaturations et 7 oxygènes. Ceux sans insaturation n'ont que 6 et 7 hydroxyles sur leur chaîne aliphatique et sont donc très polaires. Le métabolisme de la plante est préférentiellement orienté vers les acétogénines en C35, comme le suggère la littérature « classique ».

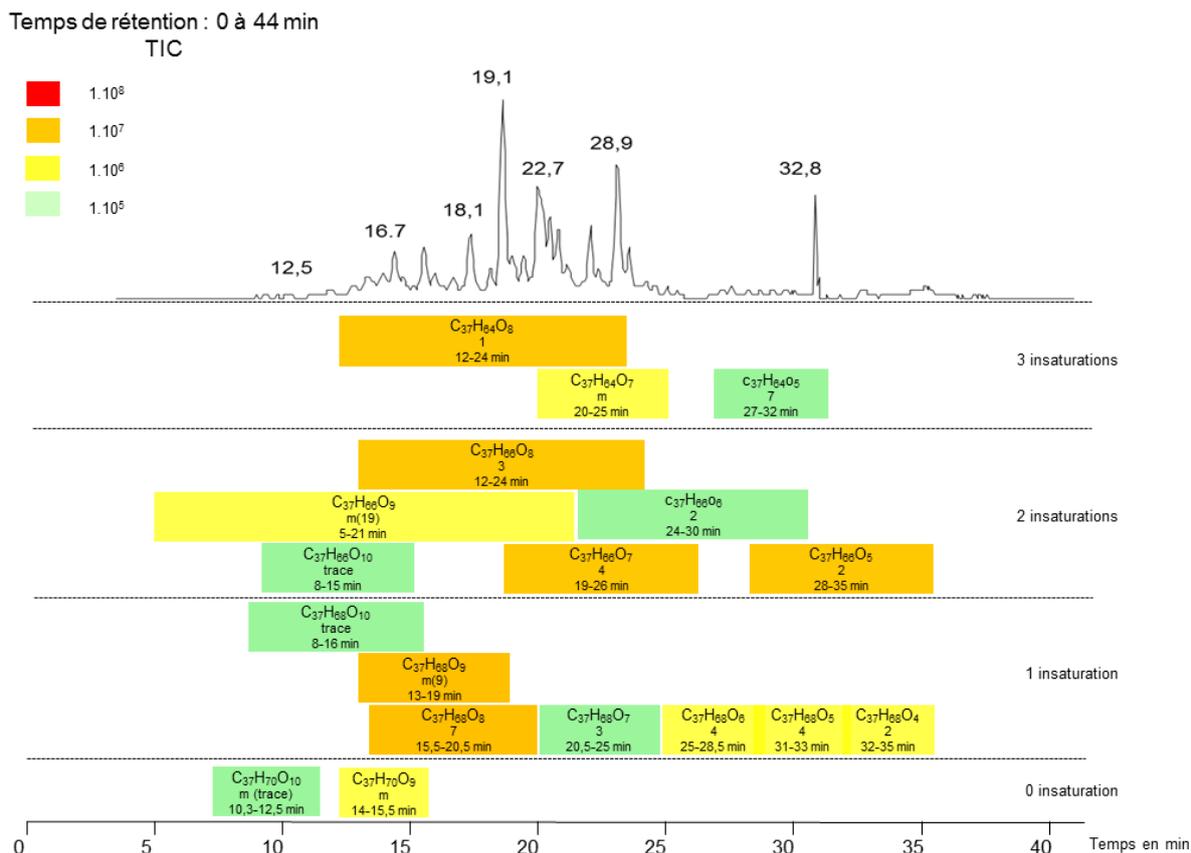


Figure 117 : Résumé de différentes formules brutes en C37 retrouvées dans le nectar d'*A. muricata* lors de la déréplication

Six acétogénines en C37 ont été détectées, dont deux de type E sur neuf déjà isolées d'*A. muricata* dont l'identité a pu être déterminée : la cohibine-C et la cohibine-D. Cinq acétogénines déjà publiées sont potentiellement trop apolaires pour être visibles dans notre étude. Plusieurs hypothèses très plausibles pour cette plante ont pu être émises pour d'autres acétogénines.

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	Époxydes	C=C	Temps de rétention	Isolée d' <i>A. muricata</i>
Cohibine-C	E1a	576	C ₃₇ H ₆₈ O ₄	17;18	0	n = 1	33,71 min	OUI
Cohibine-D	E1a	576	C ₃₇ H ₆₈ O ₄	15;16	0	n = 1	33,32 min	OUI

Tableau 82 : Acétogénines de type E en C37 identifiées par la déréplication

Trois structures d'acétogénines sur six déjà isolée d'*A. muricata* ont pu être attribuées au sein de ce nectar. Une dernière acétogénine a été identifiée à la xylomatacine (*Xylopija aromatica*) (Tableau 83).

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	Temps rétention	Isolée d' <i>A. muricata</i>
Réticulacine	A1a	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅ Li	17,22	[18;21]	0	31,67 ; 32,01 min	OUI
Uvariamicine I	A1a	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅ Li	15,20	[16;19]	0	32,01; 32,39 min	OUI
Xylomaticine	A1b	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇ Li	4, 10,15,20	[16;19]	0	22,91; 23,17	NON
<i>cis</i> -Réticulacine-10-one	A1a	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆ Li	17,22	[18;21]	n = 1	26,05; 26,29 min	OUI

Tableau 83 : Acétogénines de type A en C37 identifiées par la déréplication

Seulement une acétogénine de type C a été attribuée dans ce nectar : la gigantécine un de nos standards et isolée d'*A. muricata* (Tableau 84).

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	Temps rétention	Isolée d' <i>A. muricata</i>
Gigantécine	C1b	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	4,14,17,22	[10,13] + [18,21]	0	18,81 min	OUI

Tableau 84 : Acétogénines de type C en C37 identifiées par la déréplication

En conclusion, au moins 188 acétogénines ont été visibles par la déréplication au sein du nectar d'*A. muricata*. De nombreux autres représentants sont probablement présents comme le suggèrent les pics déformés ou les massifs homogènes et larges. Plus de 70 % de ces acétogénines sont en C35. La majorité est de type A et de sous-type 1b. Cette méthode a permis de détecter un plus grand nombre d'acétogénines de type par rapport à la littérature. La diversité des ACGs identifiées est grande, et suggère un métabolisme d'une assez faible régiosélectivité et potentiellement, une large tolérance de substrats par les oxygénases impliquées. Cependant, on remarque que les fonctionnalisations « majeures » se font généralement en C15 (époxydes, THF....).

	Type ACGs	C35	C37
E (0 insaturation)	1a	15 (8,0 %)	0
	1b	8 (4,2 %)	1 (0,5 %)
E	1a	5 (2,6 %)	2 (1,0 %)
	1b	0	0
A	1a	11 (5,8 %)	8 (4,2 %)
	1b	23 (12,2 %)	6 (3,2 %)
B	1a	0	0
	1b	0	0
C	1a	4 (2,1 %)	0
	1b	0	4 (2,1 %)
n.d.	1a	52 (27,6 %)	19 (10,1 %)
	1b	15 (8,0 %)	15 (8,0 %)
	Total	133 (70,7 %)	55 (29,3 %)

Tableau 85 : Recensement des acétogénines du nectar d'*Annona muricata* obtenues par notre méthode de déréplication

4. Déréplication sur un alcool d'*Annona cherimolia*

4.1 Présentation de l'alcool et extraction des acétogénines

Un alcool commercial d'*A. cherimolia*, acheté en Espagne dans la région de Madère en 2008, a fait l'objet d'une analyse par déréplication similaire à la précédente (Photo 18). L'alcool à 20 degrés, a été soumis à une extraction liquide/liquide avec de l'acétate d'éthyle. Une émulsion a été visible en raison d'une forte concentration en sucre, le mélange a donc été centrifugé puis la phase aqueuse a été extraite par deux fois. Les solutions organiques ont été réunies puis séchées avec du sulfate de sodium anhydre et évaporées à sec. Une solution de 1 mg.mL^{-1} de l'extrait obtenu de masse 141 mg (rendement = $4,7 \cdot 10^{-2} \%$ m/v) a été filtrée puis injectée par CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® avec infusion de lithium post-colonne.



Photo 18: Alcool d'*A. cherimolia* utilisé lors de l'étude de déréplication

Malgré l'utilisation d'une solution deux fois plus concentrée que celle du nectar de corossol le TIC était beaucoup plus pauvre en acétogénines que celui du nectar. De plus, contrairement au nectar, les molécules majoritaires en UV ne sont pas les acétogénines (Figure 118).

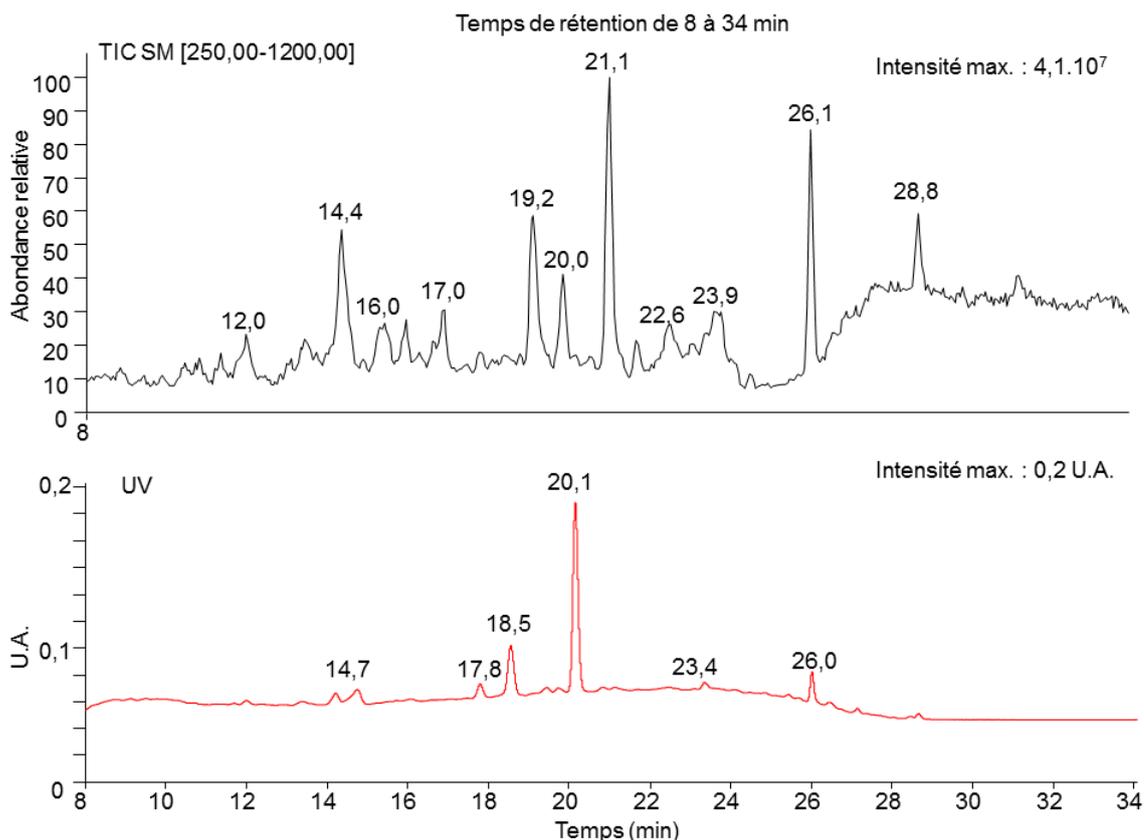


Figure 118 : UV et TIC obtenu par DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® avec infusion de lithium post-colonne et Chromatogrammes UV à $\lambda = 210$ nm à de l'alcool d'A. cherimolia

En effet, les trois molécules à $t_r = 18,5$ min, $20,15$ min et 26 min bien distinguable en UV ont des masses équivalentes aux formules brutes respectivement de $C_{25}H_{38}O_5$, $C_{26}H_{40}O_5$ et $C_{24}H_{38}O_4$. Les deux composés les plus polaires, ayant des spectres UV similaires, seraient des analogues à un groupement méthoxy de différence. Des études complémentaires MS^n devront être effectuées pour permettre l'identification de ces trois composés majoritaires.

4.2 Acétogénines contenues dans l'extrait d'alcool

L'analyse des données de déréplication de l'alcool a été effectuée selon la même démarche que pour le nectar. Dans cette thèse, seul un résumé des résultats sera présenté.

Les acétogénines sans insaturation ne sont pas visibles dans l'extrait de l'alcool. Celles-ci étaient déjà difficilement perceptibles dans l'étude du nectar. Au vu du peu de quantité d'acétogénines dans cet extrait, elles sont probablement sous le seuil de la détection.

Les acétogénines en C35 ont été visibles de 1 à 3 insaturations et de 4 atomes d'oxygène à 9 au maximum (Figure 119). Comme pour le nectar, celles à 1 et à 2 insaturations sont majoritaires. En particulier, les acétogénines correspondant à la formule brute $C_{35}H_{64}O_7$ représentent les acétogénines donnant les plus grandes intensités ioniques.

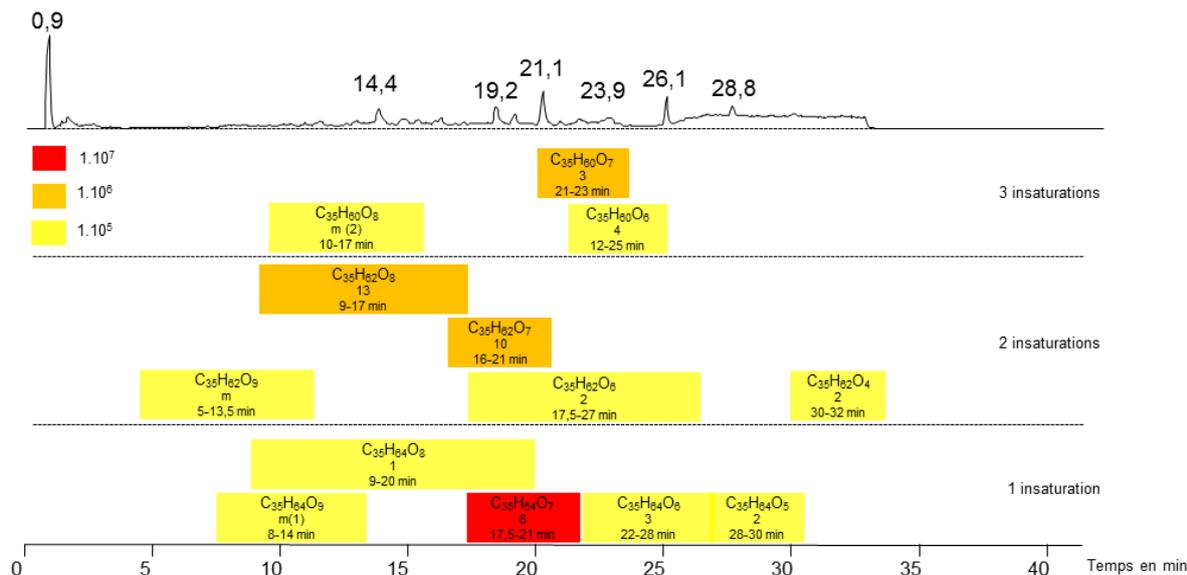


Figure 119 : Récapitulatif des acétogénines en C35 visibles sur le chromatogramme totale de l'extrait d'alcool d'*A. cherimolia*

Onze acétogénines en C35 ont été identifiées. Aucune acétogénine de type E n'a été décrite dans la littérature pour *A. cherimolia*. La diépomuricanine-B a été identifiée sans ambiguïté, au tr = 30,45 min (Tableau 86).

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyle	Époxydes	C=C	Cétone	Isolée d' <i>A. cherimolia</i>
Diépomuricanine-B	E1a	546	$C_{35}H_{62}O_4$	-	[17;18]; [21;22]	-	-	NON

Tableau 86 : Acétogénines de type E en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d'*A. cherimolia*

Neuf acétogénines de type A ont été identifiées (Tableau 87). Quatre d'entre elles avaient déjà été isolées de cette plante et trois d'entre elles déjà extraites d'une autre Annonaceae (Annexe 7).

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Temps de rétention	Isolée d' <i>A. cherimolia</i>
Corossolone	A1a	578	$C_{35}H_{62}O_6$	15,20	[16,19]	n = 1	-	24,2 ; 24,5 min	NON
Corossoline	A1a	580	$C_{35}H_{64}O_6$	10,15,20	[16,19]	-	-	23,7 ; 24,0 min	OUI
Annocherine	A1b	594	$C_{35}H_{62}O_7$	4,15,20	[16,19]	n = 1	-	20,01 ; 21,4 min	OUI
<i>trans</i> -Annonacine	A1b	596	$C_{35}H_{64}O_7$	4,10,15,20	[16,19]	-	-	19,1 min	OUI
<i>cis</i> -Annonacine	A1b	596	$C_{35}H_{64}O_7$	4,10,15,20	[16,19]	-	-	19,3 min	OUI
Xylopacine	A1b	596	$C_{35}H_{64}O_7$	4,8,15,20	[16,19]	-	-	19,6 min	NON
Goniothalamicine	A1b	596	$C_{35}H_{64}O_7$	4,10,13,18	[14,17]	-	-	20,21 ; 20,42 min	NON

Tableau 87 : Acétogénines de type A en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d'*A. cherimolia*

Une acétogénine de type B identifiées a déjà été extraites d'*A. muricata*. Deux autres n'avaient jamais été décrites pour cette plante (Tableau 88). Nos résultats sont intéressant car peu d'acétogénine ont été publié de cette plante et il apparait qu'un alcool de fruit contient une quantité de différentes acétogénines non négligeable (Annexe 9). Aucune acétogénine de type C n'a été décrite lors de cette déréplication.

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Temps rétention	Isolée d' <i>A. cherimolia</i>
Squamocine-B	B1a	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	13,22,22+	[14,21]	0	0	16,08; 16,67 min	NON
Molvizarine	B1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,13,22	[14,21]	0	0	19,05; 19,72 min	OUI
Annonisine	B1b	610	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	4,8,13,22	[14,21]	0	0	13,17; 14,08 min	NON

Tableau 88 : Acétogénines de type B en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d'*A. cherimolia*

Au moins 28 acétogénines en C37 ont été visibles. Comme pour le nectar, les intensités de ces molécules sont plus faibles et montreraient qu'elles sont minoritaires par rapport aux acétogénines en C35 (Figure 120). Des formules brutes d'acétogénines présentant entre 1 et 3 « insaturations » et de 7 à 9 oxygènes sont détectées. Les acétogénines les plus intenses sont toutes à deux « insaturations ». Celles sans insaturation ont 6 ou 7 hydroxyles sur leur chaîne aliphatique et sont donc très polaires.

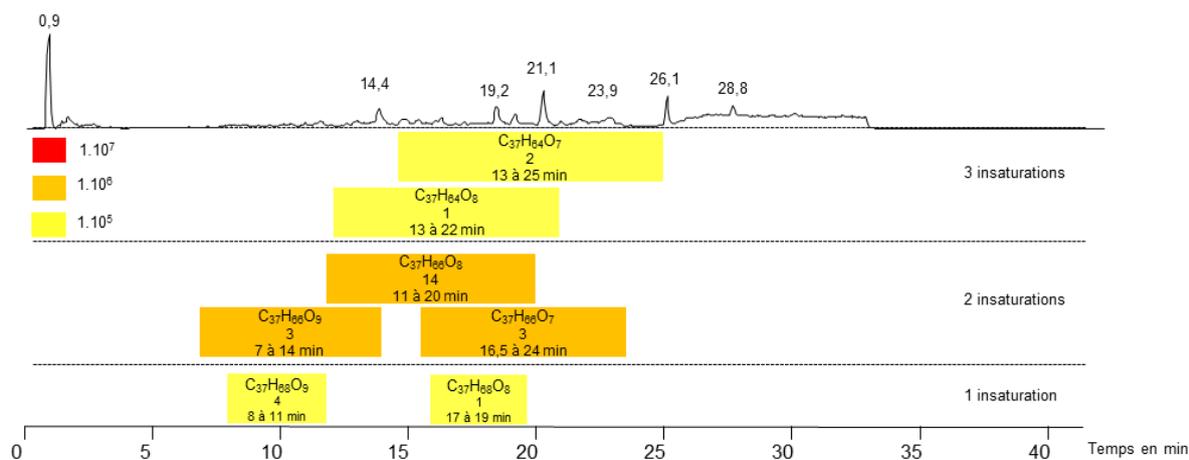


Figure 120 : Récapitulatif des acétogénines en C37 visibles sur le chromatogramme total de l'extrait d'alcool d'*A. cherimolia*

Aucune des acétogénines en C37 n'est de type E ou A. Trois acétogénines de type B ont été identifiées, dont deux déjà isolées d'*A. cherimolia* (Tableau 89). D'après la littérature, ce type (B) est très présent dans cette plante, ce qui corrèle avec nos résultats.

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Temps de rétention	Isolée d' <i>A. cherimolia</i>
Type-motriline	B1a	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	15,24,24+	[16,23]	19,19 min 19,73 min	OUI
Asimicine	B1b	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	4,15,24	[16,23]	21,63 min	OUI
Type-salzamoline	B1b	654	C ₃₇ H ₆₆ O ₉	4,10,15,24,24+	[16,23]	10,75 min	NON

Tableau 89 : Acétogénines de type B en C37 identifiées par la déréplication de l'alcool d'*A. cherimolia*

Une acétogénines de type C a été identifiées dans l'extrait (Tableau 90, Annexe 11).

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Temps de rétention	Isolée d' <i>A. cherimolia</i>
Type-cherimoline	C1a	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	16,19,24,24+	[11;15][16;23]	19,19 ;19,73 min	OUI

Tableau 90 : Acétogénines de type E en C35 identifiées par la déréplication de l'alcool d'*A. cherimolia*

En conclusion, le fruit d'*A. cherimolia* semble bien contenir des ACGs, contrairement à la première analyse menée au laboratoire [Guillopé R. 2011] – sous réserve d'une contamination par les graines lors de la préparation industrielle de l'extrait employé pour aromatiser l'alcool. Au moins 83 acétogénines ont été visibles au sein de l'extrait de l'alcool d'*A. cherimolia* (Tableau 91). Comme, pour le nectar d'*A. muricata*, environ 70 % de ces acétogénines sont en C35. La majorité est de type A et de sous-type 1b. Cependant, contrairement au nectar, les acétogénines de type B sont plus nombreuses. Nos résultats sont intéressants car la composition en acétogénines de cette plante est mal connue, et on ignorait la présence d'ACGs dans le fruit de l'espèce. Il apparait qu'un alcool de ce fruit contient une quantité de différentes acétogénines non négligeable. De plus comme pour le nectar des structures originales ont pu être visibles comme la montanacine et trois masses inconnues ont aussi été détectées.

	Type ACGs	C35	C37
E	1a	2 (2,4 %)	0
	1b	0	0
A	1a	6 (15,7 %)	0
	1b	13 (3,6 %)	1 (1,2 %)
B	1a	3 (3,6 %)	4 (4,8 %)
	1b	7 (8,4 %)	7 (8,4 %)
C	1a	0	2 (2,4 %)
	1b	0	0
n.d.	1a	8 (9,6 %)	6 (10,8 %)
	1b	16 (19,3 %)	8 (9,6 %)
	Total	55 (66,3 %)	28 (33,7 %)

Tableau 91 : Recensement des acétogénines du nectar d'*Annona muricata* obtenus par notre méthode de déréplication

5. Étude qualitative et quantitative de produits commerciaux

L'AFSSA rappelait dans sa saisine l'importance de l'évaluation humaine de l'exposition à l'annonacine et, par extension, aux acétogénines. Des études de colorimétrie par réactif de Kedde ou des dosages UV d'extraits ont souvent été utilisées pour permettre l'étude quantitative des lactones insaturées pouvant être extrapolées aux ACGs totales de l'extrait [Gromek D. 1994]. Plus récemment, des techniques très sensibles par spectrométrie de masse ont été utilisées (MALDI, FAB, ESI) dans le but de quantifier des composés individuels [Gu Z.-M. 1999, Laprèvote O. 1993, Champy P. 2004b]. Cependant, elles ne permettent pas de distinguer toutes les ACGs de même masse. Pour des résultats précis, pour des composés individuels, les techniques utilisant une séparation par CLHP et dosage UV par calcul des aires à la longueur d'onde $\lambda = 210$ nm sont intéressantes. Lors de nos études quantitatives de l'annonacine, la disponibilité des systèmes CLHP-UV permettant de ne pas utiliser d'étalon interne et la robustesse de ce détecteur ont attiré notre attention par rapport aux systèmes CLHP-SM.

Une analyse qualitative, visant à évaluer la teneur en ACGs majoritaires de produits à base d'*A. muricata* de consommation humaine, a été réalisée. Une identification préalable des pics d'intérêt a été menée par fragmentation des ions les plus intenses par CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap®, avec comparaison avec les données obtenues par déréplication et présentées précédemment.

Différents produits commerciaux achetés dans différents pays tel que le Pérou, le Brésil, les États-Unis ou la France ou sur des sites proposant des compléments alimentaires ou des aliments à base d'*A. muricata* via Internet ont été fait l'objet de ce travail. Ces différents produits sont classés en trois catégories : les fruits, les produits « médicinaux » et les produits alimentaires transformés.

5.1 Présentation des différents produits

La première étape de notre étude quantitative est l'extraction de l'annonacine et des autres acétogénines des différents produits commerciaux mis à notre disposition.

Nous avons travaillé sur des fruits d'*A. muricata* et 3 types de produits manufacturés issus de différents organes de la plante :

- Des fruits provenant du Vietnam et de Madagascar ;
- Des nectars de corossol artisanaux (Brésil) ou produit industriellement (Guyane, Pérou)
- Des produits cuisinés : des confitures (Madagascar) et des bonbons (Vietnam)
- Des compléments alimentaires à base de feuilles (Pérou) et une teinture mère (Pérou)

5.1.1 Fruits

Deux lots de fruits ont fait l'objet de notre étude :

- un corossol originaire du Vietnam, acheté chez Tang frères (Paris, Mars 2011) (Photo 19, Tableau 92).

- Trois fruits cueillis à Madagascar en Juin 2011 (Tableau 92).

La séparation de la pulpe, des graines et du péricarpe ont été effectués afin d'analyser les différentes parties du fruit.



Photo 19: Corossol Vietnamien employé

	Fruit Vietnamien	3 Fruits Malgaches
Total	2060 g	1815 g
Pulpe	1671,8 g (81,1 %)	1544 g (85,1 %)
Péricarpe	85,2 g (4,1 %)	88 g (4,8 %)
Graines	303 g (14,8 %)	183 g (10,1 %)

Tableau 92 : Répartition de la masse des fruits étudiés

5.1.2 Nectars

Au cours de cette thèse 5 lots de nectar ont été étudiés : 1 purée de corossol brésilienne, 2 jus brésiliens, un guyanais et un jus péruvien.



Photo 20 : Purée de corossol pour l'obtention de l'annonacine

Purée de corossol

La purée de corossol (30 kg) a été préparée industriellement et produite au Brésil (Photo 20). Elle est vendue par la compagnie Iprona® installée à Lana en Italie et était conditionnée dans deux gros pots en plastique. Elle était composée de 25 % d'une purée de corossol, sans additif.

Nectar Brésilien

Une bouteille de 500 mL de nectar de corossol commercialisé au Brésil par la société Dafruta® a été utilisée. Ce nectar était composé de purée de corossol (50 % minimum), de l'eau, de conservateurs et acidifiant (acide citrique).

Jus Brésilien

Dans les rue de Rio, il est très facile d'acheter du nectar de préparation artisanale de Graviola (Corossol). Ce jus a été produit par pressage extemporané de fruits frais et conditionné dans une bouteille de 500 mL de récupération.



Photo 21 : Nectar de Graviola



Photo 22 : Nectar Guyanais

Nectar Guyanais :

Ce nectar d'*A. muricata*, de marque "Caresse Guyanaise" (1 brique de 500 mL) a été acheté à Cayenne en Guyane Française dans un petit magasin d'alimentation générale. Ce nectar est de production industrielle guyanaise et fabriqué par Solam[®], une société laitière de Macouria. Sa composition est de l'eau, du sucre et une purée de pulpe de corossol à 26 %.

Briques de jus péruvien

Deux briques de 1 L de jus péruvien de marque Gloria[®], fabriqués à Lima au Pérou ont été rassemblés et étudiés. Elles sont composées essentiellement de sucre, de pulpe du fruit et d'eau.



Photo 23 : Jus du Pérou

5.1.3 Produits originaux

5.1.3.1 Bonbons

Les bonbons vietnamiens à base de corossol ont été achetés dans une grande surface asiatique dans le 13^e arrondissement de Paris. La boîte était constituée d'une centaine de bonbons pour une masse totale de 500 g. Ces bonbons sous emballage individuels avaient l'aspect d'une pâte de fruit avec en décoration une graine de la plante posée au-dessus de chacun.



Photo 24 : Bonbons vietnamien

5.1.3.2 Confitures



Photo 25 : Confiture Malgaches

La confiture est de marque Codal[®] originaire de Madagascar est composée principalement de corossol et de sucre. La confiture est composée de 70 % de fruit. Trois pots de 320 g soit 960 g ont été employés.

5.1.4 Compléments alimentaires

5.1.4.1 Formes sèches

Quatre poudres de feuilles d'*A. muricata* de trois marques différentes, ont été utilisées (Raintree[®], Inka Natural[®], Maximize[®]). Les indications proposées pour ces produits sont variées : antibiotique à large spectre, antihypertenseur, « antistress ». C'est cependant un potentiel anticancéreux (préventif et curatif) qui est mis en avant, avec des arguments du type « on connaît les propriétés de la feuille de corossol riche en cytotoxines qui ont pour fonction la destruction des cellules cancéreuses du corps » (Raintree). Pour ces produits sous forme de gélules, une posologie de 3 à 4 unités de prise par jour est proposée, pour des périodes de 3 mois et des fenêtres thérapeutiques d'une semaine d'interruption. Pour la poudre en vrac, la posologie conseillée est de deux cuillères à café pour 1 L de décoction répartie en 3 prises par jour.

Le lot Raintree[®] est une association de tiges et de feuilles d'*A. muricata* et d'*A. montana* d'origine péruvienne vendu par correspondance. La proportion des deux espèces n'est pas précisée par le fabricant. Lors des études nous avons utilisé deux boîtes contenant 120 gélules de 600 mg. soit 144g de poudre.



Photo 26: Compléments alimentaires Raintree[®]



Photo 27 : Compléments alimentaires Inka Natural[®]

Deux lots des compléments alimentaires Graviola Inka Natural[®] ont été achetés par correspondance à la société péruvienne Inkanal. Le premier est une boîte de gélules et le second un sachet de poudre en vrac de feuilles micropulvérisées d'*A. muricata*. Pour le lot de gélules, une boîte de 90 gélules contenant chacune 500 mg de poudre de feuilles, soit 45 g de poudre au total, a été utilisée. Tandis que le sachet contenait au total 170 g de poudre en vrac.

Le lot Maximize[®] a été acheté aux États-Unis dans un magasin de la chaîne de diététique « Vitamine Shoppe ». Ce lot équivaut à des gélules de poudre de feuilles d'*A. muricata* appelé Graviola 750[®] dont l'origine n'est pas connue. Lors des études, nous avons utilisés deux boîtes de 100 gélules de 750 mg, soit 150 g de poudre au total.



Photo 28 : Complément alimentaire Maximize[®]

5.1.4.2 Teinture



Photo 29: Teinture mère d'*A. muricata*

Deux lots de la teinture ont été achetés par correspondance à la société péruvienne ShammanMarket. La teinture mère est obtenue par macération des feuilles d'*A. muricata* desséchées et broyées dans de l'alcool éthylique. Le degré alcoolique final est de 35° à 45° d'après les mentions du fabricant. Deux bouteilles de 120 mL ont été utilisées.

5.2 Extraction des échantillons

Deux méthodes d'extraction ont été mises au point pour la majorité des produits, permettant l'élimination des molécules indésirables.

Les différentes parties du fruit (péricarpe, graines et pulpe) ont été séparées. Les graines et le péricarpe séchés à température ambiante ont été broyés pour obtenir de fines poudres. Les gélules ont toutes été décapsulées pour obtenir des fines poudres de feuilles. Ces matières premières sont dégraissées par du cyclohexane (2x100 mL/100 g) avec agitation pendant 1 h puis une filtration est effectuée pour obtenir différents marcs dépourvus des molécules les moins polaires (Figure 121). Deux extractions successives au CH₂Cl₂ (2x100 mL/100 g) avec agitation pendant 1 h ont été effectuées pour extraire l'annonacine et les autres acétogénines de polarité intermédiaire, extractions suivies d'une filtration, d'un séchage par MgSO₄ et enfin d'une évaporation sous pression réduite pour obtenir les différents extraits.

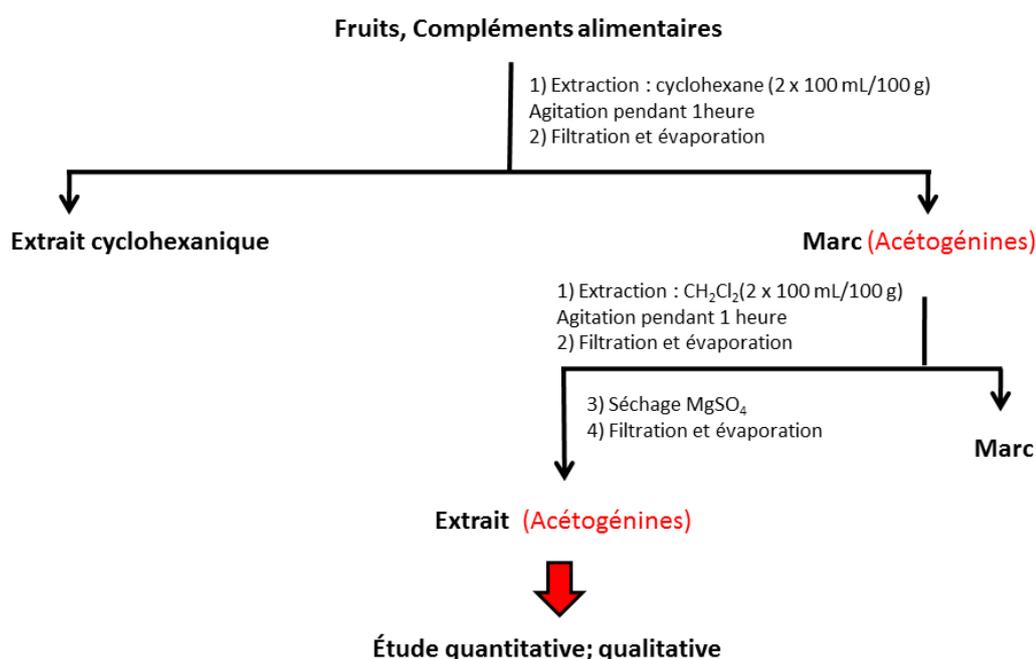


Figure 121 : Schéma d'extraction des acétogénines des fruits et des compléments alimentaires

Une autre méthodologie a été adoptée pour les produits contenant principalement des impuretés polaires (sucres) et une proportion importante d'eau (purée, nectars, confiture). Pour les nectars une première centrifugation a été effectuée (Figure 122). Puis le culot obtenu et la confiture ont subi trois lavages successifs à l'eau permettant d'éliminer les sucres. Deux extractions à l'AcOEt (100 ml/100 g) avec agitation pendant 1 h puis filtration, séchage au MgSO₄ et enfin évaporation sous pression réduite ont été effectués (Figure 122).

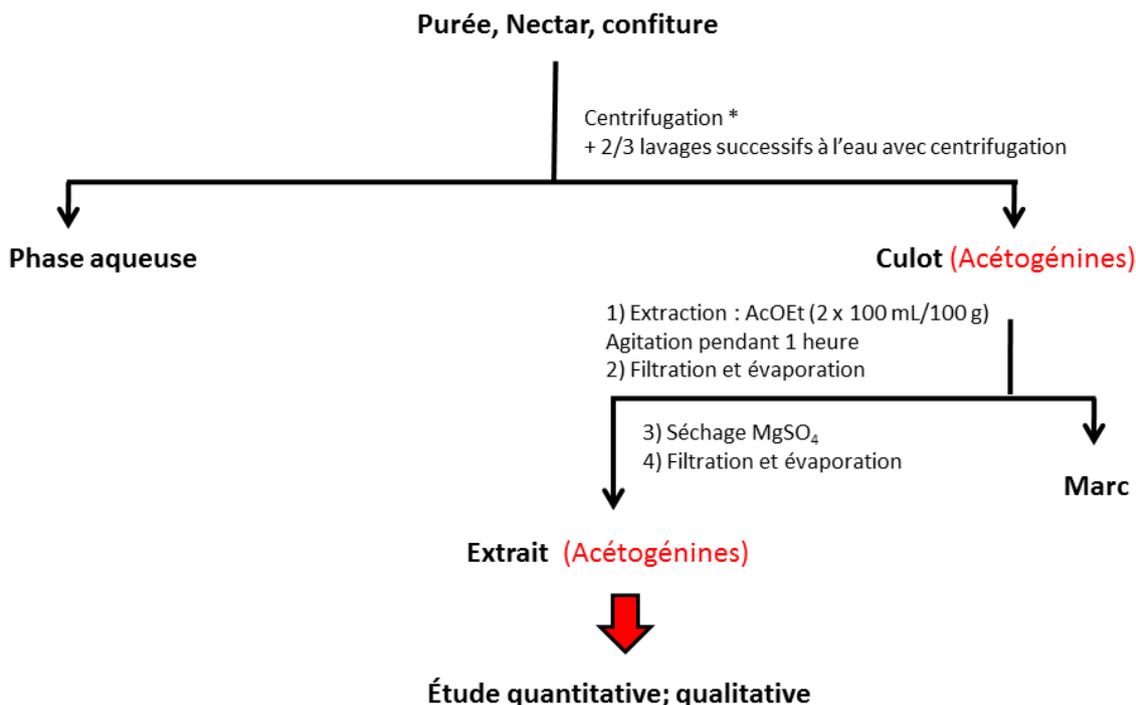


Figure 122 : Schéma d'extraction des acétogénines de la purée, des nectars et de la confiture

Les bonbons ont été tout d'abord mélangés avec de l'eau pendant 45 minutes puis ont subi une sonication pendant 30 min pour permettre l'élimination complète des molécules polaires (Figure 123). Trois extractions à l'AcOEt (100 mL/100g) sous agitation pendant 1 h, puis une filtration, un séchage avec du MgSO₄ et enfin une évaporation sous pression réduite ont été effectués.

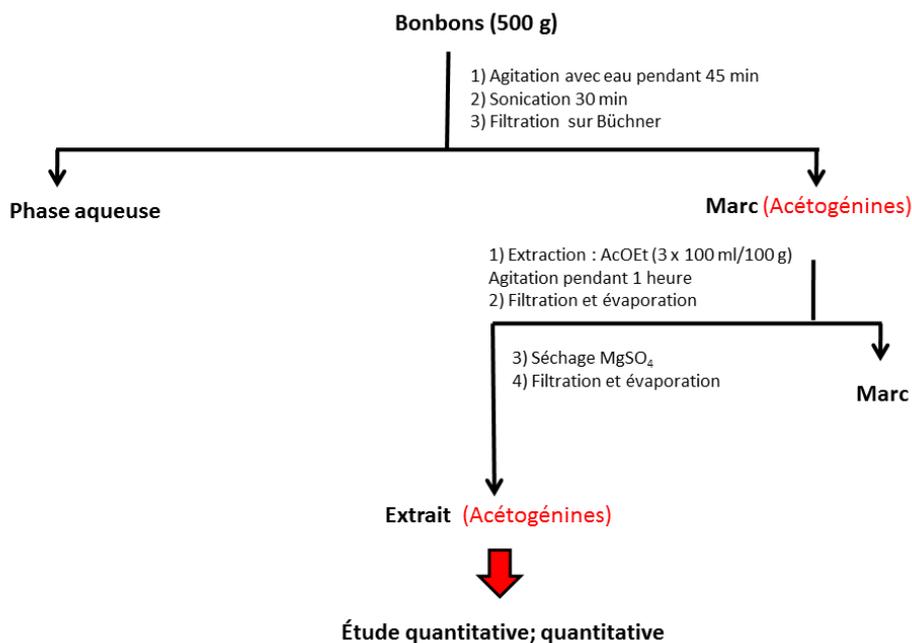


Figure 123 : Schéma d'extraction des acétogénines des bonbons

La teinture mère a été tout d'abord évaporée à sec (Figure 124). L'extrait a été partitionné par deux fois entre l'AcOEt et l'H₂O 50 : 50. La phase organique a été séchée par du MgSO₄ puis évaporée à sec sous pression réduite.

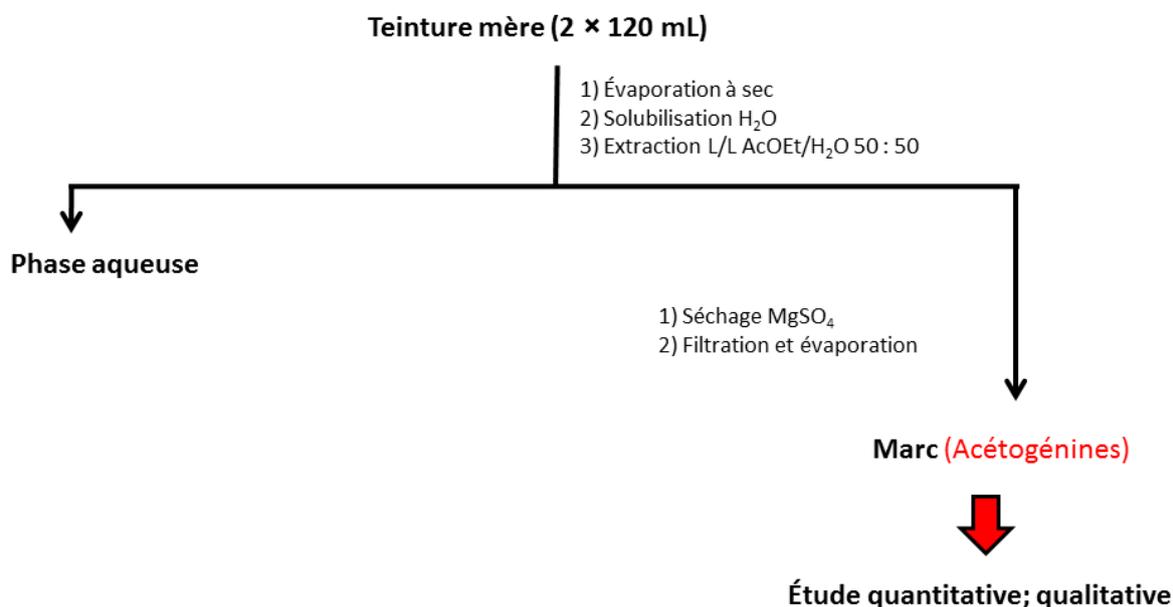


Figure 124 :Schéma d'extraction des acétogénines de la teinture mère

On notera que le prétraitement des extraits a été moyennement efficace, par la présence parfois décelée d'annonacine dans les extraits issus du dégraissage.

5.3 Étude qualitative

L'étude qualitative a été effectuée sur le même gradient que lors de la déréplication, une première comparaison des spectres UV a été effectuée avant une étude structurale par spectrométrie de masse CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap®.

5.3.1 Étude par CLHP- UV

Les chromatogrammes, des différentes parties des deux lots de fruits sont identiques à $\lambda = 210$ nm. La composition et la proportion des acétogénines de la pulpe et du péricarpe semblent également semblables (Figure 125). Environ vingt sept molécules fortement co-éluées sont visibles sur les différents chromatogrammes. Comme pour le nectar, tous les chromatogramme UV montrent une majorité de pics entre 13 min et 23 min (ACGs en C₃₅H₆₄O₇, type A), L'annonacine est majoritaire (≈ 15 %) à un temps de rétention de 19;1 min. Les profils chromatographiques sont identiques au profil du nectar utilisé lors de la déréplication et les molécules visibles dans le massif seraient donc toutes des acétogénines. Les chromatogrammes des extraits de graines sont beaucoup plus

« pauvres », par rapport au nombre de pics visibles sur les autres chromatogrammes. Ils contiennent moins d'acétogénines polaires. De plus, les proportions semblent très différentes par rapport aux autres parties du fruit comme l'étude quantitative nous l'a montré les graines contiennent une quantité plus importante d'annonacine et au vue du chromatogramme cette acétogénine est majoritaire ($\approx 22\%$). Ces résultats sont notablement différents de ceux obtenus précédemment au laboratoire [Champy P. 2004b] : une proportion de 70 % d'annonacine avait été mise en évidence, dans des conditions chromatographiques moins favorables (colonne C18 μ bondapak[®], cartouche). L'homologie des profils étant forte, seuls des exemples sont présentés ci-dessous.

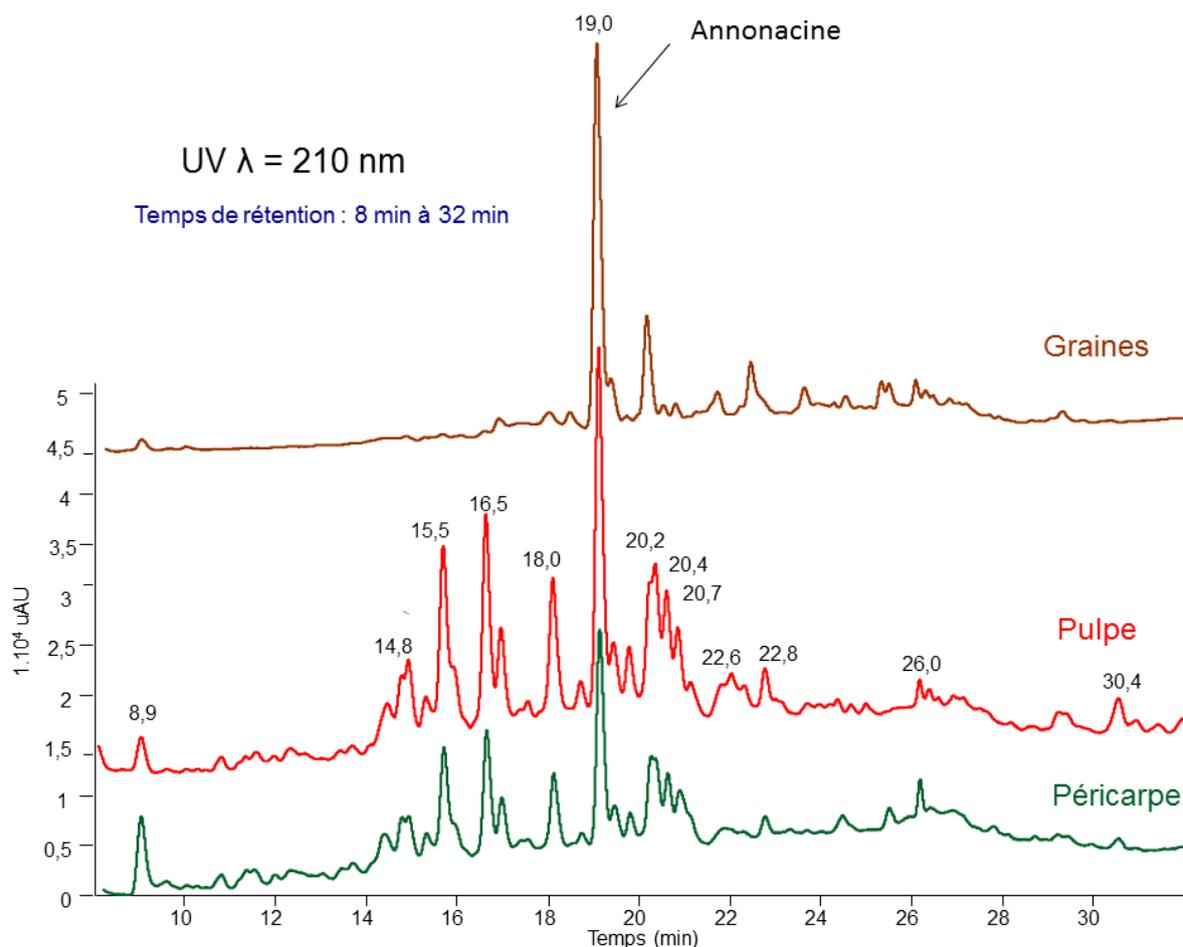


Figure 125 : Chromatogramme UV représentant le fruit vietnamien

Les profils chromatographiques des nectars et des produits dérivés du fruit sont similaires au profil de la pulpe. L'annonacine est toujours la molécule majoritaire ($\approx 15\%$) et les proportions des acétogénines semblent être identiques. Les profils chromatographiques des compléments alimentaires sont semblables aux autres produits dérivés de la plante (Figure 126). Cependant, les proportions des différentes acétogénines majoritaires sont différentes. En effet, l'annonacine ne semble plus être la molécule majoritaire ($\approx 12\%$) : six autres ACGs, deux plus polaires (**a** et **b**) aux temps de rétention $t_r = 16,5$ et $16,8$ min et quatre plus apolaires (**c** à **f**) de temps de rétention $t_r = 20,2$; $20,7$ et $20,9$ min sont présentées. Ces six molécules ont une proportion respective d'environ 10 % (**a**), 12 % (**b**) et 25 % pour les quatre apolaires (**c** à **f**) parmi l'ensemble des ACGs. D'après les études de dérégulation sur le nectar le composé **c** est l'annonacinone. En outre, on notera que la *cis*-annonacine est également plus abondante dans les feuilles.

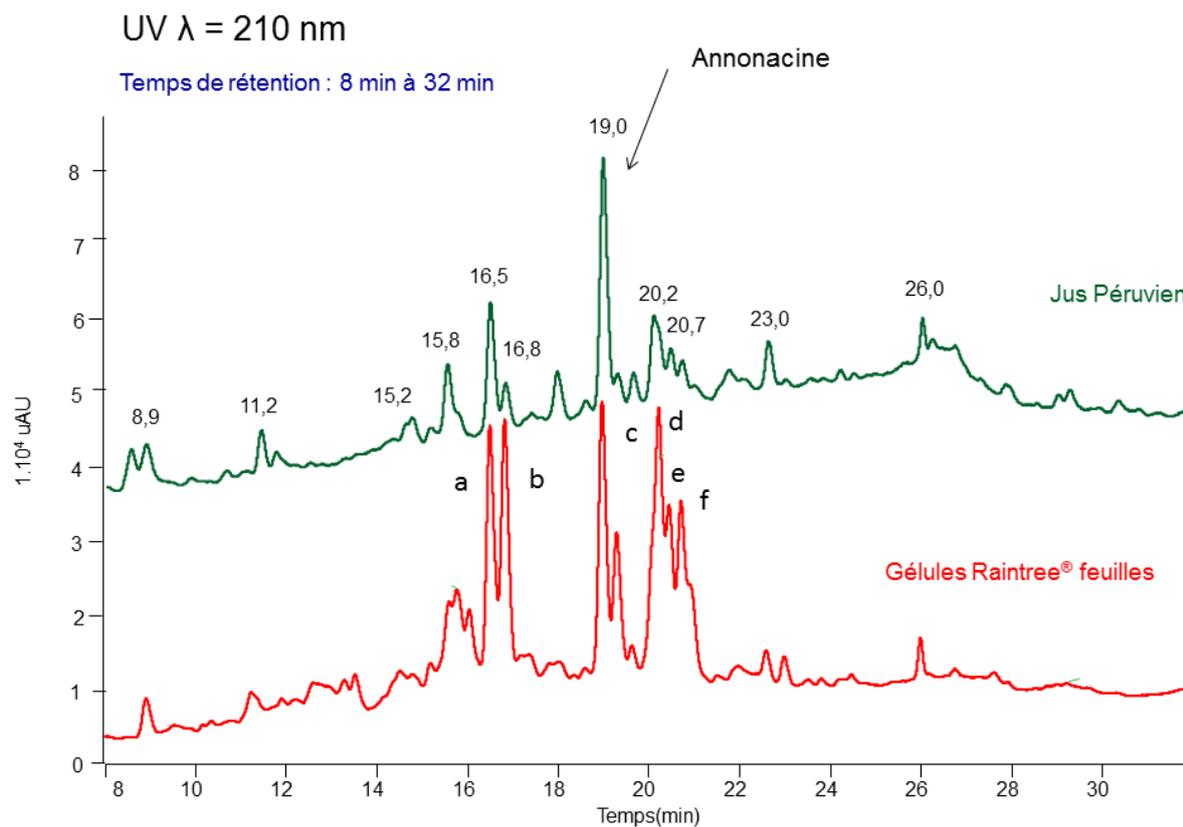


Figure 126 : Chromatogramme UV comparant le jus péruvien et les gélules Raintree®

5.3.2 Étude par CLHP-UV-SM

Une étude structurale des acétogénines majoritaires visibles en UV a été effectuée par DAD-ESI-LTQ-Orbitrap®. Les temps de rétention, les masses exactes et les fragments SM/SM, ont été comparés avec les données de la déréplication et une attribution structurale des différents composés a pu être effectuée. Les mêmes acétogénines sont présentes. Les formules brutes des ACGs les plus abondantes sont : $C_{35}H_{60}O_7$, $C_{35}H_{62}O_7$, $C_{35}H_{64}O_7$, $C_{35}H_{62}O_8$ et $C_{35}H_{64}O_8$ (Figure 127). Par contre, leurs proportions relatives peuvent varier.

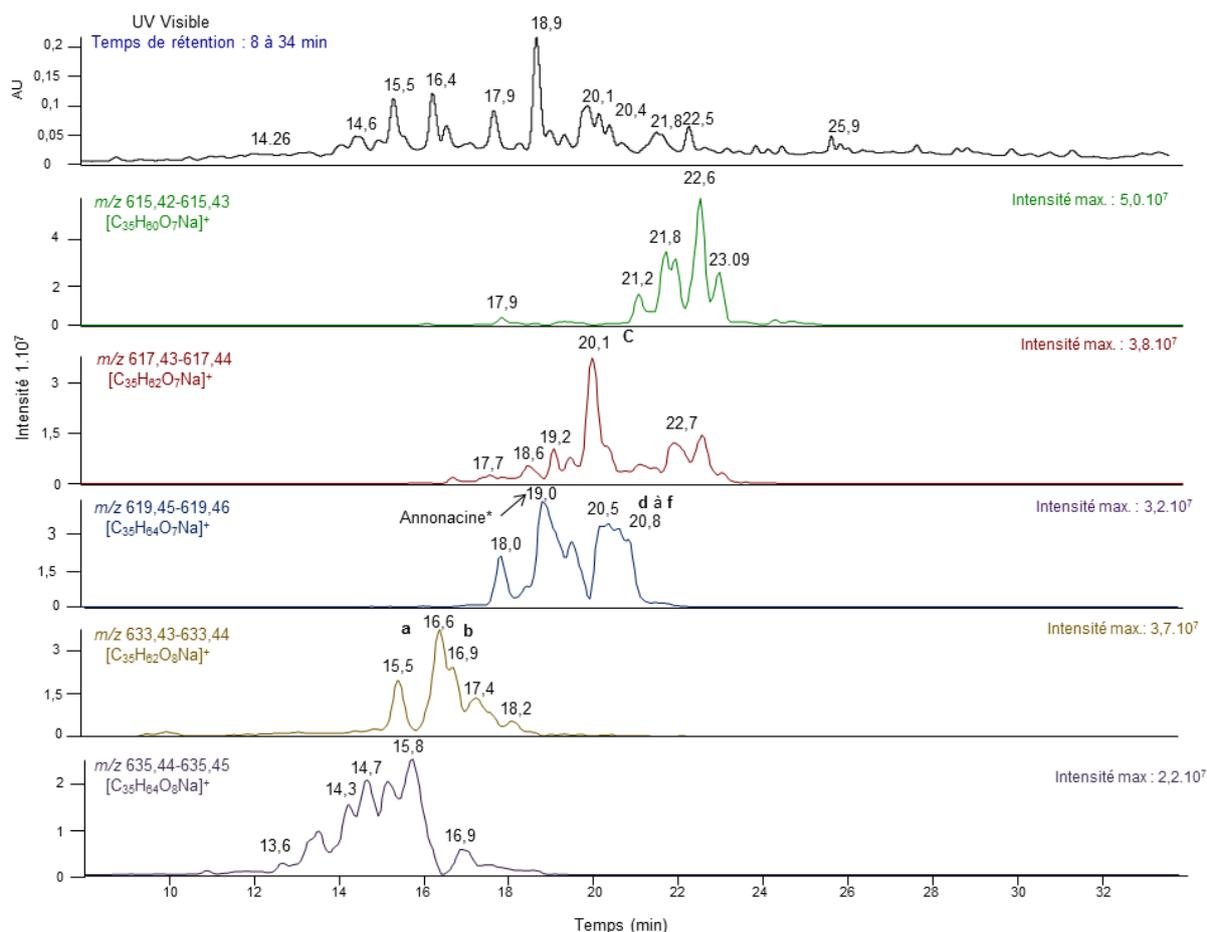


Figure 127 : Chromatogramme des ions extraits $[M+Na]^+$ correspondant aux acétogénines majoritaire en SM et en UV de la pulpe du fruit vietnamien

Les composés majoritaires ont tous soit 7 ou 8 oxygènes dans leur formule brute et entre 1 à 3 « insaturations ». La fragmentation de leurs ions cationisés au sodium comme pour les études de fragmentation de l'annonacine avec adduits au sodium, seulement les pertes d' H_2O , de CO , de CO_2 , et de rupture en β de la lactone ont été obtenues. Une comparaison des résultats obtenus par la déréplication du nectar avec infusion au lithium ont permis d'émettre des hypothèses sur leur structure (Figure 128).

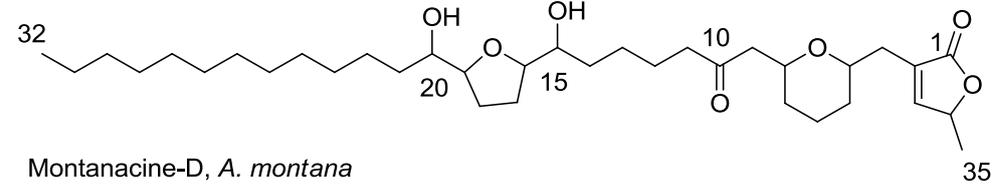
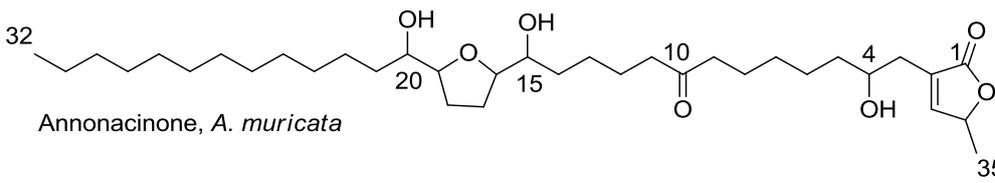
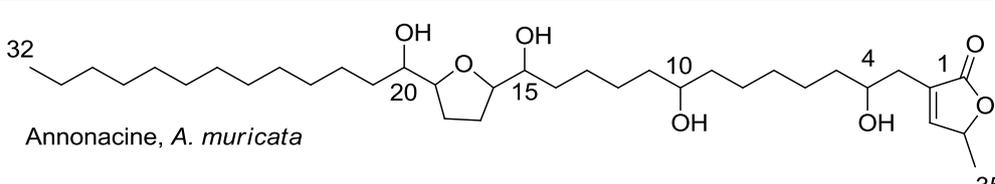
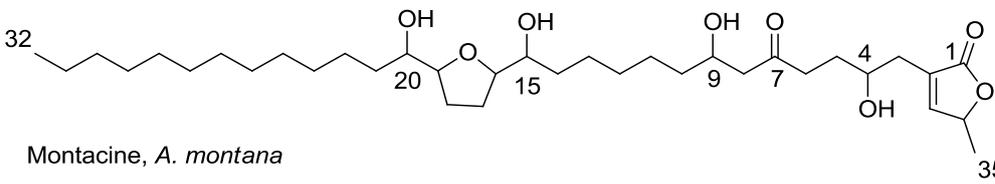
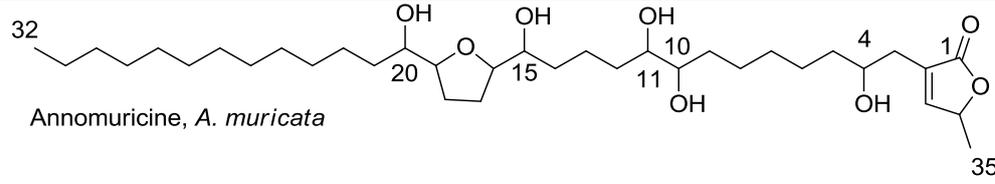
Formule brute, m/z [M+Na] ⁺	Exemple de structure des composés majoritaires
$C_{35}H_{60}O_7$ m/z 615,42	 <p>Montanacine-D, <i>A. montana</i></p>
$C_{35}H_{62}O_7$ m/z 617,44 Annonacinone (c)	 <p>Annonacinone, <i>A. muricata</i></p>
$C_{35}H_{64}O_7$ m/z 619,45 Annonacine + d à f	 <p>Annonacine, <i>A. muricata</i></p>
$C_{35}H_{62}O_8$ m/z 633,43 a et b	 <p>Montacine, <i>A. montana</i></p>
$C_{35}H_{64}O_8$ m/z 635,45	 <p>Annomuricine, <i>A. muricata</i></p>

Figure 128 : Proposition des structures des majoritaires des fruits et produits d'*A. muricata*

Les composés majoritaires sont tous des acétogénines en C35 et pour la plupart de type A et de sous type 1b. Les deux composés majoritaires sont l'annonacine et l'annonacinone.

5.4 Étude quantitative

5.4.1 Validation analytique

Une étude préalable en CCM (vanilline, réactif de Kedde) et CLHP-UV-SM analytique a été effectuée pour déterminer les extraits contenant les acétogénines. Ceux-ci ont ensuite été dosés par CLHP-DAD à une longueur d'onde $\lambda = 210$ nm par injection en triplicat.

La limite de détection (LOD) mesurée pour l'annonacine est de 5.10^{-12} moles injectée et la limite de quantification (LOQ) de $1,2.10^{-11}$ mole injectée. La droite d'étalonnage obtenue avait un coefficient de détermination de $R^2 = 0,999$. Les résultats ont été validés lorsque l'écart type était inférieur à 10 %.

5.4.2 Résultats

							Annonacine			
		Masse du produit (g)	Extrait	Masse de l'extrait (g)	Rendement/fruit	Rendement/partie	Qté/partie (mg)	Qté/lot (mg)	Qté (mg)/100g	Qté totale (mg)/100g
Fruit vietnamien (2060 g)	Pulpe (81,1 %)	1671,8	C ₆ H ₁₂	0,23	0,01 %	0,01 %	92	370	5	18
			CH ₂ Cl ₂	1,32	0,06 %	0,08 %				
	Graines (4,2 %)	85,2	C ₆ H ₁₂	6,71	0,30 %	7,80 %	246		289	
			CH ₂ Cl ₂	3,98	0,19 %	4,67 %				
	Péricarpe (14,7 %)	303	C ₆ H ₁₂	0,12	0,01 %	0,04 %	32		11	
			CH ₂ Cl ₂	1,02	0,05 %	0,33 %				
Lots de 3 fruits malgaches (1815 g)	Pulpe (85,1 %)	1544	C ₆ H ₁₂	0,02	0,00 1%	0,001 %	76	246	4,9	13
			CH ₂ Cl ₂	1,3	0,001 %	0,01 %				
	Graines (4,8 %)	88	C ₆ H ₁₂	6,71	0,37 %	15,25 %	152		172	
			CH ₂ Cl ₂	3,97	0,22 %	9,02 %				
	Péricarpe (10,1 %)	183	C ₆ H ₁₂	0,12	0,01 %	0,10 %	18		9,8	
			CH ₂ Cl ₂	1,02	0,06 %	0,88 %				

Tableau 93 : Résultats de l'étude quantitative des deux lots de fruits d'*A. muricata*

Le premier fruit était un gros fruit vietnamien non mûr il contenait une quantité totale de 370 mg d'annonacine (Tableau 93). Les trois autres petits fruits malgaches ont mûri au cours du trajet et au laboratoire. Ils avaient une quantité globale d'annonacine moindre (246 mg pour le lot entier). Les graines du fruit sont la partie qui contient le plus d'annonacine : respectivement de 246 mg et 152 mg (Tableau 93). La deuxième partie contenant le plus d'annonacine est la pulpe ≈ 60 fois moins que la quantité dans les graines. Une correspondance entre la quantité d'annonacine entre les différentes parties du fruit corréle avec la raison d'être probable des ACGs. En effet, ces molécules sont de très bons insecticides : le fruit charnu et sucré ne produit pas ou ne contient que peu de de toxines et les graines sont mieux protégées contre les insectes grâce à un niveau élevé d'annonacine ; de ce fait la plante peut se disséminer dans la nature.

	Masse du produit	Extrait	Masse de l'extrait (g)	Rendement/Échantillon	Annonacine		
					Qté/Échantillon (mg)	Qté totale (mg)	Masse mg/L
Purée brésilienne	500 g	C ₆ H ₁₂	0,92	0,06 %	Pas d'acétogénine	11,2	2,3 mg/100g
		AcOEt	2,43	0,16 %	11,2		
Jus brésilien non industrielle	500 mL	H ₂ O	9,40	6,40 %	Pas d'acétogénine	8,4	16,9
		AcOEt	4,82	3,40 %	8,4		
Nectar brésilien	500 mL	CH ₂ Cl ₂	1,16	2,50 %	8,1	8,1	16,2
Nectar guyanais	500 mL	H ₂ O	9,57	5,60 %	Pas d'acétogénine	0,7	1,4
		AcOEt	9,89	5,80 %	0,7		
Jus péruvien	2 L	H ₂ O	1,35	0,90 %	Pas d'acétogénine	11,0	5,5
		AcOEt	1,85	1,20 %	11,0		

Tableau 94 : Résultats de l'étude quantitatives des nectars et jus à base d'*A. muricata*

Les nectars sont moins concentrés en annonacine que les fruits (Tableau 94). La plupart d'entre eux sont même 10 fois moins concentrés. La purée concentrée est le produit dérivé contenant le plus d'annonacine.

	Masse du produit (g)	Échantillon	Masse de l'extrait (g)	R./Échantillon	Annonacine		
					Masse totale / échantillon (mg/g)	Qté (g/kg)	Qté /gélule (µg)
Gélules Raintree®	144 (240 gélules)	C ₆ H ₁₂	9,4	6,40%	Pas d'acétogénine	2,1	31,4
		CH ₂ Cl ₂	4,84	3,40%	2,1		
Gélules Nutriva stevia®	45 (90 gélules)	C ₆ H ₁₂	1,16	2,50%	0,8	2,1	29,8
		CH ₂ Cl ₂	1,03	2,30%	1,3		
Poudre Nutriva stevia®	170	C ₆ H ₁₂	9,57	5,60%	1,5	4,6	-
		CH ₂ Cl ₂	9,89	5,80%	3,1		
Gélules Maximize®	150 (200 gélules)	C ₆ H ₁₂	1,35	0,90%	Pas d'acétogénine	≤ 0,4	≤ 0,3
		CH ₂ Cl ₂	1,85	1,20%	≤ 0,4		
Teinture mère	120 mL	AcOEt	0,53	0,22 % m/v	≤ 6,7 µg/mL	≤ 6,7 mg/L	≤ 0,8 mg/ bouteilles

Tableau 95 : Résultats de l'étude quantitative des compléments alimentaire et de la teinture mère À base d'*A. muricata*

Les poudres et complément alimentaire contiennent peu d'acétogénines : environ 30 µg par gélules (Tableau 95). La quantité d'annonacine est 2 fois supérieure pour les poudres mais reste toujours plus faible que la pulpe ou les graines. Étrangement, un des compléments alimentaire (Maximize®) ne contient pas d'acétogénines. Cela pourrait être du au fait que les feuilles d'*A. muricata* n'en contenaient pas (erreur d'identification de l'espèce, chimiotype, date de récolte). Il a été précédemment montré au laboratoire que les feuilles de la plante ont une teneur très variable en ACGs, *a priori* en fonction de la saison [Champy P. 2004b]. Les acétogénines contenues dans la teinture mère n'ont pu être détectées qu'en spectrométrie de masse : elles n'étaient donc pas quantifiable pour cette étude. D'après le LOD, les teintures mères contenaient moins de 6,7 µg/mL soit 0,8 mg par bouteille (Tableau 95).

	Masse du produit (g)	Échantillon	Masse de l'extrait (g)	R./Échantillon	Annonacine		
					Qté/ Échantillon (mg)	Qté (mg/kg)	Qté /boîte (mg)
Bonbons	500	AcOEt	0,4082	0,08%	18,6	37,2	18,6
Confiture	960 (3 pots)	AcOEt	1,3591	0,14%	126	131,7	42

Tableau 96 : Résultats de l'étude quantitative des produits préparés à base du fruit d'*A. muricata*

À masse « fraîche » égale la confiture contient plus d'acétogénines que la pulpe de fruit, potentiellement en raison d'une faible teneur en eau (Tableau 96). La quantité d'annonacine pour les bonbons est plus faible mais n'est pas négligeable. Un consommateur peut ingérer 18,5 mg d'annonacine par boîte de 100 bonbons (Tableau 96).

5.4.3 Exposition humaine

Pour permettre une comparaison de l'exposition à l'annonacine des différents produits et dérivés du corossol, une extrapolation sur la consommation annuelle a été effectuée.

Si l'on considère la consommation de la pulpe d'un fruit par jour (petit ou grand) pour un adulte de 70 kg, l'ingestion d'annonacine est alors de l'ordre de 100 à 500 mg par an (Tableau 97).

Produit	Annonacine		
	Concentration de l'extrait	Dose/unité	Dose/an (mg/kg)
Pulpe de fruit Vietnamien	55,0 mg/kg	93 mg (1 gros fruit)	484,9
Pulpe des fruits Malgache	98,4 mg/kg	25,3 mg (1 petit fruit)	131,9

Tableau 97 : Exposition annuelle à l'annonacine par les fruits pour un adulte

La consommation annuelle des nectars de corossol pour un usager consommant un jus de 500 mL par jour est située entre 3 et 42 mg/kg (Tableau 98).

Produit	Annonacine		
	Concentration de l'extrait	Dose/unité	Dose/an (mg/kg)
Purée brésilienne	23,4 mg/kg	-	-
Nectar brésilien	16,2 mg/L	8,1 mg (500 mL)	42,2
Jus brésilien	16,9 mg/L	8,4 mg (500 mL)	43,8
Nectar guyanais	1,4 mg/L	0,7 mg (500 mL)	3,6
Jus Péruvien	5,5 mg/L	2,2 mg (500 mL)	11,4

Tableau 98 : Exposition annuelle à l'annonacine par les nectars pour un adulte

La posologie indiquée sur les boîtes de compléments alimentaires est de 3 à 4 gélules par jour pendant 3 mois soit environ 470 mg pour un traitement. En extrapolant, à une personne consommant ce produit toute l'année avec une interruption d'une semaine tous les trois mois, elle consommerait environ 25 mg/kg correspondant à une quantité équivalente à la consommation annuelle de nectar. Les gélules et la poudre étudiées dans cette thèse sont 10 fois plus concentrées en annonacine que lors des études menées par Pierre Champy (317,8 mg par kg de feuilles) [Champy P. 2004b]. Dans ces travaux dévolus à l'analyse de tisanes, il avait démontré qu'environ 1/6 de la quantité d'annonacine passait en phase aqueuse au cours d'infusion ou de la décoction. Par extrapolation, pour la poudre de feuille utilisée au cours de cette thèse, il a été considéré que pour une infusion d'un litre il faut 2 cuillères à café, soit environ 5 g de poudre dans 1 litre. La quantité totale d'annonacine pour 1 litre est 4,5 mg et donc pour une tasse environ 1 mg. Les personnes ingèrent 300 mg pour une cure de 3 mois avec trois tasses par jour.

Complément alimentaire	Annonacine		
	Concentration de l'extrait	Dose /gélule	Dose/traitement
Capsule Raintree	2,1 g/kg	1,3 mg	468 mg
Capsule Nutrivia	2,1 g/kg	1,0 mg	360 mg
Poudre Nutrivia	4,6 g/kg	-	300 mg*

Tableau 99 : Récapitulatif des doses totale et annuelle consommée pour un adulte pour les compléments alimentaires

*Par extrapolation des résultats présentées dans : [Champy P. 2004b]

La quantité d'annonacine dans les pots de confiture et dans une boîte de bonbons est non négligeable (Tableau 100) cependant la consommation est moins importante que pour les autres dérivés.

Produit	Annonacine	
	Concentration de l'extrait	Dose/unité
Bonbons	37,2 mg/kg	0,2 mg
Confiture	131,7 mg/kg	42,1 mg

Tableau 100 : Récapitulatif des doses totale par unités pour les produits préparés à base de corossol

L'annonacine a fait l'objet d'une quantification spécifique. Il semble important de connaître l'apport global en acétogénines (Tableau 101). Une estimation est donc proposée, sur la base des aires de pics de ces molécules, visualisées en U.V. Les acétogénines mises en évidence présentent un chromophore sensiblement identique. Leur coefficient d'absorption spécifique est cependant variable, selon certains auteurs [Yang H. 2009], qui rapportent cependant des données de quantification surprenantes. Les chiffres proposés ici sont donc à considérer avec précaution et ne sont donnés qu'à titre indicatif, dans l'attente d'une confirmation avec une méthode de quantification globale analytiquement validée.

Organes ou produit	Teneur
Pulpe	300 – 400 mg/lot
Péricarpe	≈ 600 mg/kg
Graines	8 – 13 g/kg
Feuilles	17 – 40 g/kg
Nectar	30 – 120 mg/L
Confiture	880 mg/kg
Bonbons	250 mg/kg

Tableau 101 : Teneur en ACGs totales pour les différents produits et fruits étudiés

Conclusion de la déréplication

L'étude semi-quantitative et qualitative des extraits a démontré que le profil chromatographique des différents produits issus d'*A. muricata*, d'origine géographiques différentes, préparés à des périodes différentes, semble être identique, démontrant une grande homogénéité. Cette conservation métabolique est remarquable, pour des arbres de répartition géographique très large (Amérique du Sud, Asie, Océan indien). Le profil des ACGs des graines est particulier et sensiblement différent de celui des autres organes, avec une abondance de l'annonacine légèrement moindre.

De plus, cette étude montre que *A. cherimolia* constitue aussi une source d'exposition alimentaire aux ACGs. Elle met en évidence une certaine proximité métabolique entre les deux espèces étudiées, déjà suggérée par la littérature phytochimique classique [Bermejo A. 2005, Cavé A. 1997] : les acétogénines en C35 sont majoritaires, appartiennent principalement au type A, et sont surtout tétra- ou penta-hydroxylées. L'annonacine est l'ACG majoritaire dans tous les cas, mais dans une proportion inférieure à celle précédemment rapportée. On remarque que chez *A. cherimolia*, les ACGs bis-THF sont beaucoup plus abondantes. Chez *A. muricata*, on observe une plus large oxydation d'hydroxyles libres en cétones, l'annonacinone étant particulièrement abondante.

En outre, l'étude quantitative de l'annonacine par CLHP-DAD a montré une différence notable entre les différentes parties du fruit et ces dérivés (quantités d'annonacine, et d'ACGs globales, ces derniers chiffres étant exprimés avec les réserves présentées précédemment) :

- Les graines et les feuilles (gélules et poudre) sont les parties de la plante contenant le plus d'annonacine (2 à 5 g.kg⁻¹) et d'ACGs totales.
- La pulpe contient une quantité non négligeable d'annonacine (50 à 100 mg.kg⁻¹ ; environ 350 à 700 mg.kg⁻¹ d'ACGs totales). Le péricarpe contient des quantités variables de la molécule.
- Les produits dérivés comme les nectars quant à eux contiennent des quantités moins importantes d'ACGs (5 à 25 mg.kg⁻¹ d'annonacine ; environ 40 à 200 mg.kg⁻¹ d'ACGs totales). La confiture est plus riche en ces composés, à masse « fraîche » égale.

Ces résultats concordent avec ceux précédemment obtenus au laboratoire [Champy P. 2005]. L'ensemble de ces données indique que les quantités d'annonacine et d'ACGs sont plus importantes pour les parties pas ou peu consommées. En effet, les graines ne sont qu'exceptionnellement utilisées p.o., traditionnellement : elles sont même mondialement considérées comme toxiques. Les médecines populaires tropicales ne retiennent, de manière très convergente, que l'emploi topique comme antiparasitaire et surtout comme pédiculicide. Les feuilles, quant à elles, sont traditionnellement employées sous forme d'infusions, avec des masses de drogue végétale faibles. Par ce mode de préparation, seulement 1/6 de l'annonacine est extraite [Champy P. 2004b]. La consommation de gélules de poudre, sous forme de compléments alimentaires serait donc une source potentielle d'intoxication chronique, supérieure à la consommation thérapeutique traditionnelle. Nous confirmons ici, avec des lots de provenances variées, que c'est l'alimentation qui est la source d'exposition principale.

Enfin, si l'homogénéité métabolique chez *A. muricata* semble importante, la corrélation des profils et de la toxicité potentielle des extraits devra être vérifiée et confrontée aux relations structure activité déjà connues pour des acétogénines isolées. Ce type d'études sera particulièrement pertinent en comparaison aux autres espèces incriminées dans la maladie, pour lesquelles la présence d'acétogénines a été montrée (*A. squamosa*) ou semble probable. D'un point de vue quantitatif, on observe des différences notables, potentiellement liées à des paramètres inconnus ici (chimiotype ? conditions culturelles ? période de récolte ? pression des prédateurs ?), qui devront être identifiés.

Introduction à la pharmacocinétique : étude ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion)

Comme cela a été vu dans le chapitre 2, il n'existe pas d'étude sur la biodisponibilité et la pharmacocinétique des acétogénines. Pour permettre d'infirmer ou d'affirmer l'hypothèse du lien de ces molécules avec l'apparition des syndromes parkinsoniens guadeloupéens, nous avons initié ces études pour l'acétogénine majoritaire d'*A. muricata* : l'annonacine.

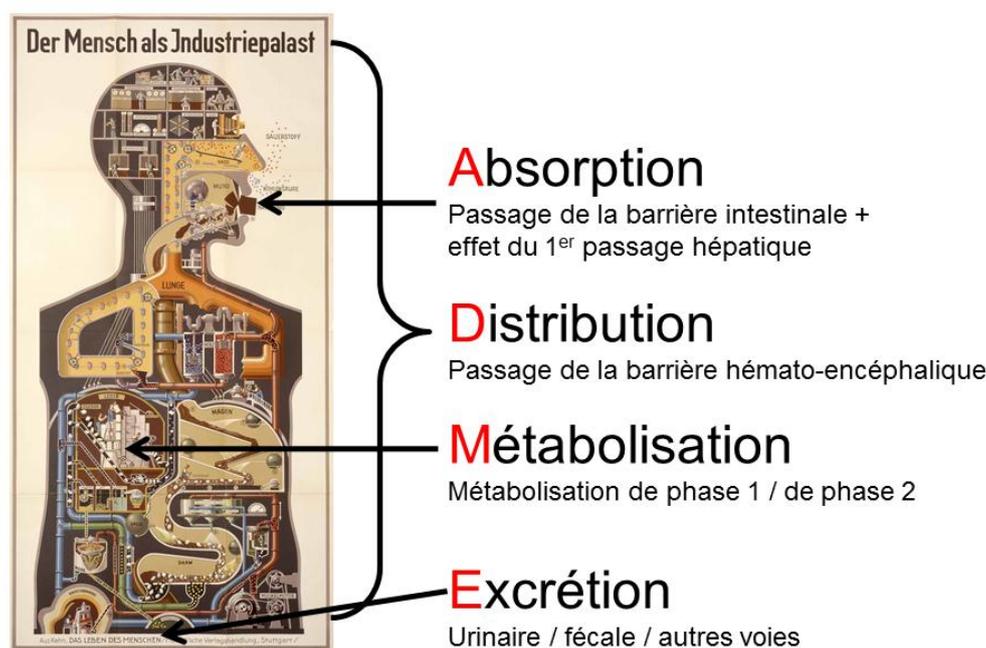


Figure 129 : Schéma du processus d'ADME

L'ADME désigne 4 étapes définissant le destin pharmacocinétique des xénobiotiques. Trois étapes de l'ADME ont fait l'objet de travaux au cours de cette thèse : la Métabolisation a constitué la thématique essentielle du volet biologique de ce travail (Figure 129). Plus précisément nous nous sommes intéressés à l'étude :

- du passage de l'annonacine à travers la barrière intestinale ;
- de son passage à travers la barrière hémato-encéphalique, dans des modèles *in vitro* ;
- de la métabolisation de phase 1 de la molécule.

Dans cette partie, nous verrons quelques généralités sur les caractéristiques des barrières étudiées, puis nos travaux personnels spécifiques à chaque barrière (chapitre 5). Enfin, le chapitre 6 portera sur la métabolisation de phase 1 de l'annonacine et sur la détermination structurale des métabolites identifiés.

Chapitre 5 : Approches de l'absorption et de la distribution

1. Absorption

1.1 Introduction

L'annonacine et les acétogénines exerceraient leur neurotoxicité après absorption par voie orale. La première problématique est l'absorption de ces molécules au niveau de la barrière intestinale. Le processus d'absorption comprend une phase de pénétration dans et à travers les membranes situées entre le milieu extérieur et les tissus interstitiels, par le biais de mécanismes potentiellement variés puis une phase d'absorption du milieu extravasculaire jusqu'au sang.

Au vu des expériences antérieures et de la structure de l'annonacine, il semblerait que l'absorption de cette molécule au niveau de la barrière intestinale soit difficile (voir chapitre 2).

Nous rappellerons d'abord la physiologie du système intestinal, les différents mécanismes de passage de molécules à travers la muqueuse intestinale et plus particulièrement la membrane entérocytaire, ainsi que la méthode utilisée au cours de cette thèse permettant de quantifier le passage intestinal des xénobiotiques.

1.2 Passage de membranes

Le premier obstacle à l'absorption des molécules ingérées est la muqueuse intestinale. Dans l'organisme humain et au niveau gastro-intestinal en particulier, les différentes membranes ont des propriétés hétérogènes. Cependant, le phénomène d'absorption se conforme à un certain nombre de règles générales qui prennent en compte la nature chimique des composés et l'organisation générale des membranes [Houin G. 1990].

1.2.1 Caractéristiques des membranes biologiques

Une membrane biologique est schématisable comme une double couche lipidique constituée principalement de phospholipides dans laquelle sont insérés des protéines et d'autres lipides. Les pôles hydrophobes des couches lipidiques se font face au centre, alors que les parties hydrophiles sont situées à l'extérieur, en contact avec les milieux intra ou extracellulaires. De nombreux mécanismes permettent le passage des nutriments et des xénobiotiques. Nous les détaillerons plus spécifiquement pour les barrières : intestinale et hémato-encéphalique dans leurs chapitres respectifs.

1.2.2 Caractéristiques physicochimiques des molécules pouvant traverser les membranes de manière passive

1.2.2.1 pKa

Pour prévoir le passage des molécules, on admet que seule la fraction non ionisée (et donc liposoluble) est capable de passer les membranes biologiques contrairement à la fraction ionisée.

Cette hypothèse permet une prédiction du rapport de ces deux formes en fonction du pH et donc de prévoir les possibilités d'absorption.

1.2.2.2 Coefficient de partage (Log P)

L'importance du caractère lipophile dans le passage passif des molécules au travers des membranes est primordiale. Le coefficient de partage d'une substance constitue un reflet de la liposolubilité de sa forme non ionisée. Il s'agit du rapport des concentrations de la substance à l'équilibre dans deux solvants non miscibles. On détermine ce paramètre, nommé, log P, par une relation octanol / eau. Plus le log P sera grand, plus la substance sera liposoluble. Il est important de connaître le pH de la phase aqueuse lors de la détermination de la liposolubilité. Le Log D est une mesure plus raffinée du log P tenant compte de la modification de celui-ci en fonction du pH de la phase aqueuse et du pKa du composé étudié. Le Log de P de l'annonacine sera donné et étudié dans ce chapitre à la partie 3.1.2.

1.3 Milieu intestinal

1.3.1 Barrière intestinale

L'intestin grêle s'étend du pylore au colon et se divise en trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Il joue le rôle majeur de la fonction d'absorption grâce à sa structure comprenant des valvules conniventes, des villosités intestinales et des microvillosités [Ménez C. 2006]. Lors de la digestion, le chyme gastrique est secrété dans l'intestin où il rencontre les sucs intestinaux (suc pancréatique de pH = 7,6 - 8,2 et bile de pH = 7,5) qui provoqueront un effet tampon dû à leur pH alcalin.

1.3.1.1 Rôle du mucus dans l'absorption des médicaments

La première barrière au niveau intestinal est une couche de mucus qui constitue un obstacle physique entre le tissu sous-jacent et les micro-organismes ou les xéniobiotiques. Ce gel assure la protection de la muqueuse contre les ions H⁺ par création d'un gradient de pH combiné aux sécrétions de bicarbonates excrétées par les cellules caliciformes. Il facilite le transit intestinal en augmentant la lubrification des parois. Ses propriétés physicochimiques vont intervenir sur l'absorption des xéniobiotiques.

1.3.1.2 Structure de la muqueuse intestinale

La paroi intestinale est constituée de plusieurs couches concentriques de la lumière jusqu'à la séreuse : la muqueuse, la *muscularis mucosae* (musculaire muqueuse), la sous-muqueuse composée de tissu conjonctif lâche, la musculeuse et la séreuse représentée par le péritoine.

Tout au long de l'intestin la muqueuse repose sur la couche lymphoïde et est formée de deux régions qui sont les villosités constituées d'un épithélium de revêtement reposant sur un axe de tissu conjonctif (le chorion) et les cryptes ou glandes de Lieberkühn (Figure 130).

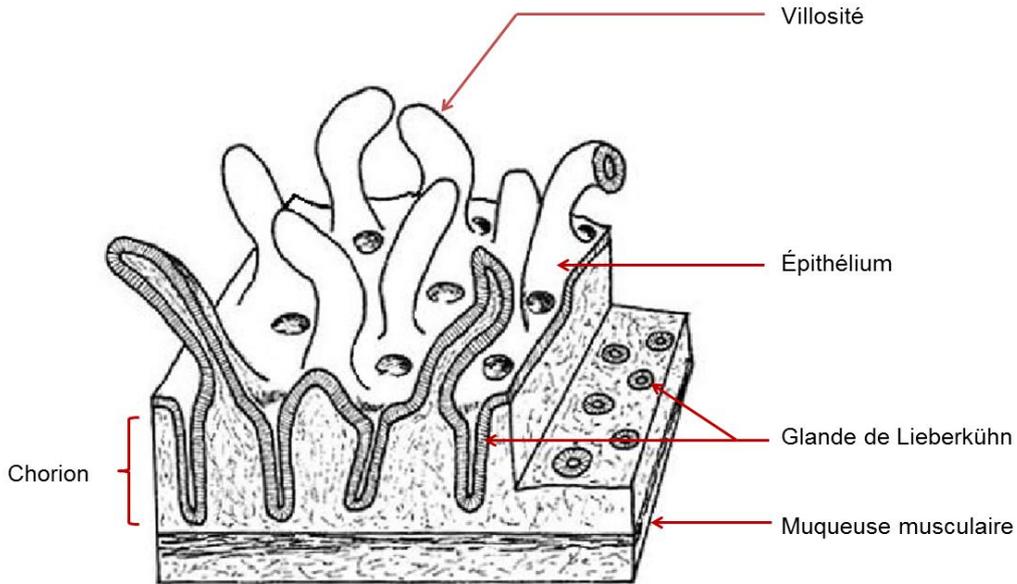


Figure 130 : Muqueuse intestinale

Lors de nos études, nous nous sommes donc intéressés au passage de l'annonacine à travers cette barrière.

L'épithélium est prismatique simple et comprend cinq types cellulaires : des entérocytes, des cellules caliciformes, des cellules neuroendocrines, des cellules de Paneth et principalement au niveau de l'iléon, appartenant au système immunologique, des cellules « M » (Figure 131).

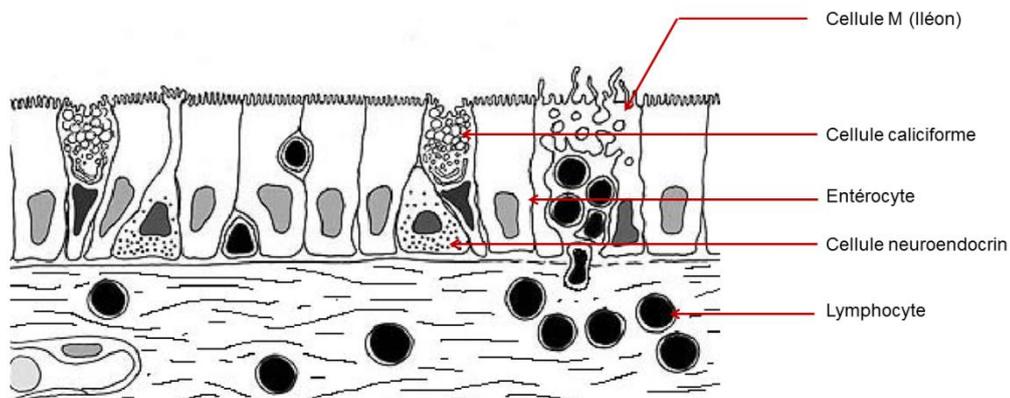


Figure 131 : Epithélium intestinal

Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses et sont responsables de la fonction d'absorption intestinale. Elles proviennent des cellules indifférenciées, situées dans les cryptes de Lieberkühn, et se différencient lors de leur migration vers le sommet des villosités (Figure 132). Cette différenciation est surtout caractérisée par la polarisation de l'entérocyte. En effet, la membrane apicale forme alors des microvillosités qui constituent la bordure en brosse. Cette structure augmente considérablement la surface membranaire du pôle apical de la cellule et joue donc un rôle notable dans les phénomènes d'absorption.

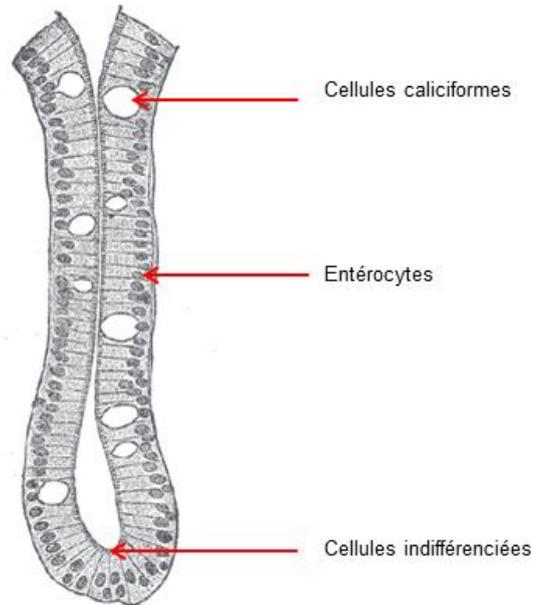


Figure 132 : Glande de Lieberkühn

De plus, cette dernière est soutenue par une armature centrale de microfilaments d'actine et de myosine permettant le mouvement des microvillosités et ainsi l'accroissement du contact cellules-alimentation et donc de l'absorption. La bordure en brosse est revêtue d'un manteau fibrillaire riche en glycoprotéines, appelé le glycocalyx. Il contient de nombreuses protéines à fonction enzymatique telles que des hydrolases et des peptidases. Les entérocytes sont séparés les uns des autres par des espaces intercellulaires qui sont peu perméables du côté apical en raison de la présence de jonctions serrées.

Les cellules caliciformes ou cellules à mucus à pôles apicaux ouverts assurent la lubrification de l'épithélium par la sécrétion du mucus.

Le tissu conjonctif situé sous l'épithélium de revêtement constitue le chorion. Il contient une population hétérogène de cellules participant essentiellement à la défense immunitaire de l'organisme : les lymphocytes T et B et les mastocytes isolés ou organisés en amas (plaque de Peyer), situés au voisinage des glandes de Lieberkühn. Celles-ci sont des glandes invaginées en doigt de gant dans la partie profonde du chorion ; elles s'ouvrent dans la lumière intestinale entre les villosités. Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes et sécrètent des substances exocrines telles que du lysozyme, de la phospholipase A2 et plusieurs peptides de la famille des défensines tel que les cryptidines. Ces cellules contribuent donc au rôle de défense de la barrière de la muqueuse intestinale.

1.3.1.3 Mécanismes d'absorption intestinale

Les différents mécanismes d'absorption des molécules par la barrière intestinale sont divisés en deux groupes : la diffusion par les voies transcellulaires et le passage par voie paracellulaire [De Boer A. G. 1994].

1.3.1.3.1 Voie paracellulaire

La voie paracellulaire correspond au passage des molécules dans les espaces intercellulaires en passant par les jonctions serrées. Ce transfert d'une molécule dépend essentiellement de ses caractéristiques physico-chimiques : poids moléculaire, coefficient de partage, pKa. C'est un phénomène de diffusion passive simple qui ne nécessite pas d'apport en énergie.

1.3.1.3.2 Voies transcellulaires

Les mécanismes de passage transcellulaire de l'entérocyte sont de quatre types : la diffusion passive, la diffusion facilitée, les transports actifs et l'endocytose (Figure 133).

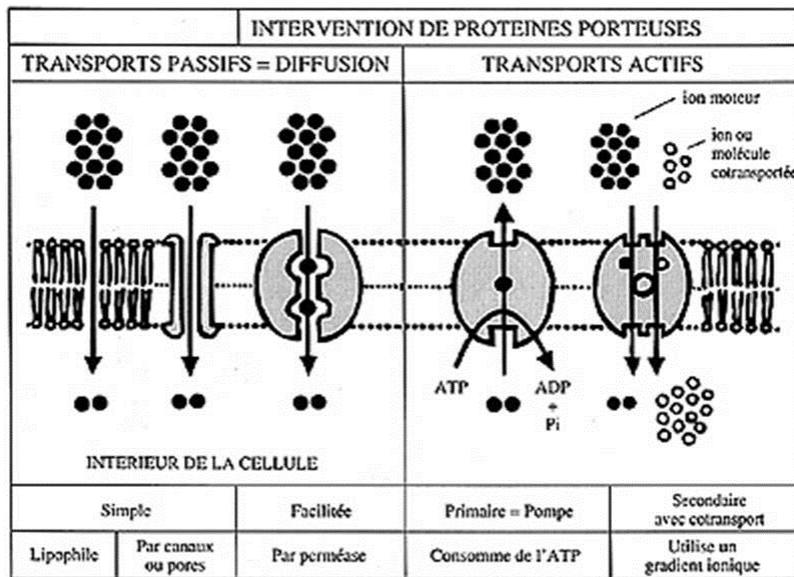


Figure 133 : Différents transports transcellulaires

Diffusion passive

Pour diffuser passivement à travers la membrane entérocytaire, les molécules doivent être liposolubles et non ionisées. La vitesse de diffusion de ces dernières dépendra essentiellement des caractéristiques physicochimiques et de la concentration de ces molécules aux pôles cellulaires apical et basal. Ce mode de transport ne fait pas intervenir de protéines membranaires et est limité aux molécules lipophiles (ex : hormones stéroïdiennes) et, dans certaines limites à l'eau.

La diffusion par un transporteur augmente très largement la vitesse et la sélectivité de transport par rapport à la diffusion simple. Certaines protéines (ex : aquaporines) agissent comme des pores permettant la diffusion passive des ions (canaux ioniques) ou de molécules de petite taille (H₂O, nucléotides, acides aminés,...). Ce transport ne nécessite pas d'énergie car l'analyte suit un gradient de concentration ou un gradient ionique. Il a une capacité de transport d'environ 10⁷ à 10⁸ molécule.sec⁻¹.

Diffusion facilitée

D'autres protéines agissent comme des transporteurs ou perméases. La fixation de leur ligand entraîne un changement de leur conformation, assurant le transfert de ce ligand. Ce mouvement ne nécessite pas d'énergie et, est utilisé par des molécules polaires.

Transports actifs

Ces transports sont réalisés contre le gradient électrique ou chimique et consomment de l'énergie : on parle alors de transport actif. Il permet le maintien de concentrations de solutés différentes de part et d'autre de la membrane ; le transport de solutés contre leur gradient chimique (concentration) ou électrique (différence de potentiel de membrane).

Il existe deux types de transport actif :

- le transport primaire par des pompes membranaires ATP-dépendantes hydrolysant l'ATP et qualifiées d'ATPases (ou ABC pour *ATP Binding Cassette*). Elles sont saturables et ont une capacité de transport actif d'environ 10^2 à 10^3 molécule.sec⁻¹. Chez l'homme, 48 transporteurs ABC ont été décrits dont plusieurs ont un rôle majeur dans l'influx et l'efflux de médicaments (comme par exemple : MRP : *multidrug resistance protein* ; BCRP : *breast cancer resistance protein* et les glycoprotéines P : P-gp) (Figure 134) [Giacomini K.M. 2010].

- le transport secondaire permettant le mouvement d'une substance contre son gradient électrochimique grâce à un co-transport (symport ou antiport) avec un autre composé dont le gradient est maintenu par ailleurs de façon active. Ce transport actif, en effet, nécessite une pompe appelées SLC (*solute carrier*). Ces transporteurs ont une capacité de transport 10^2 à 10^4 molécules.sec⁻¹. La famille SLC est composée de 43 sous-familles de gènes soit un total d'environ 300 transporteurs. Les transporteurs SLC les plus typiques des transports des médicaments au niveau intestinal sont de la famille des transporteurs OATP (*organic anion transporting polypeptide*), PEPT (*di/tripeptide transporter*), ASBT (*ileal apical sodium/bile acide co-transporter*), MCT (*monocarboxylic acid transporter*), OCT (*organic cation transporter*) et OST (*organic solute transporter*) de manière non exhaustive (Figure 136) [Giacomini K.M. 2010, Sai Y.2004].

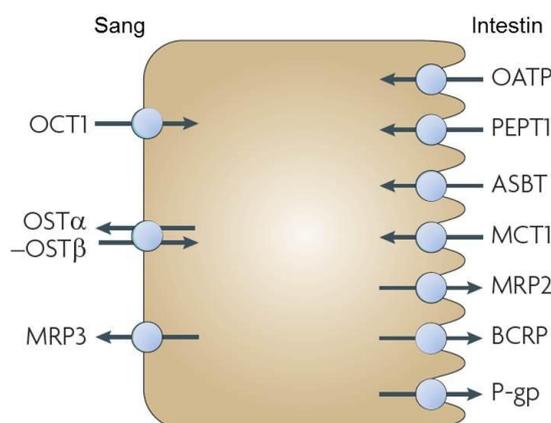


Figure 134 : Protéines humaines impliquées dans le transports des médicaments et des substances endogènes au niveau intestinal

Endocytose

L'endocytose permet à de grosses particules de structures micellaires ou à des macromolécules d'entrer dans la cellule. Elle procède par inclusion dans une vésicule formée par invagination de la membrane plasmique.

Un cas particulier de ce mécanisme est le transport des lipides. En effet, malgré leur forte lipophilie, les lipides ne peuvent pas passer par diffusion simple. Ils vont être endocytés sous forme micellaire, au niveau de l'intestin grêle par les entérocytes, avec d'autres substances liposolubles (différentes vitamines notamment). Les micelles (3 à 6 nm) sont formées grâce à l'action de sels biliaires, des enzymes digestives et du brassage mécanique. Celles-ci ainsi structurées dans le duodénum sont endocytées essentiellement dans le jéjunum. Les sels biliaires sont exclus dans ce processus et sont libérés dans la lumière intestinale où ils peuvent participer à la formation de nouvelles micelles.

1.3.2 Modèle d'étude : cellules Caco-2

Outre des modèles *in vivo*, des approches *ex vivo* sont employées pour la mesure de l'absorption intestinale des xénobiotiques. De nombreux modèles de monocouche cellulaire mimant l'épithélium intestinal *in vivo* chez l'humain ont été développés et jouissent d'une grande popularité [Artursson P. 2001]. Le modèle de cellules Caco-2, provenant de cellules d'adénocarcinome de colon humain, est le plus connu et le plus utilisé (Photo 30).

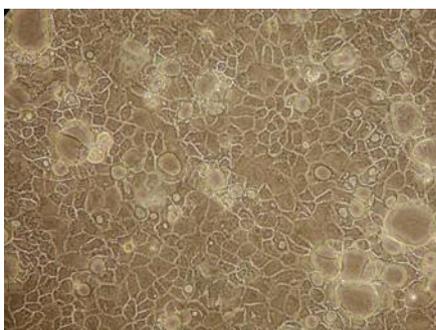


Photo 30: Cellules Caco-2

De plus, les cellules Caco-2 se développent rapidement et subissent une différenciation spontanée formant des monocouches confluentes présentant les caractéristiques de plusieurs types cellulaires épithéliaux. Les cellules possédant un phénotype d'entérocytes en culture sont polarisées avec des jonctions serrées bien établies. Ces cellules ont les capacités de transport présentées ci-dessus [Han Van de Walerbeend H. 2003, Balimane P. V. 2000, Artursson P. 2001]. En effet, l'une des principales caractéristiques de ce modèle est qu'il exprime des transporteurs d'efflux comme les Pg-P. Cependant, l'expression de ces transporteurs est variable en fonction des conditions et du temps de culture [Behrens I. 2003, Bravo F.A. 2004]. De bonnes corrélations ont été observées entre la perméabilité à travers la monocouche Caco-2 et l'absorption de molécules variées *in vivo* désignant ce modèle comme potentiellement valable dans notre problématique.

2. Approche de la distribution

Lorsque les molécules passent la barrière intestinale, elles parviennent au niveau de la circulation sanguine, où elles vont connaître un passage au niveau hépatique et seront diffusées hors du système vasculaire pour être enfin distribuées dans les différents organes et compartiments liquidiens de l'organisme.

L'annonacine est neurotoxique chez le rat et la souris après administration i.v. ou s.c. suggérant une traversée possible de la BHE [Champy P. 2004]. De plus, la molécule a été retrouvée dans le parenchyme cérébral de rat après 4 semaines d'intoxication par voie i.v.

Conformément à notre problématique, l'étude du passage de l'annonacine dans un modèle de barrière hémato-encéphalique humaine a été entreprise.

2.1 Barrière hémato-encéphalique

La découverte de cette barrière a été initiée à la fin du 19^e siècle par Paul Ehrlich, mais c'est Lewandowski qui a le premier utilisé le terme "barrière hémato-encéphalique" [Lewandowski M. 1900]. Les deux fonctions principales de la BHE sont la protection du cerveau vis-à-vis de composés toxiques provenant de la circulation générale et le maintien de l'homéostasie du système nerveux central. L'organisation et la régulation de la perméabilité de l'endothélium de cette barrière ont été décrites dans une revue de N. Weiss dont un résumé est proposé ci-dessous [Weiss N. 2009].

2.1.1 Organisation

La BHE est constituée d'un complexe neurovasculaire rendu étanche par des jonctions serrées et adhérentes.

2.1.1.1 Complexe neurovasculaire

Les capillaires cérébraux sont les vaisseaux les plus petits de la circulation humaine (3-7 μm de diamètre avec une longueur totale de 600-650 km et une superficie de 20 m² [Pardridge 2003]. Ces capillaires sont séparés des autres types cellulaires constituant la BHE (astrocytes, péricytes, neurones) par la lame basale (Figure 135). Ce complexe neurovasculaire participe à la régulation de la circulation cérébrale en interagissant avec les cellules musculaires lisses [Abbott N. J. 2006].

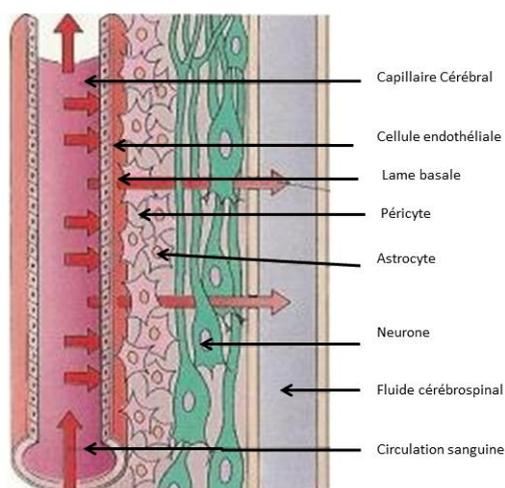


Figure 135 : Complexe neurovasculaire

Les cellules endothéliales cérébrales se distinguent des cellules endothéliales périphériques par :

- un grand nombre de mitochondries associées à une activité métabolique importante ;
- un manque de fenestrations corrélé à la présence de jonctions serrées avec une très faible diffusion paracellulaire des composés hydrophiles ;
- une activité de transcytose non spécifique minimale et ;
- l'expression polarisée de récepteurs et de transporteurs membranaires, responsables du transport actif des nutriments du sang vers le cerveau ou de l'efflux de substances toxiques du cerveau vers le compartiment vasculaire.

Les cellules endothéliales sont entourées par la lame basale. Celle-ci est une matrice extracellulaire constituée de trois couches accolées, composées de collagène, de glycoprotéines et de protéoglycanes. L'une est formée majoritairement de laminines-4 et -5 produites par les cellules endothéliales, l'autre de laminines-1 et -2 produites par les astrocytes, et la troisième, située entre les deux premières, de collagène IV produit par les astrocytes et les cellules endothéliales. La lame basale a une importance non négligeable dans l'intégrité de la BHE.

Les péricytes sont entourés de la lame basale et sont impliqués dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux, la vaso-régulation et le maintien d'une perméabilité faible de la BHE. Les prolongements astrocytaires forment un manchon entourant les microvaisseaux et ont pour rôle le maintien de l'intégrité de celle-ci. Les projections neuronales sont étroitement en contact avec les astrocytes périvasculaires, les péricytes et les cellules endothéliales. Elles permettent, par l'intermédiaire de neuromédiateurs, de réguler le débit sanguin local.

2.1.1.2 Jonctions serrées

Les structures clés de la barrière hémato-encéphalique sont les jonctions serrées. Ce sont des jonctions intercellulaires de type étanche qui sont responsables de la très faible perméabilité de la BHE vis-à-vis des protéines ou des nutriments plasmatiques. Elles consistent en trois groupes de protéines membranaires : l'occludine, les claudines et les *junctional associated molecules* (JAM) qui sont liées à différentes protéines cytoplasmiques : les protéines accessoires (ex : ZO-1, ZO-2, ZO-3).

2.1.2 Transport

Les mécanismes de transport de la BHE sont les mêmes que ceux de la barrière intestinale. Cependant, dans le cas de la BHE le passage des molécules est largement dépendant de transporteurs ou de récepteurs spécifiques.

Les transporteurs responsables de l'influx et de l'efflux des nutriments et des xénobiotiques au niveau de cette barrière, comme pour la barrière intestinale, appartiennent à deux super familles : les transporteurs *solute carrier* (SLC) et les transporteurs *ATP binding cassette* (ABC). Ces derniers ont la particularité d'être impliqués dans l'extrusion des molécules potentiellement toxiques en dehors du cerveau ou du LCR et sont l'une des caractéristiques de la BHE (Figure 136) [Giacomini K.M. 2010].

Des récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales cérébrales peuvent être internalisés par la voie des endosomes où ils délivrent leur substrat. C'est le cas de l'insuline traversant la BHE après liaison à son récepteur membranaire (INSR) ou le transport de lipoprotéines pour répondre aux besoins en lipides des cellules cérébrales. Ce transport est réalisé au moyen de la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (*LDL*) notamment le *LDL receptor-related proteins* LRP-1 ou LRP-2.

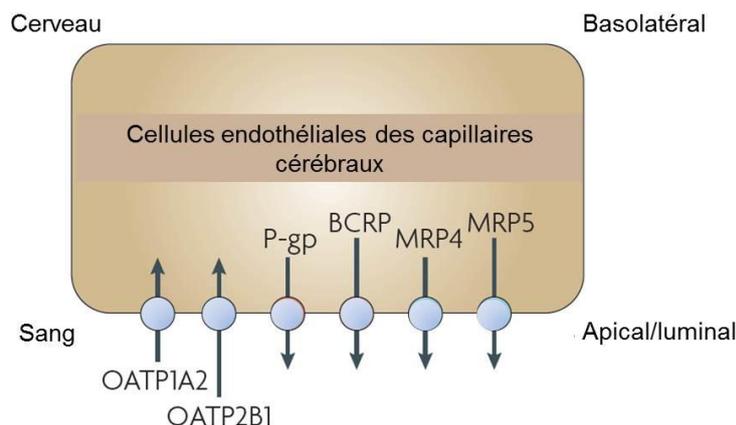


Figure 136 : Protéines humaines impliquées dans le transports des médicaments et des substances endogènes au niveau de la BHE

2.2 Modèle d'étude : cellules hCMEC/D3

Les modèles de barrière hématoencéphalique sont de plus en plus développés. Les plus couramment employés sont des co-cultures de cellules endothéliales et d'astrocytes, issus ou non de la même espèce (le Rat, par exemple). De manipulation complexe, ces modèles présentent des avantages et des inconvénients qui ne seront pas présentés ici. La première lignée stable de barrière hémato-encéphalique de cerveau humain bien caractérisée est la lignée cellulaire endothéliale hCMEC/D3, qui a été brevetée en 2006 (Photo 31). Ces cellules ont été isolées d'un tissu cérébral sain, après excision chirurgicale, chez une femme adulte épileptique [Weksler B.B. 2005].

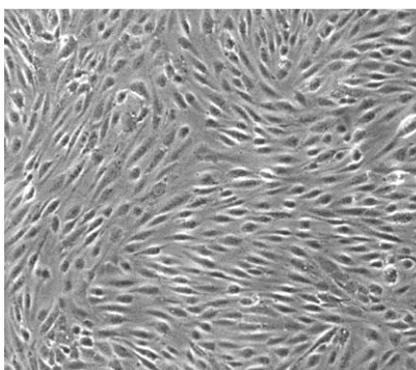


Photo 31 : Cellules hCMEC/D3

Outre les aspects techniques, les avantages de la lignée cellulaire hCMEC/D3, résident dans le fait qu'il s'agit d'une lignée cellulaire humaine qui imite la perméabilité de l'endothélium cérébral pour un large éventail de variétés de composés, à l'exception des petites molécules hydrophiles (< 300 Da) et des ions [Cecchelli R. 2007].

La perméabilité pour des médicaments à action centrale, aux liposomes et aux nanoparticules lipidiques a également été testée sur ce modèle. Il a été démontré que la lignée cellulaire conserve de nombreuses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules endothéliales du cerveau, et exprime les pompes d'efflux représentatives de la BHE et plusieurs transporteurs de la famille des transporteurs SLC. En outre, ce modèle à monocouche montre des propriétés de passage de barrière

paracellulaire. Cependant, l'exploitation commerciale de cette lignée cellulaire pour le *screening* à haut débit des substances actives n'est pas généralisée [Deli M.A. 2005 ; Cecchelli R. 2007 ; Toth A. 2011].

3. Travaux personnels

3.1 Mise au point physicochimique

Pour permettre l'étude de l'annonacine dans les modèles cités, des travaux préliminaires ont été nécessaires. En début de thèse, nous avons donc évalué différents protocoles permettant d'optimiser les futurs tests biologiques.

3.1.1 Solvant de solubilisation

Dans la littérature, pour les études biologiques, 2 solvants (MeOH et DMSO) sont surtout utilisés. Lors des premiers tests, le DMSO semblait mieux convenir que le MeOH. En effet, lors de la mise en phase aqueuse d'une solution concentrée en annonacine, la solution méthanolique se troublait et les rendements de récupération du produit par extraction L/L étaient moins bons (90 % MeOH vs 100 % DMSO pour une solution initiale à $1,6 \cdot 10^{-2}$ M). L'annonacine a donc été solubilisée dans du DMSO pour les études d'approche de l'absorption et de la distribution, même si l'emploi du MeOH ne semblait cependant pas réhibitoire.

3.1.2 Analyse de différentes méthodes de contre-extraction

Pour permettre une récupération optimale de l'annonacine lors des tests biologiques, l'étude des conditions de contre-extraction a été effectuée, avec :

- différentes concentrations de solution ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M ; $3,3 \cdot 10^{-6}$ M ; $3,3 \cdot 10^{-7}$ M) ;
- différents volumes ($V_{aq}/V_{org} = 2/1$; $1/1$; $1/2$ et $1/3$) ;
- différents nombres de contre-extraction (1, 2, 3) ;
- différents solvants de contre-extraction (CH_2Cl_2 et AcOEt).

Le CH_2Cl_2 est un bon solvant d'extraction pour l'annonacine, cependant, en raison de sa densité supérieure à 1 et de son caractère volatil, nous avons préféré l'AcOEt.

Avec l'AcOEt, une contre-extraction par un volume 1 / 1 permet de récupérer la totalité de l'annonacine mise en solution. Une seconde contre-extraction n'apparaissant pas excessivement contraignante, elle a été systématiquement effectuée, par mesure de sécurité, afin de pallier les variations potentiellement induites par les différentes matrices biologiques employées. Au cours des manipulations décrites plus loin, aucune différence significative dans le rendement d'extraction de l'annonacine n'a été observée, pour des modèles de natures différentes (microsomes, cellules).

Enfin, lors de ces études, le volume de 200 μ l de MeOH permettant la mise en solution de l'annonacine à partir du résidu sec obtenu après extraction L/L a été validé : un rendement de 100 % est obtenu pour les différentes quantités ($1,6 \cdot 10^{-2}$ mol, $3,3 \cdot 10^{-3}$ mol, $3,3 \cdot 10^{-4}$ mol).

3.1.3 Solution mère d'annonacine

Les solutions d'annonacine utilisées lors des expériences sont à 20, 10, 5 et 1 μM et elles sont préparées à partir d'une solution mère de 10 mM d'annonacine dissoute dans du DMSO, et d'un volume qsp 20 μM , 10 μM , 5 μM et 1 μM de tampon de perméabilité (HEPES/Tris) avec une concentration finale de DMSO à 0,1 %.

L'annonacine étant une molécule apolaire, l'ajout excessif de solvant polaire pourrait rendre les solutions initiales insolubles. La turbidimétrie des solutions a été analysée par un turbiscan classic[®] MA 2000. Le principe de cette méthode consiste à passer un faisceau lumineux le long du tube contenant la solution. Pendant une durée déterminée et d'en mesurer la diffraction lumineuse. Les solutions à 20 μM , 10 μM , 5 μM et 1 μM n'ont montré aucun changement de diffraction lumineuse par rapport au témoin sur une durée de 45 min. Les solutions peuvent donc être validées comme étant homogènes pour la durée des analyses.

3.1.4 Stabilité à pH alcalin

L'annonacine comporte une γ -méthyl- γ -lactone- α,β -insaturée. Des études de stabilité des acétogénines en milieu alcalin méthanolique ont montré l'ouverture de la lactone et la formation d'iso-acétogénines [Duret P. 1997].

Dans l'optique d'une étude d'absorption de l'annonacine au niveau intestinal, la stabilité de l'annonacine a été vérifiée en milieu alcalin aqueux. Elle a été mise à incuber dans 1 ml d'une solution de PBS à différents pH, physiologiques ou non (pH 7 à pH 14), pendant 24 h à 37 °C puis les solutions sont analysées par CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap[®].

L'examen des chromatogrammes UV montre que l'aire du pic d'annonacine diminue avec l'augmentation du pH : à pH 14 environ 25 % de l'annonacine est dégradée. Cette formation des produits de dégradation commence à pH 9, avec des pics observables en UV de $t_r = 21$ min (le plus abondant) et de $t_r = 18,7$ min.

La figure (A), à pH 7, montre que l'annonacine est en très grande majorité sur le chromatogramme ionique total. À $t_r = 18,7$ min, une impureté est visible à la masse m/z 637,46-637,47 ne provenant pas de l'échantillon d'annonacine et n'étant pas une acétogénine (Figure 137).

Le chromatogramme (B), à pH 14, montre deux nouveaux pics visibles à $t_r = 18,1$; $t_r = 20,9$ min (Figure 137).

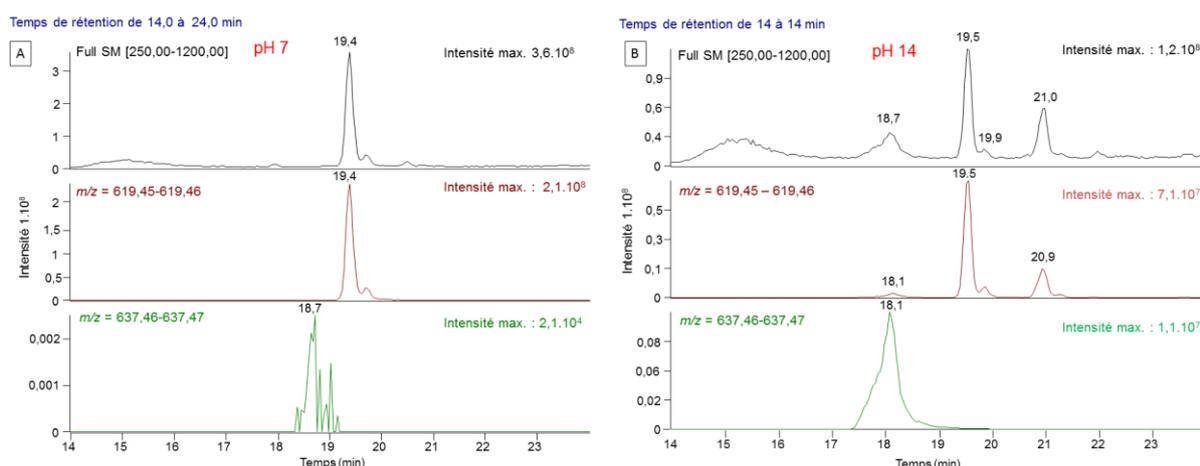


Figure 137 : Stabilité de l'annonacine à pH alcalin (A) pH 7 et (B) pH 14

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

Le pic à $t_r = 18,1$ min de formule brute $C_{35}H_{66}O_8$ ($[M+Na]^+$ m/z 637,4641 ; $\Delta ppm = -1,4$) correspondrait à l'annonacine ayant subi une hydrolyse alcaline. L'ouverture de la lactone engendre un produit portant un acide carboxylique en C-1 et d'un alcool secondaire en C-34 (Figure 138).

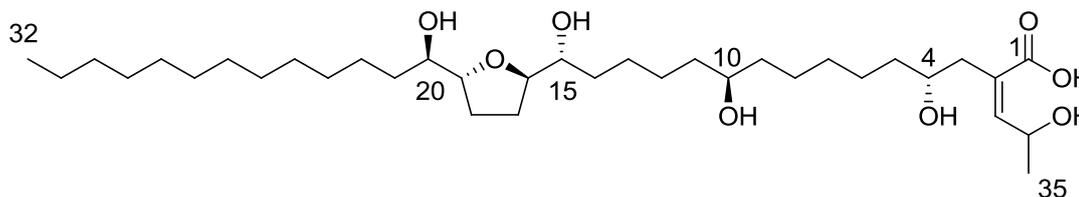


Figure 138 : Molécule $t_r = 18,1$ min

Le spectre de masse du pic le plus apolaire ($t_r = 21$ min) montre la même formule brute que l'annonacine $C_{35}H_{64}O_7$ ($[M+Na]^+$ m/z 619,4536 ; $\Delta ppm = -1,4$). La fragmentation SM/SM de l'ion $[M+Na]^+$ et la co-élution avec un étalon d'*iso*-annonacine permet d'identifier ce composé comme l'*iso*-annonacine, produit de translactonisation (Figure 139).

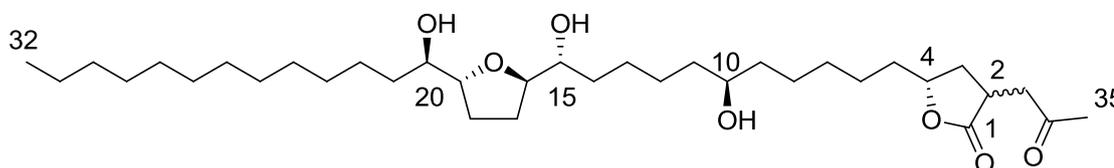


Figure 139 : isoannonacine

3.2 Étude prédictive de la capacité de l'annonacine à traverser les membranes

La règle de Lipinski est une méthode *in silico*, très utilisée en milieu industriel, permettant de prévoir le passage des molécules à travers une barrière physiologique en fonction de leurs propriétés physicochimiques.

Avant de débiter les études de passage de barrière *in vitro*, nous avons comparé les propriétés physicochimiques de l'annonacine avec les données de la règle des 5 de Lipinski et de celles retrouvées dans la littérature permettant respectivement de prévoir le passage des molécules au sein de la BHE [Lipinski C.A.1997, Pajouhesh H. 2005] (Tableau 102).

Propriétés physicochimiques	Annonacine	Barrière intestinale	BHE
Poids moléculaire	596 g.mol ⁻¹	< 500 (opt. ≈ 350)	≤ 450 g.mol ⁻¹
log P	6,36	-2 < logP < 5 (opt. ≈ 3)	≤ 5
Donneur de liaisons H	4	< 5 (opt. ≈ 2)	≤ 3
Accepteur de liaisons H	7*	< 10 (opt. ≈ 5)	≤ 7
Liaisons rotatives	26	≤ 5	≤ 8
pKa	-	-	7,5-10,5

Aire polaire de surface (PSA)	107 Å°	-	≤ 60-70 Å
-------------------------------	--------	---	-----------

Tableau 102: Tableau prédictif du passage des barrières physiologiques pour l'annonacine

* [Höllerhage M. 2009]

On peut constater que l'annonacine ne possède quasiment aucune des propriétés physicochimiques favorables à sa diffusion à travers la BHE et la barrière intestinale. Néanmoins, ce type de prédiction est limité à la diffusion passive de la molécule et ne prend pas en compte d'éventuelles interactions avec la barrière, tel le transport actif ou l'endocytose.

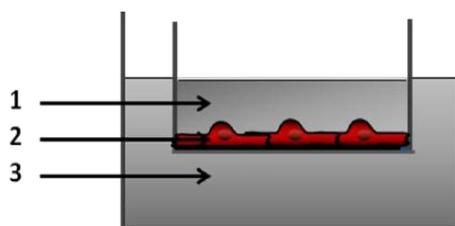
Des arguments expérimentaux ayant suggéré pour l'annonacine la traversée possible des barrières intestinales et de la BHE (Chapitre 2), des études de passage de barrière ont paru nécessaires pour les quantifier et en comprendre les mécanismes. Au vu de la faible quantité d'annonacine isolée pour la totalité de cette thèse (421 mg), les études *in vitro* semblaient plus judicieuses.

3.3 Passage des barrières

3.3.1 Principe de l'expérience

Le passage de molécules à travers une barrière physiologique *in vitro* est déterminé par des études cinétiques de transfert d'un puits à un autre en un temps défini, à travers des inserts sur lesquels se trouvent des cellules en culture (Figure 140).

Avant ces manipulations, les cellules Caco-2 ou hCMEC/D3 sont donc mises en culture sur des inserts de culture jusqu'à confluence (deux semaines pour la lignée Caco-2, 6 jours pour la lignée hCMEC/D3). Les cellules hCMEC/D3 poussant plus difficilement sur des matériaux plastiques, un « coating » de collagène I est appliqué sur les inserts avant de mettre les cellules en culture.



1. Compartiment luminal (apical) = « sang » ou « lumière intestinale », V = 1,5 mL
- 2- Monocouche de cellules = « barrière hémato-encéphalique » ou « barrière intestinale + insert +/- coating »
- 3- Compartiment abluminal (basolatéral) = « cérébral » ou « sanguin », V = 2,5 mL

Figure 140 : Principe de l'expérience de passage de barrière

Volumes pour plaque 6 puits

À $t = 0$, l'annonacine est ajoutée dans le compartiment apical, correspondant au niveau sanguin ou à la lumière intestinale. Aux temps 10 min, 25 min, et 45 min pour les cellules hCMEC/D3 ou toutes les 5 min pour les cellules Caco-2, les inserts avec la solution apicale sont transférés dans un nouveau puits contenant du tampon neuf. Après extraction et séparation chromatographique dans un système UPLC-ESI-TQ, la fraction ayant traversé la monocouche de cellules hCMEC/D3 ou Caco-2 (compartiment basolatéral, correspondant au niveau cérébral ou sanguin) est évaluée par

spectrométrie de masse (Figure 140). À la fin de l'expérience, le compartiment apical est lui aussi contre-extrait et quantifié par spectrométrie de masse.

3.3.2 Étude des inserts

Une étude préliminaire sur inserts sans cellules est nécessaire afin d'exclure l'existence d'interaction entre l'annonacine et les polymères des inserts ou le « *coating* » de collagène.

Les premières expériences sur filtres nus ont été effectuées à une concentration de 10 μM d'annonacine en triplicat. Les inserts testés ont été les :

- CLS3491 nus (Corning) déjà « précoatés » au collagène I et III ;
- CLS3450 (Corning) « coatés » par du collagène I à l'institut Cochin ;
- CLS3412 (Corning) et les PIRP30R48 (Millipore) nus.

Tous les inserts avaient des diamètres de pores de 0,4 μm .

Dans cette première expérience, l'annonacine a été retrouvée à 70 % dans le compartiment apical. Malgré une sensibilité élevée du spectromètre de masse (1.10^{-15} mol détectée), l'annonacine n'a pas été détectée au niveau basolatéral même avec une haute concentration de 20 μM (Tableau 103). Ces résultats montrent une fixation de l'annonacine sur le « *coating* » et / ou l'insert.

Au vu des résultats précédents, de nouveaux tests qualitatifs sur inserts ayant des tailles de pores beaucoup plus importantes et précédemment saturés par de l'albumine ont été effectués par Estella Vallade, stagiaire de Master 1, en Juillet 2011. L'augmentation de la taille des pores et la saturation de l'insert en albumine permettraient de diminuer les sites et la surface de fixation de l'annonacine sur le polymère des inserts.

Les inserts testés sont les :

- Millipore PIEP 15R48 avec un diamètre de pore de 8 μm ;
- Grenier 665638 avec un diamètre de pore de 8 μm ;
- Corning 3452 avec un diamètre de pore de 3 μm et ;
- Corning 3422 avec un diamètre de pore de 8 μm .

Toutes les manipulations ont été réalisées en duplicat et sur inserts nus, « coatés » au collagène I ou « coatés » et saturés à l'albumine (pôle apical et basolatéral), pendant 1 heure. Les différents résultats obtenus sont présentés dans le tableau (Tableau 103).

	Référence	Marque	Matériau	taille des pores	Condition	Nombre de puits	pôle apical	pôle basolatéral
1 ^{ère} expérience	CLS 3491	Corning®	PTFE (polytétrafluoroéthylène)	0,4 µm	collagène IV	6	+	-
	CLS 3450	Corning®	Polyester	0,4 µm	collagène I	6	+	-
	CLS 3412	Corning®	polycarbonate	0,4 µm	nu	6	+	-
	PIRP 30R48	Millipore®	PET (polyéthylène téréphtalate)	0,4 µm	nu	6	+	-
2 ^e expérience	PIEP 15R48	Millipore®	PET	8 µm	nu	12	+	+
					collagène		+	+
					albumine		+	+
	665638	Grenier®	PET	8 µm	nu	12	+	n.d.
					collagène		+	n.d.
					albumine		+	-
	CLS 3452	Corning®	PET	3 µm	nu	6	n.d.	n.d.
					collagène		+	+
					albumine		+	+
	CLS 3412	Corning®	Polycarbonate	8 µm	nu	12	n.d.	n.d.
					collagène		+	+
					Albumine		+	+

Tableau 103 : Étude de différents inserts

+ : annonacine visible ; - : annonacine non visible ; n.d. non déterminé

Le tableau 2 montre que l'augmentation de la taille des pores semblerait résoudre le problème. Néanmoins, une validation de cette expérience est nécessaire pour poursuivre les différents essais. En effet, certaines expériences, n'ont pas pu être analysées en raison de problèmes techniques. De plus, les inserts avec des pores de 8 µm sont généralement utilisés pour étudier la migration cellulaire. Or les cellules Caco-2 et hCMEC/D3 étant des cellules endothéliales très fines, les expériences cellulaires ne pourront pas être effectuées sur des inserts à ces diamètres de pores. L'étude de la taille minimale permettant à la fois de faire passer l'annonacine et de s'adapter à la croissance cellulaire et donc à l'intégrité des jonctions cellulaires devra être poursuivie.

3.3.3 Étude de l'intégrité des barrières modèles après incubation avec l'annonacine

Les acétogénines et l'annonacine étant connues pour être des molécules très cytotoxiques, elles pourraient influencer les mesures de passage au niveau paracellulaire en déstabilisant les jonctions intercellulaires. Une étude de l'augmentation de la perméabilité de la monocouche par déstabilisation des jonctions serrées a donc été effectuée au cours de ces travaux, permettant de valider la compatibilité de la concentration et le temps d'incubation de l'annonacine avec les expériences.

Deux méthodes validées pour chaque modèle ont été utilisées en fonction des différents laboratoires :

- Une méthode mesurant la résistance électrique des cellules : la mesure du TEER (*Trans Epithelial Electric Resistance*) utilisée au laboratoire de pharmacie clinique à Châtenay-Malabry.

- Une méthode par dosage de fluorescence de Lucifer Yellow utilisée à l'institut Cochin.

3.3.3.1 Caco-2 et TEER

Le TEER est mesuré par une méthode utilisant deux électrodes et calculant la résistance du passage d'un courant électrique entre les cellules. En effet, plus la monocouche de cellules est jointive, moins le courant passe et plus la résistance est élevée. Si les cellules ont subi un stress ou une mort cellulaire, les jonctions serrées seront déstabilisées et la résistance diminuera.

Lors des tests avec l'annonacine à 1 μM , 5 μM et 10 μM , menés sur des inserts avec cellules Caco-2, au bout de 30 min, aucun changement du TEER n'a été observé. L'annonacine ne déstabilise donc pas les jonctions cellulaires des cellules Caco-2 dans les conditions opératoires.

3.3.3.2 hCMEC/D3 et Lucifer Yellow

Les tests réalisés sur les cellules hCMEC/D3 ont été effectués en collaboration avec le Groupe Biologie de l'endothélium cérébral à l'Institut Cochin à Paris dirigé par le Pr P.O Couraud. Les tests ont été effectués par Fabienne Glacial.

L'étude de toxicité se fait par le calcul de la perméabilité au Lucifer Yellow (LY). Le LY est une petite molécule hydrophile de 457 Da passant de manière paracellulaire à travers une monocouche de cellules endothéliales. La BHE, caractérisée par des jonctions très serrées, a donc une très faible perméabilité au LY. Cependant, si elle est déstabilisée par des agents toxiques, les jonctions serrées se fragilisent et des petites molécules telles que le LY peuvent traverser plus facilement la monocouche.

Au cours des études de passage de barrière, le LY est utilisé à une concentration finale de 50 μM dans du tampon de transport ou mélangé avec la solution d'annonacine. A $t = 0$, les solutions sont ajoutées dans leurs compartiments apicaux respectifs. Aux temps 10 min, 25 min et 45 min les inserts contenant la solution apicale sont transférés à un nouveau puits contenant du tampon neuf.

Ensuite 200 μl d'une gamme standard de LY, les solutions initiales, les échantillons basolatéraux aux temps, 10 min, 25 min et 45 min et les échantillons apicaux à 45min sont lus dans une plaque 96 puits. La fluorescence est mesurée à la longueur d'onde d'excitation 425 nm et d'émission 538 nm. Les perméabilités au LY sont calculées en utilisant le principe de clairance décrit par Siflinger-Birnboim P.J. *et al.* [Siflinger-Birnboim P.J. 1987] : on obtient une valeur de perméabilité indépendante de la concentration ; pendant l'expérience de 45 minutes, le volume de clairance augmente linéairement avec le temps. La pente des courbes de clairance des inserts avec cellules est notée PS_t et la pente des courbes des inserts sans cellule PS_f . La perméabilité au LY pour la monocouche endothéliale (PS_e) est calculée par la formule $1/PS_e = 1/PS_t - 1/P_f$ et exprimée en $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. La PS_e est ensuite divisée par la superficie de la membrane (cm^2) qui donnera le coefficient de perméabilité endothélial (P_e en $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$).

Les études de toxicité ont été effectuées sur 2 types d'inserts.

La 1^{ère} expérience a été effectuée sur les inserts 3491 « pré-coatés » au collagène I et III. Les concentrations en annonacine étaient de 1 μM , 5 μM et 10 μM .

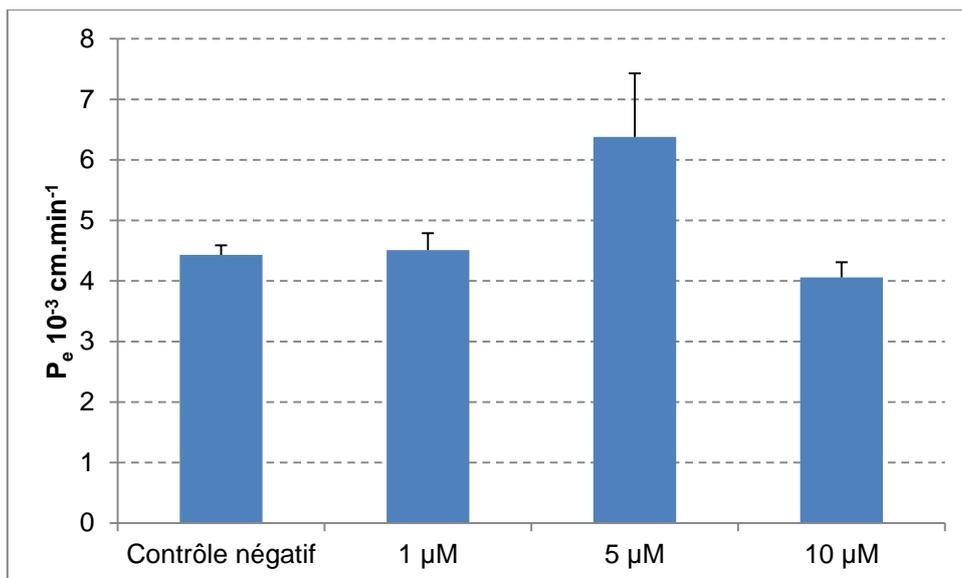


Figure 141: Étude du passage de la LY en fonction de la concentration en annonacine

Cellules hCMEC/D3 ; Culture Jour 6 ; Insert 3491 ; Collagène I et III

On observe une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du coefficient de perméabilité P_e au LY en présence de 5 μM d'annonacine par rapport au contrôle, suggérant une toxicité de la molécule sur les cellules. Étrangement, en présence d'annonacine 10 μM , on ne retrouve pas cette augmentation du P_e (Figure 141). Pour valider nos résultats, une seconde expérience a été effectuée.

La deuxième expérience a été effectuée sur des filtres 3450 « coatés » au collagène I, avec des concentrations testées croissantes (5 μM , 10 μM et 20 μM).

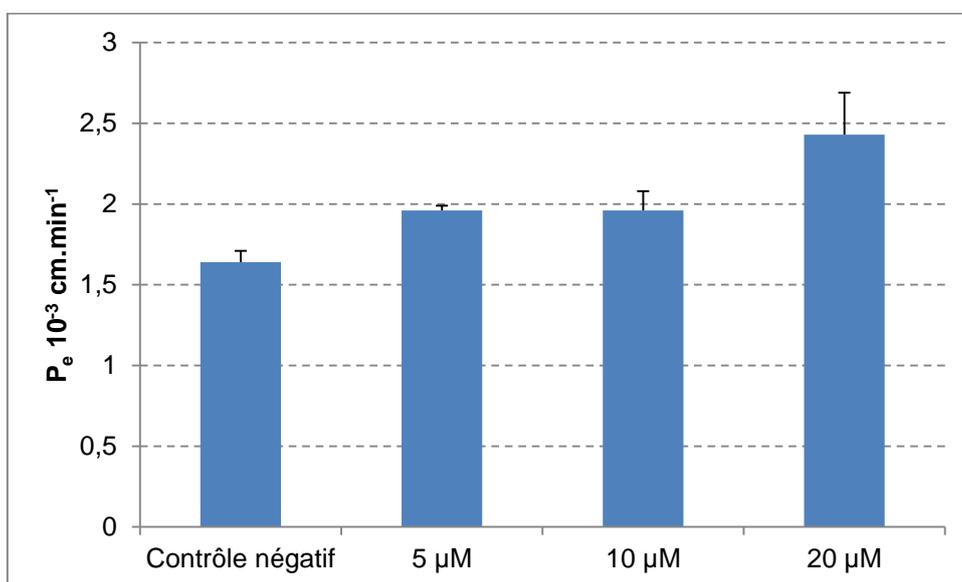


Figure 142 : Étude du passage de la LY en fonction de la concentration en annonacine

Cellules hCMEC/D3 ; Culture Jour 7 ; Insert 3450 ; Collagène I

Le coefficient de perméabilité à la LY est constant que ce soit en absence ou en présence d'annonacine à 5 μM et à 10 μM . Par contre une légère augmentation du P_e est observé à la concentration de 20 μM , mais elle est non significative (Figure 142).

Les concentrations d'annonacine de 1 μM , 5 μM et 10 μM pour un temps d'incubation de 45 min ne déstabilisent donc pas les jonctions cellulaires et ces conditions pourront être utilisées pour les futurs tests de passage de barrière.

3.4 Approche de l'absorption

3.4.1 Test de séquestration de l'annonacine (Uptake) sur cellules Caco-2

Les tests sur les cellules Caco-2 ont été effectués en collaboration avec le laboratoire de pharmacie clinique UPRES EA 2706 à la faculté de Châtenay-Malabry et sous la direction du Dr. Marion Buyse.

L'annonacine en raison de son caractère lipophile a probablement une distribution préférentielle dans les membranes cellulaires [Derbré S. 2005 ; Kojima N. 2010]. Le modèle Caco-2 serait donc capable de séquestrer l'annonacine dans la fraction membranaire de façon importante.

L'analyse de séquestration consiste à déterminer la quantité d'annonacine dans le milieu de culture et dans la fraction cellulaire. Ce test (uptake) a été réalisé avec une solution de 10 μM d'annonacine dans le DMSO, dans des plaques de 6 puits. Le milieu cellulaire et le culot cellulaire gratté sont récupérés et extraits par trois fois par l'acétate d'éthyle (V/V) puis évaporés à sec. La quantité d'annonacine dans chaque puits a été calculée à différents temps (30 minutes, 1 heure et 24 heures) permettant l'évaluation du passage de l'annonacine du milieu de culture vers les cellules Caco-2.

L'analyse quantitative se fait par CLHP-ESI-SM/SM triple quadripôle en mode SRM (*Single Reaction Monitoring*) en recherchant la transition de l'ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 619,5 au fragment $[\text{M}+\text{Na} - \text{lactone}]^+$ m/z 507,5.

Malgré des problèmes techniques dans l'établissement des gammes d'étalonnage, des résultats préliminaires peuvent être proposés avec, cependant, un coefficient de variation de 20 % pour quatre échantillons analysés à différents temps et différents types. Ces manipulations devront être confirmées.

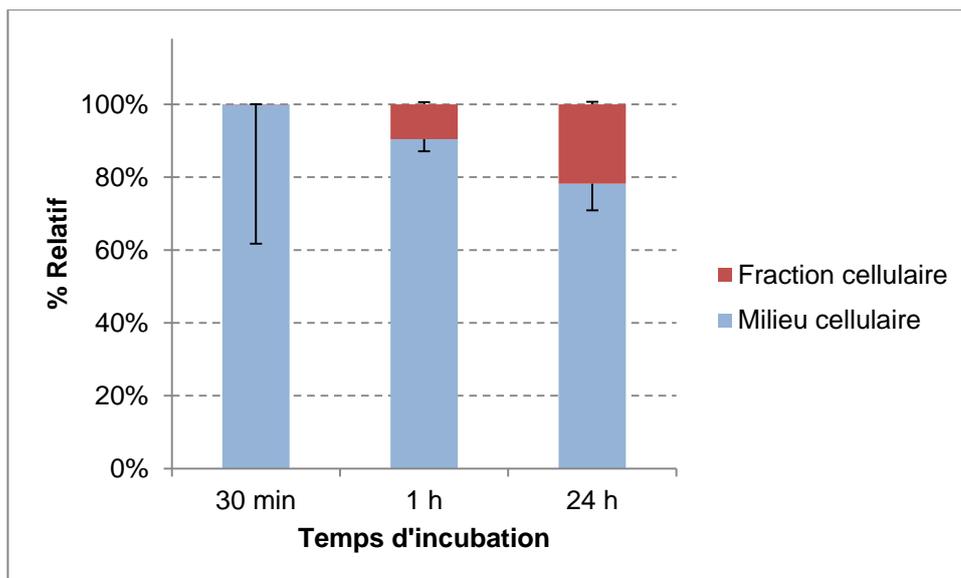


Figure 143 : Pourcentages relatifs d'annonacine dans la fraction cellulaire par rapport au milieu en fonction du temps d'incubation pour une concentration de 10 μM d'annonacine

(Écart type négatif : milieu cellulaire ; écart type positif : fraction cellulaire)

L'annonacine semble peu rentrer dans les cellules Caco-2. En effet, au bout de 30 min la quantité d'annonacine dans le culot par rapport à la quantité totale est négligeable. Après une heure d'incubation, seulement 10 % d'annonacine semble être dans le culot et au bout de 24 h seulement 22 % (Figure 143).

Ces résultats divergent sensiblement des données microscopiques obtenues pour des dérivés fluorescents de la squamocine [Debré S. 2005]. Par contre, ces résultats sont en adéquation avec la prédiction proposée par la règle de Lipinski.

3.4.2 Cytotoxicité

Les acétogénines et l'annonacine étant connues pour être des molécules très cytotoxiques, il est important d'évaluer cette toxicité sur le modèle de barrière intestinale.

Une méthode de détermination de la cytotoxicité par dosage de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture a été utilisée. La lactate déshydrogénase est une enzyme exclusivement cytoplasmique et relativement stable (Figure 144). L'augmentation de l'activité de cette enzyme dans le milieu de culture des cellules permet de détecter une altération de la perméabilité membranaire liée à la mort des cellules. La production de NADH, co-facteur de l'enzyme, est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 450 nm.

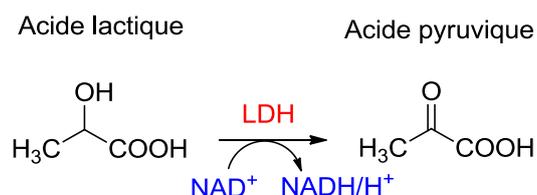


Figure 144 : Conversion de l'acide lactique en acide pyruvique par la lactate déshydrogénase libérée par les cellules mortes ou à la perméabilité altérée

Ces études ont été effectuées par Estella Vallade au cours de son stage de Master 1. À 30 minutes d'incubation, l'annonacine ne présente pas de toxicité à 100 nm, 1, 10 et 100 μM . À 24 heures d'incubation, l'annonacine entraîne 53 % de mortalité à 100 μM mais une absence de cytotoxicité à 10 μM , 1 μM et 100 nM (**Figure 145**).

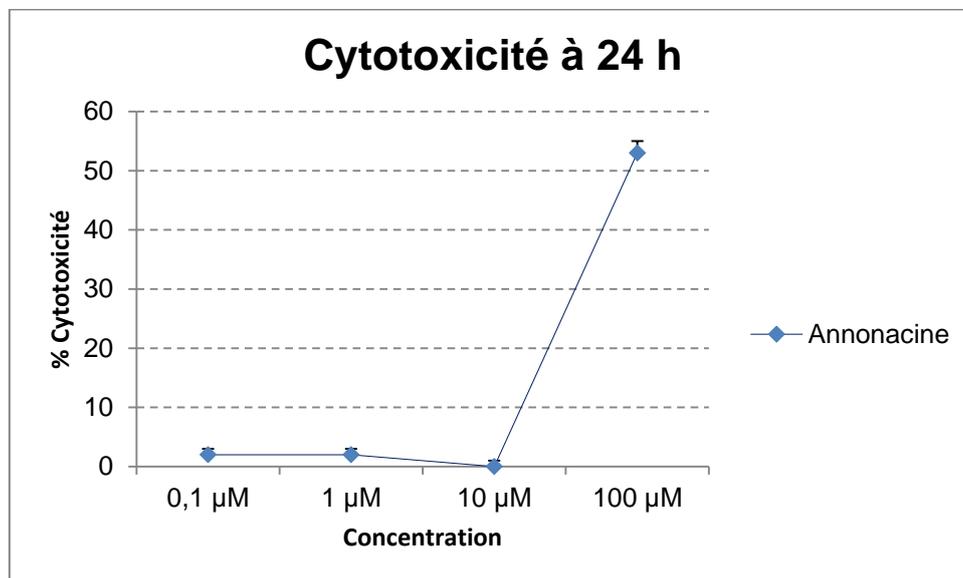


Figure 145 : Cytotoxicité de l'Annonacine à 24 h

Dans les conditions employées pour les mesures de passage de membrane et de séquestration dans le modèle Caco-2 (10 μM , 30 min), l'annonacine ne semble donc pas exercer de toxicité.

3.5 Distribution : récupération de l'annonacine après incubation avec les protéines plasmatiques

La distribution aux tissus est proportionnelle avec la fraction plasmatique libre. Des analyses très succinctes ont permis d'évaluer la fixation de l'annonacine à l'albumine.

L'annonacine ($8,4 \cdot 10^{-9}$ mol) a été mise à incuber avec de l'albumine ($50,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) pendant 24 h à 37 °C. Après deux extractions (L/L) par l'AcOEt, l'extrait a été évaporé puis resolubilisé dans 200 μl d'un mélange de phase mobile : ACN / H₂O (60 : 40) en enfin, injecté en CLHP couplé à un PDA. Les résultats montrent que l'annonacine a été fixée à 97 % par l'albumine.

Ces tests préliminaires, révèlent qu'il semble être difficile de récupérer l'annonacine incubé avec l'albumine. La liaison n'est pas a priori covalente, selon des travaux menés au laboratoire pas Séverine Debré [Debré S. 2006]. Des travaux évaluant la liaison aux éléments du plasma total et de sang total devront compléter ces résultats lorsque la détermination des propriétés pharmacocinétiques de l'annonacine sera menée *in vivo*.

Conclusion

Les études de passage de barrière, nécessaires pour quantifier et comprendre les mécanismes de passage de l'annonacine au travers des barrières physiologiques, n'ont pas été possibles pour des raisons techniques inhérentes aux modèles employés (fixation de l'annonacine au polymère des inserts). Cependant, ces études de mise au point ont apporté des informations importantes suggérant une poursuite possible de cette thématique. En outre, dans les conditions mises au point pour ces mesures de passage sur les deux modèles (Caco-2 et hCMEC/D3), l'annonacine ne semble pas exercer de toxicité.

Des études ayant montré que l'annonacine a des propriétés neurodégénératives *in vivo* chez le Rat et la Souris (iv, sc), des travaux de pharmacocinétique *in vivo* devront être envisagés. Nos tests préliminaires ayant montré une fixation importante de l'annonacine à l'albumine, cela nécessitera la mise au point d'un protocole d'extraction spécifique.

Chapitre 6 : La métabolisation

1. Généralités

1.1 Métabolisation de phase 1 et de phase 2

La métabolisation est l'une des phases de la pharmacocinétique permettant la détoxification et conditionnant souvent l'élimination de molécules exogènes. Les différentes étapes du métabolisme conduisent en effet à la formation de molécules hydrosolubles plus facilement éliminées par l'urine ou la salive. Une autre voie d'élimination est l'élimination par les *faeces*. Les xénobiotiques seront alors éliminés sous formes conjuguées. La métabolisation se fait essentiellement dans le foie, mais également dans les reins, les poumons et l'intestin.

Cette phase fait intervenir deux types de réactions [Williams R. T. 1959] :

- les réactions de phase I, de fonctionnalisation
- les réactions de phase II, de conjugaison

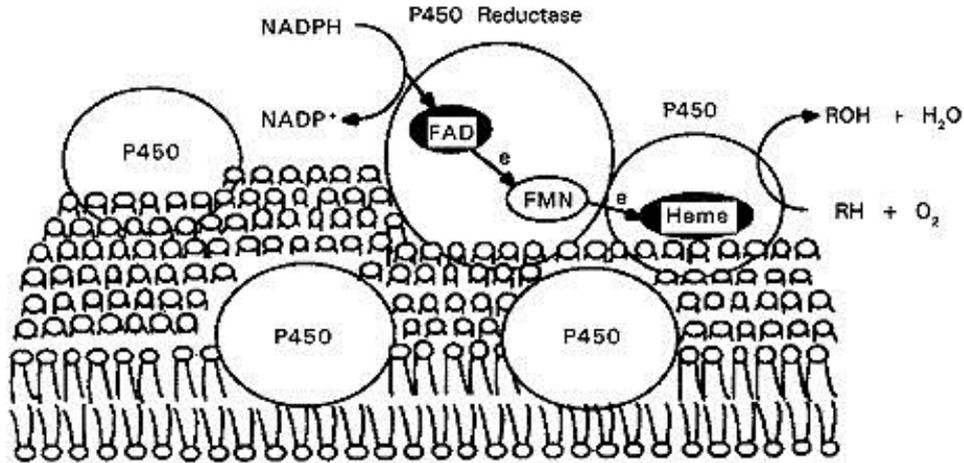
Les réactions de phase I correspondent à des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse et d'hydratation. Elles consistent principalement à une « préparation » des molécules pour les réactions de phase II en introduisant des groupes chimiquement aptes à l'addition de groupements polaires *via* des oxydations, en particulier. Ainsi, les réactions de phase II constituent généralement la principale voie de détoxification et donnent la majeure partie des produits excrétés. La phase I n'est pas obligatoire. Des réactions de cette phase peuvent aussi produire des métabolites polaires pouvant être directement éliminés. L'activité des métabolites ne peut pas être connue *a priori*. Dans le cas des ACGs la difficulté des relations structure activité de celles-ci ne permet pas d'appréhender l'activité des métabolites [Hollerhage M. 2009].

La phase II est une phase de conjugaison de groupements polaires facilement éliminés par le rein. La conjugaison est en fait le transfert de fonctions tels que les groupements glucuronyle, sulfate sur un groupe fonctionnel (OH, NH₂, COOH). Cette phase n'a pas fait l'objet de travaux au cours de cette thèse.

1.2 Mono-oxygénase à cytochromes P450

La majorité des substrats endogènes et exogènes sont oxydés par des enzymes du groupe des cytochromes P450 [Guengerich F. P. 1999, Guéguen Y. 2006]. Ils sont localisés dans les membranes du réticulum endoplasmique.

Les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP) forment une super-famille d'hémoprotéines agissant dans le métabolisme oxydatif d'une large variété de substrats endogènes et exogènes. Leur poids moléculaire varie entre 45 et 55 kDa. Ils sont situés sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique où ils sont ancrés par leurs extrémités *N*-terminale *via* des domaines hydrophobes. Ils appartiennent à un complexe multienzymatique appelé système de mono-oxygénase à CYP qui est composé de l'une des isoformes de CYP, de NADPH cytochrome P450 réductase et de cytochrome b5 (Figure 146).



Source: Ohkawa *et al.* 1998

Figure 146 : Complexe de cytochrome au niveau du réticulum endoplasmique

Un cycle catalytique détaillé est représenté sur la [Figure 147](#) [Hollenberg P. F. 1992].

Au repos, le fer de l'hème est à l'état d'oxydation (+III). Après fixation du substrat, un premier électron venant du NADPH est apporté par la NADPH cytochrome P450 réductase et permet la réduction du fer à l'état ferreux. Une molécule de dioxygène est alors fixée et un second électron est apporté, ce qui permet la formation d'un hydroperoxyde de fer. L'apport de deux protons permet l'élimination d'un atome d'oxygène sous la forme d'une molécule d'eau. Le fer forme alors un complexe fer-oxo à haut degré d'oxydation. Enfin, le second atome d'oxygène est transféré sur le substrat qui est alors libéré et le fer revient à l'état ferrique. On a donc introduction d'une nouvelle fonction oxygénée sur le substrat de l'enzyme.

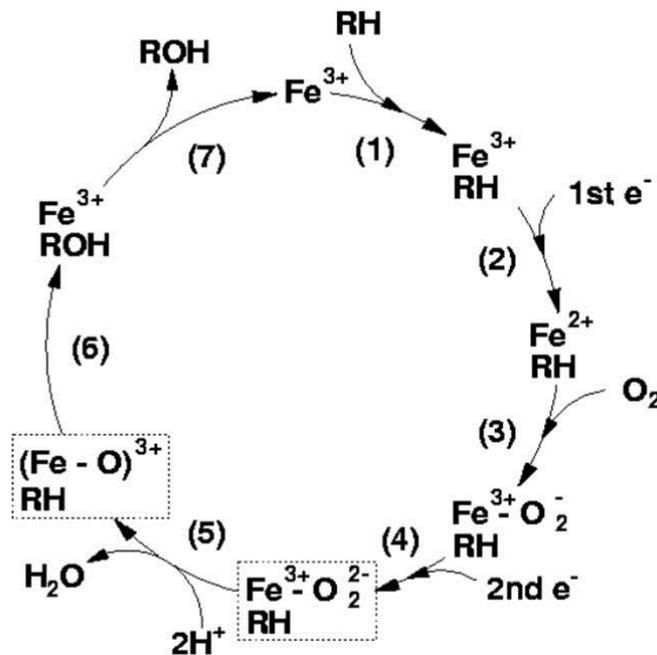


Figure 147 : Cycle catalytique de cytochrome P450

Il existe plus d'une centaine d'isoformes différentes de CYP qui pour la plupart ont été purifiées à partir du foie de rat et du foie humain. Les cytochromes P450 peuvent être inhibés ou induits par des médicaments ou des aliments, provoquant notamment des interactions médicamenteuses. Trois familles jouent un rôle important dans la biotransformation des molécules exogènes : les 1, 2 et 3 [Guengerich F.P. 2005].

Un cytochrome n'est pas spécifique d'un substrat : il peut métaboliser plusieurs substrats parfois très différents. Un substrat peut être métabolisé par plusieurs cytochromes [Beaune P.H. 2000]. Les plus impliqués dans le métabolisme des médicaments chez l'Homme sont les CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, et CYP2C19 (Figure 148).

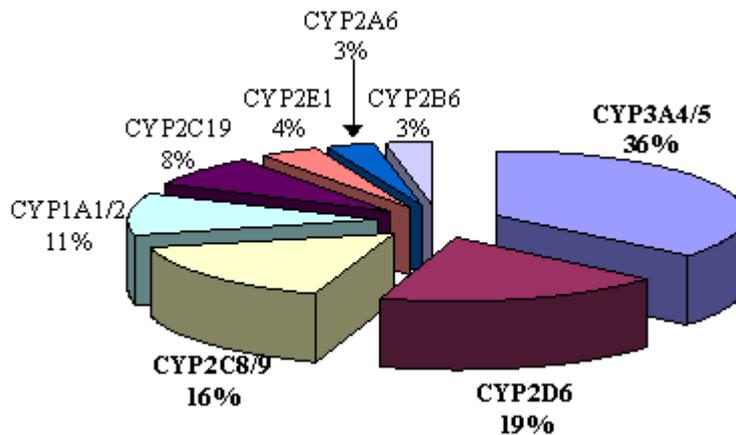


Figure 148 : Principaux cytochromes humains et leur proportion par rapport à la métabolisation des médicaments

Le CYP3A4 est impliqué dans la biotransformation d'environ 50 % des médicaments.

Dans ce chapitre, nous chercherons à savoir si l'annonacine est métabolisée par les cytochromes P450, et si ses métabolites ont une toxicité plus importante que cette dernière.

2. Mise au point physicochimique

2.1 Solution et solubilisation

Lors des études de mises au point, la solubilisation de l'annonacine dans le MeOH était tout à fait acceptable (90 % de récupération après la 1^e extraction). Le DMSO étant connu pour être toxique pour les cellules à forte concentration pour des études au niveau microsomal, le méthanol a donc été préféré dans les expériences de métabolisation.

2.2 Mise en pratique sur des acétogénines plus polaires

Après incubation microsomale, un mélange d'annonacine et de métabolites principalement oxygénés est attendu. Pour vérifier que les conditions d'extraction soient transposables aux métabolites, nous avons réalisé les mêmes essais sur un mélange de 6 acétogénines polaires ($C_{35}H_{64}O_8$ et $C_{35}H_{62}O_8$), obtenues par purification d'une fraction polaire du nectar utilisé pour l'obtention de l'annonacine.

D'après nos résultats, la récupération par une contre-extraction H_2O / AcOEt (V/V, 1/1) et la resolubilisation dans 200 μ l de MeOH conviennent et permettent une récupération quantitative.

3. Étude biologique de la métabolisation de phase 1

3.1 Détermination des conditions de métabolisation sur microsomes hépatiques

Les travaux de métabolisation ont été effectués au laboratoire de métabolisation des xénobiotiques à l'ICSN au CNRS à Gif sur Yvette en collaboration avec le Dr. Thierry Cresteil.

Les études préliminaires de métabolisation de phase 1 chez le Rat et l'Humain sont effectuées par incubation de l'annonacine avec des microsomes hépatiques et un système générateur NADPH *in situ* (NADP⁺ et Glucose-6-Phosphate formant du NADPH *via* la Glucose-6-phosphate déshydrogénase).

Les microsomes sont obtenus à partir de cellules hépatiques homogénéisées puis par centrifugation différentielle pour obtenir le réticulum endoplasmique sous formes de vésicules (microsomes) auxquelles les différents cytochromes P450 sont associés.

Pour optimiser les conditions de formation des métabolites, différents paramètres ont été évalués :

- le temps d'incubation : 0 min ; 30 min ; 60 min ; 90 min ;
- le volume de microsomes de rats : 0 μ l, 10 μ l et 20 μ l induits au Phénobarbital (PB) et ;
- le volume de la solution d'annonacine à 10 mM : 1,25 μ l, 2,5 μ l et 5 μ l

Les paramètres non variables pour chaque expérience sont fixés de façon arbitraire : temps d'incubation de 60 min, 20 μ l de microsomes ou l'utilisation de 2,5 μ L d'une solution d'annonacine à 10 mM. Les incubats sont extraits à deux reprises par l'AcOEt avec centrifugation puis évaporés sous azote avant d'être injectés en CLHP-SM.

Après comparaison des différents profils chromatographiques en CLHP-ESI-MSD, les paramètres les plus favorables à la formation des métabolites ont pu être déterminés. Les conditions optimales opératoires sont un temps d'incubation d'une heure, une quantité de microsomes de 20 μ l et un volume de 2,5 μ l d'annonacine à 10 mM soit une quantité de $2.5 \cdot 10^{-8}$ mol dans 500 μ l soit une concentration finale de 50 μ M.

3.2 Métabolisation par microsomes de rat

3.2.1 Comparaison du TIC de l'échantillon métabolisé et du blanc

Après incubation de l'annonacine avec la préparation de microsomes en absence ou présence de co-facteurs (échantillon témoin négatif), les échantillons sont analysés par CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap®.

La comparaison des chromatogrammes UV d'un échantillon ayant été incubé avec co-facteurs (échantillon métabolisé) et celui d'un échantillon sans NADPH (témoin négatif), indique une diminution de l'intensité du pic de l'annonacine ($\leq 1\%$), montrant une métabolisation de la molécule.

Dans l'échantillon, des pics apparaissent entre 7 min et 17 min. Ils sont potentiellement attribuables aux métabolites de l'annonacine (Figure 149).

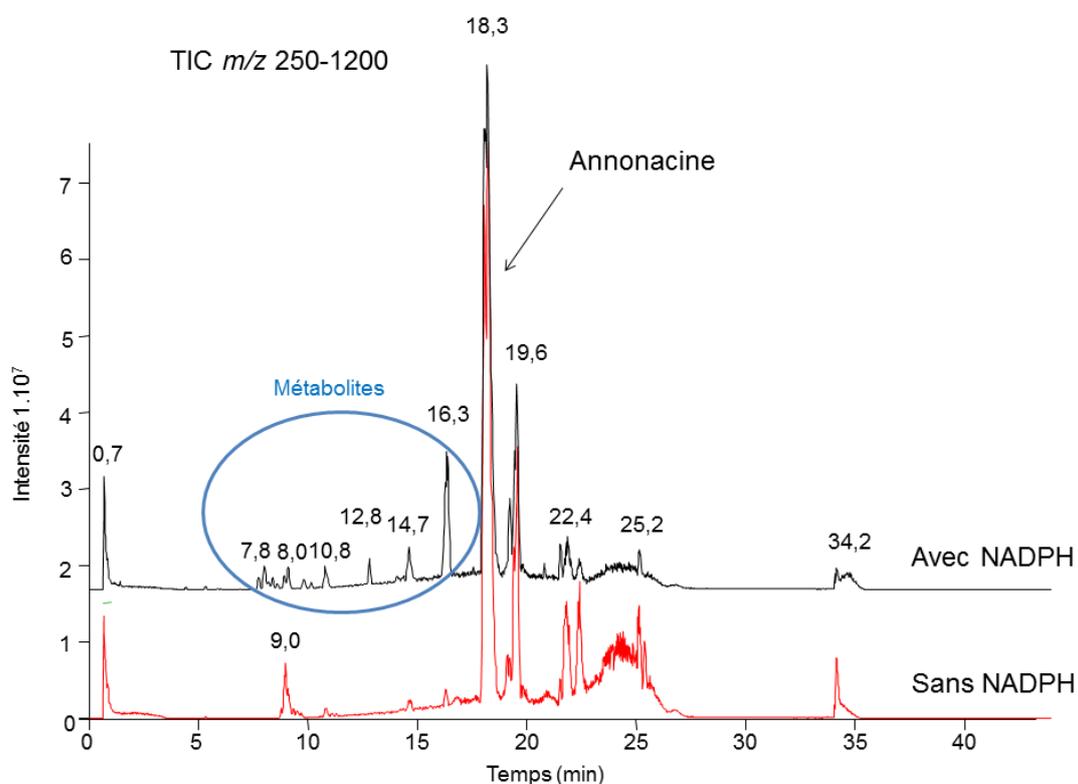


Figure 149 : Comparaison des chromatogrammes obtenus en CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®-pour le témoin négatif et l'échantillon métabolisé par des microsomes de rats au PB.

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°1 (voir Matériels et méthodes)

3.2.2 Recherche des différents métabolites

L'analyse par CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® montre que les nouveaux pics chromatographiques correspondent à des ions de rapport m/z 635,45, de formule brute $[C_{35}H_{64}O_8Na]^+$. Ceci suggère une hydroxylation de l'annonacine ou une époxydation au niveau de la double liaison de la lactone (gain de 16 u.m.a. par rapport à l'adduit sodique de l'annonacine) (Figure 150). Pour ces pics chromatographiques, l'ion $[M+H]^+$ à m/z 613,44 $[C_{35}H_{64}O_8H]^+$ est également détecté

Les molécules cationisées par le sodium étant majoritaires pour les métabolites, ils seront seuls considérés dans la suite du travail.

On remarquera qu'une hydrolyse de la lactone $[M+H_2O+Na]^+$ à m/z_{th} . 637,4665 soit $[C_{35}H_{66}O_8Na]^+$ n'est pas observée (Figure 150).

Enfin, un métabolite de type époxyde $[M+O+Na]^+$ (m/z_{th} . 635,4499) est susceptible de subir une hydratation (+18 u.m.a) soit par voie enzymatique, soit par voie spontanée, pour former un diol ($[M+O+H_2O+Na]^+$; m/z_{th} . 653,4605). Aucun dérivé de ce type n'a été observé (Figure 150).

Les masses exactes du produit d'une hydroxylation de l'annonacine et du produit d'époxydation sont identiques, ne permettant pas de les distinguer sur le chromatogramme.

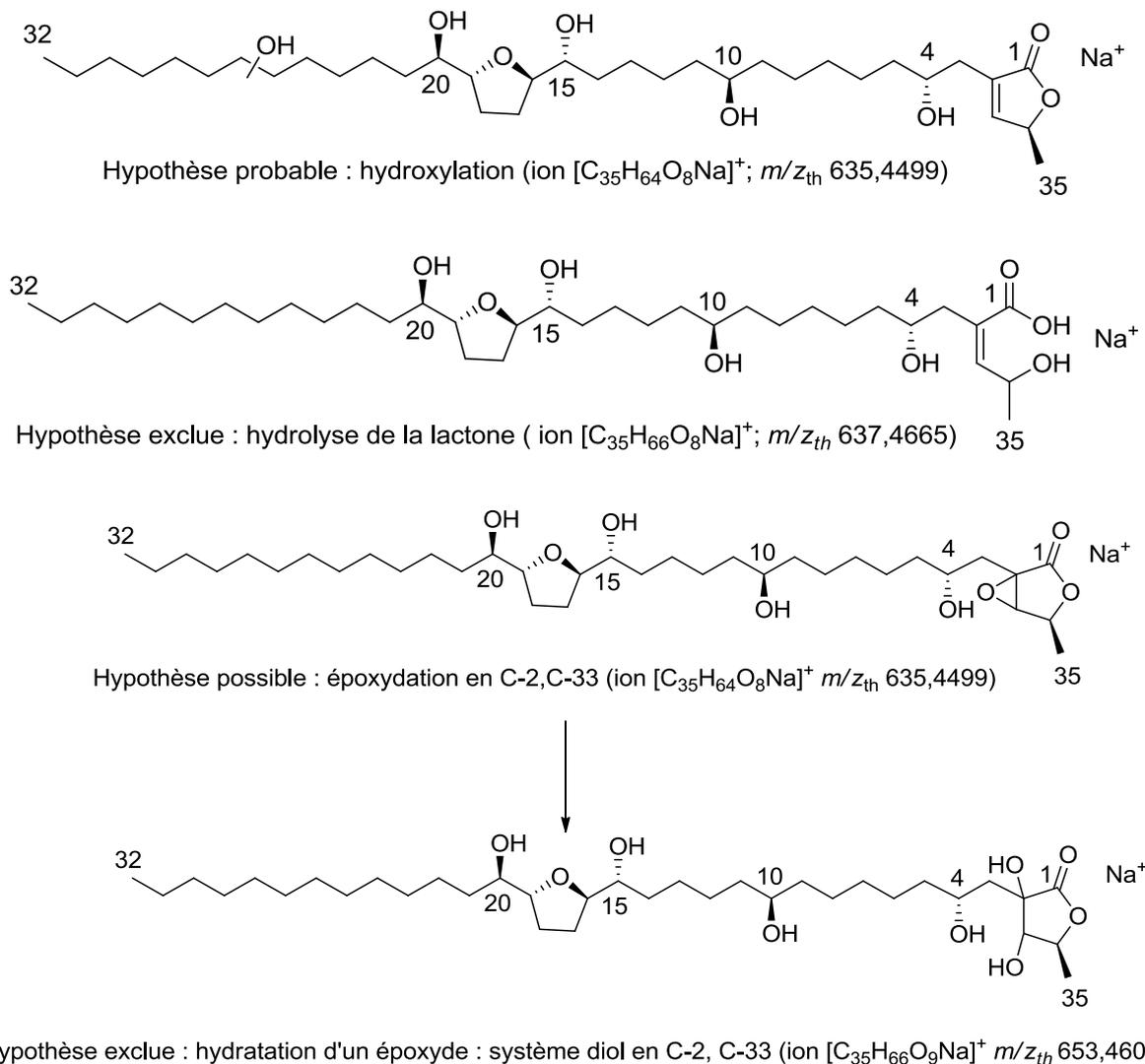


Figure 150 : Hypothèses de métabolisation de l'annonacine

En conclusion, les chromatogrammes TIC et SIM m/z 635,44-635,45 montrent la présence de 25 pics soit 25 hydroxylations possibles ou 24 hydroxylations et une époxydation en C-2/C-33 sur cette molécule. Un chromatogramme SIM à m/z 635,44-635,45 montrant la numérotation des métabolites est présenté (Figure 151).

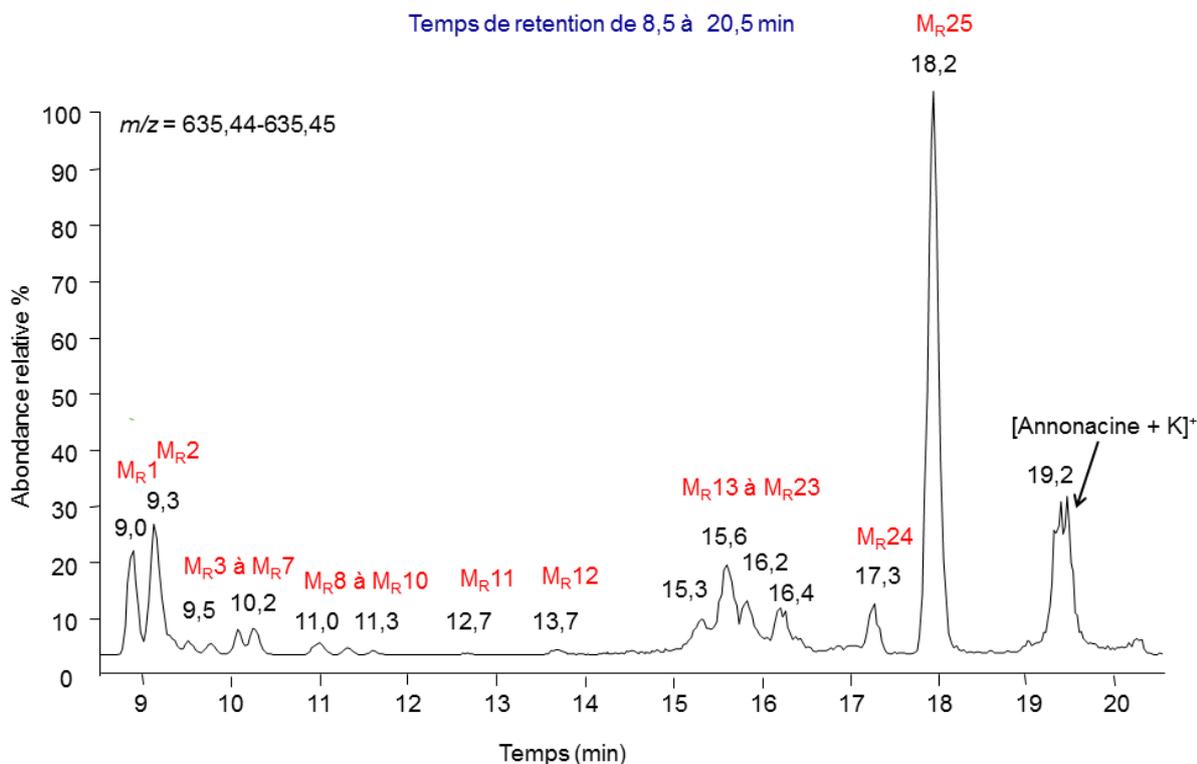


Figure 151 : Chromatogramme SIM des métabolites $[C_{35}H_{64}O_8Na]^+$ obtenu après incubation d'annonacine par les microsomes de rats PB (MR1 à MR25)

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

3.2.3 Validation des résultats

Saturation du détecteur

Les métabolites étant peu abondants, des grandes quantités d'incubat ont dû être injectées pour permettre leur détection et, ultérieurement, leur fragmentation. Dans ces conditions, une saturation du détecteur par l'annonacine ($t_r = 19,2$ min) est observée, sous la forme d'un large pic aux multiples apex. Afin d'infirmer l'hypothèse d'impuretés à ce temps de rétention une gamme de dilution d'un échantillon d'annonacine a été préparée et injectée. Le premier échantillon correspond à une quantité d'annonacine similaire à nos conditions expérimentales ($6,25 \cdot 10^{-10}$ mol injectée sur la colonne CLHP), et reproduit le chromatogramme à $t_r = 19$ min avec les échantillons métabolisés. À une dilution au $10\ 000^e$ le pic d'annonacine ne présente plus de multiplicité, validant l'hypothèse d'une saturation du détecteur.

De manière embarrassante, dans les conditions de saturation du détecteur, pour $6,25 \cdot 10^{-10}$ mol injectée, une impureté est visible à $t_r = 17,9$ min, avec une intensité très faible. Ce pic a un temps de rétention et une masse exacte à celui du métabolite MR25. Étant donné le mode de purification de

l'annonacine (CLHP préparative en UV), ce produit apparait comme un possible artefact formé à partir de l'annonacine.

3.2.4 Pourcentage de métabolisation

En l'absence d'étalons permettant une quantification des métabolites, le pourcentage de métabolisation a été calculé par la différence de l'aire du pic de l'annonacine après métabolisation et sans métabolisation. L'annonacine est dégradée à hauteur de moins de 1 % dans nos conditions expérimentales.

3.2.5 Km et Vi des métabolites « majoritaires »

La métabolisation de l'annonacine est essentiellement une hydroxylation, les métabolites ont donc des structures proches. En émettant l'hypothèse que tous ces métabolites ont le même coefficient d'ionisation, des études de cinétique enzymatique ont été initiées.

Trois métabolites apparaissent comme majoritaires (**M_{R1}**, **M_{R2}** et **M_{R25}**). Les métabolites **M_{R1}** et **M_{R2}** étant co-élués, les études ont été effectuées sur l'ensemble des aires de ces deux métabolites. Les constantes enzymatiques de ces deux groupes (**M_{R1}** et **M_{R2}**) et **M_{R25}** ont donc été étudiées.

L'annonacine a été incubée par des microsomes induits au BNF (β -naphthoflavone) pendant différents temps d'incubation (0 min, 30 min, 60 min et 90 min). Les extraits ont été analysés en duplicat par CLHP-ESI-piège à ions.

Les aires des métabolites polaires **M_{R1}** et **M_{R2}** et du métabolite apolaire **M_{R25}** ont été mesurées, afin d'obtenir les vitesses initiales de leur formation. L'impureté présente dans la solution mère d'annonacine, évoquée précédemment, identique au métabolite **M_{R25}**, était visible dans les extraits obtenus à partir des témoins négatifs. L'aire moyenne mesurée dans ces témoins a été soustraite de l'aire de **M_{R25}** mesurée pour les échantillons métabolisés.

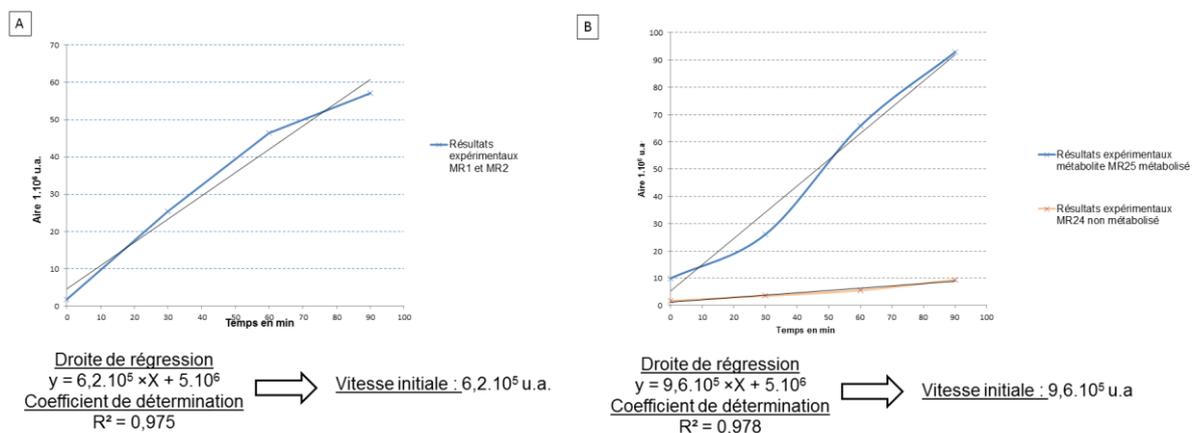


Figure 152 : Vitesse initiale de formation (A) des métabolites polaires (M_{R1} et M_{R2}) (B) et du métabolite apolaire M_{R25}

La vitesse initiale de formation des métabolites polaires **M_{R1}** et **M_{R2}** est de $6,2 \cdot 10^5$ u.a.min⁻¹. Le métabolite apolaire à t = 90 min, continue à se former. La vitesse initiale de formation du métabolite apolaire **M_{R25}** est de $9,6 \cdot 10^5$ u.a.min⁻¹ (Figure 152).

Le métabolite apolaire **M_R25** se formerait plus rapidement que les deux métabolites polaires **M_R1** et **M_R2**, en supposant que leurs coefficients d'ionisation sont identiques.

La constante de Michaelis (Km) et la vitesse maximale de formation des métabolites ont été déterminées. La constante de Michaelis permet d'évaluer l'affinité du substrat pour une enzyme. Elle est d'autant plus petite que l'affinité est grande. La vitesse maximale (Vmax) correspond à la vitesse que peuvent atteindre les enzymes en contact avec un large excès de substrat (enzyme saturée). Des échantillons ont été incubés pendant 30 min avec différentes concentrations initiales d'annonacine (0 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM). Chaque condition a été étudiée en triplicat et les extraits ont été analysés en duplicat par UPLC-ESI-TQ.

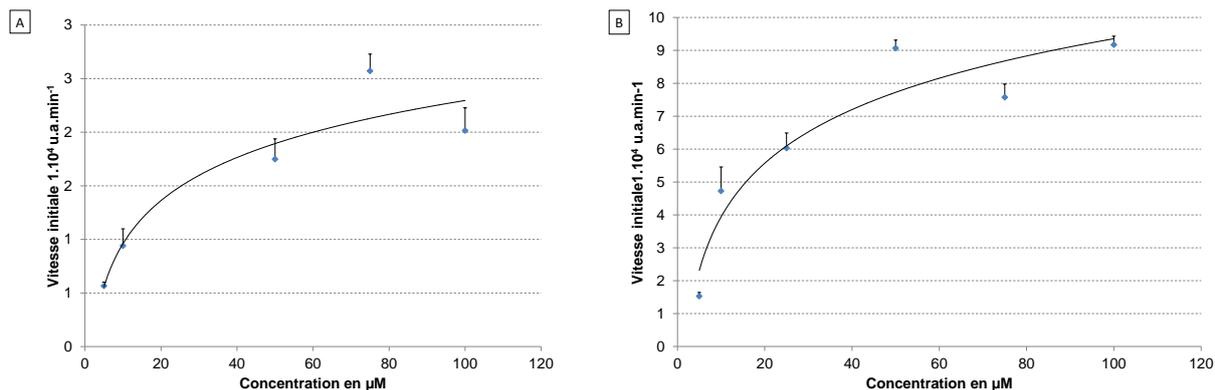


Figure 153 : Vitesses initiales des métabolites en fonction des concentrations initiales en annonacine (A) Métabolites polaires M1 et M2 (B) Métabolite apolaire M25⁵

SEM ; n = 6 ; coefficients de détermination : (A) $R^2 = 0,887$; (B) $R^2 = 0,900$

Les courbes, asymptotiques, montrent une saturation des cytochromes impliqués. La saturation des cytochromes formant les métabolites polaires se situent aux alentours de 50 µM d'annonacine. La saturation est moins visible sur le graphique du métabolite apolaire et serait située à environ 80 µM (Figure 153).

Les droites $1/V_i$ en fonction de $1/C_i$ donnant le Km et le Vm des différents métabolites sont présentées ci-dessous (Figure 154).

⁵ Pour l'échantillon A le point de concentration 25 µM n'a pas été inclus sur la courbe en raison d'un écart type trop élevé.

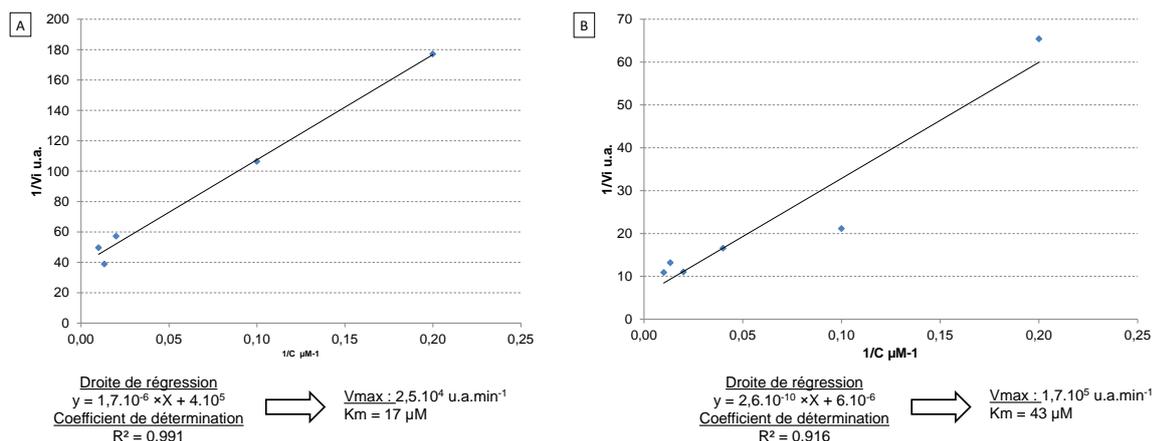


Figure 154 : Calcul du Km et Vmax des métabolites polaires M1 et M2 (A) et du métabolite apolaire M25 (B)

Le Km et la vitesse maximale des métabolites polaires (**M1** et **M2**) et du métabolite apolaire (**M25**) sont respectivement de 17 µM, de 43 µM et de $2,5 \cdot 10^4 \text{ u.a. min}^{-1}$ et $1,7 \cdot 10^5 \text{ u.a. min}^{-1}$.

Plus la vitesse maximale est grande plus les cytochromes peuvent rapidement métaboliser ce xénobiotique. La Vmax du métabolite apolaire (**M_R25**) est 7 fois plus élevée que celle des métabolites polaires. Le métabolite apolaire (**M_R25**) se formerait plus rapidement que les autres métabolites.

La comparaison du coefficient d'ionisation des métabolites (**M_R1** et **M_R2**) et (**M_R25**) par établissement de droite d'étalonnage est nécessaire pour confirmer ces observations. Cependant, l'obtention des métabolites (**M_R1**, **M_R2** et **M_R25**) par voie hémisynthétique (chapitre 5 partie 6) n'a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes pour cette étude.

3.3 Métabolisation humaine

Conformément à la problématique de ce travail, sur la base des paramètres cinétiques observés avec les microsomes de rats induits au BNF, la métabolisation de l'annonacine par des microsomes humains a été étudiée.

Les études de métabolisation sont effectuées par incubation de l'annonacine avec 40 µl de microsomes hépatiques humains. Les autres conditions sont exactement les mêmes que celle utilisées chez le rat.

Trois pics apparaissent ($t_r = 9,0 \text{ min}$; $9,3 \text{ min}$; $18,1 \text{ min}$) potentiellement attribuables aux métabolites de l'annonacine (Figure 155). L'analyse par CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® montre des nouveaux pics à m/z 635,45, correspondant aux ions $[\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_8\text{Na}]^+$ suggérant, comme précédemment, une hydroxylation de l'annonacine et / ou une époxydation au niveau de la double liaison de la lactone.

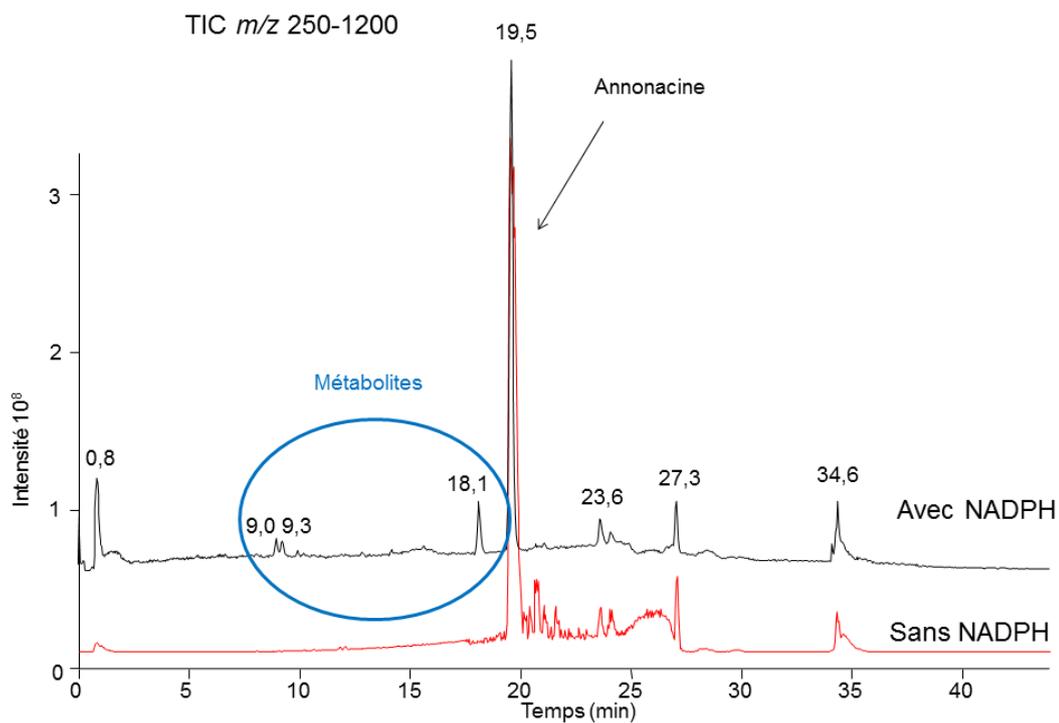


Figure 155 : Comparaison des chromatogrammes obtenus en CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap[®]-pour le témoin négatif et l'échantillon métabolisé par des microsomes humains

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

En comparant ce résultat au chromatogramme obtenu par les microsomes de rats et en pratiquant une co-injection des deux extraits, on observe que trois métabolites désignés **M_H1**, **M_H2** et **M_H3⁶** ont la même masse et le même temps de rétention que les métabolites majoritaires chez le rat (**M_R1**, **M_R2** et **M_R25**) (Figure 156).

Le pourcentage de métabolisation n'a pas pu être mesuré pour les mêmes raisons que celles décrites précédemment. La comparaison de l'aire en UV de l'annonacine dans les échantillons et pour les témoins négatifs montre une différence inférieure à 1 % comme précédemment.

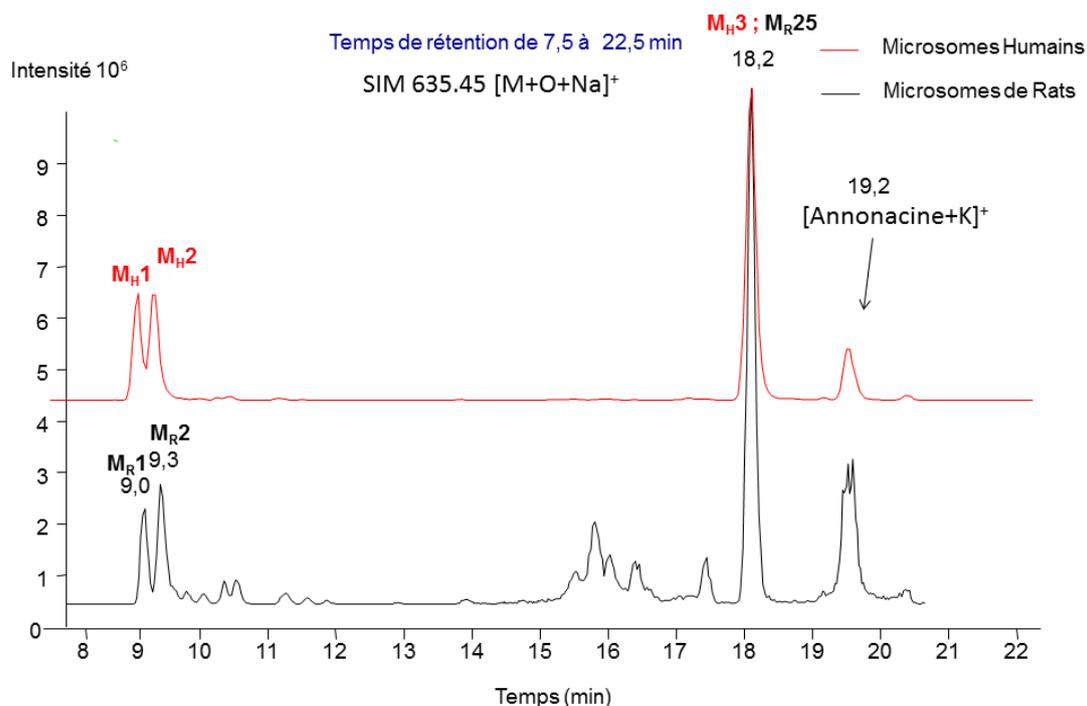


Figure 156: Comparaison du SIM 635,45 de l'échantillon de métabolisation par microsomes humains et par microsomes de rats

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

⁶ Ce code correspond aux métabolites chez l'humain et à l'ordre d'éluion (tr = 9,0 min ; 9,3 min ; 18,2 min)

4. Identification des cytochromes impliqués

Les différents cytochromes impliqués dans la métabolisation de l'annonacine restaient à identifier chez le Rat et l'Humain.

4.1 Microsomes de rats induits

Pour avoir une idée des cytochromes impliqués dans la métabolisation de l'annonacine chez le rat, l'annonacine a été mise à incuber avec 3 différents types de microsomes de rats : des microsomes induits au phénobarbital (PB) augmentant la quantité des CYP 2B1 et 2B2 ; des microsomes induits à la β -naphtoflavone (BNF) provoquant l'augmentation de l'expression des cytochromes de la famille 1A ; enfin, des microsomes non induits correspondant majoritairement à des cytochromes 2C11 issus de rats mâles.

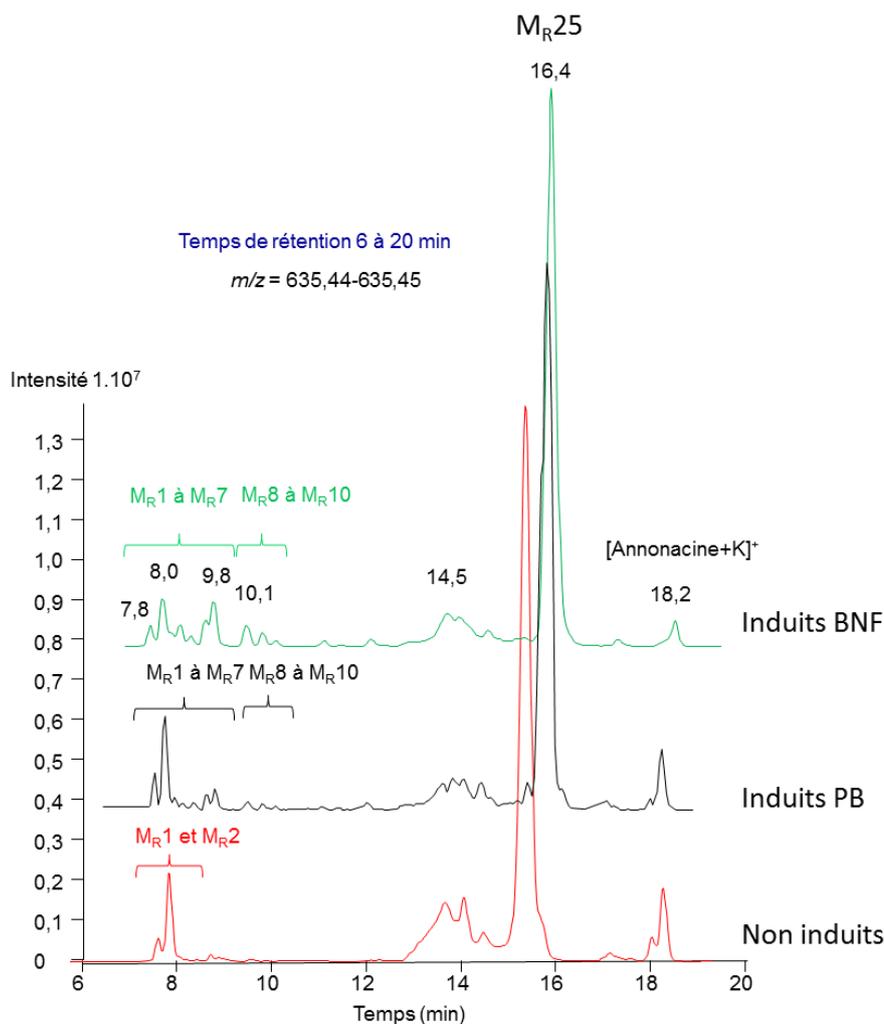


Figure 157 : Chromatogrammes obtenus après métabolisation par microsomes non induits, induits avec le PB ou la BNF

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°1 (voir Matériels et méthodes)

Les profils chromatographiques en SIM m/z 635,44-635,45, des trois types de microsomes ne montrent pas de différence significative pour les métabolites de polarité intermédiaire (**M_R13** à **M_R23**) et pour les métabolites apolaires (**M_R24** et **M_R25**). Le profil chromatographique des microsomes non induits montre une formation majoritaire des 2 métabolites les plus polaires (**M_R1** et **M_R2**) par rapport, aux autres métabolites polaires (**M_R3** à **M_R10**)⁷. En outre, le chromatogramme montrant la métabolisation par les microsomes induits avec la BNF montre une augmentation de la formation des métabolites les plus polaires (**M_R1** à **M_R10**) par rapport aux autres microsomes.

La formation des métabolites intermédiaires (**M_R11** à **M_R24**) et apolaires (**M_R25**) semblent être surtout métabolisés par le CYP 2C11 (Figure 157). Tandis que les métabolites polaires (**M_R1** à **M_R10**) seraient métabolisés chez le rat par les CYP de la famille des 1A.

4.2 Étude sur microsomes humains avec inhibiteurs spécifiques

Les microsomes humains forment 3 métabolites (**M_H1**, **M_H2** et **M_H3**). L'étude des cytochromes impliqués dans la métabolisation de phase 1 a été réalisée avec deux techniques complémentaires. La première correspond à l'incubation de l'annonacine avec des microsomes humains et des inhibiteurs spécifiques de certains isoformes de CYP450 (Tableau 104). Les CYP450 inhibés ne pourront ainsi plus former les métabolites et la comparaison avec des conditions sans inhibiteur permettra de déduire les CYP450 impliqués.

Les inhibiteurs utilisés sont spécifiques de CYP impliqués majoritairement dans la métabolisation des médicaments (Figure 148).

Inhibiteur	CYP Inhibés
Kétoconazole	3A4
Sulfaphénazole	2C9
Furafylline	1A2
Chlorydrate de Ticlopidine	2C19
Quinidine	2D6

Tableau 104 : Inhibiteurs de CYP employés et leur spécificité

⁷ Les différences de rétention des métabolites sont dues à un décalage chromatographique. La similitude des métabolites a été vérifiée par une co-injection et par des études de fragmentation.

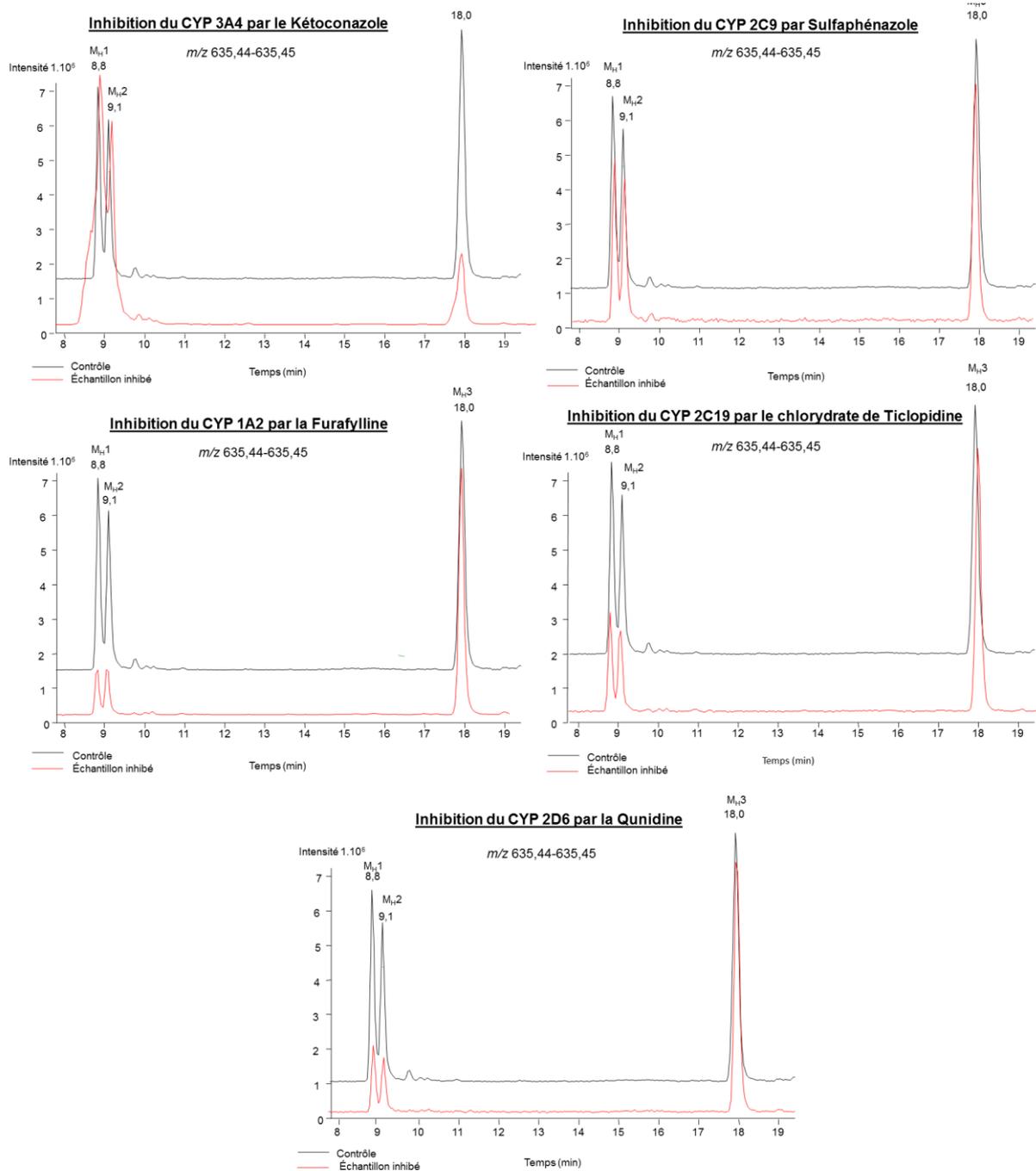


Figure 158 : Comparaison du chromatogramme d'un échantillon témoin et des chromatogrammes des échantillons inhibés par les différents inhibiteurs sélectifs

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

L'aire du métabolite le plus apolaire **M_{H3}** (tr = 17,9 min) diminue en présence de kétoconazole, montrant une grande probabilité de la formation de ce métabolite par le CYP3A4. La formation de ce métabolite n'est cependant pas totalement inhibée par l'inhibition du CYP3A4. Ce métabolite pourrait donc être métabolisé par d'autres CYP450, de manière moindre.

Les 2 métabolites polaires **M_{H1}** et **M_{H2}** (tr = 8,8 min et 9,1 min), voient leur formation diminuée par la furafylline, le chlorhydrate de ticlopidine et la quinidine. Cependant, la diminution est plus importante dans l'échantillon inhibé par la furafylline (Figure 158). Ces 2 métabolites seraient donc majoritairement formés par la famille 1A.

Afin de valider ces observations, une étude menée sur des cellules transfectées par des gènes différents de CYP450 a été réalisée.

4.3 Cytochromes transfectés

Les cellules Ad 293 (HEK 293) sont des cellules fœtales rénales humaines. Le modèle employé ici équivaut à des cellules transfectées avec du cDNA de CYP humain inséré dans le vecteur d'expression pMT2 puis sélectionnées pour former des clones stables, selon un protocole modifié de Chu et Sharp [Chu G. 1981]. Elles expriment différentes isoformes humaines de mono-oxygénases à cytochromes P450 : 3A4, 3A7, 2C9, 2C18, 2C19, 2B6, 1A1 et 1A2. De plus, afin que ceux-ci puissent être actifs, un gène de réductase a été associé. La désignation des lignées est Ad293-Red-CYPx, « CYPx » désignant le cytochrome transfecté. La lignée Ad293-Red correspondant à des cellules non transfectées avec les gènes de CYP est utilisée comme contrôle négatif. Ces lignées ont été préparées par l'équipe de Thierry Cresteil puis congelées à -80 °C dans de l'azote liquide.

Cette étude a donc été effectuée par incubation d'annonacine pendant 24 h à 37 °C dans des flacons de 1 mL dans du milieu de culture où les cellules sont à confluence.

4.3.1 Mise au point

Pour permettre une métabolisation optimale de l'annonacine par ces cellules, une étude préliminaire avec 4 concentrations finales de la molécule (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M et 75 μ M) a été réalisée sur des cellules Ad293-Red et Ad293-Red-CYP3A4. L'annonacine et ses métabolites sont ensuite récupérés par extraction L/L (V/V) par de l'AcOEt puis évaporés à sec sous azote.

En contact des cellules transfectées par le gène 3A4, une augmentation de l'aire du métabolite apolaire **M_H3** est visible surtout aux fortes concentrations (Figure 159). L'impureté évoquée précédemment identique au **M_R25** et par conséquent au **M_H3**, est toujours visible dans les échantillons négatifs. Cependant son aire est faible et stable par rapport aux aires du métabolite **M_H3** formé par le CYP3A4 des cellules transfectées. Sa formation n'est donc pas cytochrome-dépendante et le métabolite **M_H3** est bien un produit de métabolisation de l'annonacine.

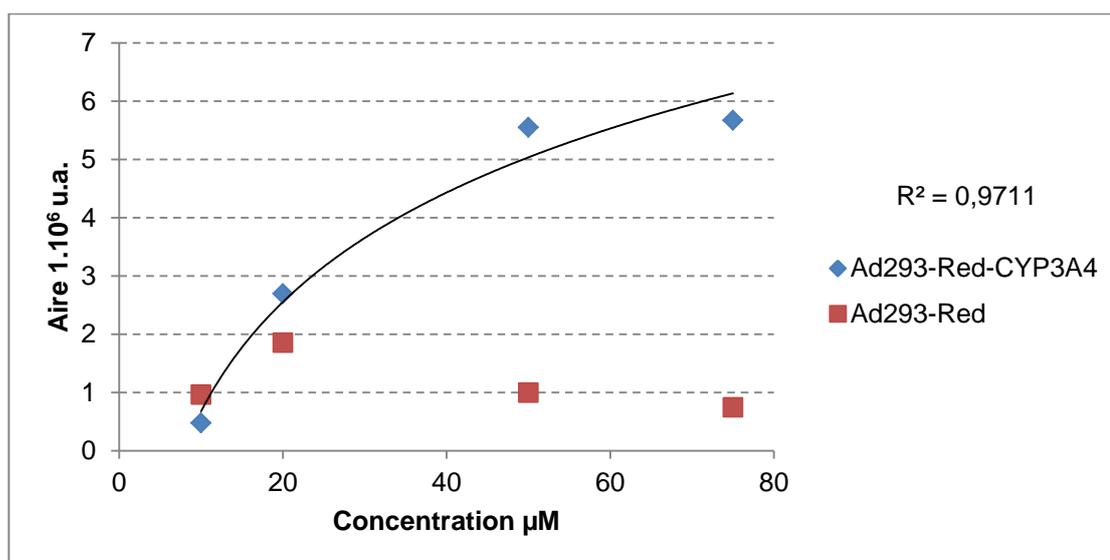


Figure 159 : Aire du métabolite **M_H3 en fonction de la concentration initiale en annonacine**

D'après les résultats précédents, la concentration de 75 μM initiale d'annonacine semble adéquate pour la poursuite des études sur cellules à cytochromes transfectées. Une seconde expérience effectuée en triplicat sur 3 types de cellules Ad293-Red, Ad293-Red-CYP3A4 et Ad293-Red-CYP3A7 a été réalisée afin de valider les conditions expérimentales.

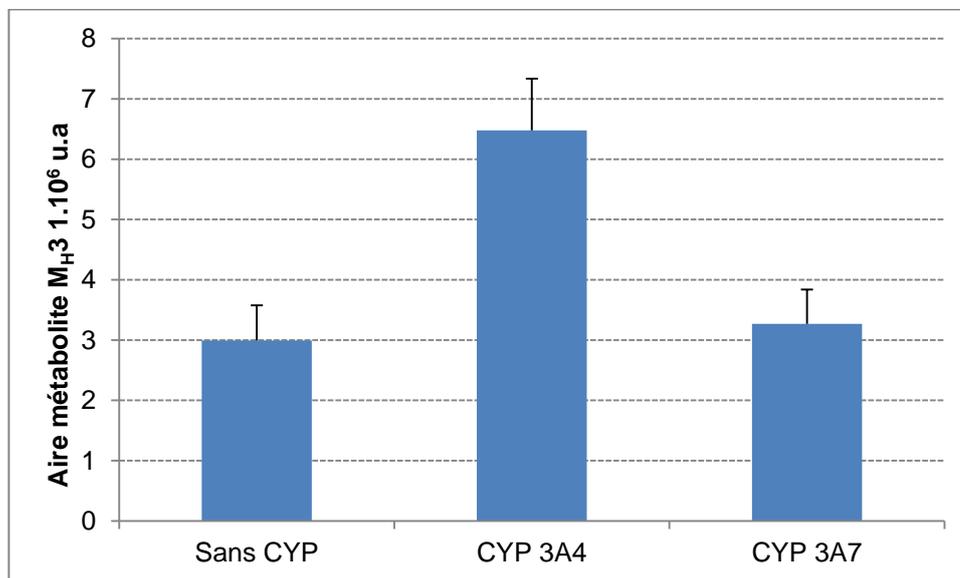


Figure 160 : Aire du métabolite M_{H3} en fonction de l'incubation par différentes cellules transfectées⁸

SEM (n = 3)

L'augmentation de l'aire du métabolite M_{H3} par les cellules transfectées Ad293-Red-CYP3A4 valide nos conditions de manipulations (Figure 160). Le métabolite M_{H3} serait entre autre formé par le CYP3A4 humain et ne le serait pas par le CYP3A7 ni dans les témoins négatifs correspondant aux cellules sans CYP.

4.3.2 Résultats

Les études ont été poursuivies par l'incubation de l'annonacine à 75 μM en présence des cellules transfectées par les cytochromes 3A4, 2D6, 2B6, 2C9, 2C19, 1A2 et 1A1.

Les métabolites polaires M_{H1} et M_{H2} ont été visibles uniquement dans les extraits obtenus par incubation de l'annonacine avec les cellules transfectées par les cytochromes 2C19, 1A2 et 3A4. Cependant, la formation des deux métabolites n'est pas exclusive et l'on remarque également la formation de tous les métabolites polaires visibles chez le rat (M_{R1} à M_{R10} désignés par M_{C1} à M_{C10} ⁹) (Figure 161). Les deux cytochromes 2C19 et 1A2, formeraient cependant en majorité les métabolites M_{H1} et M_{H2} comme le suggèrent les résultats obtenus sur microsomes humains, où les métabolites M_{R3} à M_{R10} sont en dessous du seuil de détection, dans nos conditions expérimentales.

⁸ Les aires des métabolites sans CYP et avec CYP 3A7 ne sont pas nulles en raison de la présence infime due à une impureté de même formule brute et de même temps de rétention dans la solution mère d'annonacine.

⁹ Ce code correspond aux métabolites formés par les cellules transfectées

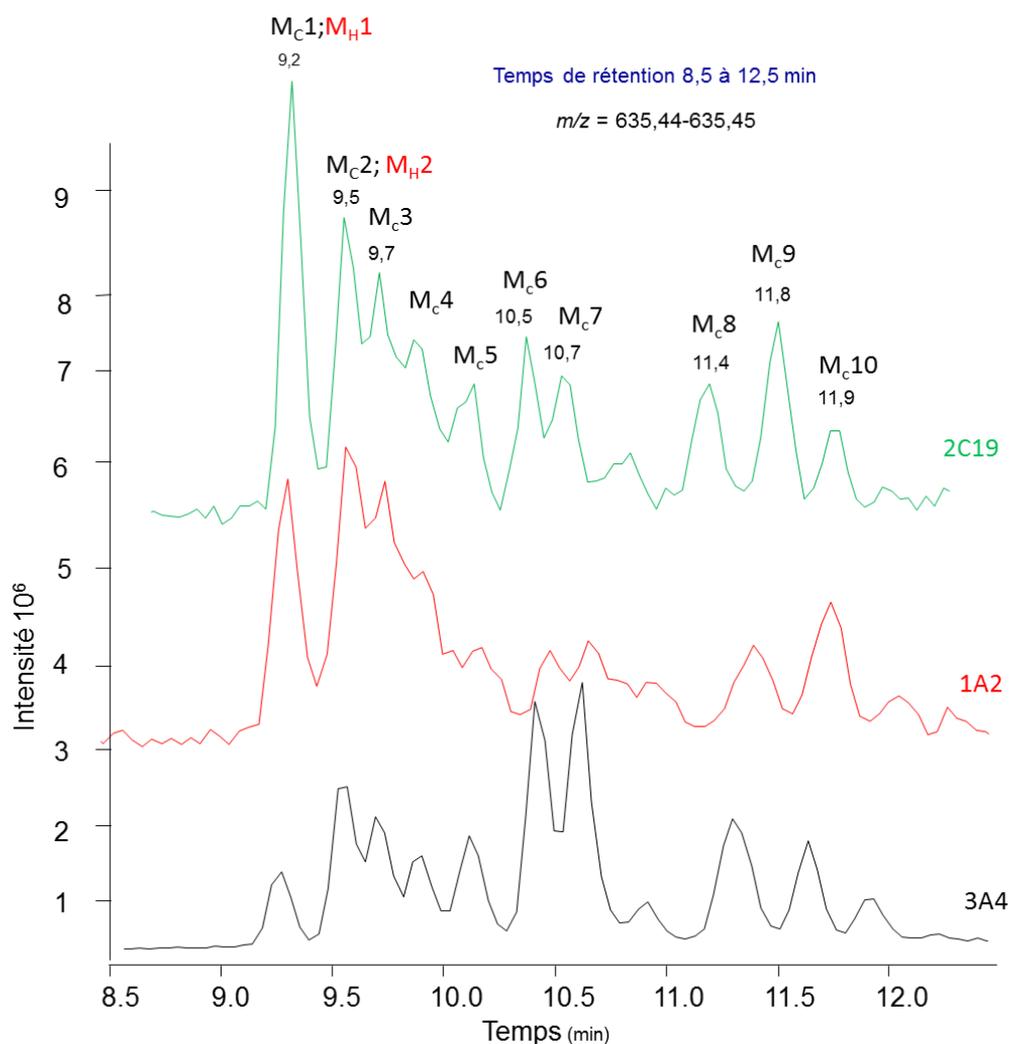


Figure 161 : Chromatogramme des métabolites polaires (M_C1 à M_C10) obtenus par les cellules transfectées Ad293-Red-CYP2C19 ; Ad293-Red-CYP1A2 et Ad293-Red-CYP3A4
 Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

Le cytochrome 3A4 semble ne pas être spécifique de la formation des métabolites polaires (M_C1 à M_C10) ou de polarité intermédiaire (M_C11 à M_C20) observés chez le rat, mais non détectables avec les microsomes humains. En effet, les chromatogrammes obtenus pour l'extrait équivalent à l'incubation de l'annonacine avec les cellules transfectées par le CYP 3A4 sont identiques aux chromatogrammes obtenus chez le rat.

Temps de rétention 8 à 21 min

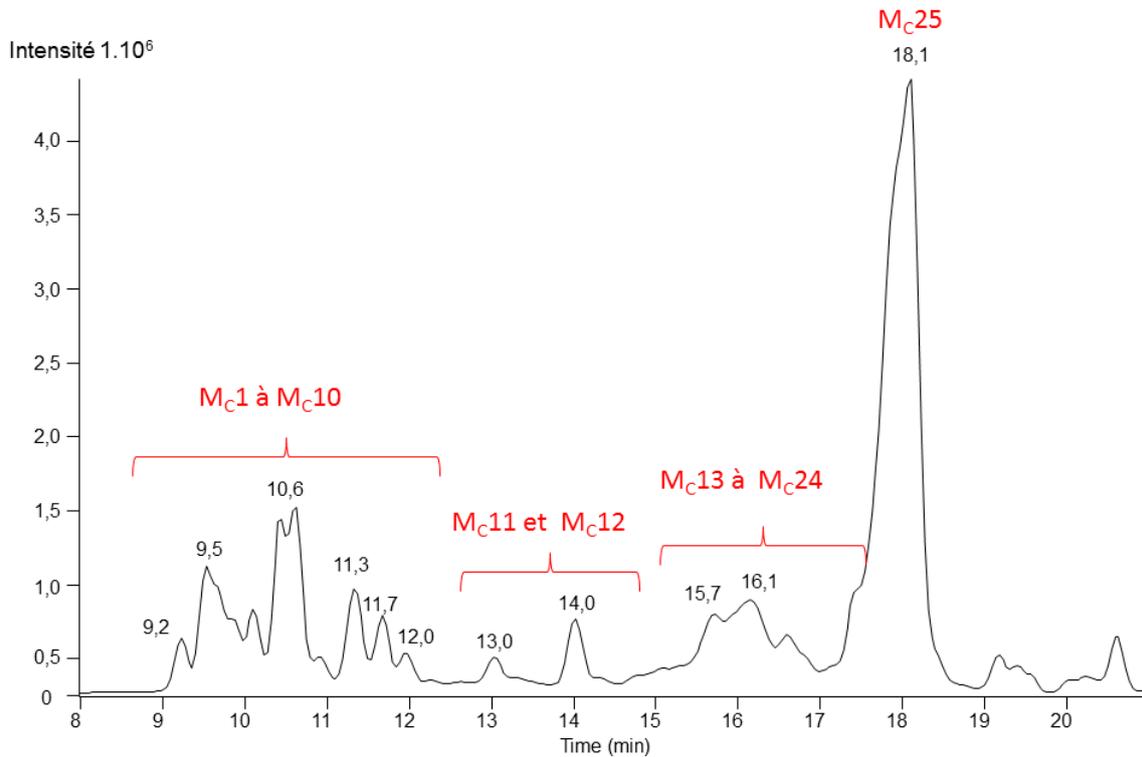
Intensité max. : $4,8 \cdot 10^6$ $m/z = 635,44-635,45$ 

Figure 162 : Chromatogramme des métabolites (M_C1 à M_C25) obtenus par les cellules transfectées Ad293-Red-CYP3C4

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

Les CYP 1A2 et 2C19 formeraient les métabolites polaires (M_C1 à M_C10). Le cytochrome 3A4 serait non spécifique et il formerait 25 (M_C1 à M_C25) métabolites. La différence entre les chromatogrammes obtenus par incubation de microsomes et les chromatogrammes obtenus après incubation avec les cellules transfectées révèle une activité des CYP manifestement plus importante dans le second cas, potentiellement liée à une faible proportion dans les préparations microsomales, ou encore révélatrice de phénomènes de compétition avec les autres CYP.

5. Étude structurale des métabolites par spectrométrie de masse

Les études structurales des métabolites ont été effectuées par ESI-LTQ-Orbitrap® en mode d'ionisation positif et négatif. Ce spectromètre nous permet d'enregistrer le spectre des fragments SM/SM en haute résolution et ainsi de déterminer leurs formules brutes avec des erreurs sur la mesure inférieures à 4 ppm. Pour simplifier les notations, un code a été déterminé : M correspond à la masse de l'annonacine et M+O la masse des métabolites.

5.1 Métabolites obtenus après incubation avec microsomes de rats

5.1.1 Mode positif

5.1.1.1 Molécules protonées

L'intensité de ces métabolites pour ce mode d'ionisation étant trop faible nous n'avons pas pu les fragmenter et donc aucune information structurale n'a pu être déterminée.

5.1.1.2 Molécules cationisées par le sodium

L'étude des fragments des molécules cationisées par le sodium (m/z 635,45) donne plus d'informations structurales que pour les protonées.

Métabolites les plus polaires (**M_R1 à M_R10**) et métabolites intermédiaires (**M_R11 à M_R23**)

Sur le spectre SM/SM de tous les métabolites (**M_R1 à M_R23**), seulement deux pertes d'eau ($[M+Na-H_2O]^+$; m/z 617,44) et $[M+Na-2H_2O]^+$; m/z 599,43) sont identifiées, comme pour l'annonacine, ne permettant pas la confirmation directe du nombre d'hydroxyle sur les métabolites. Les seuls autres ions fragments attribués sur les spectres sont : un fragment indiquant la perte de monoxyde de carbone à m/z 607,45 ($[M+O+Na-CO]^+$) ; une perte de dioxyde de carbone à m/z 591,46 ($[M+O+Na-CO_2]^+$) suivie d'une perte d'eau à m/z 573,45 ($[M+O+Na-CO_2-H_2O]^+$) et enfin une perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène à m/z 523,40 pour $[M+O+Na-C_6H_8O_2]^+$.

L'ion m/z 523,40 (X5), issu de la perte de la lactone, permet de positionner l'hydroxylation supplémentaire au niveau de la chaîne aliphatique après l'hydroxyle en C-4, et non pas sur la lactone ou en position C-3 sur la chaîne aliphatique (Figure 163).¹⁰

¹⁰ Seules les masses monoisotopiques à deux décimales sont données ici. Toutes les formules brutes sont données avec une précision ≤ 4 ppm.

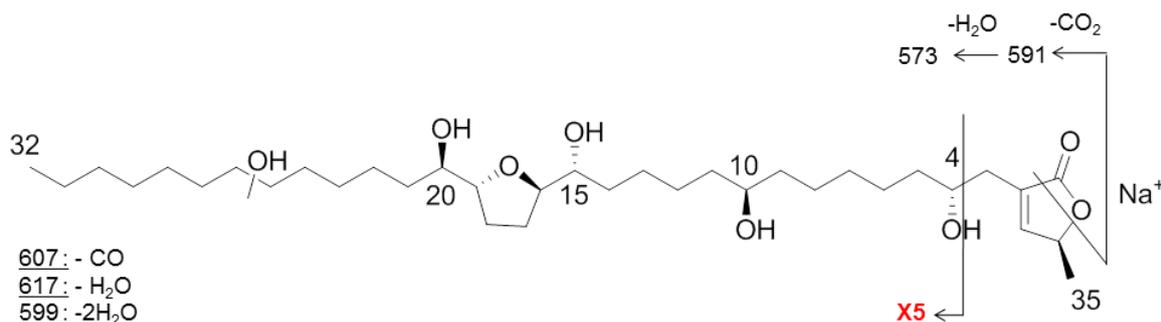


Figure 163 : Fragmentation des ions $[M+O+Na]^+$ des métabolites polaires (M_{R1} à M_{R10}) et des métabolites intermédiaires (M_{R11} à M_{R23})

Sur le spectre SM/SM des métabolites (M_{R24} et M_{R25}), comme pour les autres métabolites et l'annonacine, seulement deux pertes d'eau sont décrites ($[M+Na-H_2O]^+$; m/z 617,44) et $[M+Na-2H_2O]^+$; m/z 599,43). Une perte de monoxyde de carbone à m/z 607,45 ($[M+O+Na-CO]^+$), une perte de dioxyde de carbone m/z 591,46 ($[M+O+Na-CO_2]^+$) suivie d'une perte d'eau m/z 573,45 ($[M+O+Na-CO_2-H_2O]^+$) sont aussi mises en évidence.

La seule différence pour ces métabolites (M_{R24} et M_{R25}), par rapport aux autres métabolites (M_{R1} à M_{R23}), est la perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène, conduisant à un ion m/z 507,40, de formule brute $[M+Na-C_6H_8O_3]^+$. En effet, ce fragment a une différence de 16 u.m.a par rapport aux autres métabolites (M_{R1} à M_{R23}). Par conséquent ces métabolites apolaires (M_{R24} et M_{R25}) ont le même fragment de perte de la lactone (X4) que celui de l'annonacine à m/z 507,40 permettant donc de positionner l'hydroxylation supplémentaire (ou l'époxydation) au niveau de la lactone (Figure 164) ou en position C-3 de la chaîne aliphatique.

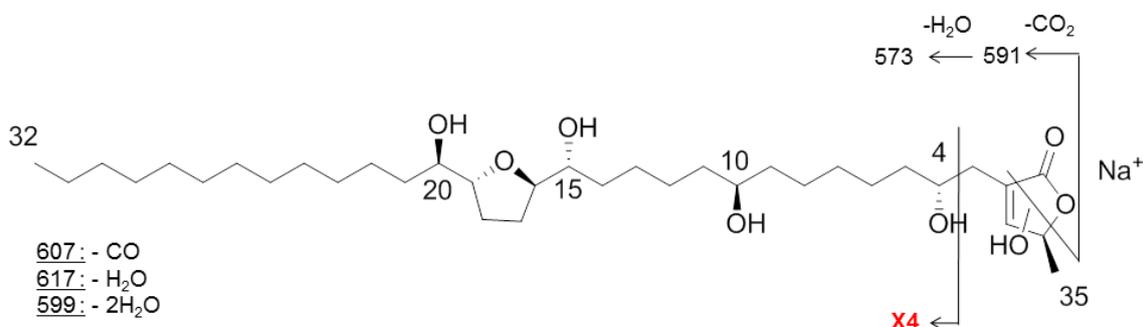


Figure 164 : Fragmentation des ions $[M+O+Na]^+$ des métabolites apolaires (M_{R24} à M_{R25})

L'hypothèse d'une époxydation au niveau de la lactone ou de l'hydroxylation en C-33 pour les deux métabolites M_{R24} et M_{R25} est peu probable. En effet, le mécanisme de fragmentation conduisant à l'ion X4 nécessite la formation d'une double liaison (Figure 165), il est donc peu probable que le mécanisme soit possible avec un époxyde ou un hydroxyle en C-33. De plus, pour tous les métabolites M_{R1} à M_{R23} et M_{R25} le fragment X5 ou X4 est le pic de base. L'ion X4 du métabolite M_{R24} a une intensité relative plus faible (70 %). Cette fragmentation étant favorisée par un mécanisme comprenant la double liaison en C-2, C-33 et l'hydroxyle en C-4, la diminution de l'intensité de ce fragment pourrait être due au positionnement d'un hydroxyle en C-3. Les hypothèses

d'une hydroxylation au niveau du C-3 pour le métabolite **M_R24** ou au niveau de la lactone du C-34 ou C-35 pour le métabolite **M_R25** semblent donc être les plus probables.

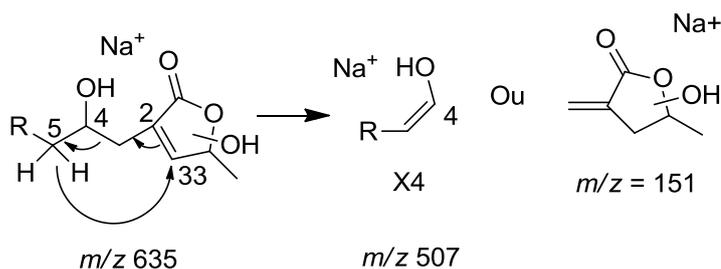


Figure 165 : Perte de la lactone et formation du fragment X4 des métabolites **M_R24 et **M_R25****

5.1.2 Mode négatif

L'ionisation en mode négatif de l'annonacine et de ses métabolites étant peu favorisée, le mode d'ionisation négatif nous permet seulement d'observer les métabolites majoritaires ou les plus acides : l'ion $[M-H]^-$ à m/z 611,45 correspond aux métabolites **M_R1**, **M_R2** et **M_R25**. Sur leur spectre SM/SM comme pour l'annonacine seulement une perte d'eau est visible ($[M+O-H-H_2O]^-$; m/z 593,44) ne permettant pas donc de différencier l'annonacine de ses métabolites.

Métabolite polaires **M_R1** et **M_R2**

Les spectres des ions SM/SM $[M+O-H]^-$ indiquent une perte de dioxyde de carbone (ion à m/z 567,46 $[M+O-H-CO_2]^-$) suivie d'une perte d' H_2O (m/z 549,44 $[M+O-H-CO_2-H_2O]^-$) ayant une différence de 16 u.m.a avec l'annonacine. La perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène à m/z 483,41, très faiblement détectée sur le spectre de l'annonacine $[M-H-C_6H_8O_2]^-$, n'est pas observée sur le spectre de ces deux métabolites (soit $C_{29}H_{55}O_6^-$ à m/z 499,40) en raison sûrement de la faible intensité globale des spectres SM/SM.

Deux ruptures du cycle THF ayant une différence de 16 u.m.a. par rapport à l'annonacine ($[C_{14}H_{27}O_3]^-$: m/z 243,20 et $[C_{15}H_{27}O_3]^-$: m/z 255,20) sont obtenues pour **M_R1** et **M_R2**, indiquant que la partie entre le THF et la lactone de ces métabolites n'a pas subi d'oxydation. De plus, une rupture autour du groupement hydroxyle en position C-10 (X4: m/z 399,31) confirme la position de l'hydroxylation des métabolites (**M_R1** et **M_R2**) entre le carbone C-21 et C-32 (Figure 166).

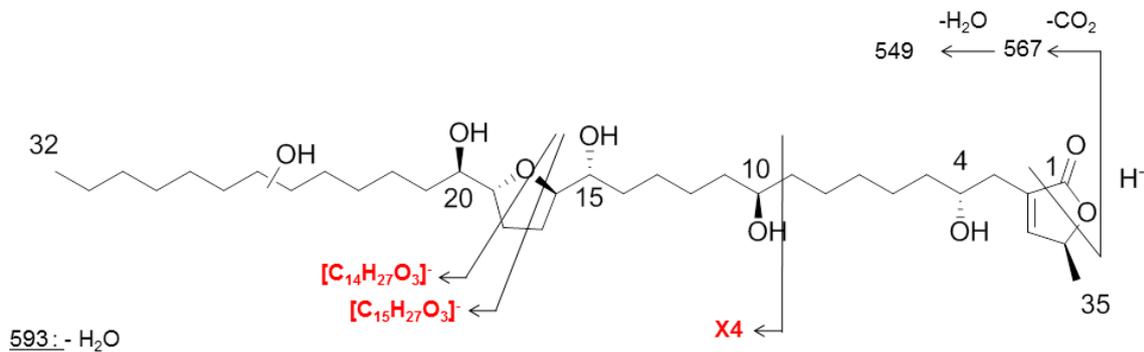


Figure 166 : Fragmentation des ions $[M+O-H]^-$ des métabolites polaires (M_{R1} à M_{R2})

Métabolite apolaire M_{R25}

Le spectre SM/SM $[M+O-H]^-$ du métabolite M_{R25} indique la présence d'un fragment associé à une perte de dioxyde de carbone et une perte d'eau (m/z 549,44 $[M+O+H-CO_2-H_2O]$) ayant une différence de 16 u.m.a par rapport au fragment équivalent de l'annonacine. La perte du dioxyde de carbone seule n'est pas observée contrairement aux autres métabolites M_{R1} et M_{R2} . Le positionnement d'un hydroxyle en C-34 ou C-35 pourrait favoriser cette fragmentation en raison d'une perte plus favorable de l'hydroxyle au niveau de la lactone.

De plus, la perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène (X4) à m/z 483,41 $[M+O-H-C_6H_8O_2]$ ainsi qu'une rupture autour du groupement hydroxyle en position C-10 (X3: m/z 383,32) sont visibles sur le spectre SM/SM du métabolite M_{R25} et sont identiques à celles de l'annonacine déprotonée. Ces différents fragments nous permettent de valider nos hypothèses et de positionner l'hydroxyle du métabolite M_{R25} en position C-34 ou C-35 sur la lactone (Figure 167).

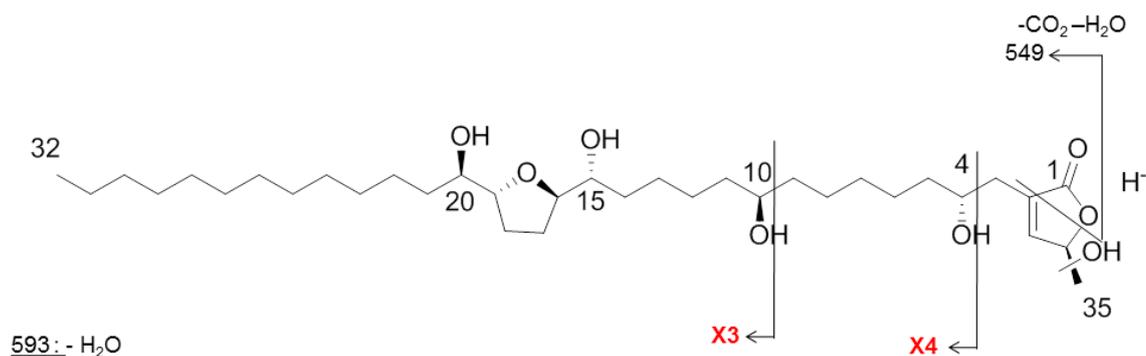


Figure 167 : Fragmentation des ions $[M+O-H]^-$ du métabolite le plus apolaire (M_{R25})

5.1.3 Molécules cationisées par le lithium

L'étude de la fragmentation des molécules cationisées par le lithium $[M+O+Li]^+$ à m/z 619,47 fournit des informations structurales plus précises que les modes précédents sur l'emplacement des hydroxyles des différents métabolites.

Sur le spectre SM/SM des métabolites (**M_R1** à **M_R23**), quatre pertes d'eau ($[M+Li-H_2O]^+$; m/z 601,46 ; $[M+Li-2H_2O]^+$; m/z 583,45 ; $[M+Li-3H_2O]^+$; m/z 565,44 ; m/z 547,43 $[M+Li-4H_2O]^+$) sont clairement identifiées comme dans le cas de l'annonacine. Cette information ne nous permet donc pas de déterminer le nombre d'hydroxyles sur les métabolites.

Les mêmes voies de fragmentation sont obtenues sur les différents spectres SM/SM des molécules cationisées par le lithium que pour celles cationisées par le sodium : la perte de monoxyde de carbone à m/z 591,48 ($[M+O+Li-CO]^+$), une perte de dioxyde de carbone m/z 575,49 ($[M+O+Li-CO_2]^+$) suivie de trois pertes d' H_2O ($(m/z$ 557,47 ; $[M+O+Li-CO_2-H_2O]^+$) ; $(m/z$ 539,46 $[M+O+Li-CO_2-2H_2O]^+$) ; m/z 521,45 $[M+O+Li-CO_2-3H_2O]^+$) et une perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène à m/z 507,42 $[M+O+Li-C_8H_6O_2]^+$ suivie d'une perte d' H_2O (m/z 489,41 $[M+O+Li-C_8H_6O_2-H_2O]^+$).

Les spectres de fragmentation des molécules cationisés par le lithium, plus riches en fragments informatifs, nous ont permis de classer les métabolites en 4 groupes ayant des spectres de masse différents :

- les métabolites polaires de **M_R1** à **M_R8** ;
- les métabolites polaires de **M_R9** à **M_R12** ;
- le métabolite intermédiaire **M_R13** ;
- les métabolites intermédiaires **M_R14** à **M_R23** ;
- les métabolites apolaires **M_R24** et **M_R25**.

Métabolites les plus polaires (**M_R1** à **M_R8**)

L'ion à m/z 507,42 (X5), issu de la rupture en β de la lactone, permet de positionner l'hydroxylation supplémentaire au niveau de la chaîne aliphatique après l'hydroxyle en C-4, et non pas sur la lactone ou en position C-3 sur la chaîne aliphatique.

Une rupture du cycle THF identique à celle de l'annonacine (B1-2H : m/z 359,24) suivie de sa perte d'eau (B1-2H- H_2O : m/z 341,23) pour $[M+O+Li]^+$ est décrite permettant de valider notre hypothèse que la partie entre le THF et la lactone des métabolites (**M_R1** à **M_R8**) ne porte pas d'hydroxyle. De plus, une rupture autour des groupements hydroxyle en position C-10 (X4 : m/z 407,43) et C-15 (X3 : m/z 321,26) nous permet de positionner l'hydroxylation des métabolites (**M_R1** à **M_R8**) entre les carbones C-21 et C-32. (Figure 168).

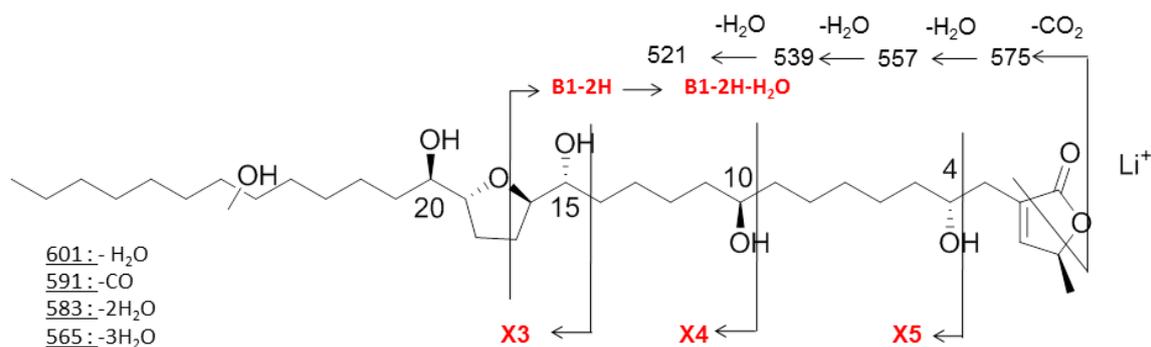


Figure 168 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ des métabolites polaires (M_R1 à M_R8)

Métabolites polaires M_R9 à M_R12

L'ion à m/z 507,42 (X5), issu de la rupture en β de la lactone, est également détecté pour les métabolites M_R9 à M_R12 , permettant de positionner l'hydroxylation supplémentaire au niveau de la chaîne aliphatique après l'hydroxyle en C-4, et non pas sur la lactone ou en position C-3 sur la chaîne aliphatique.

Aucun fragment identique à ceux observés pour l'annonacine cationisée par le lithium (B1, X4, X3 ou X2) n'est observé pour les métabolites M_R9 à M_R12 . Néanmoins, deux fragments A4 (m/z 433,27) et A4-H₂O (m/z 415,27) correspondant à la rupture en α de l'hydroxyle en C-20 sont identifiables. Ces deux fragments montrent que ces métabolites sont hydroxylés avant le THF, c'est à dire entre C-21 et C-32. On remarquera que ces fragments n'étaient pas visibles sur les spectres des métabolites les plus polaires (M_R1 à M_R8).

De plus, sur les spectres SM³ de l'ion X5, une rupture du cycle THF identique à celle observée pour l'annonacine (B1-C₆H₈O₂; m/z 249,20 ; B1-2H-C₆H₈O₂; m/z 247,19) pour l'ion parent $[M+O+Li]^+$ confirme que la partie entre le THF et la lactone de ces métabolites n'a pas non plus subi d'hydroxylation. Les métabolites M_R9 à M_R12 seraient donc des métabolites ayant un hydroxyle proche du C-20 (par exemple C-21 ; C-22 ; C-23) (Figure 169).

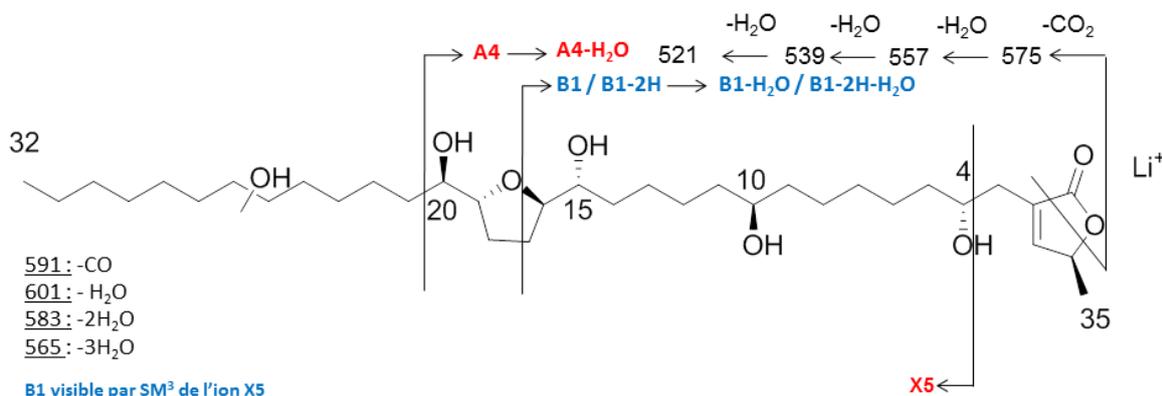


Figure 169 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ des métabolites polaires (M_R9 à M_R12)

Métabolites M_R13

Seul le fragment X5 est observé pour le métabolite M_R13 , correspondant à une perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène à m/z 507,42 $[M+O+Li-C_8H_6O_2]^+$. Néanmoins, en sélectionnant puis fragmentant l'ion X5, on obtient deux fragments : une rupture du cycle THF équivalent à B1-2H- $C_6H_8O_2$ (m/z 247,19) et un fragment équivalent à A3- C_6H_8O (m/z 221,17) correspondant à la rupture en α de l'hydroxyle en C-15, identiques à l'annonacine. Ces deux fragments montrent que ce métabolite M_R13 est hydroxylé avant le THF, c'est à dire entre C-21 et C-32 (Figure 170).

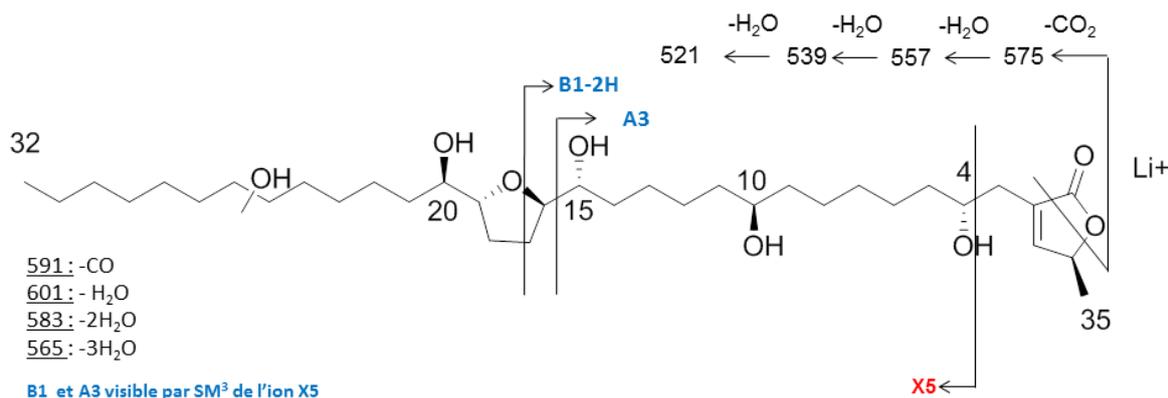


Figure 170 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ du métabolite intermédiaire (M_R13)

Métabolites intermédiaires (M_R14 à M_R23)

Pour ces métabolites co-élués, les spectres SM/SM montrent tous une rupture en β de la lactone (X5 ; m/z 507,42), et une rupture du cycle THF identique à celle observée pour l'annonacine (B1-2H : m/z 375,23) suivie de sa perte d'eau (B1-2H- H_2O : m/z 357,22). Ceci permet de placer l'hydroxyle supplémentaire issu de la métabolisation entre le THF et le carbone en C-4.

De plus, une rupture en α du groupement hydroxyle en position C-15 (X2 : m/z 305,27), nous permet de positionner l'hydroxyle des métabolites (M_R14 à M_R23) entre le carbone C-4 et C-15. L'analyse des différents fragments X3 (M_R14 à M_R18) ou X4 (M_R19 à M_R23) (Figure 171) permet de placer les hydroxyles, mettant en évidence une certaine corrélation entre la position des hydroxyles et les temps de rétention.

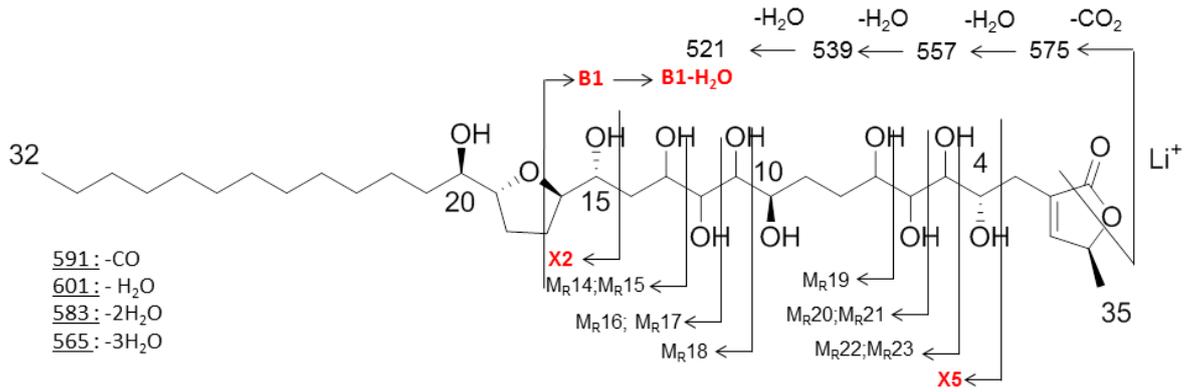


Figure 171 : Fragmentation des ions $[M+O+Li]^+$ des métabolites intermédiaires (M_R14 à M_R23)

Cependant, des métabolites avec des fragments X3 ou X4 identiques sont retrouvés à deux temps de rétention différents, indiquant la présence d'épimères distinguables dans nos conditions chromatographiques après extraction des ions correspondant aux fragments d'intérêt (Figure 172). Nous n'avons pas pu valider cette hypothèse au cours de cette thèse.

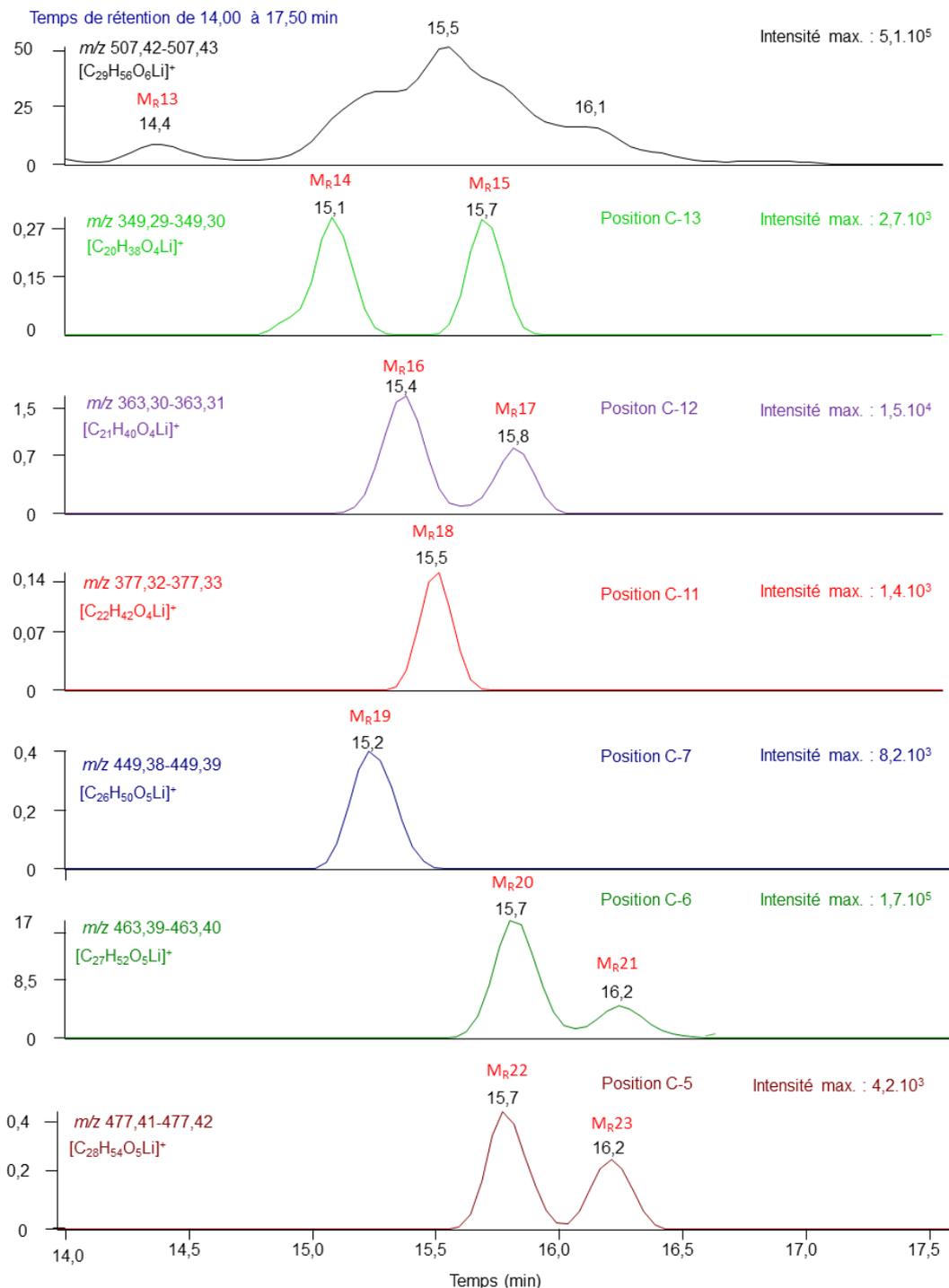


Figure 172 : Chromatogrammes des ions extraits des fragments X3 et X4 permettant de positionner les hydroxyles des métabolites intermédiaires MR14 à MR23

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

Métabolites les plus apolaires (**M_R24** et **M_R25**)

Pour ces deux métabolites, une perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène X4 (m/z 491,43) identique à celle vue pour l'annonacine est observée (Figure 173). L'intensité du fragment X4 pour le métabolite **M_R24** est, comme en mode négatif, de 40 % par rapport au métabolite **M_R25** où l'intensité relative est de 100 %. Aucun autre fragment n'est visible sur les spectres. Néanmoins, lors de l'étude SM³ du fragment X4, une rupture du cycle THF identique à celle de l'annonacine (B1- C₆H₈O₃ : m/z 249,20 ; B1-2H- C₆H₈O₃ : m/z 247,19) est identifiée permettant de valider que l'hydroxyle de la métabolisation est placé sur la lactone.

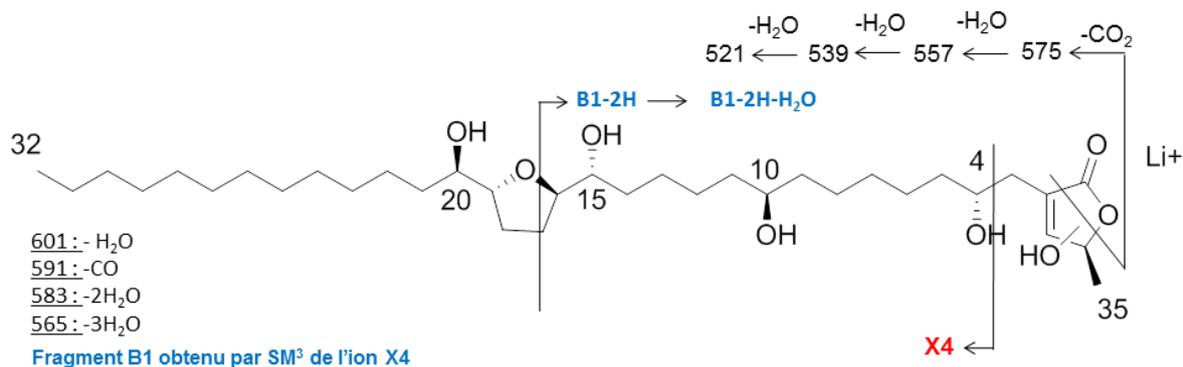


Figure 173 : Fragmentation des ions [M+O+Li]⁺ des métabolites apolaires (M_R24** et **M_R25**)**

5.2 Métabolites obtenus après incubation avec des microsomes humains

Au vu des résultats des analyses des échantillons de métabolisation chez le rat, les échantillons obtenus par incubation avec des microsomes humains ont été directement analysés par CLHP-ESI-Orbitrap[®] avec infusion de lithium en post-colonne.

Les fragments observés pour **M_H1**, **M_H2** et **M_H3** sont les mêmes que ceux des métabolites correspondant obtenus par incubation par des microsomes de rats (**M_R1**, **M_R2** et **M_R25**) : quatre pertes d'eau ([M+Li-H₂O]⁺ m/z 601,46 ; [M+Li-2H₂O]⁺ m/z 583,45 ; [M+Li-3H₂O]⁺ m/z 565,44 ; [M+Li-4H₂O]⁺ m/z 547,43 ; m/z 547,43), la perte de monoxyde de carbone à m/z 591,48 ([M+O+Li-CO]⁺), une perte de dioxyde de carbone à m/z 575,49 ([M+O+Li-CO₂]⁺) suivie de trois pertes d'H₂O ((m/z 557,47 ; [M+O+Li-CO₂-H₂O]⁺) ; (m/z 539,46 [M+O+Li-CO₂-2H₂O]⁺) ; m/z 521,45 [M+O+Li-CO₂-3H₂O]⁺)).

5.2.1 Métabolites les plus polaires (**M_H1** et **M_H2**)

L'ion à m/z 507,42 (X5), issu de la rupture en β de la lactone, permet de positionner l'hydroxylation supplémentaire au niveau de la chaîne aliphatique après l'hydroxyle en C-4, et non pas sur la lactone ou en position C-3 sur la chaîne aliphatique, comme pour les métabolites polaires (**M_R1** et **M_R2**) chez le rat. Une rupture du cycle THF (m/z 359,24 : B1-2H) pour [M+O+Li]⁺ est observée permettant d'affirmer l'hypothèse que l'hydroxylation n'a pas été effectuée entre C-15 et C-4. De plus, une rupture autour des groupements hydroxyle en position C-10 (X4 : m/z 407,33) et C-15 (X3 : m/z 321,40) nous permet de valider notre hypothèse (Figure 168).

5.2.2 Métabolite le plus apolaire (**M_H3**)

Une perte de la lactone par rupture β avec transfert d'hydrogène à m/z 491,43 (X4) est observée comme pour le métabolite le plus apolaire (**M_R25**) obtenu après incubation d'annonacine avec des microsomes de rats (Figure 173). L'hydroxylation a donc été effectuée au niveau de la lactone ou sur le carbone en α de la lactone.

En conclusion, les trois métabolites humains seraient identiques aux métabolites « majoritaires » du rat. Les deux plus polaires (**M_H1** et **M_H2**) ont leur hydroxyle en bout de chaîne aliphatique tandis que le métabolite le plus apolaire (**M_H3**) a son hydroxyle au niveau de la lactone.

L'absence de fragment X1 (**M_H1** et **M_H2**) et l'impossibilité d'obtenir des ions fragments à $m/z \leq 200$ (**M_H3**) ne permettent pas de donner la structure exacte des métabolites par analyse SM/SM (Figure 174). Le recours à la spectroscopie RMN est donc obligatoire. Cependant, cette technique nécessite une quantité suffisante de métabolites purifiés (≈ 1 mg) pour permettre cette identification. L'obtention des métabolites par incubation de microsomes étant inenvisageable en raison de la nécessité d'une quantité importante de microsomes et du rendement de métabolisation trop faible, l'hémisynthèse à partir d'annonacine apparaissait donc comme la seule solution.

6. Hémisynthèse des métabolites

Dans cette partie, une présentation des méthodes utilisées pour obtenir des métabolites hydroxylés est proposée [Estour F. 2003]. Dans un second temps, les travaux effectués au cours de cette thèse *via* deux approches et les résultats obtenus seront présentés

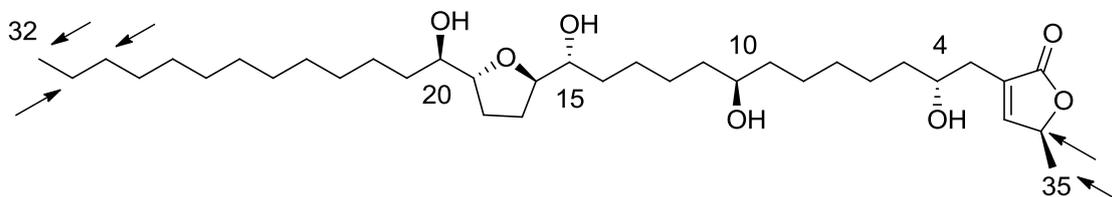


Figure 174 : Emplacement hypothétique des hydroxylations des métabolites humains

6.1 Hydroxylation d'une chaîne aliphatique et d'une lactone

6.1.1 Chimie organique classique

L'introduction de fonction alcools en une étape sur un composé chimique complexe est difficile. La synthèse totale est souvent employée, malgré les inconvénients qu'elle implique : étapes multiples, synthèse potentiellement longue et rendements parfois faibles.

La synthèse d'acétogénines est une thématique ancienne dans notre laboratoire qui nécessite de nombreuses étapes, à de très faibles rendements et présente de nombreuses difficultés dues aux nombreux carbones asymétriques [Oasa M. 2010, Hu T.S. 2001, 2000, Kojima N. 2009]. Cette méthode n'est donc pas envisageable pour cette étude.

6.1.2 Électrochimie

L'électrochimie (EC) est une méthode permettant d'induire des réactions d'oxydation. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour produire ou prévoir la formation de métabolites d'un médicament grâce à cette technique. Un grand intérêt de cette méthode est la possibilité de relier en série un appareil d'électrochimie et un appareil analytique comme une CLHP et / ou un analyseur de masse. Les proportions entre les différents métabolites sont fonction du potentiel appliqué, de la concentration de l'analyte et du débit. Ainsi, il est possible de choisir soit la formation d'un métabolite préférentiel, soit un mélange de tous les produits d'oxydation possibles.

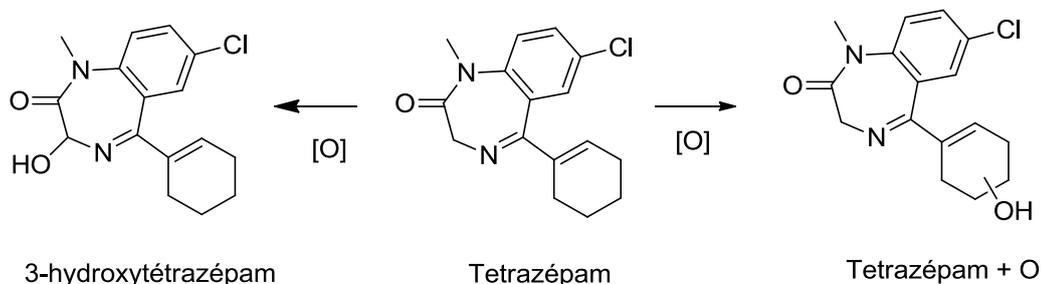


Figure 175 : Exemple de production de métabolites hydroxylés par électrochimie

Cette méthode d'oxydation permet l'obtention, notamment de composés hydroxylés, et a été mise à profit dans l'obtention de métabolites oxygénés à partir du tétrazepam (Figure 175) [Bauman A. 2009].

6.1.3 Catalyse biomimétique par squelette de type porphyrinique

Une autre stratégie consiste à employer des catalyseurs biomimétiques inspirés des systèmes enzymatiques et plus particulièrement de l'hème des mono-oxygénases à cytochromes P450.

Des dérivés hémiques variés associés à un métal, le plus souvent le fer, en conditions oxydantes (le plus souvent avec ajout de H_2O_2), permettent de former des métabolites à partir de substrats divers, parfois avec de bons rendements. Le cycle catalytique mis en jeu se rapproche très étroitement du mécanisme du CYP450 (Figure 176, Figure 177).

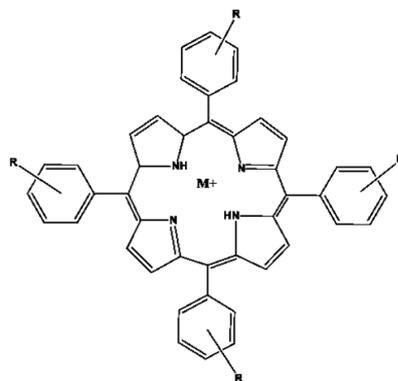


Figure 176 : Dérivés hémiques

Au repos, le fer du catalyseur est au même état d'oxydation que l'hème des cytochromes P450 (état d'oxydation (+III)) **(1)**. Après fixation du substrat, un premier électron venant d'un partenaire redox permet la réduction du fer à l'état ferreux **(2)**. Une molécule d'oxygène est alors fixée **(3)** et un second électron est apporté, ce qui permet la formation d'un hydroperoxyde de fer **(4)**. L'apport de deux protons permet l'élimination d'un atome d'oxygène sous la forme d'une molécule d'eau **((5) et (6))**. Le fer forme alors un complexe fer-oxo à haut degré d'oxydation (composé I). Enfin, le second atome d'oxygène est transféré sur le substrat **(8)** qui est alors libéré et le fer revient à l'état ferrique. On obtient donc l'introduction d'une nouvelle fonction oxygénée sur le substrat de l'enzyme.

L'ajout du peroxyde en contact du catalyseur porphyrinique permet directement d'aller au stade de la formation d'hydroperoxyde de fer (composé 0) et de simplifier ce cycle catalytique.

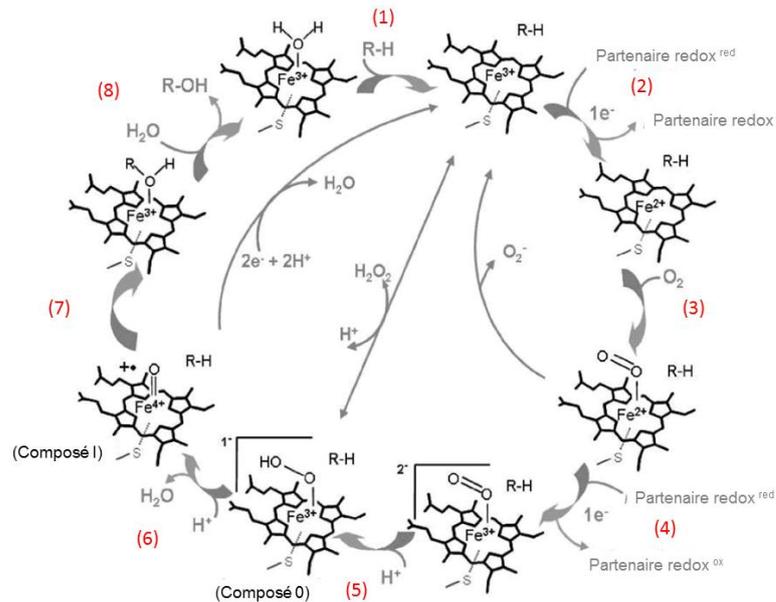


Figure 177 : Exemple d'un cycle catalytique avec catalyseur porphyrinique associé au fer

* Pour simplifier le cycle les azotes des hèmes n'ont pas été écrits

D'autre part, cette technique est rapide et se déroule souvent en une seule étape. Cependant, il est difficile de prévoir le comportement d'un catalyseur face à un substrat donné, et cette méthode peut largement manquer de sélectivité. Les conditions d'oxydation doivent être maîtrisées, car les produits d'oxygénation peuvent être aussitôt oxydés au cours de la même réaction. Il s'agit d'un phénomène de suroxydation. [Mansuy D. 2007].

6.1.4 Biotechnologies

L'utilisation des biotechnologies est aujourd'hui la méthode de choix des laboratoires pharmaceutiques pour l'étude des métabolites.

Les microsomes hépatiques ont été souvent utilisés pour l'étude de la métabolisation des médicaments. Cependant, ce système a montré ses limites en raison de l'épuisement rapide de cofacteurs indispensables au bon fonctionnement des cytochromes et cette méthode n'est pas adaptée à des fins préparatives [Estour F. 2003].

Les progrès des biotechnologies permettent d'obtenir des cellules de bactéries comme *Escherichia coli* ou champignons comme *Schizosaccharomyces pombe* surexprimant des CYP450 par transformation par des plasmides codant pour les gènes correspondant. [Yim S-K. 2006, Peters F. T. 2007]. Cette technique peut permettre des synthèses de métabolite avec de bons rendements et parfois une grande spécificité.

6.1.5 Bioconversion

L'utilisation de microorganismes (champignons ou bactéries), mettant à profit leur machinerie enzymatique, est couramment utilisée pour simuler la métabolisation des xénobiotiques chez les mammifères. Les avantages de cette méthode d'hémisynthèse sont sa sélectivité énantiomérique et sa régio-sélectivité dans des conditions douces. En effet, les manipulations sont effectuées en milieu aqueux à pH non extrême et généralement à 37°C [Smith R. V. 1983, Moussa C. 1997, Ouarradi A. E. 2008].

Les micromycètes et plus particulièrement le genre *Cunninghamella* sont souvent utilisés pour mimer la métabolisation humaine : plusieurs publications montrent le potentiel de ces champignons comme par exemple pour l'obtention d'un métabolite humain du mestranol [De Carvalho C. 2006, Asha S. 2009].

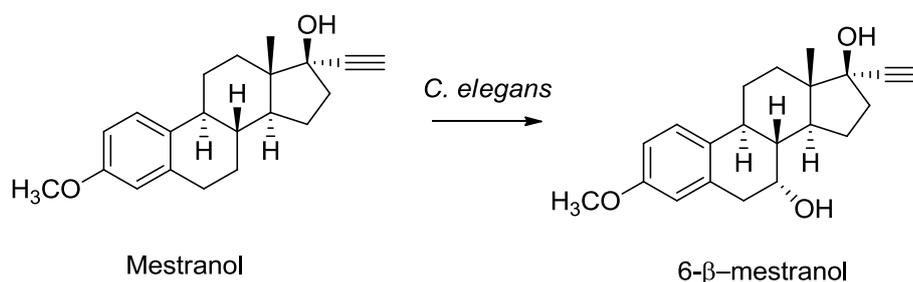


Figure 178 : Bioconversion du mestranol par *Cunninghamella elegans*

En revanche, l'extraction des métabolites formés nécessite de grandes quantités de solvants et plusieurs cycles d'extraction et de lavage pour isoler le produit. Les périodes d'incubation sont souvent longues, parfois plusieurs jours.

En conclusion, deux méthodes correspondraient le mieux à nos attentes, en terme qualitatif et quantitatif : la bioconversion par micromycètes et la catalyse biomimétique

6.2 Travaux personnels

6.2.1 Bioconversion

Les études de bioconversion ont été dirigées par le Dr. Didier Buisson, au laboratoire « Molécules de communication et adaptation des microorganismes » (MCAM), UMR 7245 CNRS/MNHN, au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Au début de cette étude, un criblage de différents micromycètes, choisis par le Dr. Buisson, pouvant potentiellement hydroxyler la chaîne aliphatique ou la lactone, a été mis en place (Tableau 105).

Famille	Genre	Espèce	Souche
Mucoraceae	<i>Absidia</i>	<i>Absidia corymbifera</i>	LCP 63-1800
Mucoraceae	<i>Absidia</i>	<i>Absidia blakeeslena</i>	ATCC 22 617
Mucoraceae	<i>Actinomucor</i>	<i>Actinomucor elegans</i>	LCP 70 2092
Cunninghamellaceae	<i>Cunninghamella</i>	<i>Cunninghamella echinulata</i>	ATCC 9245
			LCP 70 2092
			LCP 73 2203
Umbelopsidaceae	<i>Mortierella</i>	<i>Mortierella isabellina</i>	NRRL 3655
Mucoraceae	<i>Mucor</i>	<i>Mucor jansinii</i>	NRRL 1757
Mucoraceae	<i>Mucor</i>	<i>Mucor plumbeus</i>	NRRL 3628
Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus alliaceus</i>	ATCC 4740

Tableau 105 : Micromycètes testés et leur code d'identification

Des incubations de mélange de souches ont été préférées afin de faire un criblage plus rapide sur les souches pouvant nous donner des résultats. Initialement 10 souches ont été choisies puis séparées en trois lots (Tableau 106).

Lot A	Lot B	Lot C
<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Cunninghamella echinulata</i> LCP 70 2092	<i>Actinomucor elegans</i>
<i>Absidia blakeeslena</i>	<i>Cunninghamella echinulata</i> LCP 73 2203	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245
<i>Mortierella isabellina</i>	<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Mucor jansinii</i>
		<i>Aspergillus alliaceus</i>

Tableau 106 : « Lots » mis en oeuvre pour le criblage des micromycètes

Chaque souche de champignons a été mise en culture séparément dans 50 mL de milieu YMS dans des erlenmeyers pendant 48 h. Puis, les biomasses sont récupérées par filtration sur gaze, lavées par du tampon phosphate à pH 6,2. La constitution des lots est effectuée par un ajout de masse équivalente de chaque espèce de champignons puis une incubation des champignons dans des flacons de 30 mL avec une quantité adéquate de tampon phosphate pH 6,2. Enfin, on ajoute 100 µl de solution d'annonacine à 77 mM (concentration finale 0,3 M).

Les incubations sont menées à 37 °C sous agitation et suivies par des prélèvements de 1 mL à t = 24 h, t = 36 h et t = 72 h. Afin, d'extraire l'annonacine et les éventuels métabolites des biomasses on ajoute du méthanol avant analyse en UPLC-ESI-SM.

L'utilisation de l'UPLC-DAD-SM s'est limitée à la détection des produits d'oxydation de l'annonacine similaires à nos métabolites (m/z 635,4-635,5) et à une analyse semi-quantitative des produits formés.

Au cours des analyses, les chromatogrammes UV montrent que l'annonacine est toujours très présente dans les échantillons et ne montrent pas la formation de métabolites.

Cependant, l'étude par SM montre que, comparativement au profil métabolique obtenu avec les microsomes de rats, les lots A et B donnent très faiblement le métabolite apolaire (M_H3 ; t_r = 6 min), mais pas les métabolites polaires (M_H1 et M_H2 ; t_r = 3,7 min) (Figure 179). L'analyse du lot C a permis d'obtenir un chromatogramme similaire au chromatogramme témoin de métabolisation chez le

rat, avec cependant, une abondance relative inversée : les métabolites polaires (M_H1 et M_H2 ; $t_r = 3,7$ min) sont majoritaires et le métabolite apolaire (M_H3) n'est que très faiblement formé (Figure 179).

Les produits sont formés en faible quantité. De plus, l'annonacine et ses produits d'hydroxylation ne sont plus visibles à $t = 72$ h d'incubation.

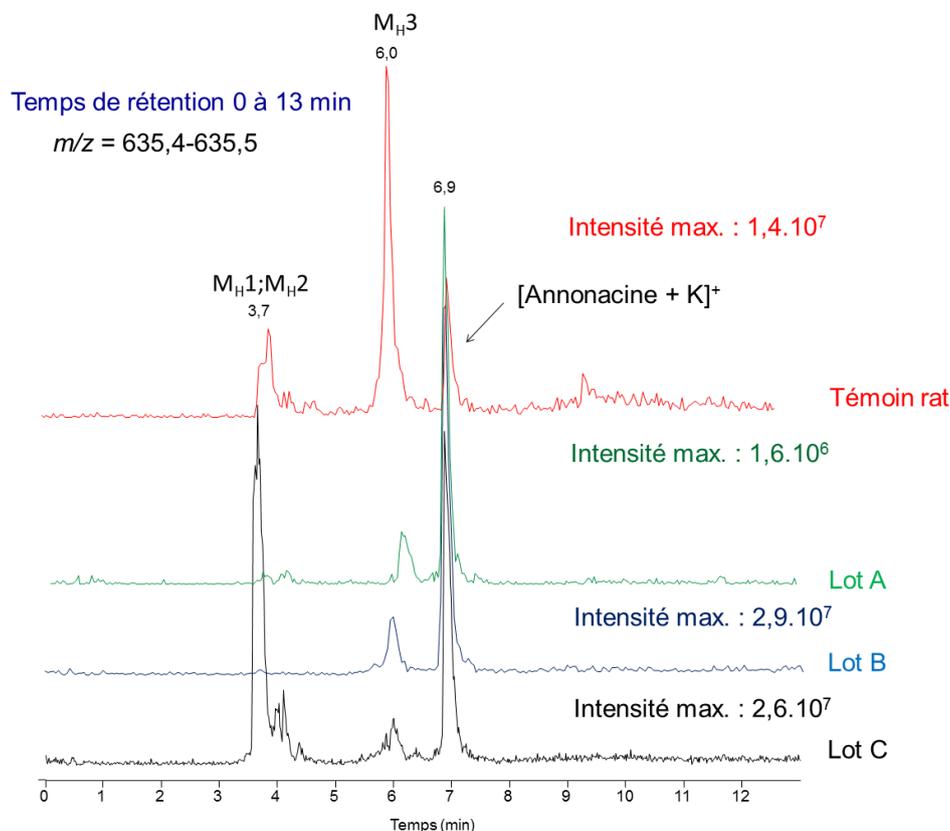


Figure 179 : Chromatogramme SIM Comparant les différents produits obtenus en fonction des lots

Le lot C montrant la formation des trois métabolites recherchés, nous avons travaillé sur chaque microorganisme séparément.

Les chromatogrammes obtenus après incubation de l'annonacine avec les espèces *Mucor jansseii* NRRL 3628 et *Cunninghamella echinulata* LCP 9245 montrent une formation du composé M_H3 en faible quantité. Ces deux espèces forment donc en majorité le métabolite apolaire (M_H3), avec un rendement très faible.

Le chromatogramme SIM à m/z 635,44-635,45 obtenu après incubation de l'espèce *Aspergillus alliaceus* montre une formation exclusive des métabolites polaires (M_H1 et M_H2), mais toujours à faible rendement (Figure 180). L'identité des métabolites formés a été vérifiée par CLHP-ESI-Orbitrap®.

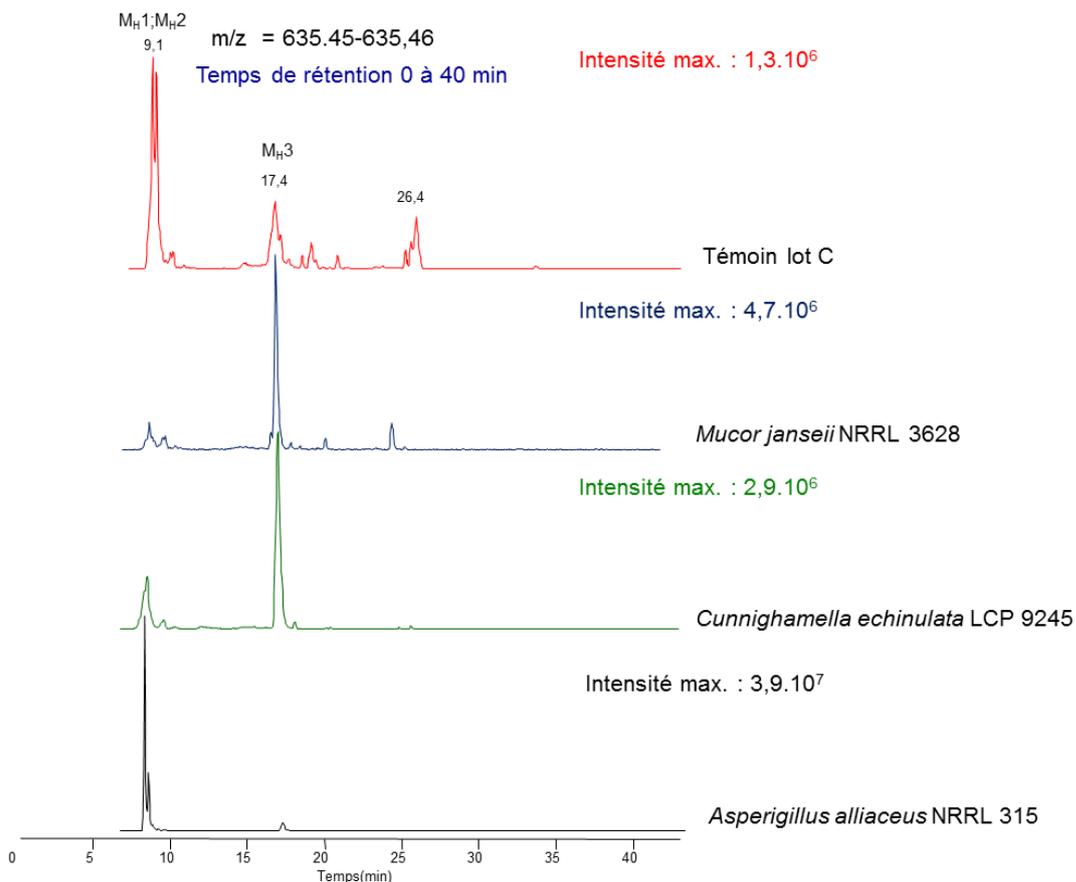


Figure 180 : Chromatogrammes SIM comparant les différents produits formés par les différents champignons du lot C à t = 18 h

Gradient CLHP-LTQ-Orbitrap n°2 (voir Matériels et méthodes)

L'utilisation d'*Aspergillus alliaceus* semblait donc être intéressante pour l'obtention des métabolites polaires (M_H1 et M_H2) à l'échelle préparative.

Nous avons vérifié l'implication de mono-oxygénases dans la formation des métabolites par une incubation d'*A. alliaceus* sous atmosphère inerte (argon). Après t = 18 h, contrairement au témoin sous air, aucun produit n'a été formé.

L'optimisation des conditions d'incubation a été travaillée pour permettre l'obtention de ces métabolites avec un rendement suffisant et éviter leur dégradation après une incubation de 36 h.

Les mises au point ont été :

- un ajout d'une plus grande quantité d'annonacine ;
- une meilleure oxygénation ;
- un ajout de glycérol pouvant potentiellement éviter la dégradation de l'annonacine par les champignons par un apport de matière carbonée ;

Pour chacune des conditions, des prélèvements ont été effectués après t = 18 h, t = 36 h, t = 42 h et t = 72 h d'incubation. L'annonacine et ses produits d'hydroxylation ne sont plus visibles au prélèvement t = 72 h quelques soient les conditions. Les résultats montrent qu'une meilleure oxygénation du milieu semble donner un meilleur rendement et que l'ajout de glycérol retarde la dégradation. En effet, à t = 42 h, l'annonacine et les métabolites ne sont visibles que dans l'incubation en présence de glycérol. La transposition préparative n'ayant pas permis d'obtenir les métabolites en quantité suffisante, l'étude par catalyse biomimétique a donc été débutée.

6.2.2 Catalyse biomimétique

Alpha chimica® est une Jeune Entreprise Innovante (JEI) installée au laboratoire et spécialisée dans la technologie des catalyseurs biomimétiques mimant l'activité des cytochromes P450. Elle a développé un "portefeuille" unique de catalyseurs de synthèse applicable à l'obtention préparative de métabolites de phase 1.

Une série de catalyseurs métallo-porphyriniques a été employée dans différentes conditions pour former des métabolites issus de l'hydroxylation de l'annonacine en grande quantité. Pour des raisons de confidentialité, les catalyseurs employés sont désignés par des codes (C₁, C₂, C₃).

6.2.2.1 Étude analytique

Cinq paramètres ont été étudiés afin de déterminer les conditions optimales d'obtention des métabolites d'intérêts (**M_{H1}**, **M_{H2}** et **M_{H3}**) : la structure des porphyrines ; le métal; l'oxydant ; le temps de réaction; la température de réaction.

Les bruts réactionnels ont été directement injectés après dilution au 100^e en CLHP-MSD (simple quadripôle). Pour cette étude, contrairement aux autres spectromètres utilisés au cours de cette thèse, la molécule protonée [M+H]⁺ était plus intense que la molécule cationisée par le sodium [M+Na]⁺. Les ions *m/z* 597,5 et les ions des métabolites [M+ O+ H]⁺ à *m/z* 613,5 ont été recherchés. Le choix des conditions initiales (=conditions standards) est fondé sur l'expérience des responsables d'Alphachimica®.

6.2.2.1.1 Métal et oxydant

Une première étude a permis de choisir le couple oxydant/métal le plus sélectif et donnant le meilleur rendement en métabolites polaires et apolaire (**M_{H1}**, **M_{H2}** et **M_{H3}**). Dans cette étude, nous avons toujours utilisé le même catalyseur (C₁). Les 2 métaux utilisés étaient le Fer et le Manganèse. Les deux oxydants mis à disposition sont PhIO (Iodosobenzène) et le couple Imidazole / H₂O₂. La réaction est effectuée à température ambiante, pendant 24h (Tableau 107).

	Catalyseur	Métal	Oxydant	Temps de réaction	Température
Conditions 1	C ₁	Mn	Imidazole / H ₂ O ₂	24 h	T.A.
Conditions 2	C ₁	Fe	PhIO	24 h	T.A.
Conditions 3	C ₁	Fe	Imidazole / H ₂ O ₂	24 h	T.A.
Conditions 4	C ₁	Mn	PhIO	24 h	T.A.

Tableau 107 : Conditions des réactions d'oxydation et comparaison de l'association oxydant / métal

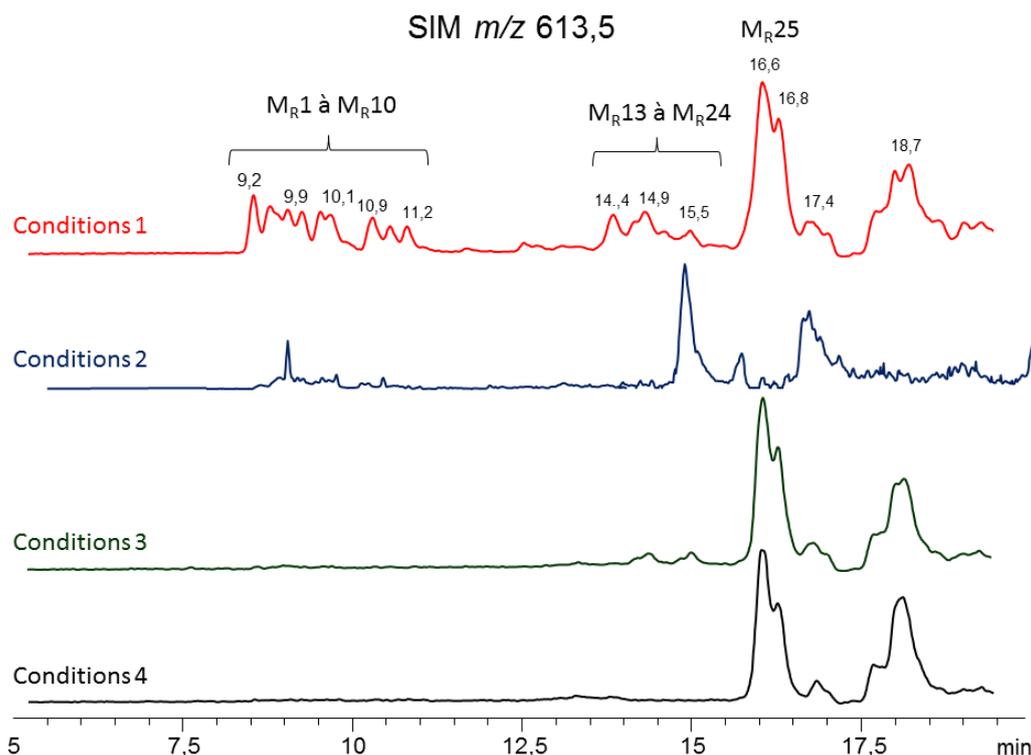


Figure 181 : Chromatogrammes SIM comparant les différents produits formés pour les différentes conditions : effet du couple oxydant / métal

Les analyses CL-SM réalisées montrent la formation de plusieurs produits d'oxydation. La comparaison des profils chromatographiques de métabolisation par porphyrines et par incubation microsomales chez le Rat montre que le composé à $t_r = 16$ min correspondrait au métabolite apolaire **M_H3** et les produits entre 9 minutes et 11 minutes aux métabolites polaires **M_R1 à M_R10** (Figure 180).

Aucun pic correspondant aux métabolites **M_R1 à M_R10** n'est visible sur les chromatogrammes SIM correspondant aux conditions 3 et 4 contrairement aux chromatogrammes des conditions 1 ou 2 où tous les pics correspondant à ces métabolites sont visibles. Les réactions aux conditions 1 et 2 produisent donc les métabolites polaires **M_R1 à M_R10**. Cependant, les pics chromatographiques de ces métabolites sont peu visibles sur le chromatogramme des conditions 2, contrairement à la réaction aux conditions 1 (Figure 181). Nous avons donc décidé de travailler sur l'association Mn/H₂O₂/Imidazole.

En outre, un composé d'oxydation à m/z 611,4 et à $t_r = 18,7$ min a été observé pour toutes ces conditions. Ce produit serait un produit d'oxydation d'un hydroxyle de l'annonacine en cétone. Ce produit n'est pas recherché pour notre étude, cette réaction parasite diminuant le rendement semble avoir une formation équivalente en fonction des conditions expérimentales.

6.2.2.1.2 La porphyrine

Des porphyrines porteuses de substitutions différentes, changeant l'interaction avec le substrat, ont été employées, dans les conditions fixées précédemment (Tableau 108).

	Catalyseur	Métal	Oxydant	Temps de réaction	Température
Conditions 1	C ₁	Mn	H ₂ O ₂ /Imidazole	24 h	T.A.
Conditions 5	C ₂	Mn	H ₂ O ₂ /Imidazole	24 h	T.A.
Conditions 6	C ₃	Mn	H ₂ O ₂ /Imidazole	24 h	T.A.

Tableau 108: Étude de différentes substitutions du catalyseur

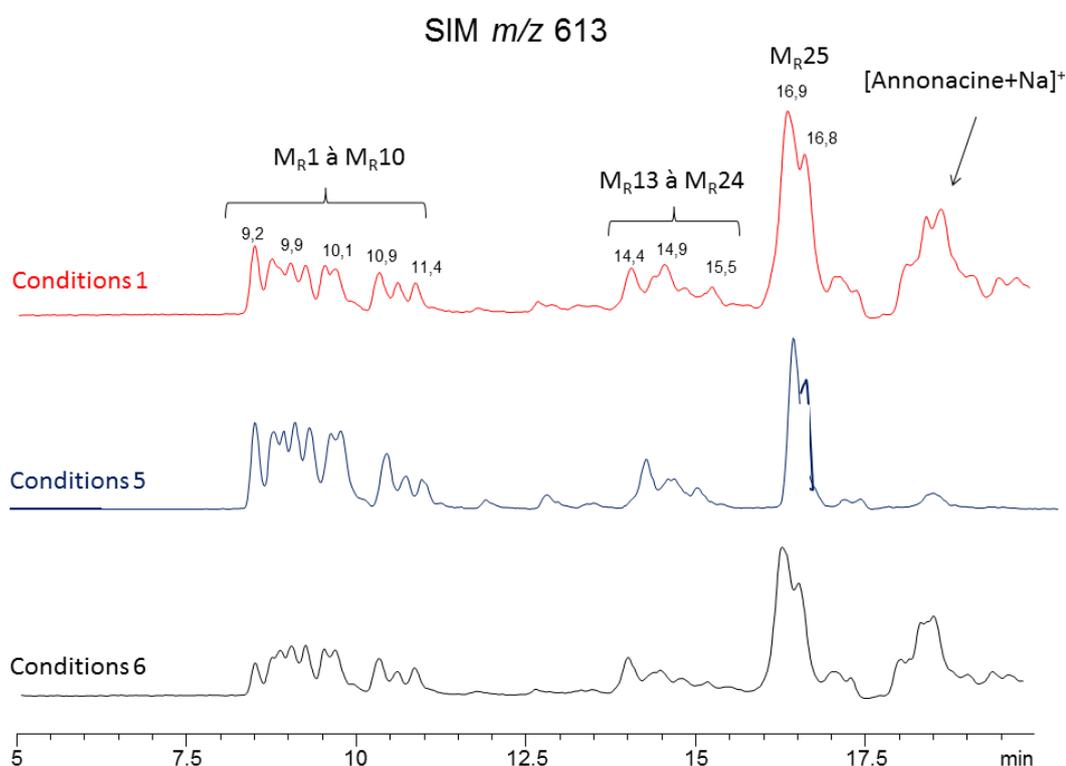


Figure 182 : Chromatogrammes SIM m/z 613 comparant les différents produits formés par différentes substitutions des catalyseurs

Les profils chromatographiques pour les trois conditions montrent le même profil que pour le chromatogramme de la métabolisation chez le Rat (Figure 151) et (Figure 182).

En comparant les aires des différents profils chromatographiques, les conditions 6 semblent donner moins de métabolites polaires (**M_R1 à M_R10**) que les 2 autres catalyseurs. De plus, le catalyseur C₂ donnerait plus de métabolites polaires (**M_R1 à M_R10**) et moins de l'apolaire **M_R25** comparé au catalyseur C₁. Les conditions optimales sont donc C₂/Mn/H₂O₂/Imidazole.

6.2.2.1.3 Temps de réaction et température

Deux autres facteurs peuvent être modifiés pour améliorer le rendement de la réaction : le temps de réaction et le chauffage.

Avec le système $C_2/Mn/H_2O_2/Imidazole$ le chauffage à $50^\circ C$ pendant les 24h de réaction a été testé. Malheureusement, l'augmentation de température provoque l'accroissement de l'aire de l'espèce issue de l'oxydation des groupements hydroxylés sans amélioration du rendement de la réaction pour les produits de réaction M_R1 à M_R25 . La température ambiante a donc été préférée.

Une étude cinétique, à température ambiante, a enfin été effectuée pour permettre l'optimisation de cette réaction à des fins préparatives. Lors de cette étude nous avons comparé les aires des produits (métabolites polaires M_R1 à M_R10 ; M_R25 et produit oxydé en fonction du temps d'incubation.

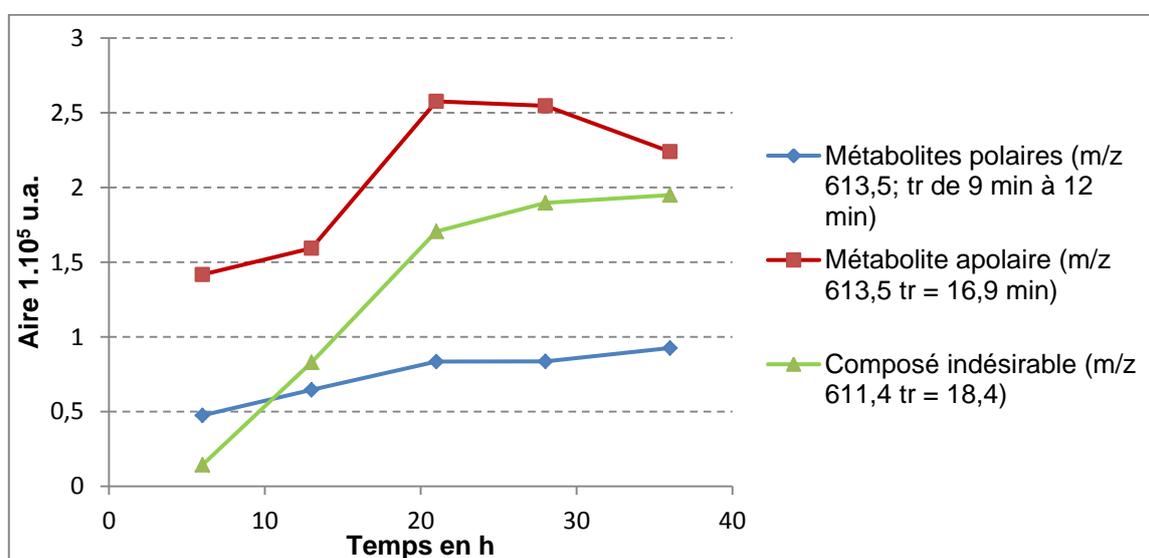


Figure 183 : Étude cinétique de la formation des différents composés par catalyse biomimétique ($C_2/Mn/H_2O_2/Imidazole$) à température ambiante

La formation des métabolites polaires (M_R1 à M_R10) semble se poursuivre tout au long de l'étude. Celle du métabolite apolaire se fait rapidement et continue à augmenter durant toute la réaction jusqu'à une diminution nette après 30 h. Le composé indésirable quant à lui se forme beaucoup plus après 11 h de réaction jusqu'à un plateau apparent à partir de 24 h.

Il semblerait que la meilleure solution soit d'arrêter la réaction très rapidement. Cependant, le rendement de cette réaction paraît être très faible (peu de diminution de l'aire de l'annonacine sous UV ($\leq 30\%$) après 24 h. L'obtention des différents métabolites devra donc être menée en répétant la réaction, après récupération de l'annonacine n'ayant pas réagi. Le profil de produits de réaction étant très complexe (obtention d'un grand nombre de métabolites), les métabolites d'intérêts M_R1 , M_R2 et M_R25 devront être obtenus par une purification, a priori difficile car nécessitant plusieurs étapes. Pour essayer d'obtenir la quantité maximale en métabolites en peu d'étapes de purification, il semblait judicieux de travailler à $t = 24$ h pour les conditions préparatives.

6.2.2.1.4 Annonacine protégée par des groupements silylés

La formation du produit d'oxydation étant indésirable, nous avons envisagé de limiter sa formation par protection des groupements hydroxyles libres *via* une silylation.

Nous avons travaillé sur l'annonacine silylée. Une réaction classique déjà étudiée au laboratoire pour des ACGs a été employée [Duval R. 2003]: Les 4 hydroxyles de l'annonacine ont été protégés par le TBDMSi (tributyl-diméthyl-silyl) (Figure 184)

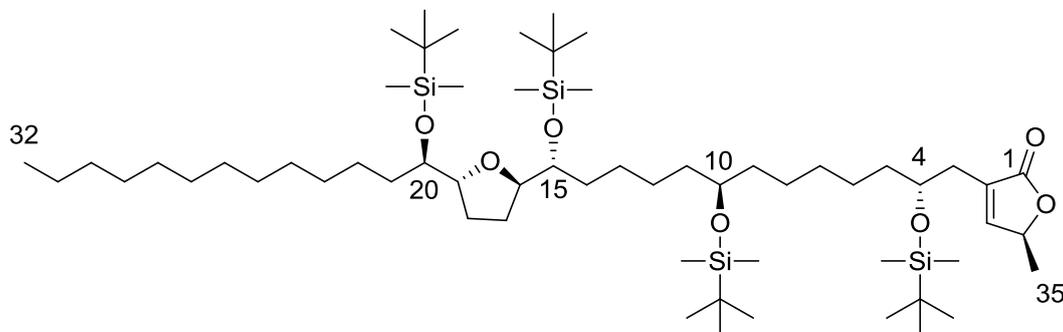


Figure 184 : Annonacine protégée par du TBDMSi

La réaction de protection a été effectuée sur 0,05 mmol d'annonacine (3 mg) dans 2,5 mL de pyridine anhydre à 0°C. On ajoutait une quantité catalytique de DMAP (≤ 1 mg ; 4-diméthylaminopyridine) et du *ter*-butyldiméthylsilyle triflate à raison de 2 équivalents par hydroxyle à silyler (soit 4 équivalents = 0,2 mmol). La réaction est effectuée pendant 48 h à température ambiante extraite après dilution à l'eau par le dichlorométhane, puis la phase organique est évaporée à sec. La réaction de catalyse biomimétique ($C_2/Mn/H_2O_2/Imidazole$) est effectuée sur le résidu sec de réaction et, après 24 h de réaction, est évaporée à sec. La déprotection est ensuite réalisée avec 1,5 mL de TBAF (Fluorure de *tétra*-butyl-ammonium) 1M dans le THF à 45 °C sous azote pendant 6 h. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau permettant de stopper la réaction puis est extrait deux à trois fois à l'AcOEt. Les phases organiques sont réunies et évaporées à sec. Le résidu sec de réaction est solubilisé dans 1 mL de MeOH puis injecté en UPLC-ESI-SM.

Sur le chromatogramme TIC, aucun ion à m/z 619,5 n'est détecté validant l'hypothèse que toute l'annonacine a été consommée lors de la réaction. Seul un produit est observé sur le chromatogramme, à un temps de rétention de $t_r = 9,1$ min. (Figure 185). Des arguments (même temps de rétention, même masse et même spectres SM/SM) indiquant que ce produit de réaction est le même composé que le métabolite **M_H3**, ont été confirmés par une co-injection avec un échantillon obtenu par incubation de microsomes de rats.

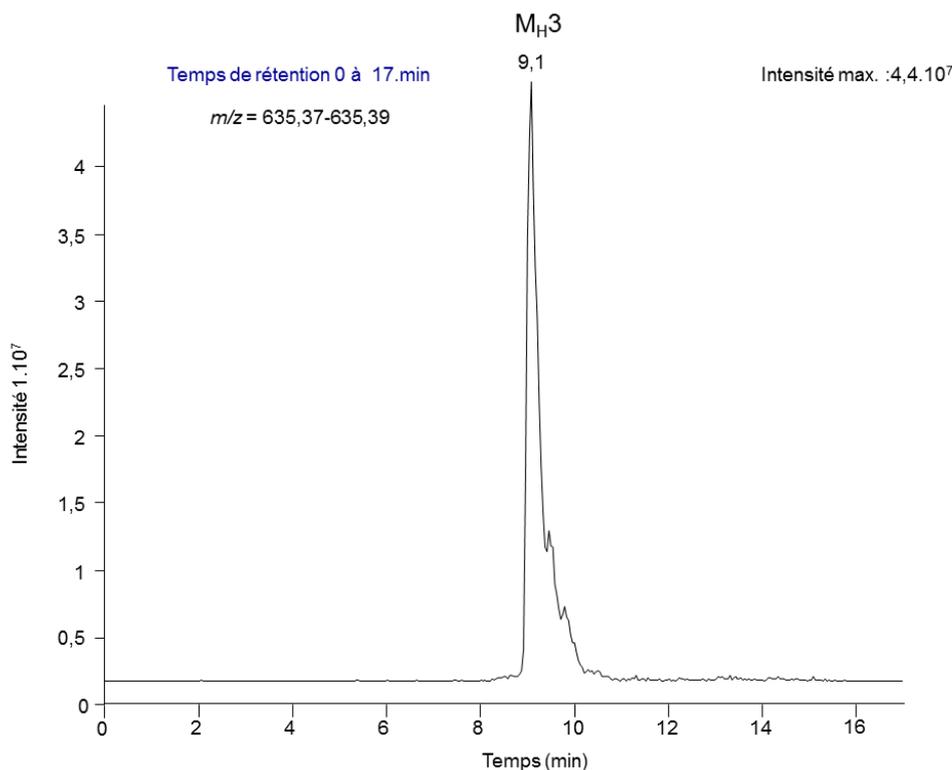


Figure 185: Produit de réaction après protection de l'annonacine, catalyse biomimétique puis déprotection

Suite à l'obtention de ces excellents résultats au stade analytique, une étude sur une quantité d'annonacine ($m = 15$ mg) a été effectuée. Les résultats ont été décevants en raison d'un problème de rendement global faible.

Ce métabolite M_{H3} ne pouvait donc pas être obtenu par cette voie et l'utilisation de la synthèse par catalyse porphyrinique à partir de l'annonacine sans protection a été choisie pour obtenir les 3 métabolites (M_{H1} , M_{H2} , M_{H3}).

6.2.2.2 Échelle préparative

Les essais réalisés sur l'annonacine et mettant en œuvre différents systèmes catalytiques nous ont permis de déterminer que les meilleures conditions de réaction sont les réactifs $C_2/Mn/H_2O_2/Imidazole$, à température ambiante, pendant 24 h.

Pour obtenir une quantité convenable des 3 métabolites humains d'intérêt (M_{H1} , M_{H2} et M_{H3}), nous avons mis en réaction 160 mg d'annonacine. Après 24 h de réaction, le mélange a été évaporé à sec puis purifié par CLHP préparative permettant de séparer les métabolites polaires (M_{R1} à M_{R10}) en un échantillon, le métabolite apolaire M_{H3} et l'annonacine. L'annonacine restante (79,5 mg) a été mise en réaction une seconde fois. La séparation du brut réactionnel en 3 fractions a été répétée. Les fractions obtenues au cours de ces deux manipulations ont été réunies puis purifiées par CLHP analytique. La fraction contenant les métabolites polaires et le catalyseur avant purification par CLHP analytique pesait 59,7 mg ($R = 37,3\%$) et celle contenant le métabolite apolaire pesait 3,8 mg ($R = 2,4\%$).

Après purification, nous avons pu obtenir le métabolite M_{H1} ($m = 0,6$ mg ; $R = 0,4\%$) ; le métabolite M_{H2} ($m = 0,8$ mg ; $R = 0,5\%$) et le métabolite M_{H3} ($m = 1,5$ mg $R = 0,9\%$). Ces quantités

très faibles, semblaient cependant suffisantes pour la réalisation d'une analyse structurale avec des spectromètres de sensibilité suffisante (600 MHz et microsonde).

7. Étude structurale des métabolites hémisynthétiques

7.1 MALDI-TOF-TOF

On rappellera que le MALDI-TOF-TOF est un spectromètre de masse permettant de générer des fragmentations de haute énergie et qui, d'après les études effectuées par Julie Allegrand [Allegrand J., 2010], semblait être une méthode adaptée pour placer les hydroxyles sur la chaîne aliphatique des acétogénines mono-THF. Ce spectromètre nous semblait être intéressant pour déterminer la structure des métabolites polaires.

La sensibilité du MALDI-TOF-TOF pour l'annonacine (SM : 3.10^{-8} M ; SM/SM: 5.10^{-5} M) est beaucoup moins importante que celle de l'Orbitrap® (SM : 1.10^{-10} M ; SM/SM : 1.10^{-6} M). De plus, tous les métabolites ayant la même masse exacte, une séparation chromatographique des métabolites est indispensable au préalable. Le couplage *on-line* est impossible pour une source MALDI et une plus grande quantité de métabolites est obligatoire pour réussir à élucider les structures des métabolites polaires (**M_{R1}** à **M_{R10}**). Les travaux d'hémisynthèses ont été obligatoires et nous ont permis d'effectuer cette étude par MALDI-TOF-TOF en couplage *off-line*.

Après la synthèse des métabolites, une purification pas CLHP analytique a été effectuée pour obtenir chaque métabolite polaire (**M_{R1}** à **M_{R10}**). Leur spectre obtenu par MALDI-TOF-TOF n'a montré aucun pic caractéristique nous permettant de placer les hydroxyles (ex : une fragmentation en α d'un hydroxyle). De plus, les pertes d'eau étant trop importantes, les spectres ne permettaient pas une bonne fragmentation de la chaîne aliphatique.

L'étude structurale des métabolites par MALDI-TOF-TOF n'a donc pas été poursuivie et l'étude par RMN a été nécessaire.

7.2 RMN

7.2.1 Métabolite polaire (**M_{H1}**)

D'après nos études en CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®, l'hydroxyle du métabolite **M_{H1}** serait positionné en bout de chaîne aliphatique. Le spectre RMN ¹H du métabolite **M_{H1}** hémisynthétique (0,6 mg) enregistré dans le chloroforme deutéré est très voisin du spectre ¹H de l'annonacine (**1**) (Figure 186). Seules, deux différences sont visibles au niveau de la RMN du proton. Le signal intégrant pour 3 protons du méthyle terminal (C- 32) et apparaissant sous forme de triplet pour l'annonacine (**1**) (3H ; $\delta = 0,87$ ppm ; t ; $J = 6,7$ Hz) n'est plus visible sur le spectre du métabolite **M_{H1}**. Un nouveau doublet, plus déblindé, intégrant pour 3 protons est visible sur ce spectre (3H ; d ; 1,6 ppm ; $J = 6,4$ Hz). Il correspondrait à un méthyl terminal voisin d'un seul proton et d'un nouvel hydroxyle.

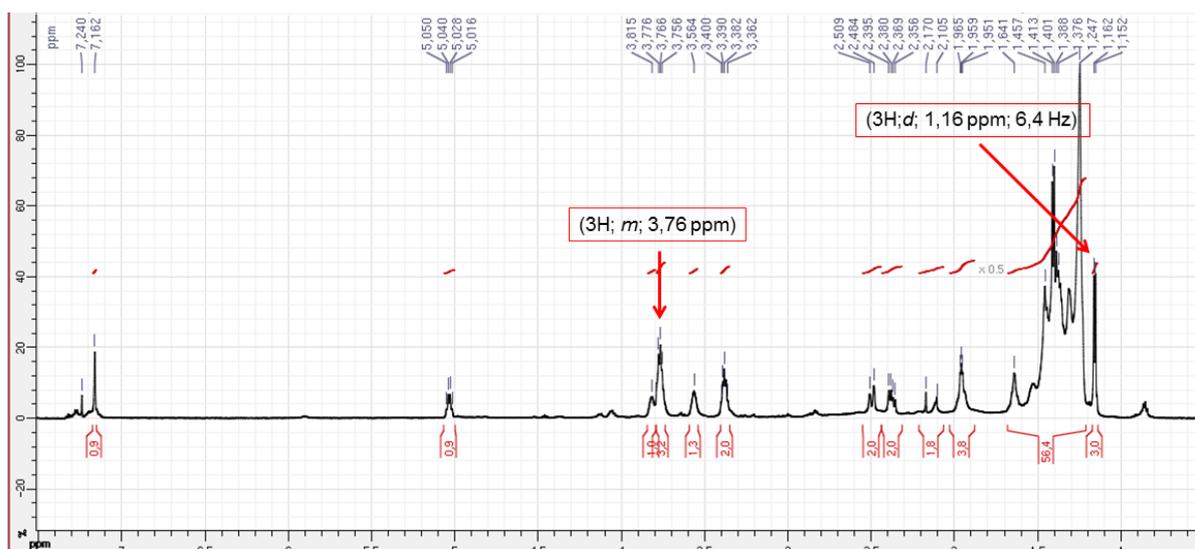


Figure 186 : Spectre RMN ^1H du métabolite $\text{M}_\text{H}1$ (600 MHz)

Ce signal corrèle sur le spectre COSY du métabolite $\text{M}_\text{H}1$ avec un multiplet déblindé ayant un déplacement de $\delta = 3,76$ ppm intégrant pour 3 protons. Ce signal correspond aux deux protons en C-16 et C-19 comme dans l'annonacine et à un dernier proton à déterminer. Ce proton serait donc voisin d'un méthyl terminal.

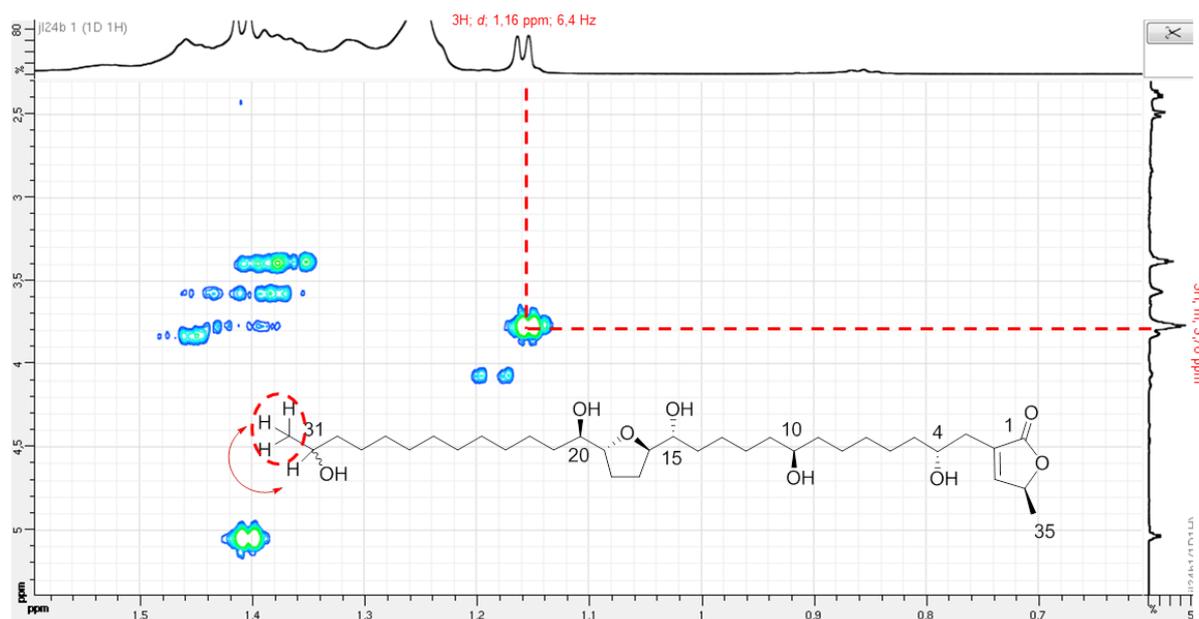


Figure 187 : Corrélation observée sur le spectre COSY entre les signaux du méthyl terminal en C-32 et du proton en C-31

D'après ces données et les études en spectrométrie de masse plaçant l'hydroxyle en bout de chaîne aliphatique de l'annonacine, l'hydroxyle du $\text{M}_\text{H}1$ peut être placé en α du carbone en C-32. La faible quantité du métabolite ne permet pas d'avoir un spectre ^{13}C complet. Les déplacements des ^{13}C ont été déduits par HSQC et HMBC (

Tableau 109).

7.2.2 Métabolite polaire (M_{H2})

De même que le métabolite M_{H1}, d'après les études en CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap®, l'hydroxyle du métabolite M_{H2} (0,8 mg) serait positionné en bout de chaîne aliphatique. Le spectre RMN ¹H du métabolite M_{H2} effectué dans le chloroforme deutéré est très proche du spectre ¹H de l'annonacine (1). Une seule différence est visible : un multiplet intégrant pour un proton est visible à un déplacement de $\delta = 3,52$ ppm, confirmant l'apparition d'un nouvel hydroxyle au niveau de la chaîne aliphatique.

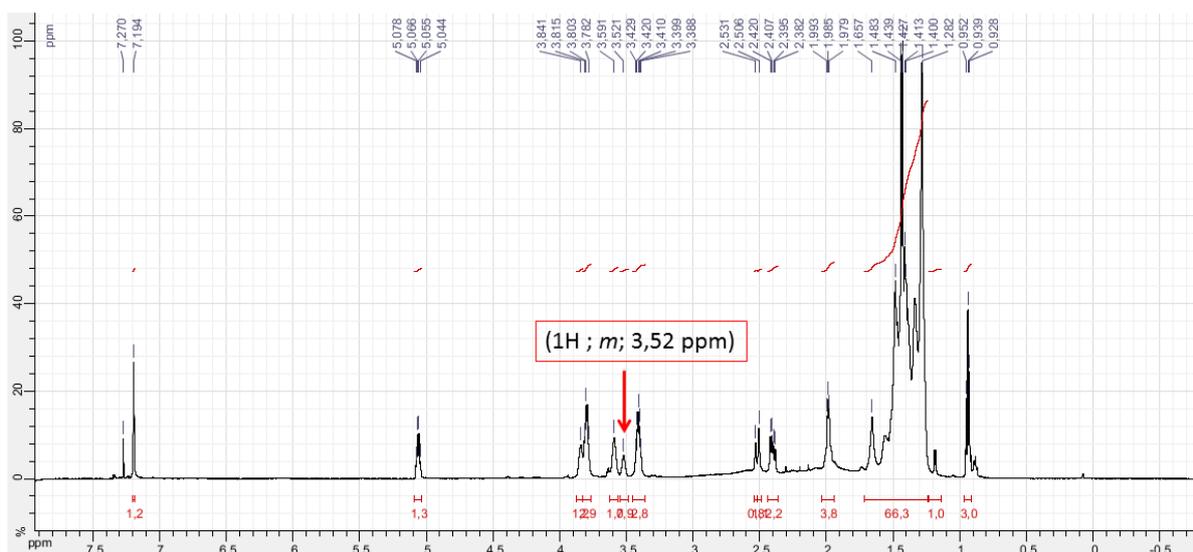


Figure 188 : Spectre RMN ¹H du métabolite M_{H2} à 600 MHz

Sur le spectre HSQC, ce multiplet corrèle avec un carbone qui a un déplacement chimique de $\delta = 73,3$ ppm compatible avec un alcool secondaire (Figure 189).

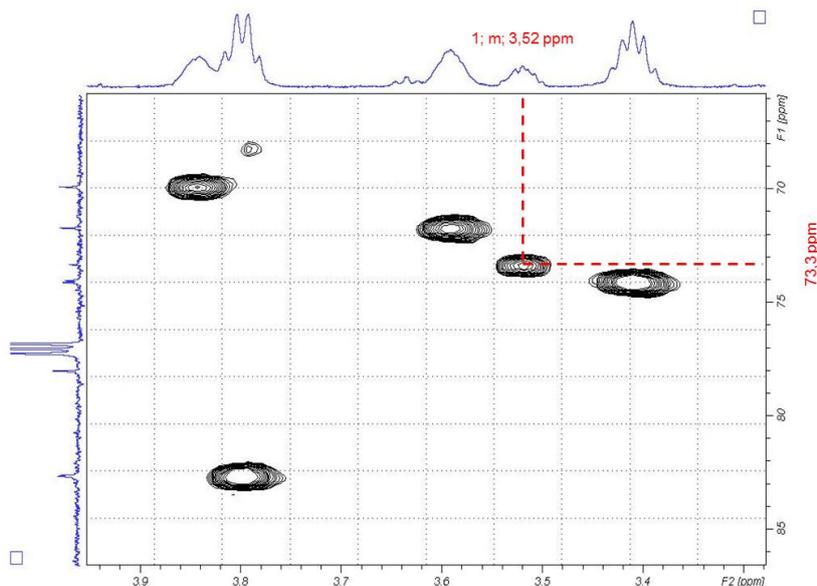


Figure 189 : Corrélation observée sur le spectre HSQC entre le nouveau proton et son carbone (600 MHz)

Sur le spectre HSQC, les signaux de ces deux carbones corrélient respectivement avec un signal multiplet à 1,19-1,47 ppm correspondant entre autres aux protons H-31 et un triplet (3H) à 0,94 ppm attribué aux 3 protons H-32. Ces résultats permettent de positionner l'hydroxylation en C-30. La confirmation de cette hydroxylation en C-30 est apportée en HMBC par les corrélations entre le triplet du méthyl en 32 avec les signaux des C-31 (J2 à 30,1 ppm) et C-30 (J3 à 73,3 ppm) (Figure 190).

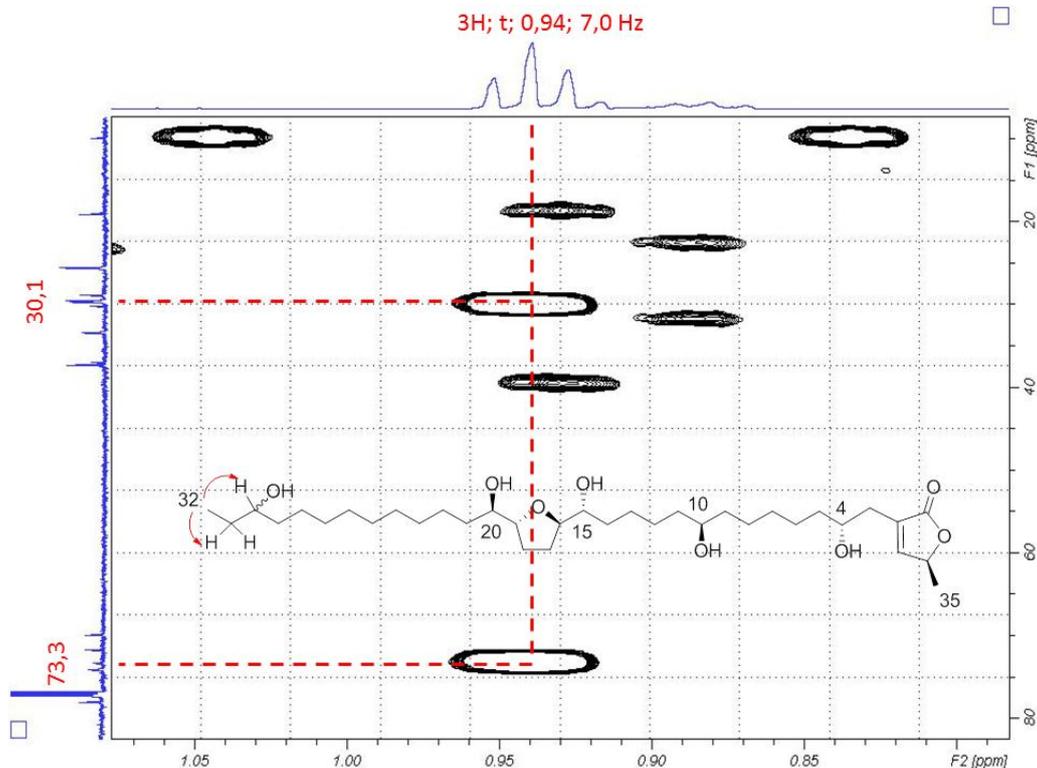


Figure 190 : Corrélation observée sur le spectre HMBC du méthyl terminal et du carbone en C-31 et C-30 portant l'hydroxyle (600 MHz)

D'après ces données et les études en spectrométrie de masse plaçant l'hydroxyle en bout de chaîne aliphatique de l'annonacine, nous pouvons placer l'hydroxyle du **M_H2** en β du carbone en C-32 c'est-à-dire en C-30 (

Tableau 109).

7.2.1 Métabolite apolaire (**M_H3**)

D'après nos études en CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap[®], l'hydroxyle du métabolite **M_H3** serait positionné au niveau de la lactone en C-34 ou C-35. Le spectre RMN ¹H du métabolite **M_H3** (1,5 mg) enregistré dans le chloroforme deutéré est très voisin du spectre ¹H de l'annonacine (**1**) (Figure 191), mais avec quatre différences principales:

- le signal (1H; qd; 5,08 ppm; 6,8 Hz; 1,4 Hz) intégrant pour un proton, et correspondant au proton porté par le carbone C-34 de l'annonacine n'est plus visible sur le spectre du métabolite **M_H3**. Le positionnement d'un hydroxyle au niveau du carbone en C-34 supprimerait ce signal.

- de plus, le doublet de déplacement $\delta = 7,20$ ppm ($J = 1,4$ Hz) correspondant au proton en C-33 de l'annonacine a lui aussi disparu.

- un nouveau singulet d'un proton éthylénique à δ 5,85 ppm apparaît pouvant correspondre au proton en C-33, ne corrélant plus avec un proton.

- le doublet intégrant pour 3 protons à δ 1,40 ppm ($J = 6,8$ Hz) correspondant au méthyle porté par le carbone en C-35, n'existe plus mais un singulet plus déblindé (2,14 ppm) intégrant lui aussi pour 3 protons, est visible sur le spectre. Son déplacement chimique est compatible avec un méthyl en C-34 d'un groupement méthyl-cétone.

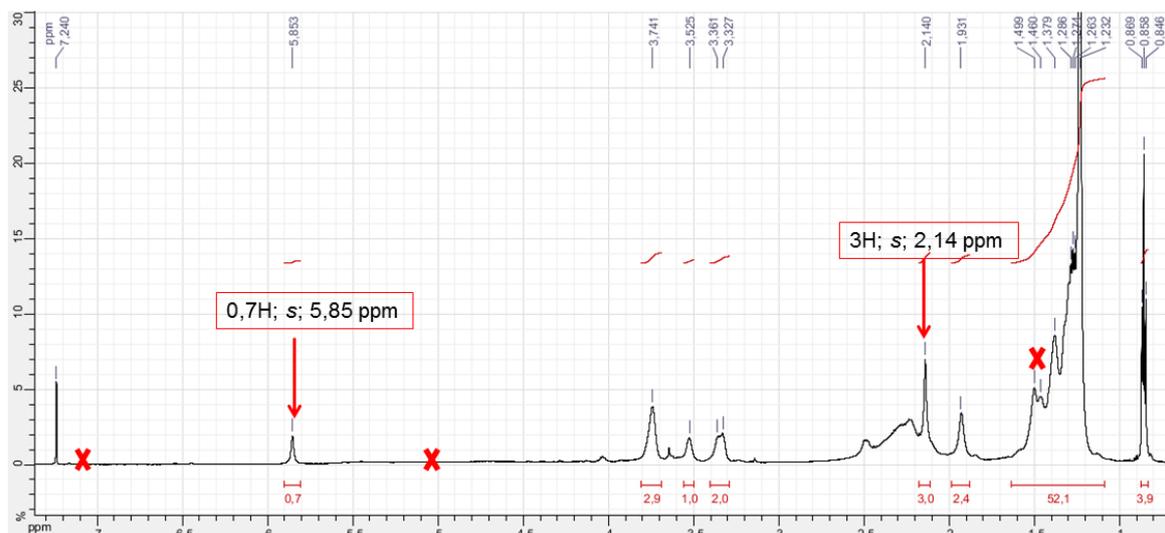


Figure 191 : Spectre RMN ^1H du métabolite $\text{M}_\text{H}3$ (600 MHz)

L'hypothèse de structure pour $\text{M}_\text{H}3$ serait alors, celle d'une forme céto-acide qui résulterait de l'ouverture de la lactone à partir d'un précurseur hydroxylé en C-34 selon le schéma suivant (Figure 192).

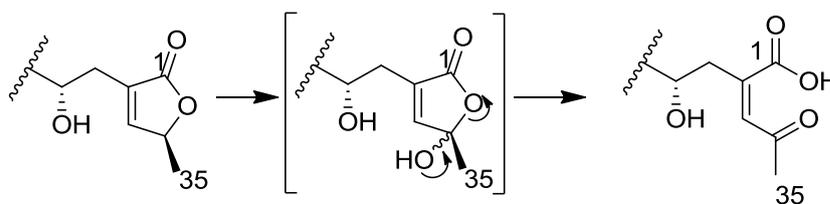


Figure 192 : Hypothèse de structure du métabolite $\text{M}_\text{H}3$

La faible quantité du métabolite $\text{M}_\text{H}3$ n'a pas permis l'obtention d'un spectre HMBC interprétable. Cependant sa formation, tant lors des études de métabolisation qu'au cours de son hémisynthèse, est tout à fait en accord avec la littérature. En effet, Seltzer et Stevens ont montré que l'hydrolyse du dérivé **a** pouvait conduire à trois composés principaux: deux dérivés *cis*, l'un fermé, **b**, appelé pseudo-acide et correspondant à l'hémiacétal et l'autre ouvert, **c**, correspondant à l'acide *cis*- β -acétylacrylique (sous forme carboxylate); un dérivé *trans* ouvert, **d**, issu d'une isomérisation pendant l'hydrolyse acide et correspondant à l'acide *trans*- β -acétylacrylique (Figure 193). Ces auteurs ont montré qu'en milieu neutre la forme *cis* n'existait que sous forme ouverte, ne se cyclisant en hémiacétal qu'à $\text{pH} \leq 3$. L'étude en RMN ^1H des deux formes *cis* indique des déplacements chimiques respectifs des protons du groupe méthyle à δ 1,70 (forme cyclisée) et 2,29 (forme ouverte) ppm. [Seltzer, S 1968].

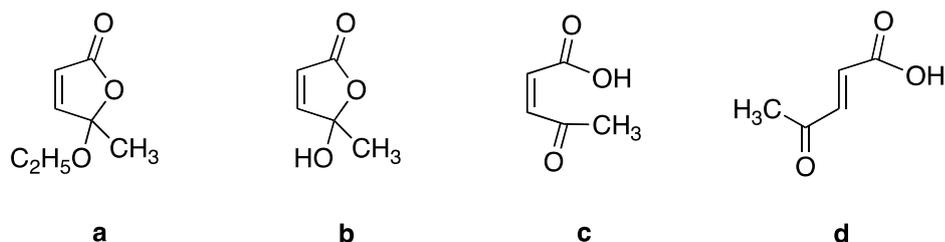
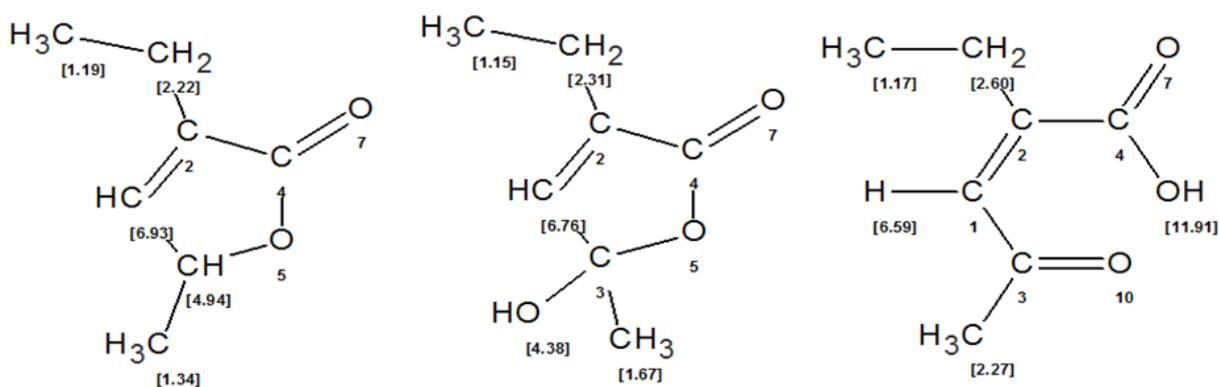


Figure 193 : Pseudo-éthyl ester de l'acide *cis*- γ -acétylacrylique et ses produits d'hydrolyse

Ces valeurs de déplacement chimique sont d'ailleurs retrouvées avec les prédictions obtenues à l'aide du logiciel ACD/C Predictor® associé à une base de données (Figure 194).

Prédiction des déplacements des protons



Annonacine

Hémiacétal = hydroxyle en C-34

Ouverture de l'hémiacétal

Figure 194 : Prédiction des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C obtenus pour l'annonacine et les deux hypothèses pour le métabolite $\text{M}_{\text{H}3}$

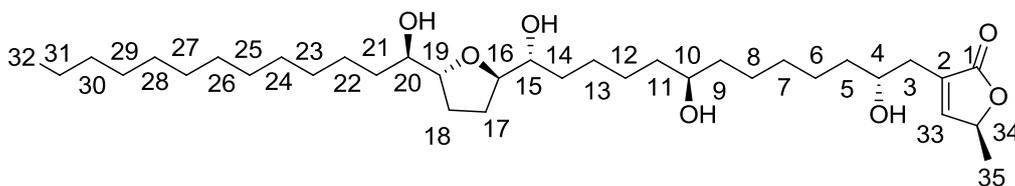
Les données de la littérature ainsi que celles de ce logiciel de prédiction sont donc tout à fait en accord avec une structure ouverte pour le métabolite $\text{M}_{\text{H}3}$. Cette structure résulte donc de l'ouverture spontanée du précurseur hémiacétalique dans les conditions d'incubation en présence de microsomes d'une part, comme lors des purifications HPLC en phase inverse d'autre part. D'ailleurs le temps de rétention et les fragmentations en SM/SM indiquent en effet, que le composé $\text{M}_{\text{H}3}$ observé après incubation microsomale et une première extraction L/L est le produit d'ouverture de l'hémiacétal en C-34.

Le

Tableau 109 ci-dessous consigne l'ensemble des données RMN des trois métabolites humains

Annonacine			M _H 1 (Hydroxyle en C-31)			M _H 2 (Hydroxyle en C-30)			M _H 3 (Hydroxylation en C-34 puis ouverture)		
Atome n°	RMN ¹ H δ ppm, J Hz	RMN ¹³ C δ ppm	Atome n°	RMN ¹ H δ ppm, J Hz	RMN ¹³ C δ ppm	Atome n°	RMN ¹ H δ ppm, J Hz	RMN ¹³ C δ ppm	Atome n°	RMN ¹ H δ ppm, J Hz	RMN ¹³ C δ ppm
1	-	174,6	1	-	-	1	-	-	1	-	-
2	-	131,2	2	-	-	2	-	-	2	-	-
3a	<i>dd</i> 2,39 (15,0; 8,2)	31,9	3a	<i>dd</i> 2,39 (15,2; 8,3)	33,3	3a	<i>dd</i> 2,39 (15,2; 8,3)	33,3	3a	<i>m</i> 2,60	33,3
3b	<i>dd</i> 2,43 (15,0; 1,9)	31,9	3b	<i>dd</i> 2,49 (15,7; 1,9)	33,3	3b	<i>dd</i> 2,49 (15,1; 1,9)	33,3	3b	<i>m</i> 2,69	33,3
4	<i>m</i> 3,81	69,8	4	<i>m</i> 3,76	69,9	4	<i>m</i> 3,81	69,9	4	<i>m</i> 3,74	69,9
5	<i>m</i> 1,50	37,3	5	<i>m</i> 1,64	37,5	5	<i>m</i> 1,46	37,5	5	<i>m</i> 1,46	37,5
6-8	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6	6-8	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6	6-8	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6	6-8	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6
9	<i>m</i> 1,37	37,2	9	<i>m</i> 1,38	37,5	9	<i>m</i> 1,46	37,5	9	<i>m</i> 1,46	37,5
10	<i>m</i> 3,60	71,7	10	<i>m</i> 3,76	71,7	10	<i>m</i> 3,76	71,7	10	<i>m</i> 3,74	71,7
11	<i>m</i> 1,37	37,2	11	<i>m</i> 1,38	37,5	11	<i>m</i> 1,46	37,5	11	<i>m</i> 1,46	37,5
12-13	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6	12-13	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6	12-13	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6	12-13	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6
14	<i>m</i> 1,37	33,4	14	<i>m</i> 1,38	33,6	14	<i>m</i> 1,46	33,6	14	<i>m</i> 1,46	33,6
15	<i>m</i> 3,40	74,1	15	<i>m</i> 3,38	74	15	<i>m</i> 3,38	74	15	<i>m</i> 3,34	74
16	<i>m</i> 3,81	82,7	16	<i>m</i> 3,77	82,7	16	<i>m</i> 3,77	82,7	16	<i>m</i> 3,74	82,7
17a-18a	<i>m</i> 1,64	28,8	17a-18a	<i>m</i> 1,64	28,8	17a-18a	<i>m</i> 1,64	28,8	17a-18a	<i>m</i> 1,64	28,8
17b-18b	<i>m</i> 1,95	28,8	17b-18b	<i>m</i> 1,96	28,8	17b-18b	<i>m</i> 1,96	28,8	17b-18b	<i>m</i> 1,93	28,8
19	<i>m</i> 3,79	82,7	19	<i>m</i> 3,77	82,9	19	<i>m</i> 3,77	82,9	19	<i>m</i> 3,77	82,9
20	<i>m</i> 3,40	74,1	20	<i>m</i> 3,56	74,1	20	<i>m</i> 3,55	74,1	20	<i>m</i> 3,52	74,1
21	<i>m</i> 1,37	33,3	21	<i>m</i> 1,37	33,2	21	<i>m</i> 1,37	33,2	21	<i>m</i> 1,37	33,2
22-30	<i>m</i> 1,19-1,47	25,2-29,6	22-30	<i>m</i> 1,19-1,47	25,2-29,4	22-29	<i>m</i> 1,19-1,47	25,2-29,4	22-30	<i>m</i> 1,19-1,47	25,2-29,4
						30	3,52	73,3			
31	<i>m</i> 1,26	22,7	31	<i>m</i> 3,81	68,1	31	<i>m</i> 1,19-1,47	30,1			
32	<i>t</i> 0,87 (6,7)	14,5	32	<i>d</i> 1,6 (6,4)	23,5	32	<i>t</i> 0,94 (7,4)	9,9	32	<i>t</i> 0,86 (6,5)	14,3
33	<i>d</i> 7,18 (1,4)	151,9	33	<i>s</i> 7,16	151,8	33	<i>s</i> 7,19	151,8	33	<i>s</i> 5,85	122,5
34	<i>qd</i> 5,05 (6,8; 1,4)	78,0	34	<i>q</i> 5,03 (6,8)	78	34	<i>q</i> 5,05 (6,8)	78,0	34	-	-
35	<i>d</i> 1,40 (6,8)	19,1	35	<i>d</i> 1,40 (6,8)	19,1	35	<i>d</i> 1,41 (6,7)	19,1	35	<i>s</i> 2,14	30,5

Tableau 109 : Déplacements chimiques obtenus pour l'annonacine et les métabolites M_H1, M_H2 et M_H3 à 600 MHz



Conclusion de la métabolisation de phase I de l'annonacine

L'étude de la métabolisation de phase I a été effectuée *in vitro* par incubation de l'annonacine avec des microsomes de rats et des microsomes humains : 25 métabolites ont été observés chez le Rat et seulement 3 métabolites chez l'Humain. Dans les deux cas la métabolisation semble faible. En effet, dans nos conditions, moins d'1 % de l'annonacine est transformée. Des études des cytochromes impliqués (microsomes induits chez le Rat) dans la métabolisation de phase I chez le Rat ont montré que la formation des métabolites intermédiaires (**M_R11** à **M_R23**) et apolaires (**M_R24** et **M_R25**) semblent être surtout dus au CYP 2C11. Tandis que les métabolites polaires (**M_R1** à **M_R10**) seraient métabolisés chez le rat par les CYP de la famille des 1A. Chez l'homme les études d'inhibition de microsomes humains par inhibiteurs spécifiques et cellules transfectées par différents cytochromes humains ont montré que le CYP 3A4 était impliqué dans la formation des 3 métabolites et que les CYP 1A2 et 2C19 l'étaient dans celle des métabolites polaires **M_H1** et **M_H2**.

Les études préliminaires en spectrométrie de masse par ESI-LTQ-Orbitrap® ont permis l'élucidation structurale partielle des 25 métabolites de rats. Les métabolites **M_R1** à **M_R13** sont hydroxylés entre le THF et le méthyle terminal. Les positions des hydroxyles des métabolites intermédiaires (**M_R14** à **M_R23**) ont été partiellement déterminées et elles sont situées entre le THF et le carbone en C-4. Enfin, les deux métabolites apolaires (**M_R24** et **M_R25**) ont leur hydroxyle respectivement placé en C-3 et pour le second en C-34 ou en C-35. De plus, il a été démontré que les métabolites humains **M_H1**, **M_H2** et **M_H3** correspondent respectivement aux métabolites **M_R1**, **M_R2** et **M_R25** de la métabolisation chez le rat. Cependant, une quantité plus importante des trois métabolites humains était nécessaire, à la fois pour préciser leur structure mais aussi en vue d'étude de toxicité. C'est pourquoi des études d'hémisynthèse ont été initiées.

Après comparaison de deux techniques d'hémisynthèse de métabolites (bioconversion et catalyse biomimétique) et des études méthodologiques, l'obtention des 3 métabolites humains **M_H1** à **M_H3** par catalyse biomimétique a été réalisée. Leurs structures ont été déterminées par RMN 600 MHz. Les métabolites les plus polaires **M_H1** et **M_H2** résultent d'une hydroxylation en bout de chaîne. Le métabolite **M_H3** ne possède plus le cycle lactone, et sa structure résulterait d'une hydroxylation initiale au niveau du carbone en C-34 formant un hémiacétal instable qui s'ouvrirait en une forme céto-acide (Figure 195).

Des études de toxicité sur ces trois métabolites vont être effectuées au laboratoire de « *Experimental Neurology* » à Marburg en Allemagne (direction : G. Höglinger) sur cultures primaires striatales. De plus, des études de métabolisation de phase II devront être envisagées.

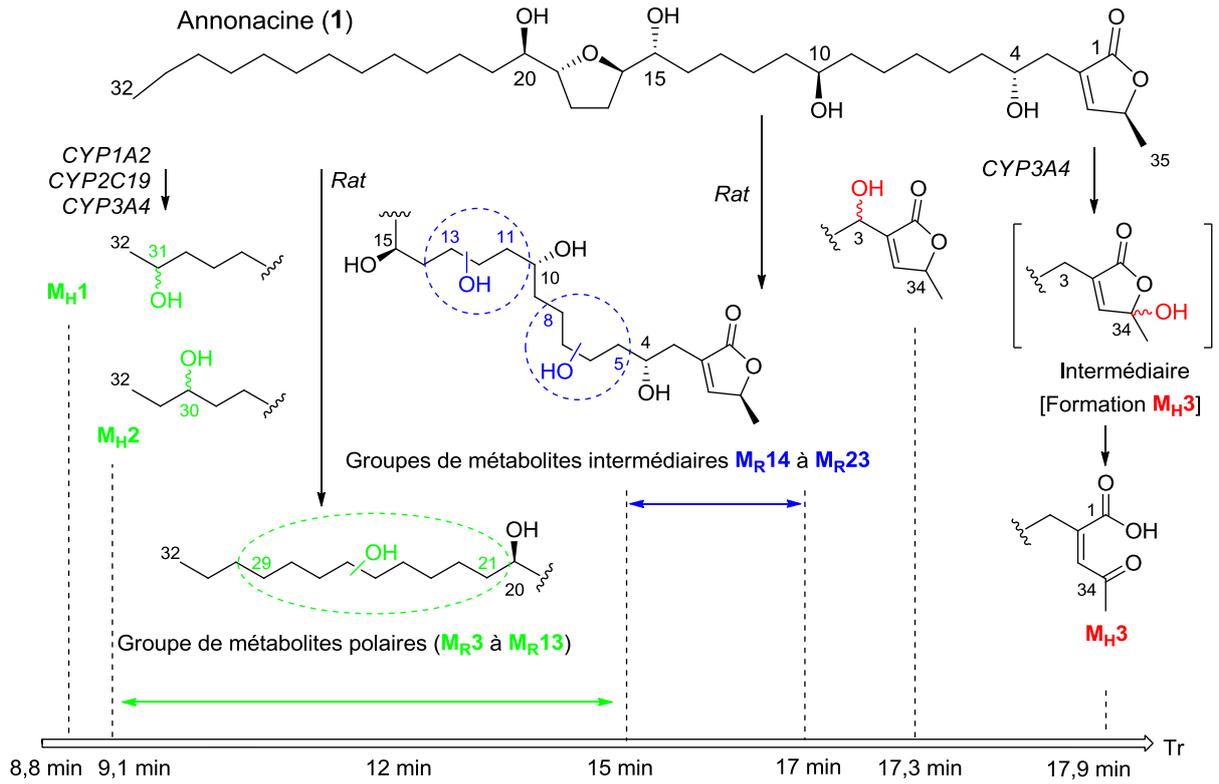


Figure 195 : Résumé des études biologiques et structurales de la métabolisation de phase I de l'annonacine par incubation avec des microsomes de rats et humains

Conclusion générale

Par ce travail, nous avons contribué à l'étude du lien possible entre la survenue de parkinsonismes atypiques et la consommation d'Annonaceae en Guadeloupe. L'évaluation chimique des acétogénines contenues dans des fruits et des produits dérivés de deux espèces (*A. cherimolia* et *A. muricata*) de cette famille a été effectuée. L'annonacine, acétogénine majoritaire d'*A. muricata*, déjà utilisée comme modèle en neurotoxicologie expérimentale, a été choisie pour l'étude de la biodisponibilité de ces molécules.

Les études qualitatives et quantitatives des acétogénines des fruits, de leur produits dérivés ainsi que de compléments alimentaires, d'une teinture mère à base de feuilles de corossol ont été conduites afin d'évaluer l'exposition humaine à ces métabolites [Le Ven J., 2011]. Une technique analytique par spectrométrie de masse CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap® en haute résolution avec infusion de lithium post-colonne a été mise au point, permettant l'étude qualitative d'extraits bruts. Cette analyse chimique a révélé la présence d'au moins 190 acétogénines différentes au sein d'un nectar d'*A. muricata* et des hypothèses structurales tangibles ont pu être émises. Une comparaison des différents profils chromatographiques des fruits et des différents dérivés du corossol a pu être effectuée en UV et par spectrométrie de masse CLHP-DAD-ESI-LTQ-Orbitrap®. Les profils chromatographiques entre les fruits et les différents dérivés sont qualitativement similaires : seules les proportions des acétogénines majoritaires sont différentes. Une étude qualitative a aussi été menée sur un alcool d'une annone très cultivée en Espagne : *A. cherimolia*. Environ 80 acétogénines ont été détectées. Des différences de profil métabolique pour des deux espèces étudiées ont pu être observées. Les résultats montrent que l'annonacine est l'acétogénine majoritaire des deux espèces ; cependant, au vu du nombre impressionnant d'acétogénines dans ces différents extraits, ces données devront être complétées d'une analyse biologique (inhibition du complexe I, cytotoxicité pour des neurones en culture, capacité à induire la redistribution de Tau, permettant de dégager des relations structure-activité, comparativement à celles d'ACGs purifiées [Höllerhage M. 2009]. Cette étude a débuté à Marburg. Ces travaux devront être élargis aux autres espèces contenant des acétogénines et incriminées dans cette maladie.

Une étude quantitative de l'annonacine a aussi été réalisée de manière directe à partir d'extraits bruts par CLHP-DAD. Ces analyses ont montré une différence notable entre les parties du fruit mais aussi entre les produits dérivés ayant des origines géographiques différentes. En effet un consommateur de fruits ingère entre 70 et 100 mg d'annonacine par kg de pulpe ou boit entre 1 à 17 mg.L⁻¹ de nectar d'*A. muricata*. La confiture contient environ 132 mg.kg⁻¹. Les bonbons contiennent des quantités moindres, soit 18,6 mg d'annonacine par boîte de 100 bonbons. Les compléments alimentaires, à base de feuilles et de tiges, contiennent une quantité non négligeable d'annonacine (environ 1 mg par gélule). De par la teneur et la consommation, l'exposition semble plus importante pour le fruit, la confiture et le nectar. L'usage alimentaire serait donc la source potentielle principale d'intoxication chronique devant les compléments alimentaires et enfin la consommation thérapeutique traditionnelle [Caparros-Lefèbvre D. 1999].

Des études de pharmacocinétique de l'annonacine ont été initiées. Trois points centraux sur quatre ont fait l'objet d'étude : l'absorption, la distribution et la métabolisation de phase 1. Théoriquement, et selon des études antérieures *in vivo*, l'annonacine ne posséderait pas les propriétés physicochimiques favorables à sa pleine diffusion passive à travers la barrière intestinale et la barrière hémato-encéphalique. En ce qui concerne la distribution, des études passées et actuelles ont montré que l'annonacine possède des propriétés neurotoxiques *in vivo* chez le Rat et la Souris (iv, sc). Ceci est également observé *per os* au long cours, chez la souris [Yamada H. en préparation]. Au cours de nos études *in vitro*, le passage de barrière a été réalisé sur des cellules modèles de barrière-hématoencéphalique (hCMEC/D3) et intestinale (Caco-2) permettant de comprendre et de quantifier

les mécanismes de passage de l'annonacine au travers des barrières physiologiques. Des études d'*uptake* ont montré que l'annonacine rentre peu dans le modèle cellulaire de passage de barrière intestinale utilisé lors de nos travaux (cellules Caco-2). Ces études n'ont pas pu aboutir pour des raisons techniques ; elles ont cependant montré que, dans les conditions employées pour ces mesures de passage pour les deux modèles, l'annonacine ne semble pas exercer de toxicité. Ces études de mise au point ont tout de même apporté des informations importantes et elles devront être poursuivies pour permettre une bonne compréhension du passage de l'annonacine au travers de ces barrières. En outre, des études de pharmacocinétique *in vivo* devront être menées afin de mieux appréhender la toxicité de cette molécule et surtout son lien possible avec les maladies. Des études sur d'autres acétogénines, plus neurotoxiques, pourront être aussi effectuées [Höllerhage M. 2009].

Enfin, l'étude de la métabolisation de phase I, permettant de comprendre la détoxification de l'annonacine par l'organisme a été effectuée *in vitro* par incubation de microsomes de rats et humains. 25 métabolites ont été observés chez le Rat et seulement 3 métabolites chez l'Homme. Dans les deux cas, la métabolisation semble faible : moins d'1 % de l'annonacine est transformée [Le Ven J., 2010]. Les cytochromes impliqués chez le Rat sont : le CYP 2C11 pour le métabolite apolaire et la famille des CYP 1A pour les métabolites les plus polaires (*i.e.* hydroxylés en bout de chaîne aliphatique). Chez l'Homme, c'est le CYP 3A4 qui est impliqué pour la formation des 3 métabolites et les CYP 1A2 et 2C19 pour la formation des métabolites les plus polaires. Des études en spectrométrie de masse par CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap® ont permis l'élucidation structurale partielle des 25 métabolites de Rat. L'hémisynthèse par catalyse biomimétique a permis d'obtenir les trois métabolites humains et de les étudier sur le plan structural en spectrométrie de masse et RMN. Les études de toxicité des métabolites sur cultures primaires striatales sont en cours. Au vu des données de relations structure-activité des acétogénines pour l'inhibition du complexe I, les métabolites sembleraient moins toxiques que la molécule native. En effet, une hydroxylation sur la chaîne aliphatique est peu susceptible de modifier fondamentalement la toxicité. De plus, concernant le métabolite apolaire, on peut faire plusieurs remarques : quelques acétogénines naturelles hydroxylées sur la même position (*i.e.* en β de la double liaison) ont été décrites [Bermejo A. 2005] – leurs activités biologiques ne sont pas connues. L'ouverture de l'hémiacétal modifie profondément le pharmacophore interagissant avec le complexe I. Des dérivés proches ont été obtenus par hémisynthèse : par exemple, pour la squamocine, la substitution de la lactone par un acide carboxylique diminue d'un facteur 100 l'activité inhibitrice du complexe I, mais ne la supprime pas [Derbré S. 2006a]. De même, l'équivalent de **M_H3** en série squamocine a été synthétisé au laboratoire : son activité est de 2 logs inférieure à celle de la squamocine *versus* complexe I, et de 4 logs en cytotoxicité sur cellules KB [Duval R. 2005]. L'annonacine ne semble être que peu détoxifiée par le métabolisme de phase 1. Cependant, les cytochromes impliqués dans sa métabolisation (famille des 1A et 3A4) sont connus pour être induits ou inhibés par de nombreux facteurs environnementaux. La métabolisation de phase 1 de l'annonacine pourrait donc être plus importante qu'expérimentalement. De plus, en raison de sa structure polyhydroxylée, l'annonacine pourrait être un bon substrat au niveau de la métabolisation de phase 2. Des études complémentaires de métabolisation de phase 2 mais aussi d'élimination sont donc nécessaires pour permettre de mieux connaître la détoxification de cette molécule par l'organisme.

Des résultats obtenus *in vivo* chez la souris par l'équipe de G. Höglinger montrent que cette neurotoxine semblerait un bon modèle expérimental pour induire des tauopathies et une neurodégénérescence chez la Souris. Des études de toxicité *in vivo* chez la Souris et le Rat devront donc être poursuivies. L'étiologie des parkinsonismes guadeloupéens étant probablement due à plusieurs facteurs concomitants (environnementaux et génétiques), des études de neurotoxicité des effets synergiques suspectés devront être menées. Cela est envisagé dans les modèles sur souris transfectés avec le gène Tau Humain chez nos collègues [Yamada E. 2009, Rotsholl R. 2011]. À l'heure actuelle, aucune identification d'autres facteurs environnementaux n'a été relevée par l'épidémiologie.

Enfin, les études cliniques et épidémiologiques concernant les parkinsonismes atypiques dans les Caraïbes et ailleurs en zone tropicale sont quasi inexistantes et semblent donc indispensables. La

compréhension et l'évaluation de ce problème de santé publique nécessitent la mise en œuvre rapide d'une politique de recherche multidisciplinaire, dans les Caraïbes et les pays où les Annonaceae sont consommées à des fins médicales et alimentaires.

Les effets toxiques des ACGs semblent vraisemblables. Dans cette hypothèse, la consommation à long terme aurait des conséquences néfastes pour l'organisme mais l'ingestion occasionnelle ne semble pas comporter de risque prépondérant. Ces données devraient donc être portées à la connaissance du grand public afin que chacun puisse consommer ces aliments en connaissance de cause. Cependant, les compléments alimentaires comportant des propriétés cytotoxiques, l'encouragement de leur consommation dans le cadre de traitements anticancéreux et comme complément alimentaire paraît démesuré et inadéquat. L'interdiction de la vente de ce type de produits devrait être effective, malgré un apport en acétogénines réduit.

Chapitre 7 : Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1 Produits chimiques

1.1.1 Solvants

- Les solvants utilisés pour les extractions et l'isolement de l'annonacine étaient de marque CarloErba[®] (Cyclohexane, CH₂Cl₂) et Prolabo[®] (alcools, AcOEt).
- L'AcOEt de qualité analytique pour les extractions L/L était de marque CarloErba[®].
- Le MeOH (*LCMS grade*) et l'acétonitrile (*HPLC/MS*) employés en CLHP et UPLC ont été achetés auprès de Baker[®].
- L'eau MilliQ a été préparée à l'ICSN ou à Châtenay-Malabry avec un système Millipore[®]. Sa résistivité était inférieure à 17 mΩ.
- Le tampon PBS (*phosphate buffer saline*) à pH 7,2 a été acheté chez GIBCO Invitrogen[®].
- Le chloroforme deutéré (CDCl₃) (ampoules de 0,6 mL) est de marque Euriso-top[®] et de pureté 99,8 %.
- LE DMSO employé était de marque Merck[®].

1.1.2 Réactifs

- L'iodure de lithium a été acheté chez Sigma-Aldrich[®].
- Le sulfate de magnésium anhydre (MgSO₄) est de marque CarloErba[®].
- La 4-diméthylaminopyridine (DMAP), de pureté de 99 %, est de marque Alfa Aesar[®].
- Le triflate de *ter*-butyldiméthylsilyle, de pureté 98 %, est de marque Acros Organic[®].
- Le fluorure de tétra *n*-butyl-ammonium (TBAF) est de marque Alfa Aesar[®].
- La vanilline de pureté de 99 % est de marque Jansen chimica[®].
- L'acide 3,5-dinitrobenzoïque et les bases (KOH ou NaOH) sont de marques Sigma-Aldrich[®].

1.1.3 Étalons

Les acétogénines étalons employées sont : l'annonacine (C₃₅H₆₄O₇ ; masse monoisotopique : 596,4652 Da) ; l'annonacinone (C₃₅H₆₂O₇ ; masse monoisotopique : 594,4495 Da) ; les diépomuricanines A et B (C₃₅H₆₂O₄ ; masse monoisotopique : 546,4648 Da) ; la gigantécine (C₃₇H₆₆O₈ ; masse monoisotopique : 638,4757 Da) ; la gonionénine (C₃₇H₆₆O₇ ; masse monoisotopique : 622,4808 Da) ; la squamocine (C₃₇H₆₆O₇ ; masse monoisotopique : 622,4808 Da), l'isoannonacine (C₃₅H₆₄O₇ ; masse monoisotopique : 596,4652 Da) ; la désacetyluvaricine (C₃₇H₆₆O₆ ; masse monoisotopique : 606,4859 Da) ; la montécristine (C₃₇H₆₆O₄ ; monoisotopique : 574,4961 Da) ; la narumicine-2 (C₃₇H₆₆O₇, monoisotopique : 622,4809 Da). Ils ont été obtenus antérieurement par extraction et isolement au sein du laboratoire de pharmacognosie, à partir d'*A. muricata*, d'*A. squamosa* et d'*Uvaria chamae* [Bajin ba Ndob I. 2009, Gleye C. 1997, Bermejo 2005, Champy P. 2004].

1.1.4 Réactifs biologiques

- Le glutathion (forme réduite) a été acheté chez Acros organics[®], de pureté 98 %.
- L'albumine bovine a été achetée chez Acros organics[®].
- Le sel dilithié de lucifer yellow est de marque Sigma Aldrich[®].
- Le tampon HBSS (*Hanks Buffer Saline Solution*), avec du CaCl₂ et du MgCl₂ est de marque Invitrogen, Gibco[®].
- Le tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à 1 M est de marque PAA (The Cell Culture Company[®]).
- Le pyruvate de sodium à 100 mM est de marque Invitrogen Gibco[®].
- La chlorpromazine, l'atenolol et la fexofénadine (conservés à 10 mM dans le DMSO) ont été achetés chez Novartis[®].
- Le chlorure de magnésium (MgCl₂) pro-analysis est de marque Merck[®].
- L'hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na₂HPO₄, 12H₂O) est de marque Normapur Prolabo[®].
- L'acide orthophosphorique (H₃PO₄) est de marque Prolabo[®].
- Le NADP (sel sodique de β-Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, sel sodique) est de marque Sigma Aldrich[®].
- Le glucose 6-phosphate (C₆H₁₁O₉PNa₂) est de marque Sigma Aldrich[®].
- Le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), le SVF (sérum de veau fœtal), la glutamine, la fungizone, la pénicilline-G et la streptomycine proviennent de chez Invitrogen[®] SARL.

1.1.5 Analytique

Les vials utilisés lors des études analytiques, en verre, sont de marque Waters[®] et de dimension (12x32 mm). Les bouchons de chez Waters[®] sont pré-perçés et composés de plastique et d'un septum en PTFE/silicone.

Les inserts sont de 300 µL (6x29 mm en verre) et ont été achetés chez Waters[®].

Les filtres utilisés pour la filtration des échantillons avant injection sont des Filtre Acrodisc[®] CR 4 mm de membrane en PTFE de 0,45 µm de diamètre de pores.

1.2 Chimie extractive et analytique

1.2.1 Chromatographie sur colonne ouverte et chromatographie couche mince

Les chromatographies sur colonne (CC) ont été réalisées sur gel de silice 60 (Merck[®] 9385).

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice 60F254 (Merck) de 0,2 mm d'épaisseur avec support en aluminium, de dimension 20x20 cm. Après élution, les plaques sont révélées avec des révélateurs préparés au laboratoire de pharmacognosie :

La vanilline sulfurique (1 g de vanilline, 100 ml d'éthanol et 1 mL de H₂SO₄ 6 N) est un révélateur universel.

Le réactif de Kedde (réactif A : acide 3,5-dinitrobenzoïque à 2 % dans le méthanol ; réactif B : KOH 2 N dans le méthanol) permet de caractériser les butyrolactones α,β-insaturées, donnant une tâche de couleur rose vif fugace.

1.2.2 CLHP-DAD

1.2.2.1 CLHP-DAD analytique

(I) Les Chromatographies Liquides à Haute Performance analytiques (CLHP) à polarité de phases inversée ont été réalisées avec une chaîne constituée d'une pompe Waters® 1525 Binary, d'un détecteur UV à barrette de diodes Waters® 996 et d'un injecteur à carroussel Waters®.

Les deux colonnes utilisées sont :

- une colonne octadécyl-silylée C₁₈ Sunfire® Waters de diamètre de particules de 5 µm, de dimensions 4,6x150 mm, associée à une pré-colonne C₁₈ Sunfire Waters® de dimension 4,6 x 20 mm (diamètre de particules 5 µm). Le débit de 1 mL.min⁻¹ est systématiquement employé.

- une colonne octadécyle-silylée C₁₈ Sunfire® Waters de diamètre de particules de 3,5 µm, de dimension 2,1x100 mm, associée à une pré-colonne C₁₈ Sunfire Waters, de dimension 2,1x100mm (diamètre de particules 3,5 µm). Le débit de 0,3 mL.min⁻¹ est systématiquement employé.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Empower®.

1.2.2.2 CLHP-DAD préparative

(II) Les Chromatographies Liquides Haute Performance semi-préparatives (CLHP) à polarité de phases inversée ont été réalisées avec une chaîne constituée d'une pompe Waters® 590 Binary, d'un détecteur UV à barrette de diode Waters® 484 et d'un enregistreur ABB SE120.

La colonne était une colonne octadécyle C₁₈ Sunfire® Waters diamètre de particules de 5 µm, de dimension 19x150 mm, associée à une pré-colonne C₁₈ de dimension 19x10 mm (diamètre de particules 5 µm ; Sunfire Waters®). Le débit de 17 mL.min⁻¹ est systématiquement employé. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Empower®.

1.2.3 Spectrométrie de masse

1.2.3.1 MALDI-TOF-TOF

(III) Les expériences MALDI-SM/SM ont été effectuées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF 4800 (Applied Biosystems®) équipé d'un laser Nd: Yag à la fréquence de $\lambda = 355$ nm pulsé à la fréquence de 200 Hz. La résolution est de 15 000 dans la gamme de masse utilisée. Tous les analytes ont été déposés sur une plaque 384 puits en acier inoxydable.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Data Explorer®.

Cet équipement a été acheté en 2006 et est situé au sein de l'équipe de spectrométrie de masse à l'ICSN.

1.2.3.2 CLHP-DAD-ESI-MSD

(IV) Le spectromètre MSD 1846D Waters® comprend une source *electrospray* et un analyseur quadripolaire. Il est associé à un système CLHP Agilent® 1100 series constitué d'une pompe quaternaire, d'un passeur d'échantillons, d'un four à colonnes et d'un détecteur à barrette de diodes.

La séparation a été effectuée sur une colonne Waters Sunfire C₁₈ (100x2,1 mm, taille des particules : 3,5 µm). Le débit était de 0,3 ml.min⁻¹.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Chemstation®.

Cet équipement est situé au laboratoire de pharmacognosie à Châtenay-Malabry.

1.2.3.3 CLHP-ESI-piège à ions

(V) Le spectromètre Esquire LC Bruker[®] est un spectromètre de masse de type piège à ions, équipé d'une source *electrospray* ; Il est associé à un système CLHP HP Agilent[®] 1100 series constitué d'une pompe binaire à quatre voie et d'un détecteur UV à barrette de diodes.

La séparation a été effectuée sur une colonne octadécyle Waters[®] Sunfire C₁₈ (100x2,1 mm, taille des particules : 3,5 µm). Le débit était de 0,3 ml.min⁻¹.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Esquire control[®].

Cet équipement a été acheté en 1998 et est situé au SAMM à l'UFR pharmacie de Châtenay-Malabry.

1.2.3.4 UPLC-ESI-TSQ-Vantage

(VI) Le spectromètre de masse TSQ Vantage[®] EMR (Thermo Fisher Scientific[®]) comprend un analyseur de type triple quadripolaire et est équipé d'une source *electrospray*. Il est associé à un système de Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance analytique (UPLC) Accela[®] composé d'un détecteur UV à barrette de diodes, d'un passeur d'échantillon, d'un four à colonnes, et d'une pompe quaternaire.

La séparation a été effectuée sur une colonne Hypersil Gold Thermo Scientific[®] C₁₈ (100x2,1 mm, de taille de particules 1,9 µm). Le débit utilisé est de 0,5 ml.min⁻¹.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Xcalibur[®] 2.2.1.

Cet équipement a été acheté en 2008 par l'ICSN.

1.2.3.5 CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap[®]

(VII) Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap[®] (Thermo Fisher Scientific) comprend un analyseur hybride piège à ions / orbitrap. Ce spectromètre permet à la fois de réaliser des expériences de type MSⁿ et d'obtenir des mesures de masse précises. Il est équipé d'une source *electrospray* et est associé à un système CLHP Ultimate 3000 Dionex[®], composé d'un dégazeur, d'une pompe binaire, d'un passeur d'échantillons, d'un four à colonnes et d'un détecteur UV à barrette de diodes.

La séparation a été effectuée sur une colonne Waters Sunfire[®] C₁₈ (100x2,1 mm, de taille de particules 3,5 µm) associée à une précolonne C₁₈ Waters Sunfire (taille 3,5 µm de diamètre de particules).

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Xcalibur[®] 2.0.7.

Cet équipement a été installé en 2006 à l'ICSN.

1.2.3.6 CLHP-ESI-TQ QUATTRO ULTIMA WATERS

(VIII) Le spectromètre Quattro Ultima Waters[®] est un spectromètre de masse de type triple quadripole, équipé d'une source *electrospray*. Il est associé à un système CLHP constitué d'une pompe Waters[®] 1525 Binary, d'un détecteur UV à barrette de diodes Waters[®] 996, d'un injecteur et d'un dégazeur.

La séparation a été effectuée sur une colonne Waters Sunfire[®] C₁₈ (100x2,1 mm, taille des particules : 3,5 µm). Le débit était de 0,3 ml.min⁻¹.

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Masslynx 3.5[®].

Cet équipement a été acheté en 2001 et est situé au SAMM à Châtenay-Malabry depuis 2005.

1.2.4 RMN (Résonance magnétique)

1.2.4.1 400 MHz

Les spectres de résonance magnétique nucléaire mono et bidimensionnels (RMN ^1H , ^{13}C JMOD, COSY, HMQC, HMBC) ont été réalisés sur un appareil Bruker[®] AM-400 MHz. Ils ont été effectués au service RMN de BioCIS à Châtenay-Malabry.

1.2.4.2 600 MHz

Les spectres des métabolites de l'annonacine ont été effectués sur un spectromètre RMN 600 MHz Bruker[®] Avance équipé d'une microsonde TXI 1.7.

Ce spectromètre a été installé en 1993 à l'ICSN.

1.2.5 IR

Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer[®] type 257 (ν en cm^{-1}).

1.2.6 Fluorimètre

La mesure de fluorescence de la lucifer yellow a été effectuée par un spectromètre fluoroscan Ascent FL de marque Thermolabsystems[®]. La longueur d'onde d'excitation était $\lambda = 425$ nm, celle d'émission $\lambda = 538$ nm.

1.2.7 Turbidimétrie

La turbidimétrie des solutions a été analysée avec un turbiscan classic[®] MA 2000 de marque Formulation Scientific Analysis[®].

1.2.8 Voltmètre pour cellules épithéliales (EVOM)

Le calcul du TEER a été effectué par un voltmètre de World precision Instruments[®].

1.3 Centrifugeuses

La centrifugation des 30 kg de nectar a été réalisée avec un appareil Heraeus Christ GMBH[®] Osterode / Harz Cyofuge 6-6 CHRIST à la vitesse de 3000 tours.min⁻¹ pendant 1 h, à 4°C.

Les centrifugations à partir des produits d'*A. muricata* ont été réalisées avec un appareil ALC 4232 à la vitesse de 4000 tour.min⁻¹ à des temps variables.

Les centrifugations pour les études de métabolisation ont été réalisées avec un appareil CR 422 de marque Jouan[®] 5 à la vitesse de 2500 tours.min⁻¹ à 4°C.

1.4 Speedvac[®]

Le speedvac[®] utilisé était un Jouan[®] RC 10-22.

1.5 Matériel végétal

1.5.1 Fruits d'*A. muricata*

Ont été employés des fruits d'*A. muricata* L. frais:

- un corossol originaire du Vietnam, acheté à maturité chez Tang Frères (Paris, mars 2011), d'une masse de 2060 g.
- un lot de trois fruits mûrs achetés sur un marché d'Antananarivo à Madagascar, en juin 2011, de masse totale de 1815 g (682 g, 504 g, 629 g).

1.5.2 Nectars et purée d'*A. muricata*

1.5.2.1 Purée de corossol pour l'obtention de l'annonacine

Le matériel végétal utilisé est une purée de corossol (30 kg) produite industriellement au Brésil et conditionnée dans deux pots en plastique, acheté en janvier 2009. Il est vendu par la compagnie Iprona® installée à Lana en Italie. Le numéro de lot est 09IV0991. Il est composé de 25 % d'une purée de corossol, sans additif. La date de fabrication est inconnue.

1.5.2.2 Nectar Brésilien

Ce nectar concentré de corossol (1 bouteille de 500 mL) commercialisé au Brésil par la société Dafruta® est composé de purée de corossol (50 % minimum), d'eau (qsp 500 mL), de conservateurs (métabisulfite et benzoate de sodium) et d'un acidifiant (acide citrique). Le numéro de lot est LC-231-CE et la date de péremption est le 22 mai 2007.

1.5.2.3 Nectar Guyanais

Ce nectar d'*A. muricata*, de marque "Caresse Guyanaise" (1 brique de 500 mL) a été acheté à Cayenne en Guyane Française par Claire Largier en Juin 2009 dans un petit magasin d'alimentation générale. Ce nectar industriel est produit en Guyane par Solam®, une société laitière de Macouria. Sa composition est : eau, sucre, purée de pulpe de corossol à 26 %. Il a coûté 5 euros. Il ne portait pas de numéro de lot et sa date d'expiration était août 2009.

1.5.2.4 Jus Brésilien

Ce jus de préparation artisanale a été acheté dans les rues de Rio par Gerrardo Cebrian en avril 2009. Il a été produit par pressage extemporané de fruit frais. Il était conditionné dans une bouteille en plastique de 500 mL.

1.5.2.5 Jus Péruvien

Deux briques de 1 L de jus ont été achetées par Alexandre Maciuk au Pérou en juillet 2010. Elles sont de marque Gloria®, fabriquées à Lima au Pérou. La composition proposée est : sucre, pulpe du fruit, eau, acide citrique, vitamines A, C et D, conservateurs naturels (E-412 ; E-415). Les proportions ne sont pas précisées. La date de péremption est octobre 2010. Aucun numéro de lot ne figurait sur les emballages.

1.5.3 Compléments alimentaires

1.5.3.1 Gélules Raintree®

Les gélules « Graviola Max® », de la marque Raintree® sont une association de poudres de tiges et feuilles d'*A. muricata* et d'*A. montana*. La proportion des deux espèces et des drogues ainsi que leurs origines ne sont pas précisées par le fabricant. Une boîte contient 120 gélules de 600 mg. Lors des études, nous avons utilisé deux boîtes soit 144 g de poudre. La boîte coûte 29,95 \$ et a été achetée sur le site : <http://www.rain-tree.com>, implanté aux États-Unis. Le numéro de lot de la boîte employée est GRM1209 et la date de péremption janvier 2012.

1.5.3.2 Gélules et poudre en vrac Graviola Inka Natural®

Les compléments alimentaires originaires du Pérou « graviola Inka Natural® » ont été achetés sous formes de gélules et de poudre en vrac de feuilles d'*A. muricata*. La boîte coûte 20,80 euros et le sachet 15,70 euros. Ils ont été achetés sur le site <http://www.inkanatural.com>. La boîte employée a pour date de péremption décembre 2012. Le lot de gélules correspond à une boîte de 90 gélules contenant 500 mg de poudre de feuilles, soit 45 g de poudre totale. Le sachet contient 170 g de poudre en vrac. Les gélules ont pour date de péremption décembre 2012 et aucun numéro de lot n'était écrit sur la boîte.

1.5.3.3 Gélules Maximize®

Le produit Maximize® correspond à des gélules de poudre de feuilles d'*A. muricata* appelées « Graviola 750 ». La boîte contient 100 gélules de 750 mg. Deux boîtes ont été utilisées soit 150 g de poudre. Les boîtes coûtent 29,95 \$ chacune et ont été achetées aux États-Unis par Erwan Poupon dans un magasin de la chaîne de magasins de diététique « Vitamine Shoppe ». Le numéro de lot de la boîte employée est MD09138A et a pour date de péremption mai 2012.

1.5.4 Teinture mère

La teinture mère de marque Amazon est, d'après le distributeur, obtenue par macération des feuilles d'*A. muricata* desséchées et broyées dans de l'alcool éthylique. Le degré alcoolique final est de 35° à 45° d'après les mentions du fabricant. Deux bouteilles de 120 mL ont été achetées, en avril 2010, sur le site <http://www.shamansmarket.com> pour 9,99 \$ chacune. La date de péremption est juillet 2012.

1.5.5 Produits alimentaires transformés

1.5.5.1 Bonbons à base d'*A. muricata*

Les bonbons à base de corossol, originaires du Vietnam, ont été achetés pour 12,95 euros dans une grande surface asiatique dans le 13^e arrondissement de Paris. La boîte était constituée d'une centaine de bonbons pour une masse totale de 500 g. Sous emballages individuels, ils avaient l'aspect de pâtes de fruit. Pour décoration, une graine d'*A. muricata* était posée au-dessus de chaque bonbon.

1.5.5.2 Confiture de corossol

La confiture est de marque CodaI® et a pour origine Madagascar. Elle est composée de corossol, de sucre, d'acidifiant, de gélifiant et de vanille. La teneur totale en sucre était de 52 g pour 100 g de confiture avec 70 % de fruit mis en œuvre pour sa préparation. Le pot de confiture de 320 g

coûte 4,20 euros. 3 pots de 280 ml (320 g), soit 960 g, ont été employés. La date de péremption est novembre 2011. Le numéro de lot est C 318 pour les 3 pots.

1.5.5.3 Alcool à base d'*A. cherimolia*

L'alcool commercial d'*A. cherimolia* 20 % a été produit et acheté à Madère (Portugal). Il est conditionné dans une bouteille en verre d'un volume de 70 cL, dont 50 cL ont été employés. Il a été produit par J. Faria et Filhos, LDA[®]. La composition de cette liqueur d'alcool est : eau, alcool 20°, sucre, annone.

1.6 Matériel de culture de traitement des échantillons biologiques

1.6.1 Cellules

- Les cellules Caco-2 provenaient du laboratoire de pharmacie clinique de Châtenay-Malabry [Ménez C. 2006]
- Les cellules hCMEC/D3 provenaient de l'institut Cochin et ont été cultivées par Fabienne Glacial [Weksler B.B. 2005].
- Les cellules Ad293 (HEK 293) sont des cellules fœtales humaines rénales et ont été préparées par l'équipe du Dr. Thierry Cresteil puis congelées au laboratoire de métabolisation des xénobiotiques à l'ICSN [Lacroix 1997, Sonnier et Cresteil T. 1998, Dr. F. J.Gonzalez, NCI, Bethesda].

1.6.2 Microsomes

Les différents microsomes utilisés pour les études de métabolisation ont été préparés par le Dr Thierry Cresteil et congelés à -70 °C dans son laboratoire. Les microsomes de rats avaient pour code 26903 et les microsomes humains 405.

1.6.3 Inserts

Les inserts utilisés pour les différentes études de passage transmembranaire sont :

- Corning[®] CLS3491, 6 puits, ayant une membrane en polytétrafluoroéthylène (PTFE) et vendu précoatés avec du collagène I et III, de diamètre de pores de 0,4 µm.
- Corning[®] CLS3450, 6 puits, ayant une membrane en polyester, de diamètre de pores de 0,4 µm, coatées avec du collagène I à l'institut Cochin.
- Corning[®] CLS3412, 6 puits, ayant une membrane en polycarbonate, de diamètre de pores de 0,4 µm.
- Millipore[®] PIRP30R48, 6 puits, ayant une membrane en PET de diamètre de pores de 0,4 µm.
- Millipore[®] PIT01250, 24 puits, ayant une membrane en polycarbonate avec un diamètre de pore de 3 µm.
- Millipore[®] PIEP15R48, 12 puits, ayant une membrane en PET avec un diamètre de pores de 8 µm.
- Grenier 665638, 12 puits, ayant une membrane en PET avec un diamètre de pore de 8 µm.
- Corning 3452, 6 puits, ayant une membrane en PET avec un diamètre de pore de 3 µm.
- Corning 3422, 12 puits, ayant une membrane en polycarbonate avec un diamètre de pore de 8 µm.

1.6.4 Kit LDH

Un kit de mesure de mort cellulaire *in vitro* LDH (Lactate déshydrogénase) de Sigma Aldrich a été utilisé sur les cellules intestinales (cellules Caco-2).

1.6.5 Milieux de culture

1.6.5.1 Cellules transfectées

Le milieu de culture utilisé est le DMEM avec ou sans SVF (DMEM + 10% SVF + Glutamine + fungizone + pénicilline G + streptomycine).

1.6.5.2 hCMEC/D3

Les cellules hCMEC/D3 sont cultivés dans le milieu EBM2 contenant 5% de sérum foetal bovin «gold », 1% de pénicilline et de streptomycine, 1.4 µM d'hydrocortisone, 10 mM d'HEPES, de l'acide ascorbique à 5 µg mL et du bFGF (*basic Fibroblast growth factor*) à 1 ng mL, à 37 °C dans une atmosphère avec 5% CO².

1.6.5.3 CaCO-2

Le milieu de culture est du milieu DMEM (20 %, 1 % d'antibiotiques (pénicilline G-streptomycine) et 1% d'acides non essentiels).

1.6.6 Tampons de perméabilité

HEPES/Tris

Le milieu HEPES/Tris est un tampon Krebs à pH 7,4 modifié composé de 5,4 mM de KCl, 2,8 mM de CaCl₂, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mM de NaH₂PO₄, 137 mM de NaCl, 0,3 mM de KH₂PO₄, 10 mM de glucose et de l'HEPES à 10 mM.

MES/Tris

Le milieu MES/Tris est un tampon Krebs à pH 6,0 modifié composé de 5,4 mM de KCl, 2,8 mM de CaCl₂, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mM de NaH₂PO₄, 137 mM de NaCl, 0,3 mM de KH₂PO₄, 10 mM de glucose et de MES à 10 mM.

Pour cellules hCMEC/D3

Le tampon est composé de 25 µl de HEPES à 10mM, de 25 µl de pyruvate de sodium à 1 mM et de 2,45 ml de HBSS avec Magnesium et Calcium.

1.6.6.1 Uptake

Les plaques 96 puits (200 µL dans chaque puits) ont été utilisées avec du milieu DMEM (20 %, 1 % d'antibiotiques (pénicilline G-streptomycine) et 1% d'acides non essentiels).

1.6.6.2 Bioconversion

Pour toutes les expériences, chaque espèce de micromycètes a été mise en culture séparément dans 50 mL de milieu YMS (*Yeast extract* 4 g/L *Malt extract* 10 g/L peptone de soja 5 g/L glucose 16 g/L).

1.6.6.3 Métabolisation microsomale

1.6.6.3.1 Tampon phosphate

Les expériences sur microsomes sont réalisées dans un tampon de : 100 mM de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM de MgCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$ et 20 % glycérol bidistillé 99,5 % à un pH 7.4.

1.6.6.3.2 Système générateur

Les expériences sur microsomes ont été effectuées avec avec un système générateur formé de NADP à 0,15 mM et de glucose-6-phosphate à 2,5 nM

1.6.7 Micromycètes

Les différents mycéliums de champignons étudiés sont répertoriés et conservés au Muséum d'Histoire Naturelle (équipe Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (MCAM) UMR 7245 CNRS/MNHN) par le Dr. Didier Buisson au réfrigérateur à 4 °C (chapitre 4 partie 6.2.1 tableau 4).

2. Méthodes

2.1 Phytochimie

2.1.1 Obtention de l'annonacine

2.1.1.1 Extraction et traitement de la matière première

Les 30 kg de pulpe de corossol décongelée sont centrifugés (1 h à 3000 tours.min⁻¹ à -4 °C). Le culot pâteux (**A**) (10,12 Kg) a subi une extraction solide-liquide par le cyclohexane (C₆H₁₂) (agitation mécanique, 1 h, 300 mL de cyclohexane pour 100 g de pâte; m = 38,51 g ; R = 0,38 %). Le marc (m = 10,64 Kg) obtenu par filtration a subi une extraction par l'acétate d'éthyle (**A**) (300 mL pour 100 g de pâte) suivie d'une filtration et d'une évaporation (m_{marc} = 11,26 Kg). L'extrait acétate d'éthyle **C** (m = 110,75 g ; R = 1,09 %) est redissous dans un mélange (H₂O / MeOH / C₆H₁₂ : 1 : 4 : 5) et soumis à une partition liquide-liquide (m_D = 67,63 g ; R = 0,67 %; m_E = 24,53 g R = 0,24 %).

Après évaporation de la phase polaire, on obtient 67,63 g d'un extrait brun (**F**), présentant une réaction de Kedde positive.

La vérification de la présence de l'annonacine a été réalisée par CLHP-UV analytique (**I**) par co-élution avec un échantillon témoin d'annonacine à la longueur d'onde $\lambda = 210$ nm. La concentration des échantillons préparés est de 10 mg.mL⁻¹, le volume injecté était de 10 μ l. Le système éluant est en voie A : H₂O, et en voie B : ACN, avec pour gradient d'éluant A / B (20 : 80) jusqu'à 100 % de B en 13 min puis un plateau à 100 % de B pendant 10 min. Le temps de rétention de l'annonacine est de 9,3 min dans ce système

2.1.1.2 Isolement et purification

L'extrait polaire (**D**) (m = 67,63 g) obtenu est chromatographié sur colonne (CC) "flash" de gel de silice de granulométrie moyenne en utilisant comme phase mobile le système de gradient suivant : CH₂Cl₂ / MeOH 97 : 3 ; CH₂Cl₂ : MeOH 95 : 5 ; CH₂Cl₂ : MeOH 93 : 7 ; CH₂Cl₂ : MeOH 90 : 10. Après analyse des éluats et rassemblement selon leur profil en CCM, les deux avant-dernières fractions (F₆, m = 9,33 g ; R = 0,09 % et F₇, m = 2,02 g ; R = 0,02 %) sont rassemblées et purifiées sur CC flash de gel de silice en mode isocratique CH₂Cl₂ / MeOH / isopropanol 80 : 17 : 3. Seulement deux fractions Kedde positive (F_{6-7/6} et F_{6-7/7}) de masses respectives 1,8 g (R = 0,02%) et 4,7 g (R = 0,04 %) ont été obtenues. D'après une vérification par CLHP-UV (**I**), elles contenaient toutes les deux de l'annonacine. La concentration des échantillons préparés est de 1 mg.ml⁻¹ et le volume injecté était 10 μ l. Le gradient est le même que celui utilisé lors des de la vérification après extraction.

La fraction F_{6-7/7} a été chromatographiée sur CC flash de gel de silice, avec un gradient AcOEt/MeOH 97 : 3 ; AcOEt/MeOH 95 : 5 ; AcOEt/MeOH 93 : 7 ; AcOEt/MeOH 90 : 10. Deux fractions F_{6-7/7/7} et F_{6-7/7/8} (1,6 g ; R = 1,5.10⁻² % et 760 mg ; R = 7,14.10⁻³ %) contenant de l'annonacine ont été collectées. Ces 2 fractions et la fraction obtenue F_{6-7/6} ont été purifiées par CLHP-UV préparative (**II**) à une longueur d'onde $\lambda = 210$ nm. Une première élution isocratique (tr = 7 min ; MeOH / H₂O) 82 : 18 a permis de dégrossir l'extrait. Une seconde CLHP préparative à polarité de phases inversée (mode isocratique ACN/H₂O 70 : 30, nous a permis d'obtenir 421 mg d'annonacine (tr = 20 min ; R = 3,96.10⁻³ % par rapport au culot pâteux (**A**)).

2.1.1.3 Identification de l'annonacine

L'identité du produit obtenu a été vérifiée par co-injection avec un témoin en CLHP. De plus, l'identification de l'annonacine a été effectuée par les analyses spectrales habituelles. Le spectre de masse haute résolution obtenu par CLHP-ESI-Orbitrap® montre un ion m/z 619,4537 correspondant à l'adduit sodique donnant pour formule brute $[C_{35}H_{64}O_7Na]^+$ ($\Delta ppm = 1,2$ ppm).

La présence d'une γ -méthyl- γ -lactone α,β -insaturée est mise en évidence par une réaction de Kedde positive et par une absorption IR à 1740 cm^{-1} , correspondant au groupement carbonyle conjugué. L'UV montre un maximum d'absorption à $\lambda = 210\text{ nm}$.

La structure de l'annonacine est confirmée par les spectres RMN 1H , RMN ^{13}C , ainsi que par les spectres de RMN bidimensionnelle COSY (corrélations 1H - 1H), HMQC (corrélation 1H - ^{13}C via la constante de couplage 1J) et HMBC (corrélation 1H - ^{13}C via les constantes de couplage 2J et 3J) (Tableau 110).

Annonacine		
Position	RMN ¹ H δ en ppm, J Hz	RMN ¹³ C δ en ppm
1	-	174,6
2	-	131,2
3a	<i>dd</i> 2,39 (15,0; 1,2)	31,9
3b	<i>dd</i> 2,43 (15,0; 8,2)	31,9
4	<i>m</i> 3,81	69,8
5	<i>m</i> 1,50	37,3
06-août	<i>m</i> 1,19-1,47	25,4-29,6
9	<i>m</i> 1,37	37,2
10	<i>m</i> 3,60	71,7
11	<i>m</i> 1,37	37,2
déc-13	<i>m</i> 1,19- 1,47	25,4-29,6
14	<i>m</i> 1,37	33,4
15	<i>m</i> 3,40	74,1
16	<i>m</i> 3,81	82,7
17a-18a	<i>m</i> 1,64	28,8
17b-18b	<i>m</i> 1,95	
19	<i>m</i> 3,79	82,7
20	<i>m</i> 3,40	74,1
21	<i>m</i> 1,37	33,3
22-30	<i>m</i> 1,19-1,47	25,2-29,6
31	<i>m</i> 1,26	22,7
32	<i>t</i> 0,87 (6,7)	14,5
33	<i>d</i> 7,18 (1,4)	151,9
34	<i>qd</i> 5,05 (6,8; 1,4)	78
35	<i>d</i> 1,40 (6,8)	19,1

Tableau 110 : Déplacements chimiques obtenus pour l'annonacine

2.1.2 Déréplication

2.1.2.1 Extraction

2.1.2.1.1 Nectar Guyanais

Le nectar (500 mL) a été centrifugé (15 min à 4000 tours.min⁻¹). Le culot (184,3 g) a été lavé à l'eau (3 x 150 mL), puis extrait à l'AcOEt distillé (3 x 150 mL). L'extrait a été évaporé à sec sous pression réduite pour donner 25,34 mg d'extrait gras orange pâle (rendement: 5,10⁻³ % m/v).

2.1.2.1.2 Alcool

L'alcool (500 mL) est tout d'abord acidifié par du H₂SO₄ (0,5 N) jusqu'à pH 3 puis trois extractions L/L à l'AcOEt (V = 300mL) avec une centrifugation pendant 15 min à 4000 tour.min⁻¹ permettant de supprimer l'émulsion produite par les sucres. Les différentes phases organiques sont réunies et évaporées à sec permettant d'obtenir un extrait de masse 141 mg (rendement = 4,7.10⁻² % m/v).

2.1.2.2 Préparation des échantillons et analyse

Les extraits ont été dissous dans du MeOH (0,5 mg.mL⁻¹ pour le nectar et 1 mg.mL⁻¹ pour l'alcool) puis filtrés avant l'injection dans le système chromatographique. Les étalons ont été préparés dans le méthanol à une concentration de 1 µM.

Le spectromètre utilisé était l'ESI-LTQ-Orbitrap® (VIII). Pour l'étude, la longueur d'onde λ a été fixée à 210 nm (absorption maximale des lactones insaturées). Le four de la colonne a été fixé à 30 °C. L'élution a été réalisée avec une phase mobile constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), suivant le gradient A / B 60 : 40 jusqu'à B 100 % en 25 min puis B 100 % pendant 7 min, à un débit de 0,3 mL.min⁻¹ (gradient n°2). Le volume d'injection était de 10 µL (boucle complète) pour les étalons et l'extrait.

La gamme de masse utilisée pour les analyses « full-scan » est m/z 250 à 1200 et de m/z 160 à 700 pour les études de fragmentation. La résolution en masse a été fixée à 60 000 pour le scan et à 30 000 pour les expériences de fragmentation. L'analyse a été menée en mode d'ionisation *electrospray* positif, avec une tension de spray fixée à 5 kV, la température du capillaire à 300 °C, les tensions de *tube lens* et de capillaire respectivement à 165 V et 45 V, les gaz de désolvatation et nébulisation respectivement à 40 UA et 12 UA. L'énergie de collision optimale était de 50 UA et le temps d'activation de 33 ms.

L'infusion post-colonne d'iodure de lithium (2 mM dans du MeOH) a été réalisée à un débit de 5 µL.min⁻¹ avec un raccord en T.

2.1.3 Études quantitatives

2.1.3.1 Extraction

2.1.3.1.1 Fruits, compléments alimentaires

Les différentes parties (péricarpe, graines et pulpe) ont été séparées. Les graines et les péricarpes séchés à température ambiante ont été broyés pour obtenir de fines poudres.

La pulpe et les poudres de graines et de péricarpe ont été extraites (2x100 ml / 100 g) par du cyclohexane sous agitation pendant 1 h, puis une filtration est effectuée pour obtenir différents marcs. Deux autres extractions au CH₂Cl₂ (2x100 ml / 100 g) sous agitation pendant 1 h ont été effectuées pour extraire l'annonacine et les autres acétogénines de polarité intermédiaire puis une filtration, un

séchage avec le MgSO_4 et enfin une évaporation sous pression réduite ont permis d'obtenir les différents extraits.

Les gélules ont été toutes ouvertes et leur contenu mélangé, donnant des fines poudres de feuilles.

Ces poudres et la poudre achetée en vrac ont été extraites ($2 \times 100 \text{ mL}/100 \text{ g}$) par du cyclohexane sous agitation pendant 1 h, puis une filtration a été effectuée pour obtenir des marcs dégraissés. Deux autres extractions au dichlorométhane ($2 \times 100 \text{ ml} / 100 \text{ g}$) avec agitation pendant 1 h ont été effectuées pour extraire l'annonacine et les autres acétogénines de polarité intermédiaire, puis une filtration, un séchage avec le MgSO_4 et enfin une évaporation ont permis d'obtenir les différents extraits.

Les différents masses et rendements des extraits obtenus sont indiqués dans le chapitre 4 (5.3.2.).

2.1.3.1.2 Nectars, confiture

Pour les nectars une centrifugation à $4000 \text{ tours.min}^{-1}$ pendant 15 min a été effectuée. Le culot obtenu et la confiture ont subi trois lavages successifs à l'eau permettant d'enlever les sucres. Deux extractions avec l'AcOEt ($100 \text{ ml} / 100 \text{ g}$) sous agitation pendant 1 h, suivies d'une filtration, d'un séchage avec le MgSO_4 et enfin d'une évaporation sous pression réduite ont été effectuées.

2.1.3.1.3 Bonbons

Les bonbons ont été tout d'abord mélangés avec de l'eau pendant 45 minutes puis ont subi une sonication pendant 30 min pour permettre l'extraction complète des molécules. Après trois extractions à l'AcOEt ($100 \text{ mL}/100\text{g}$) sous agitation pendant 1 h une filtration un séchage avec du MgSO_4 et enfin une évaporation sous pression réduite ont été effectuées.

2.1.3.1.4 Teinture mère

La teinture mère ($120 \text{ mL} \times 2$) a été tout d'abord évaporée à sec. Le résidu, repris dans 200 mL a subi deux extractions L/L AcOEt/ H_2O 50 : 50. Le contre-extrait a été séché par du MgSO_4 puis évaporé à sec sous pression réduite ($m = 534 \text{ mg}$; $R = 0,22 \%$).

2.1.3.1.5 Nectar Brésilien

Le nectar a été dilué au avec de l'eau distillée (1 : 1, 500 mL , pH 3) puis cinq contre-extractions au CH_2Cl_2 V/V ont été effectuées jusqu'à épuisement. Le contre-extrait a été évaporé à sec sous pression réduite.

2.1.3.2 Analyse2.1.3.2.1 Préparation des échantillons

Les extraits ont été dissous dans du MeOH (10 mg.mL^{-1}) et filtrés avant l'injection dans le système chromatographique.

2.1.3.2.2 Étude quantitativeGradient

Le spectromètre utilisé pour les études quantitatives est le CLHP-ESI-DAD-MSD et sa colonne associée décrits précédemment (**IV**). L'éluion a été réalisée avec une phase mobile constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), suivant le gradient A / B : 35 : 65 jusqu'à B 70 % en 5 min, un plateau pendant 15 min puis une diminution de la polarité jusqu'à 100 % de B en 10 min et enfin un plateau de 5 min (Figure 196). Le volume d'injection était de $10 \mu\text{L}$ (boucle complète) pour les étalons et les extraits.

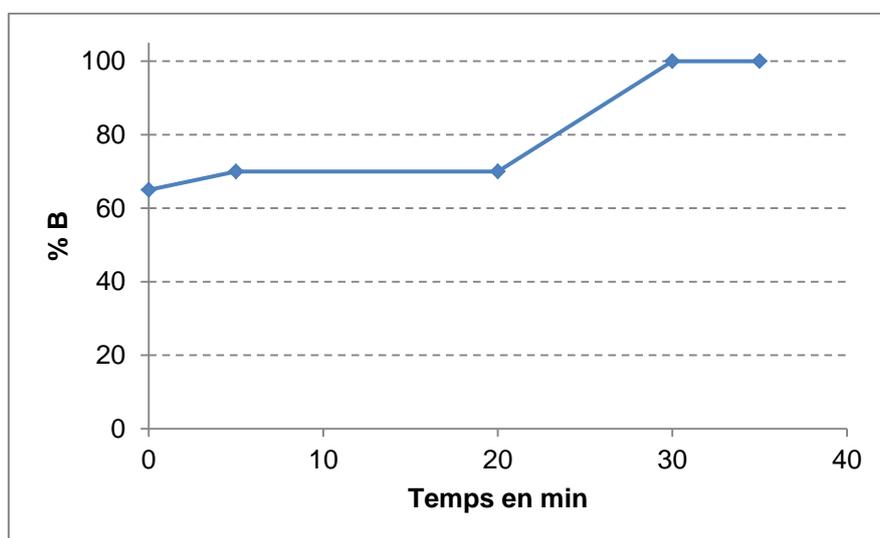
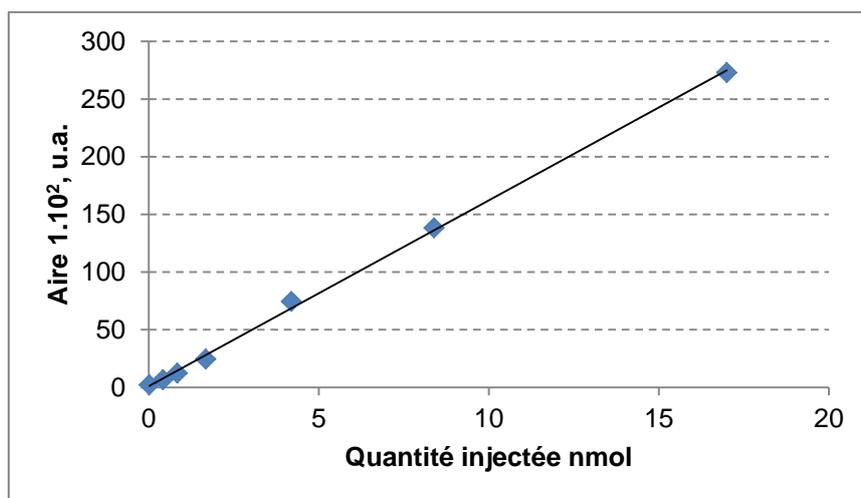


Figure 196 : Gradient utilisé pour les études quantitatives

Gamme d'étalonnage (UV)

À partir d'une solution mère de $1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$ d'annonacine diluée dans du MeOH, différentes dilutions ont été effectuées, afin d'obtenir les concentrations suivantes : $8,4 \cdot 10^{-4}$, $4,2 \cdot 10^{-4}$, $1,7 \cdot 10^{-4}$, $8,4 \cdot 10^{-5}$, $4,2 \cdot 10^{-5}$, $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. La limite de détection était de $5 \cdot 10^{-12} \text{ mol}$ injectées et la limite de quantification était de $1,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol}$ injectées en UV à $\lambda = 210 \text{ nm}$.

Les échantillons sont injectés trois fois avec un volume d'injection de $10 \mu\text{L}$. Les différentes aires obtenues en UV ($\lambda = 210 \text{ nm}$) ont permis d'établir une gamme d'étalonnage avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,999$ et une équation $y = 1,64 \cdot 10^{12} \cdot x$ (Figure 197).

Droite d'étalonnage**Figure 197 : Droite d'étalonnage pour les études quantitatives établie à partir des aires UV**

Les écarts type sont inférieurs à 5 %

2.1.3.2.3 Étude qualitative

Le système utilisé était l'ESI-DAD-LTQ-Orbitrap® (VII). Les conditions analytiques sont les mêmes que pour l'étude de déréplication en mode positif sans infusion post colonne avec du lithium.

Les ions fragmentés ont été choisis et analysés sous un mode « data dépendant ». Une liste des ions, nous paraissant les plus intéressants et correspondant aux ions les plus intenses des extraits a été établie (Tableau 111). Au cours de l'analyse à chaque scan, les trois ions les plus intenses de la liste ont été fragmentés.

589,41	591,42	599,43	601,44	603,46
613,41	615,41	617,44	619,45	629,38
631,42	633,43	635,45	641,44	643,45
645,47	647,41	649,43	651,44	653,46
655,42	657,43	659,45	661,46	663,48
673,43	677,46	689,46	705,45	727,46
785,52	789,55	805,54	843,56	857,57

Tableau 111 : Liste des ions à fragmenter2.2 Absorption Distribution2.2.1 Stabilité à pH alcalin

8 × 500 µl d'une solution d'annonacine à 17 mM dans du MeOH est dispersée dans huit tubes à essais contenant 1 mL de PBS où le pH a été préalablement ajusté (pH 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14) par l'ajout de différents volumes de NaOH d'une solution à 1 N directement dans le PBS. L'annonacine et ses éventuels produits de dégradation sont récupérés par extraction L/L (1 : 1) à

l'AcOEt puis évaporés à sec sous pression réduite. Les extraits ont été dissous dans 2 mL de MeOH puis dilué au 100^e (concentration finale : 4,2 µM). Pour l'analyse des échantillons, le système utilisé est l'ESI-DAD-LTQ-Orbitrap® (VII). Les conditions analytiques sont les mêmes que pour l'étude de déréplication mais sans infusion de lithium post-colonne. Les paramètres de masse pour les études par le sodium [M+Na]⁺ sont les mêmes que ceux présentés précédemment (chapitre 7, partie 2.1.2.3). Le volume d'injection est de 5 µl.

Les analyses ont été menées en scan de m/z 250-1200 et en SIM avec fragmentation des ions m/z 619,45 et m/z 635,44.

2.2.2 Étude des inserts

Quatre types d'inserts ont été analysés : des inserts nus ; « précoatés » au collagène ; « coatés » à l'albumine ou « précoatés » au collagène puis « coatés » à l'albumine (voir chapitre 7, Partie 1.6.2.).

Le « coating » au collagène est effectué sur le côté apical et est préparé avant les manipulations soit par le fabricant soit par les personnes de l'institut Cochin. Celui à l'albumine est effectué 30 min avant les manipulations au niveau apical et basolatéral des inserts par trempage dans une solution à 6.7 mg.ml⁻¹ soit 0.1 mM d'albumine.

Les inserts sont placés dans de nouvelles plaques avec un niveau adéquat de tampon (cf plus bas). Au temps $t = 0$, l'annonacine (concentration finale de 10 µM), est introduite au niveau apical avec un volume adéquat de tampon).

- Toutes marques, 6 puits : 1.5 ml apical et 2.6 ml basal
- Greiner, 12 puits : 0.3 ml apical et 1.25 ml basal
- Millipore, 12 puits 0.4ml apical et 2ml basal
- Millipore, 24 puits 0.4ml apical et 0.6ml basal
- Corning, 24 puits 0.1ml apical et 0.6ml basal

Au temps $t = 45$ min, les inserts et la solution apicale sont recoltés dans une nouvelle plaque. Le pôle apical ainsi que toutes les solutions basolatérales sont récupérés, pour extraction et l'analyse. Les différents compartiments apicaux et basolatéraux sont récupérés quantitativement et extraits par 2 fois d'AcOEt (V/V) puis évaporés à sec au speedvac®. Chaque échantillon est ensuite resolubilisé dans 200 µl de MeOH qualité HPLC avant d'être injecté dans le système chromatographique (VI).

Étude des inserts à diamètre de pores à 0,4 µm

Le système utilisé est l'UPLC-ESI-TQ-Vantage® (VI). La colonne utilisée est une Hypersil Gold® C₁₈ 1,9 µm × 2,1 × 100 mm et les solvants sont de l'eau MilliQ et de l'ACN qualité CLHP.

Une élution isocratique est employée ACN / H₂O 66 : 34 pendant 5 min. La température de colonne était de 50°C. L'annonacine a pour temps de rétention 2,6 min dans ce système. Les injections étaient de 10 µL. Les études ont été effectuées en mode d'ionisation *electrospray* positif en SIM (*Single Ion Monitoring*) en recherchant l'ion [M+Na]⁺ m/z 619,5 ainsi qu'en mode SRM (*Single Reaction Monitoring*) en recherchant la transition de [M+Na]⁺ m/z 619,5 à [M+Na⁺ - lactone] m/z 507,5.

La tension du spray était de 3250 V, la température du capillaire de 300 °C et sa tension fixée à 51 V, la température de vaporisation de 350 °C ; les gaz de désolvatation et nébulisation respectivement à 45 UA et 20 UA. En mode SIM le temps de scan est de 0,1 s et la résolution sur Q1 fixée à 0,2 Th. En mode SRM le temps de scan est de 0,2 s, la résolution de Q1 et Q3 est fixée à 0,4 Th, la pression de collision est 1,8 mTorr et enfin l'énergie de collision est fixée à 40 eV.

Étude des inserts avec d'autres diamètres de pores et différents « coatings »

Le système employé est le CLHP-ESI-TQ Quattro Ultima Waters® (VII), utilisé en mode d'ionisation *electrospray* positif en SRM.

Une élution isocratique est employée ACN/H₂O, 85 : 15 à un débit 0,3 mL.min⁻¹. Le volume d'injection est de 5 µL et le temps de rétention de l'annonacine à 4,1 min.

La tension du spray était de 3250 V, la température du capillaire de 300 °C et sa tension à 51 V, la température de vaporisation est de 350 °C, les gaz de désolvatation et de nébulisation sont respectivement à 45 UA et 20 UA. Le temps de scan est de 0,25 s, la résolution sur Q1 et Q3 est fixée à 0,7 Th et l'énergie de collision est fixée à 40V.

2.2.3 Caco-2

2.2.3.1 Uptake

Le test de séquestration (*Uptake*) a été réalisé en utilisant une solution d'annonacine à 10 µM dans des plaques de 6 puits (volume apical 1,5 mL ; basolatéral 2,5 mL). Les cellules précédemment cultivées pendant 14 jours jusqu'à confluence avaient une densité initiale de 100 000 cellules / puits.

Les temps d'incubation étaient de 30 min, 1 h et 24 h. Quatre puits ont été utilisés par condition ainsi que 2 puits sans cellule comme témoin négatif. Après incubation, le milieu de culture et les fractions cellulaires obtenues par grattage, sont récupérés et extraits trois fois à l'AcOEt (V/V) puis évaporés à sec au speedvac®.

Les échantillons sont resolubilisés dans 200 µL de méthanol qualité CLHP. L'annonacine est dosée par CLHP-ESI-SM triple quadripôle (VIII) (avec injections à 5 µL et 1 µL), en triplicat, dans les mêmes conditions que la deuxième étude des inserts.

Gamme d'étalonnage

À partir d'une solution 1,7 x10⁻³ mM d'annonacine diluée dans du MeOH, 8 dilutions différentes ont été effectuées, afin d'obtenir les concentrations suivantes: 8,0.10⁻⁵, 4,0.10⁻⁵, 2,0.10⁻⁵, 8,0.10⁻⁶, 4,0.10⁻⁶, 8,0.10⁻⁷, 4,0.10⁻⁷, 8,0.10⁻⁸ mM. La limite de détection était de 8.10⁻¹⁵ mol injectées et la limite de quantification était de 8.10⁻¹⁴ mol injectées en SIM et en SRM.

Les solutions ont été injectées en triplicat à deux volumes d'injections 1 µL et 5 µL permettant d'obtenir deux gammes d'étalonnage.

- une gamme avec un volume d'injection de 5 µL avec un coefficient de détermination R² = 0,991 et une équation $y = 6.10^{12} x + 10,23$ (Figure 198)

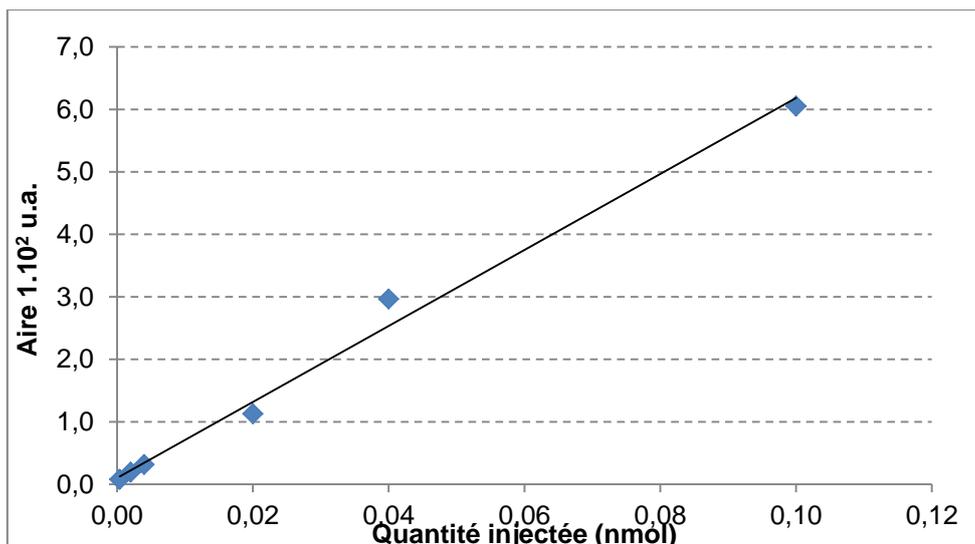


Figure 198 : Gamme d'annonacine (5 µl) obtenue par CLHP-SRM pour étude d'Uptake

- une gamme avec un volume d'injection de 1 µL avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,984$ et une équation $y = 3.10^{13} x + 76,3$ (Figure 199).

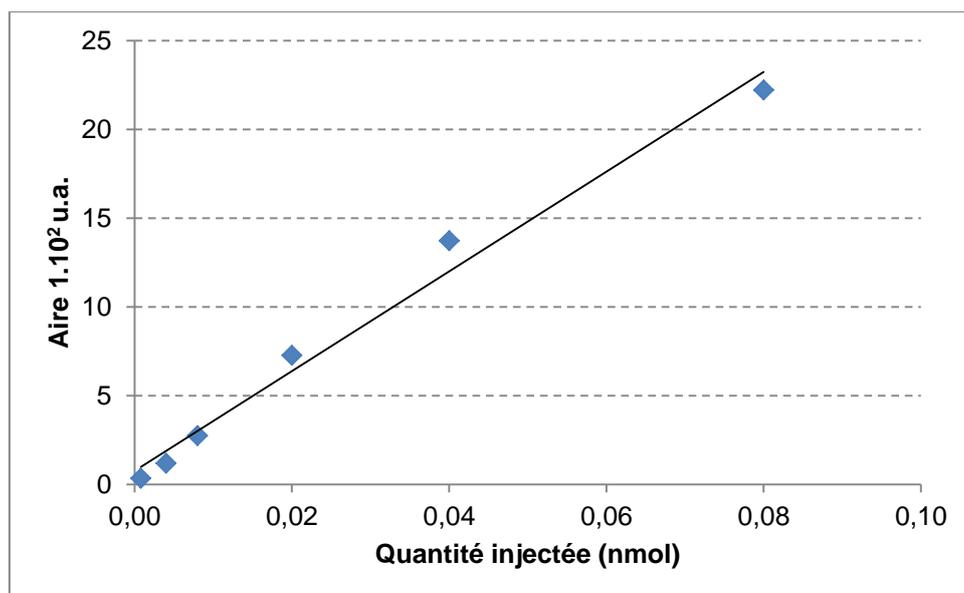


Figure 199 : Gamme 1 µl pour test uptake

Les échantillons sont injectés trois fois avec un volume d'injection de 1 ou 5 µL.

2.2.3.2 Toxicité

2.2.3.2.1 Mesure de perméabilité (TEER)

Après 18 jours de culture, les inserts nus, ou avec les cellules Caco-2, sont placés dans de nouvelles plaques 6 puits avec un volume de 2,5 mL de tampon HEPES/Tris à pH 7,4 au niveau basolatéral. A $t = 0$ min, un volume de 1,5 mL de solution d'annonacine solubilisée dans du tampon Mes/Tris à pH 6 aux concentrations de 1 µM, 5 µM et 10 µM, est introduit au niveau du pôle apical.

Aux temps $t = 0$ min et $t = 30$ min, les TEER sont mesurés avec un voltmètre pour tissus épithéliaux (EVOM).

2.2.3.2.2 Cytotoxicité : LDH

Un kit de mesure de la libération LDH (Lactate déshydrogénase) *in vitro* a été utilisé sur les cellules intestinales Caco-2 (culture : cf. paragraphe *Uptake*), traitées avec une solution d'annonacine aux concentrations finales 10 μ M, 1 μ M, 100 nM et 10 nM, à partir d'une solution-mère de 10 mM d'annonacine dans le DMSO. L'incubation a été effectuée à 30 min et à 24 h, à 37°C et à 5,1 % de CO₂, pour les différentes dilutions et les témoins de viabilité 0 % (Triton) et de viabilité 100 % (DMSO à 0,1 %). Après l'incubation, les incubats sont centrifugés pendant 4 min à 250 g, 100 μ L de chaque surnageant est prélevé. 20 μ L sont utilisés pour la détermination de la cytotoxicité avec ajout de 100 μ L du réactif LDH et 80 μ L du milieu DMEM. L'absorbance à la longueur d'onde de 450nm est mesurée avec un spectrophotomètre UV-Visible. Le pourcentage de la cytotoxicité, a pu être calculé par la formule :

$$\% \text{ Cytotoxicité} = \left(\frac{(\text{Absorbance de la dilution} - \text{Absorbance controle 100 \% viabilité})}{(\text{Absorbance controle 0 \% viabilité} - \text{Absorbance controle 100 \% viabilité})} \right) \times 100$$

2.2.4 Fixation aux protéines

L'étude a été effectuée en triplicat sur 2 mL d'une solution d'albumine bovine à 50,3 mg.mL⁻¹. Un volume de 5 μ L d'annonacine d'une solution d'annonacine à 17 mM dans le DMSO a été mis à incuber pendant 24 h à 37°C (concentration finale : 42 μ M). L'annonacine a été extraite par deux fois à l'AcOEt (V/V). Les extraits ont été évaporés au speedvac[®] pendant 1 h.

Les extraits sont remis en solution dans 120 μ L d'ACN et 80 μ L de PBS.

Le dosage par CLHP-UV ($\lambda = 210$ nm) a été effectué par une CLHP Waters avec un gradient ACN/H₂O 40 : 60 jusqu'à 100 % ACN en 35 min. L'annonacine a un temps de rétention de 17 min dans ce système chromatographique.

2.2.5 hCMEC/D3 et Lucifer Yellow

Chaque expérience est réalisée en triplicat. Un volume de 2,6 mL de tampon HEPES/Tris est placé au niveau basolatéral de plaques 6 puits. Les inserts nus ou contenant les cellules hCMEC/D3, après 6 à 7 jours de culture, sont placés dans ces nouvelles plaques. Au temps $t = 0$, 1,5 mL de solution de Lucifer Yellow à 100 μ M solubilisée dans le tampon de perméabilité HEPES/Sodium/HBSS, en présence ou non d'annonacine aux concentrations finales 1 μ M ; 5 μ M ; 10 μ M ; 20 μ M, sont placés au niveau du pôle apical. Aux temps $t = 10$ min, 25 min et 45 min, les inserts et la solution apicale sont replacés dans une nouvelle plaque 6 puits contenant déjà 2,6 mL de tampon de perméabilité.

Les incubations sont réalisées dans un incubateur à 37°C, avec une humidité de 95 % et à 5 % de CO₂.

Pour l'analyse, dans une plaque à 96 puits, on met 50 μ L d'une gamme standard de Lucifer Yellow, et les solutions récupérées à $t = 0$ min, 10 min, 25 min et 45 min et les échantillons apicaux. La fluorescence est calculée aux longueurs d'ondes d'excitation 425 nm et d'émission 538 nm. Les calculs de perméabilité sont exécutés en utilisant le principe de clairance décrit par Siflinger-Birnboimet et *al.* De cette façon, on obtient une valeur de perméabilité indépendante de la concentration et de la surface de l'insert. Pendant l'expérience de 45 minutes, le volume de clairance augmente linéairement avec le temps. La pente des courbes de clairance des inserts avec cellules est notées PS_i et la pente des courbes des inserts sans cellule, PS_f. La perméabilité de la membrane

endothéliale pour le LY est calculée par la formule $1/P_e = 1/PS_t - 1/P_f$ en $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La PS_e est ensuite divisé par la superficie de la membrane (cm^2) qui donnera le coefficient de perméabilité endothélial (P_e en $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$).

2.3 Métabolisation

2.3.1 Mise au point

2.3.1.1 Manipulation

Les microsomes sont incubés dans un bain marie à 37°C sous agitation, dans un volume total de 500 μL et constitué de : 250 μL de tampon phosphate 50 μL de système générateur

Les différentes conditions sont :

- 3 durées d'incubation $t = 0$; $t = 30$ min ; $t = 60$ min ; $t = 90$ min ;
- 3 volumes (0 μL , 10 μL et 20 μL) de microsomes de rats induits au Phénobarbital (PB) (2 nmol de CYP. mg^{-1} de protéines et 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de protéines dans un volume total de 500 μL soit 25, 50 et 100 μM) ;
- 3 volumes (1,25 μL , 2,5 μL et 5 μL) de solution d'annonacine à 10 mM, soit 25, 50 et 100 μM .

Dans ces expériences de mises au point, un paramètre est changé pour chaque manipulation, les autres variables sont alors fixées de façon arbitraire : temps d'incubation de 60 minutes, 20 μL de microsomes et 2,5 μL d'annonacine à 10 mM.

5 μL de glucose-6-phosphate-deshydrogénase sont mis dans les tubes pour déclencher la réaction. Le volume final est obtenu par addition d'eau MilliQ. Les tubes témoins ne contiennent pas de glucose-6-phosphate-deshydrogénase ni de système générateur.

La réaction est arrêtée en ajoutant un volume de 500 μL d'AcOEt à l'aide d'une seringue Hamilton. Les tubes sont alors centrifugés 5 minutes à 2500 $\text{tours}\cdot\text{min}^{-1}$ à 4°C. La phase organique contenant l'annonacine et ses métabolites est récupérée et extraite une seconde fois par de l'AcOEt (V/V), enfin on évapore les phases organiques sous azote.

Le résidu sec est repris dans 200 μL de MeOH puis on effectue l'analyse par CLHP-MSD (VI). L'injection était de 20 μL . Le gradient est linéaire commençant à $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50 : 50 et finissant à 100 % CH_3CN en 25 min avec un plateau de 10 min. Les conditions d'analyse en masse sont : le gaz de nébulisation à 25 psi, et le gaz de désolvatation à 7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, température du capillaire de 300 °C et la tension de 4 kV.

2.3.2 Microsomes induits

Les microsomes sont incubés pendant une durée de 60 min , dans un bain marie à 37°C sous agitation, dans un volume total de 500 μL et constitué de : 250 μL de tampon phosphate, 50 μL de système générateur, 10 μL de microsomes de rats induits au Phénobarbital (PB : 2 nmol de CYP. mg^{-1} de protéines), 40 μL de microsomes de rats non induit (0,7 à 0,8 nmol de CYP. mg^{-1}) ou 20 μL de microsomes de rats induits au β -naphtaflavone (BNF : 1,5 nmol de CYP. mg^{-1} de protéines) et 2,5 μL de solution d'annonacine à 10 mM et 5 μL de glucose-6-phosphate-deshydrogénase pour déclencher la réaction. Le volume final est obtenu par addition d'eau MilliQ. Les tubes témoins ne contiennent pas de glucose-6-phosphate-deshydrogénase ni de système générateur. L'extraction est la même que précédemment.

Le résidu sec est repris dans 200 μL de MeOH puis on effectue l'analyse par CL-UV-SM. L'injection est de 5 μL dans le système CLHP-DAD-ESI-LTQ/Orbitrap® (VIII). L'élution a été réalisée avec une phase mobile constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), suivant le gradient A / B 50 : 50 jusqu'à B 100 % en 25 min puis B 100 % pendant 7 min, à un débit de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (gradient n°1). Le volume d'injection était de 10 μL (boucle complète) pour les étalons et l'extrait.

Les conditions en masse sont : en mode d'ionisation positive, une tension fixée à 5 kV, la température du capillaire à 300 °C, sa tension à 45 V et celle du tube lens à 165 V. L'énergie de collision optimale était de 50 UA et le temps d'activation de 33 ms. En mode d'ionisation négative la tension est fixée à 3 kV, la température du capillaire à 300 °C, sa tension à -60V et le *tube lens* à -120 V. L'énergie de collision optimale était de 50 u.a. et le temps d'activation de 33 ms.

2.3.3 Étude cinétique : détermination du K_m et V_i

Les conditions d'incubation et d'extraction sont identiques hormis l'utilisation d'un volume fixe de microsomes de rats induits au BNF (10 μL soit 0,75 nmol de CYP) et des volumes variables d'annonacine 2,5 μL , 5 μL ou 10 μL de solution d'annonacine de 1 ou 10 mM (5 à 100 μM). Le spectromètre utilisé est l'UPLC-ESI-TQ Vantage (VI).

L'élution a été réalisée avec une phase mobile constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), suivant le gradient A / B : 55 : 45 pendant 2 min puis une augmentation de B pendant 5 min jusqu'à B 50 % puis une diminution de polarité jusqu'à 100 % de B en 6 minutes enfin un plateau à 100% de B pendant 1 min. L'annonacine a pour temps de rétention 12 min dans ce système éluant (Figure 200). Le volume d'injection est de 10 μL . Les paramètres de masse sont les même que celles ceux des études des inserts (chapitre 7 2.2.2.1).

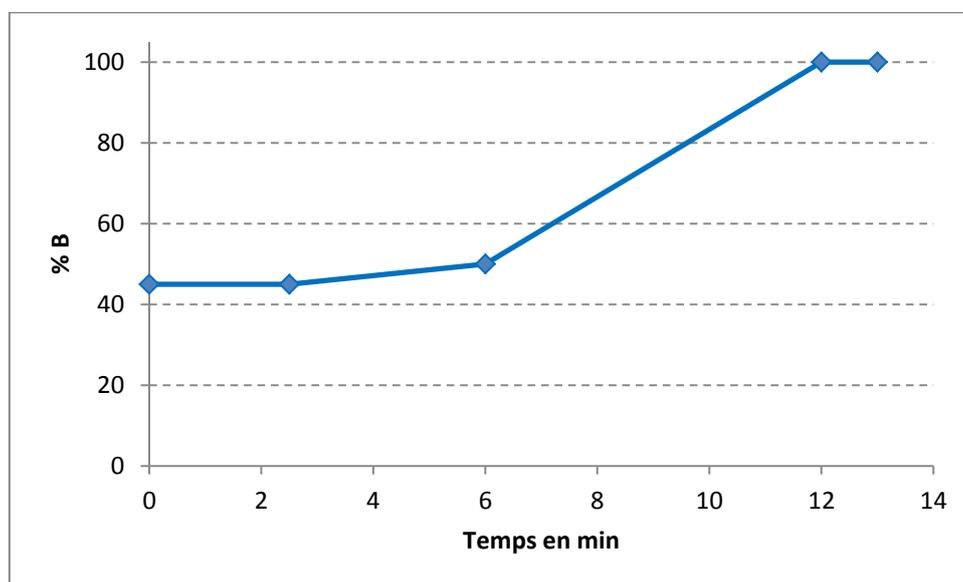


Figure 200 : Gradient UPLC utilisé pour les études de métabolisation

2.3.4 Microsomes humains

2.3.4.1 Manipulation

Les conditions d'incubation et d'extraction sont identiques hormis l'utilisation de 100 μL de microsomes humains. Les conditions de séparation chromatographiques et les conditions de spectrométrie de masse sont exactement les mêmes que pour les études de dérégulation.

2.3.5 Métabolisation en présence d'inhibiteurs des cytochromes

Les microsomes humains (75 μL) sont incubés pendant 60 min, dans un bain marie à 37°C sous agitation, dans un volume total de 500 μL et constitué de : 250 μL de tampon phosphate, 50 μL de système générateur, 2.5 μL d'annonacine 10 mM et 5 μL de glucose-6-phosphatedéhydrogénase pour déclencher la réaction. Le volume final est obtenu par addition d'eau MilliQ.

Lors de cette expérience, nous avons réalisé l'incubation avec différents inhibiteurs spécifiques de cytochromes P450. Le témoin ne contenait pas d'inhibiteur (Tableau 112).

Inhibiteur	Concentration	CYP Inhibés
Kétoconazole	2 μM	3A4
Sulfaphenazole	10 μM	2C9
Furafylline	5 μM	1A2
Ticlopidine-Cl	30 μM	2C19
Quinidine	10 μM	2D6

Tableau 112 : Concentration des inhibiteurs employés

L'arrêt de la réaction et l'extraction des composés et l'analyse sont exactement les mêmes que pour les études de métabolisation chez l'humain.

2.3.6 Cytochromes transfectés

2.3.6.1 Mise au point

Quatre concentrations différentes d'annonacine (10, 20, 50 et 75 μM) ont été mises à incuber pendant 24 h à 37 °C en présence de cellules Ad293-Red et Ad293-Red-CYP3A4 dans des flasques de 70 mL (25 cm^2) dans du milieu de culture. A confluence les cellules étaient d'environ 3.10^6 cellules par flasques. Le volume final était de 1 mL.

Une confirmation a été obtenue en triplicat sur des cellules Ad293-Red, Ad293-Red-CYP3A4 et Ad293-Red-CYP3A7 avec une concentration d'annonacine à 50 μM (incubation de 24 h à 37 °C).

2.3.6.2 Étude des cytochromes impliqués

Des cellules Ad293-Red ; Ad293-Red-CYP3A4 ; Ad293-Red-CYP1A2 ; Ad293-Red-CYP1A1 ; Ad293-Red-CYP2C9 ; Ad293-Red-CYP2C19 et Ad293-Red-CYP2B6 ont été mises en cultures dans des flasques de 70 mL (25 cm^2) dans du milieu de culture. L'annonacine a été mise en incubation pendant 24 h à 37 °C pour une concentration finale 75 μM (solution mère de 10 mM).

Le spectromètre (VII) et les conditions analytiques sont exactement les mêmes que pour les études pour la déréplication (Chapitre 7 2.1.2.2.3).

2.4 Synthèse des métabolites

2.4.1 Bioconversion

Chaque espèce de champignons a été mise en culture séparément dans 50 mL de milieu YMS dans des erlenmeyers pendant 48h. Après ce temps, ils sont récupérés sur gaze puis lavés par du tampon phosphate à pH = 6,2.

2.4.1.1 Étude par lots

3 g de biomasse de chaque microorganisme sont placés dans un erlenmeyer de 50 mL et remis en suspension avec 30 mL de tampon phosphate pH 6,2. 100 µL de solution d'annonacine (77 mM) sont ajoutés à ce milieu (concentration finale $2,6 \cdot 10^{-6}$ M). Les erlenmeyers sont mis à incuber sous agitation (160 rpm) dans une pièce thermostatée à 37°C et des prélèvements de 1 mL sont effectués à t = 24 h, t = 36 h et t = 72 h. Le pH est vérifié à chaque prélèvement. 1 mL de MeOH est ajouté aux prélèvements, les échantillons sont agités, centrifugés pendant 10 min et les surnageants sont récupérés puis injectés directement en UPLC-ESI-SM.

2.4.1.2 Étude individuelle des champignons

L'étude individuelle des souches du lot C a été conduite de la même façon que l'étude par lots. 9 g de biomasses de chacune des trois espèces de champignon ont été mis séparément à incuber dans des erlenmeyers de 50 mL en suspension dans 30 mL de tampon phosphate à pH 6,2. 100 µl d'une solution mère d'annonacine à 77 mM ont été associés à ce milieu, concentration finale $2,6 \cdot 10^{-6}$ M.

Les erlenmeyers sont mis à incuber sous agitation (160 rpm) dans une pièce thermostatée à 37°C et des prélèvements de 1 mL sont effectués à t = 24h, t = 36h et t = 72h. Le pH est vérifié à chaque prélèvement. 1 ml de MeOH est ajouté aux prélèvements, les échantillons sont agités, centrifugés pendant 10 min et les surnageants sont récupérés puis injectés en UPLC-ESI-SM.

2.4.1.3 Étude des bioconversions par *Aspergillus alliaceus*

3 g de biomasse d'*A. alliaceus* sont placés dans une fiole de 10 mL et remis en suspension avec 5 mL de tampon phosphate pH 6,2.

- Les conditions anaérobies « inertes » ont été obtenues par récupération puis centrifugation et suspension de la biomasse dans lequel de l'argon a préalablement bullé pendant 30 minutes. Cette suspension est transférée dans une fiole de 10 mL qui est ensuite fermée par un septum.

La purge des flacons contenant la suspension de champignons est réalisée suivant un cycle vide/argon qui est répété trois fois au moyen d'une seringue associée à un apport d'argon. La solution d'annonacine à concentration finale $2,5 \cdot 10^{-4}$ M est injectée par une seringue pour garder l'atmosphère inerte.

- Les autres conditions d'incubation sont :

- le lot 1 : $2,5 \cdot 10^{-4}$ M d'annonacine,
- le lot 2 : $2,5 \cdot 10^{-4}$ M avec un flux d'air constant tout au long de l'incubation ;
- le lot 3 : $5 \cdot 10^{-4}$ M d'annonacine avec un flux d'air constant tout au long de l'incubation ;
- le lot 4 : $2,5 \cdot 10^{-4}$ M d'annonacine et du glycérol à une concentration de $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;

Les erlenmeyers sont mis à incuber sous agitation (160 rpm) dans une pièce thermostatée à 37°C et des prélèvements de 1 mL sont effectués à t = 24 h, t = 36 h, t = 42 h et t = 72 h. Les conditions d'extraction et d'analyse sont les mêmes que pour les autres études de bioconversion.

2.4.2 Catalyse biomimétique

Pour les études analytiques et préparatives respectivement 2 mg et 160 mg d'annonacine ont été mises en contact avec le catalyseur d'intérêt solubilisé dans un mélange CH₂Cl₂/ACN 1/1 avec un volume adéquat permettant une concentration finale catalytique de 3 mM.

L'oxydation par PhIO se fait directement par ajout dans le milieu réactionnel.

L'oxydation par l'association H₂O₂ et Imidazole se fait en deux temps :

- Une quantité de 4 équivalent d'Imidazole est ajoutée directement dans le milieu réactionnel.

- Un mélange d'Imidazole, d'ACN et de peroxyde d'hydrogène est injecté goutte à goutte.

Les milieux réactionnels sont maintenus sous agitation à température ambiante pendant 24h.

Les conditions de réactions d'oxydation standards sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 113).

	Substrat	Catalyseur	Co-catalyseur	Oxydant	Temps de réaction	Température
Réaction 1	40 éq.	C 1 éq.	Imidazole 24 éq.	H ₂ O ₂ 200 éq.	24 h	T.A.
Réaction 2	40 éq..	C 1 éq.	non	PhIO 1.2 éq.	24 h	T.A.

Tableau 113 : Conditions oxydantes utilisées lors des études de catalyse biomimétique

Les bruts réactionnels sont ensuite dilués au 100^o puis directement analysés. L'analyse a été effectuée sur un système CLHP-ESI-MSD (**VI**). Les conditions chromatographiques sont les mêmes celles utilisées pour la déréplication. Les conditions de masse en mode d'ionisation *electrospray* positif sont : tension de spray fixée à 3 kV, la température du capillaire à 300 °C, le débit du gaz de *désolvatation* à 7 L.min⁻¹ et celui du gaz de nébulisation à 25 psi.

2.4.3 Catalyse biomimétique avec protection et déprotection de l'annonacine

Une quantité catalytique de DMAP (≤ 1 mg) est ajoutée avec 0,05 mmol d'Annonacine dans 2-3 mL de pyridine anhydre à 0°C, puis le réactif silylant (*ter*-Butyldiméthyl silyle triflate) est mis en réaction à raison de 2 équivalents par hydroxyle à silyler (soit 4 équivalent = 0,2 mmol), pendant 48 h à température ambiante. La réaction est diluée à l'eau puis extraite trois fois par du CH₂Cl₂. La phase organique est évaporée à sec à 50 °C sous vide de trompe à eau puis de pompe à palettes. Après la réaction de catalyse biomimétique est effectuée sur ce résidu. Le milieu réactionnel est évaporé à sec puis soumis à la réaction de désilylation. La déprotection se fait par 1,5 mL de TBAF 1 M dans le THF à 45 °C sous azote pendant 6 h. La réaction est diluée dans de l'eau permettant de stopper la réaction

puis deux à trois lavages à l'AcOET sont effectués. Les phases organiques sont réunies et tirées à sec.

L'analyse a été effectuée sur UPLC-ESI-TQ Vantage **(VII)** avec les mêmes conditions analytiques que pour les études de Km et V en métabolisation (chapitre 7 2.3.3).

2.5 Analyse des métabolites hémisynthétiques par MALDI-TOF-TOF

La solution de matrice d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), à 20 mg.mL^{-1} a été préparée dans un mélange MeOH/ CHCl_3 (1:1, V/V). La solution de lithium a été préparée à une concentration de $100 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$. Un mélange entre la solution stock d'acétogénine et cette solution de lithium a été faite dans les proportions de solution de lithium 22 fois supérieure à la concentration en acétogénines

Bibliographie

Bibliographie
Bibliographie

AFSSA, **2007**. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation d'un projet d'arrêté relatif à l'emploi de substances à but nutritionnel ou physiologique et de plantes et préparations de plantes dans la fabrication des compléments alimentaires. *Saisine 2007-SA-0231* (2007/12/21) [pp 3, 5].

AFSSA, **2010**. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux risques liés à la consommation de corossol et de ses préparations. *AFSSA Saisine 2008-SA-0171* (2010/04/28).

Abbott N.J., Ronnback L., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2006**, 7, 41-53.

Adjahohoun E.J. **1984**, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Gabon, Agence de Coopération Culturelle et technique, Paris.

Allegrand J., Touboul D., Schmitz-Afonso I., Guérineau V., Giuliani A., Le Ven J., Champy P., Laprèvote O. Structural study of acetogenin by tandem mass spectrometry under high and low collision energy. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **2010**, 24, 3602-3608.

Angibaud G., Gaultier C., Roscol O. Atypical parkinsonism and annonaceae consumption in New Caledonia, *Mov. Dis.*, **2004**, 19(5), 603-605.

Antkiewicz-Michaluk L., Romanska I., Papla I., Michaluk J., Bakalarz M., Vetulani J., Krygowska-Wasj A., Szczudlik A. Neurochemical changes induced by acute and chronic administration of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol in dopaminergic structures of rat brain. *Neurosciences*, **2000a**, 96(1), 59-64.

Antiewicz-Michaluk L., Romanska I., Vetulani J. Antidopaminergic effects of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol. *J. Neural Transm.*, **2000b**, 107, 1009-1019.

Apartis E., Gaymard B., Verhaeghe S., Roze E., Vidailhet M., Lannuzel A. Predominant cortical dysfunction in Guadeloupean parkinsonism, *Brain*, **2008**, 131, 2701-2709.

Artursson P., Palm K., Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 46, 27-43.

Asha S., Vidyavathi M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. *Biotechnol. Adv.*, **2009**, 27, 16-29.

Badrie N., Schauss A.G. **2010**, Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. Chapter 39 In bioactive foods in promoting health: Fruits and vegetables. Éd. Scientifique Elsevier, , 621-643.

Bajin ba Ndob I., **2008**. Étude chimique et biologique de plantes antiparasitaires gabonaises. Thèse de doctorat des Universités Paris-Sud 11 et Omar Bongo (Gabon).

Bajin ba Ndob I., Champy P., Gleye C., Lewin G., Akendengué B. Annonaceous acetogenins: Precursors from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry Lett.*, **2009**, 2, 72-76.

Baker M., Litvan I., Houlden H., Adamson J., Dickson D., Perez-Tur J., Hardy J., Lynch T., Bigio E., Hutton M. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear progressive palsy. *Hum. Mol. Genet.*, **1999**, 8, 711-775.

Balimane P.V., Chong S., Morrison R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **2000**, 44(1), 301-312.

Balimane P.V., Saeho Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *D.D.T.*, **2005**, 5(10) 335-343.

Bibliographie

- Banerjee R., Starkov A.A., Beal M.F., Thomas B. Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, 1792(7), 651-663.
- Banning J.W., Uretsky N.J., Patil P.N., Beal J.L. Reticuline: a dopamine receptor blocker. *Life Sci.*, **1980**, 26, 2083-2091.
- Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N.D. Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): A new ion source for mass spectrometry. *J. Chem. Soc., Chem Commun.* **1981**,7, 325-327.
- Barrachina I., Royo I., Baldoni H.A., Chahboune N., Suvire F., DePedro N., Zafra-Polo M.-C., Bermejo A., El Aouad N., Cabedo N., Saez J., Tormo J. R., Enriz R.D., Cortes D. New antitumoral acetogenin 'Guacone type' derivatives: Isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation of diacetyl-guacone. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 4369-4381.
- Baumann A., Lohmann W., Schubert B., Oberacher H., Karst U. Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to *in vivo* and *in vitro* methods *J. Chromatogr. A.*, **2009**, 1216, 3192-3198.
- Beal M.F. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.*, **2000**, 23, 298-304.
- Beaune P.H., Lorient A.M. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. *Med Sci.*, **2000**, 16, 1051-1056.
- Behrens I., Kissel T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers ? *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2003**, 19(5), 433-442.
- Bermejo A., Figadère B., Zafra-Polo M.-C., Barrachina I., Estornell E., Cortes D. Acetogenins from Annonaceae: Recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, 22, 269-303.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington, Clinical: morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.*, **1973**, 20, 415-455.
- Berry C., La Vecchia C., Nicotera P. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell. Death. Differ.*, **2010**, 17, 1115-1125.
- Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neurosci.*, **2000**, 3, 1301-1306.
- Betarbet R., Sherer T.B., Greenamyre J.T. Animal models of Parkinson's disease, *Bioassays*, **2002**, 24, 308-318.
- Bharath S., Hsu M., Kaur D., Rajagopalan S., Andersen J.K. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, 64, 1037-1048.
- Bleakney W.A. new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor. *Phys. Rev.*, **1929**, 34, 157-160.
- Bories C., Loiseau P., Cortes D., Myint S.H., Hocquemiller R., Gayral P., Cavé A., Laurens A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. *Planta Med.*, **1991**, 57, 434-436.
- Boyer A. **2009**, Ethnobotanique appliquée : plantes utilisées traditionnellement contre les fièvres dans le nord de Madagascar. Thèse de Doctorat de pharmacie, Université Paris-Sud 11.
- Bravo S.A., Nielsen C.U., Amstrup J., Frokjaer S., Brodin B. In-depth evaluation of Gly-Sar transport parameters as a function of culture time in the Caco-2 cell model. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2004**, 21(1), 77-86.
- Brown P. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems, CXVIII, aliphatic epoxides, *Tetrahedron.*, **1966**, Suppl. 8(part I), 241-267.

Bibliographie

- Brown T.P., Rumsby P.C., Capleton A.C., Rushton L., Levy L.S. Pesticides and Parkinson's Disease – Is there a link ? *Env. Health Persp.*, **2006**, 114(2), 156-164.
- Buraud M. **2010**, Ethnopharmacologie appliquée à la Guadeloupe dans le cadre du programme TRAMIL, Thèse de Doctorat de pharmacie, Université Paris-Sud 11.
- Cabre H. **1939**, Flore de la Guadeloupe et de ses dépendances. Tome III- Notes de phytothérapie allopathique et homéopathique comparées. Imprimerie Catholique Basse-Terre, Guadeloupe, 240 p.
- Camuzat A., Romana M., Dürr A., Feingold J., Brice A., Ruberg M., Lannuzel A. The PSP-associated MAPT H1 subhaplotype in Guadeloupean atypical Parkinsonism. *Mov. Disord.*, **2008**, 23(16), 2384-2391.
- Caparros-Lefèbvre D., Elbaz A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: A case-control study. *Lancet*, **1999**, 354(9175), 281-286.
- Caparros-Lefèbvre D., Sergeant N., Lees A., Camuzat A., Daniel S., Lannuzel A., Brice A., Tolosa E., Delacourte A., Duyckaerts C. Guadeloupean parkinsonism: A cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain*, **2002**, 125, 801-811.
- Caparros-Lefèbvre D, Lees A.J. Atypical unclassifiable Parkinsonism on Guadeloupe: An environmental toxic hypothesis. *Mov. Disord.*, **2005**, 20(12), 114-118.
- Caparros-Lefèbvre D. Steele J., Kotake Y., Ohta S. Geographic isolates of atypical parkinsonism and tauopathy in the tropics : possible synergy of neurotoxins. *Mov. Disord.*, **2006**, 21(10) 1769-1771.
- Cashaw J.L., Geraghty C.A. Tetrahydropapaveroline and the blood-brain barrier in rats. *Alcohol*, **1991**, 8, 317-319.
- Cavé A. **1997**, Acetogenins from Annonaceae *In* « Progress in the Chemistry of Organic Natural Products » Herz W., Kirby G.W., Moore R.E., Steglich W. et Tamm C. édés., Springer, Vienne, New York, 81-288.
- Cecchelli R., Berezowski V., Lundquist S., Culot M., Renftel M., Dehouck M., Laurence P., Fenart L. Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development *Nature Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 650-661.
- Champy P., Höglinger G.U., Féger J., Gleye C., Hocquemiller R., Laurens A., Guérineau V., Laprévotte O., Medja F., Lombès A., Michel P.P., Lannuzel A., Hirsch E.C., Ruberg M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: Possible relevance for atypical Parkinsonism in Guadeloupe. *J. Neurochem.*, **2004a**, 88, 63-69.
- Champy P. **2004b**, Étude chimique et biologique des neurotoxines d'*A. muricata* L. (Annonaceae) pouvant être impliquées dans le survenue des parkinsonismes atypiques en Guadeloupe. Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud 11.
- Champy P., Melot A., Guérineau V., Gleye C., Fall D., Höglinger G.U., Ruberg M., Lannuzel A., Laprévotte O., Laurens A., Hocquemiller R. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord.*, **2005**, 20, 1629-1633.
- Champy P., Gleye C., Höglinger G., Ruberg M., Laurens A., Hocquemiller R. Traditional consumption of Annonaceae species in the etiology of atypical parkinsonism in the French West Indies. *Revista de Fitoterapia*, **2005**, 5(S1), 153-155. [Actes du 5th European colloquium on ethnopharmacology ; article]
- Champy P., Escobar-Khondiker M., Bajin ba Ndop I., Yamada E., Lannuzel A., Laprévotte O., Ruberg M., Höglinger G.U. Atypical parkinsonism induced by Annonaceae: Where are we yet? *Planta Med.*, **2008**, 74(9), 936-937. [Actes du 7th joint meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Athènes, août 2008 ; résumé].

Bibliographie

Champy P., Guérineau V., Laprèvote O. MALDI-TOF MS profiling of Annonaceous acetogenins in *Annona muricata* products of human consumption. *Molecules*, **2009**, 14, 5235-5246.

Champy P., **2011**. Chapter 51: « Acetogenins from the seeds of the Custard Apple (*Annona squamosa* L.) and their health outcomes ». In : Nuts and seeds in health and disease prevention (1st ed.). Preedy V.R., Watson R.R., Patel V.B. (Éds). Academic Press / Elsevier, London, Burlington, San Diego. pp 429-437.

Chang F.-R., Wu Y.-C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 925-931.

Chang F.-R., Liaw C.-C., Lin C.-Y., Chou C.-J., Chiu H.-F., Wu Y.-C. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med.*, **2003**, 69, 241-246.

Chaudhuri K.R., Hu M.T., Brooks D.J. Atypical Parkinsonism in Afro-caribbean and Indian origin immigrants to the UK, *Mov. Disord.*, **2000**, 15(1), 18-23.

Chen C.-Y., Chang F.-R., Chiu H.-F., Wu M.-J., Wu Y.-C. Aromin-A, an annonaceous acetogenin from *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*, **1999**, 51, 429-433.

Chu G., Sharp P.A. SV40 DNA transfection of cells in suspension: Analysis of efficiency of transcription and translation of T-antigen. *Gene*, **1981**, 13, 197-202.

Chulia S., Noguera M.A., Ivorra M.D., Cortes D., D'Ocon M.P. Vasodilator effects of liriodenine and norushinsunine, two aporphine alkaloids isolated from *Annona cherimolia*, in rat aorta. *Pharmacology*, **1995**, 50, 380-387.

Cichetti F., Drouin-Ouellet J., Gross R.E. Environmental toxins and Parkinson's disease: What have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol. Sci.*, **2009**, 30(9), 475-483.

Cohen De Cock V., Lannuzel A., Verhaeghe S., Roze E., Ruberg M., Derenne J.-P., Willer J.-C., Vidailhet M., Arnulf I. REM sleep behavior disorder in patients with Guadeloupean Parkinsonism, a Tauopathy. *Sleep*, **2007**, 30(8), 1026-1032.

Collins M.A. Atypical parkinsonism in the French West Indies. *Lancet.*, **1999**, 354(9188), 1473-1474.
Cortes D., Rios J.L., Villar A., Valverde S. Cherimoline et dihydrocherimoline, deux nouvelles γ -lactones bis-tétrahydrofuraniques possédant une activité antimicrobienne. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3199-3202.

Cortes D., Myint S.H., Laurens A., Hocquemiller R., Lebœuf M., Cavé A. Corossolone et corossoline, deux nouvelles γ -lactones mono-tétrahydrofuraniques cytotoxiques. *Can. J. Chem.*, **1991a**, 69, 8-11.

Cortes D., Myint S.H., Lebœuf M., Cavé A. A new type of cytotoxic acetogenins: The tetrahydrofuranic γ -hydroxy-methyl γ -lactones. *Tetrahedron Lett.*, **1991b**, 32, 6133-6134.

Cortes D., Myint S.H., Hocquemiller R. Molvizarin and motrilin: Two novel cytotoxic bis-tetrahydrofuranic γ -lactone acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron*, **1991c**, 47, 8195-8202.

Cortes D., Myint S.H., Dupont B., Davoust D Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*, **1993**, 32, 1475-1482.

Costa-Lotuf L.-V., Cunha G.M., Farias P.A., Viana G.S., Cunha K.M., Pessoa C., Moraes M.O., Silveira ER, Gramosa N.V., Rao V.S. The cytotoxic and embryonic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin, *Toxicon*, **2002**, 40(8), 1231-1234.

Couvreur T.L., Richardson J.E., Sosef M.S., Erkens R.H., Chatrou L.W. Evolution of syncarpy and other morphological characters in African Annonaceae: A posterior mapping approach. *Molecul. Phylogenet. Evol.*, **2008**, 47, 302-318.

Bibliographie

Cuendet M., Oteham C.P., Moon R.C., Keller W.J., Peaden P.A., Pezzuto, J.M. Dietary administration of *Asimina triloba* (pawpaw) extract increases tumor latency in *N*-methyl-*N*-nitrosoureatreated rats. *Pharm. Biol.*, **2008**, 46, 3-7.

De Boer A.G. **1994**, Drug absorption enhancement concepts, possibilities, limitations and trends Harwood Academic Publishers Switzerland 490 p.

De Carvalho C.C.R., Da Fonseca M.R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.*, **2006**, 24,134-142.

De Lau L.M., Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, **2006**, 5(6), 525-535.

Deli M., Brahm C.A.S., Kataoka Y., Niwa M. Permeability studies on *in vitro* Blood-Brain Barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Molec. Neurobiol.*, **2005**, 25 (1), 59-127.

Degli-Esposti M., Ghelli A., Ratta M., Cortes D., Estornell E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem. J.*, **1994**, 301,161-167.

Degli-Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1364, 222-235.

Derbré S., Roué G., Poupon E., Susin S.A., Hocquemiller R. Annonaceous acetogenins: the hydroxyl groups and THF rings are crucial structural elements for targeting the mitochondria, demonstration with the synthesis of fluorescent squamocin analogues. *ChemBiochem.*, **2005**, 6(6), 979-982.

Derbré S., Duval R., Roué G., Garofano A., Poupon E., Brandt U., Susin S.A., Hocquemiller R. Semisynthesis and screening of a small library of pro-apoptotic squamocin analogues: Selection and study of a benzoquinone hybrid with an improved biological profile. *Chem. Med. Chem.*, **2006a**, 1, 118-129.

Derbré S. **2006b**, Quelques "bonnes réactions" de chimie organique pour élucider les mécanismes d'action de produits naturels actifs Thèse l'Université Paris-Sud 11.

Derbré S., Gil S., Taverna M., Boursier C., Nicolas V., Demey-Thomas E., Vinh J., Susin S.A., Hocquemiller R., Poupon E. Highly cytotoxic and neurotoxic acetogenins of the *Annonaceae*: New putative biological targets of squamocin detected by activity-based protein profiling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 5741-5744.

Derek A., Patel M. Differential contribution of the mitochondrial respiratory chain complexes to reactive oxygen species production by redox cycling agents implicated in Parkinsonism. *Toxicol. Sci.*, **2009**, 112(2), 427-434.

Descourtiz E., 1821. Flore pittoresque et médicale des Antilles, Ed. Courtimard, Martinique, 8 vol. (réédition) : **1977**.

Dewick M.P. **2002**. Medicinal natural products - A biosynthetic approach. 2^e éd. John Wiley and Sons, Chichester, 507p.

Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49(5), 2240-2249.

Duret P., Gromek D., Hocquemiller R., Cavé A., Cortes D. Isolation and structure of three new bis-tetrahydrofuranic acetogenins from the roots of *Annona cherimolia*. *J. Nat. Prod.*, **1994**, 57, 911-916.

Duret P. **1997**. Étude chimique et biologique des acétogénines des racines d'*Annona cherimolia* et des graines d'*Annona atemoya* (Annonaceae). Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud 11,.

Duval R. **2005**, Hémisynthèse et évaluation biologique d'analogues de la squamocine, une acétogénine d'Annonaceae, Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud 11.

Bibliographie

Duval R.A., Poupon E., Romero V., Peris E., Lewin G., Cortes D., Brandt U., Hocquemiller R. Analogues of cytotoxic squamocin using reliable reactions: New insights into the reactivity and role of the α,β -unsaturated lactone of the annonaceous acetogenins. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 6248-6257.

Escobar-Khondiker M., Höllerhage M., Muriel M.P., Champy P., Bach A., Depienne C., Respondek G., Yamada E.S., Lannuzel A., Yagi T., Hirsch E.C., Oertel W.H., Jacob R., Michel P.P., Ruberg M., Höglinger G.U. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci.* 2007 Jul 18;27(29):7827-37.

Estornell E., Tormo J.R., Gallardo T., Gonzalez M.C., Cortes D. Differential interaction of antitumor Annonaceous acetogenins with the target enzyme, mitochondrial complex I. communication. International Congress " 2000 years of Natural Products Research- Past, present and future". Amsterdam, 26-30 juillet **1999**.

Estour F., Ménager S., Akagah B., Lafont O. Comparaison of the efficiency of various methods for the synthesis of models of metabolites: Example of 4 α -methylhexahydronaphtalenones. *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, 38, 925-928.

Fekam Boyom F., Amvam Zollo P.H., Menut C., Lamaty G., Bessièrre J.M., Aromatic plants of tropical central africa. Part XXVII. Comparative study of the volatile constituents of five Annonaceae species growing in Cameroon. **1996**,11(6), *J.Flav.Frag.* 333-338 Ed. Wiley.

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989** 246(4926), 64-71.

Fries R.E. **1959**, Annonaceae. *In: Die Natürlichen Pflanzenfamilien 2^e Ed.*, Engler A. et Prantl K., Eds. Dunker et Humblot, Berlin, vol 17a, II.

Foley P., Riederer P. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *J. Neuro. Chem.*, **2000**, 247(2), 82-94.

Giacomini K.M., Huang S.-M., Tweedie D.J., Benet L.Z., Brouwer K.L. R. Chu X., Dahlin A., Evers R., Fisher V., Hillgren K. M., Hoffmaster K.A., Ishikawa T., Keppler D., Kim R.B., Lee C.A., Niemi M., Polli J.W., Sugiyama Y., Swaan P.W., Ware J.A., Wright S.H., Yee S.W., Zamek-Gluzczynski M.J., Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nature Rev. Drug Discov.*, **2010**, 9, 215-236.

Gleye C., Laurens A., Hocquemiller R., Figadère B., Cavé A. Muridienin-1 and -2: The missing links in the biogenetic precursors of acetogenins of Annonaceae. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 9301-9304.

Gleye C., Raynaud S., Fourneau C., Laurens A., Laprèvote O., Serani L., Fournet A., Hocquemiller R. Cohibins A and B, acetogenins isolated from roots of *Annona muricata* L. *Phytochemistry*, **1997**, 44, 1541-1545.

Gleye C., Laurens A., Hocquemiller R., Cavé A., Laprèvote L., Serani L. Isolation of montecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using tandem mass spectrometry. *J. Org. Chem.*, **1997b**, 62, 510-513.

Gleye C., Duret P., Laurens A., Hocquemiller R., Cavé A. *Cis*-monotetrahydrofuran acetogenins from the roots of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1998a**, 61, 576-579.

Gleye C. **1998b** Acétogénines des racines et grains d'*Annona muricata* (Annonaceae); étude particulière des précurseurs biogénétiques. Doctorat de l'Université Paris-Sud 11.

Gleye C., Raynaud S., Hocquemiller R., Laurens A., Fourneau C., Serani L., Laprèvote O., Roblot F., Lebœuf M., Fournet A., Rojas de Arias A., Figadère B., Cavé A. Muricadienin, muridienins and chatenaytrienins, the early precursors of Annonaceous acetogenin. *Phytochemistry*, **1998c**, 47, 749-754.

Bibliographie

- Gleye C., Laurens A., Hocquemiller R., Faucheur N., Serani L., Lapr evote O. Mass spectrometry and structure elucidation of 15-palmitoyl- and 15-oleylsolin, the first known fatty acid esters of acetogenins from *Annona muricata* L. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **1998d**, 12, 1051-1056.
- Gleye C., Laurens A., Lapr evote O., Serani L., Hocquemiller R. Isolation and structure elucidation of sabadelin, an acetogenin from roots of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, **1999**, 52, 1403-1408.
- Gleye C., Rafidiarison N., Duret P., Laurens A., Hocquemiller R. Robustocin, a new acetogenin from the seeds of *Annona muricata*. *Nat. Prod. Lett.*, **2000**, 14, 239-245.
- Gleye C., Akendengue B., Laurens A., Hocquemiller R. Coronin from roots of *Annona muricata*, a putative intermediate in acetogenin biosynthesis. *Planta Med.*, **2001**, 67, 570-572.
- Gleye F., Laugel T., Leb euf M., Cav e A., Lapr evote O. Two acetogenins from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry*, **1993**, 34, 281-285.
- Gromek D., Figadère B., Hocquemiller R., Cav e A., Cortes D. Corepoxylone, a possible precursor of mono-tetrahydrofuran γ -lactone acetogenins: Biomimetic synthesis of corossolone. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 5247-5252.
- Gromek D., Hocquemiller R., Cav e A. Qualitative and quantitative evaluation of Annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, **1994**, 5, 133-140.
- Gu Z.M., Fang X.-P., Zeng L., Song R., Ng J.H., Wood K.V., Smith D.L., McLaughlin J. Gonioenin: A new cytotoxic annonaceous acetogenin from *Goniothalamus giganteus* and the conversion of mono-THF acetogenins to bis-THF acetogenins. *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 3472-3479.
- Gu Z.M., Zhou D., Wu J., Shi G., Zeng L., McLaughlin J.L. Screening for Annonaceous acetogenins in bioactive plants extracts by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Nat. Prod.*, **1997a**, 60, 242-248.
- Gu Z.-M., Zhou D., Lewis N., Wu J., Shi G., Zeng L., McLaughlin J.L. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.*, **1997b**, 5, 1911-1916.
- Gu Z.-M., Zhou D., Lewis N. J., Wu J., Johnson H.A., McLaughlin J.L., Gordon J. Quantitative evaluation of annonaceous acetogenins in monthly samples of paw paw (*Asimina triloba*) twigs by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Phytochem. Anal.*, **1999**, 10, 32-38.
- Gu eguen Y., Mouzat K., Ferrari L., Tissandie E., Lobaccaro J.M.A., Batt A.-M., Paquet F., Voisin P., Aigueperse J., Gourmelon P., Souidi M. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann. Biol. Clin.*, **2006**, 64(6), 535-548.
- Guengerich F. P. Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1999**, 39, 1-17.
- Guengerich F.P. Cytochromes P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.*, **2006**, 8(1), 101-111.
- Guignard J.-L. **2001**, Botanique - systématique moléculaire (abr eg e de), 12^{ e} Ed., Masson, Paris, 290 p.
- Gui H.-Q., Yu J.-G., Yu Z.-L. Muricatalin, a new polyketide from *Annona muricata* (Annonaceae). *Chin. Chem. Lett.*, **1995**, 6, 45-48.
- Gui H.-Q., Yu J.-G. Muricatalicin, a new pentahydroxy derivative of acetogenin from *Annona muricata* (Annonaceae). *Chin. Chem. Lett.*, **1996**, 7, 561-564.
- Gui H.-Q., Wang H.-W., Yu J.-G. Muricatin A and muricatin B, two novel acetogenins isolated from *Annona muricata*. *Youji Huaxue*, **1999**, 19, 293-299.

Bibliographie

- Guillopé R., Escobar-Khondiker M., Guérineau V., Laprévotte O., Höglinger G.U., Champy P. Kaurenoic acid from pulp of *Annona cherimolia* in regard to Annonaceae-induced Parkinsonism. *Phytother. Res.*, **2011**, 20(11), 1861-1864.
- Han Van de Walerbeend H., **2003**. Predictory oral absorption and bioavailability. *In: Progress in medicinal chemistry*, 41, King F.D., Oxford A.W Eds. Elsevier Science.
- Hasrat J.A., De Bruyne T.D.E., Baker J.-P., Vauquelin G., Vlietinck A.J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats : unexploited anidepressive (lead) products. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1997a**, 49, 1145-1149.
- Hasrat J.A., De Bruyne T.D.E., Baker J.-P., Vauquelin G., Vlietinck A.J. Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT_{1A} ligands: Bioactive isoquinoline alkaloids from fruit of *Annona muricata*. *Phytomedicine*, **1997b**, 4, 133-140.
- Hatcher J.-M., Pennell K.D., Miller G.W. Parkinson's disease and pesticides: A toxicological perspective, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2008**, 29(6), 322-329.
- Higgins J.J., Litvan I., Pho L.T., Li W., Nee L.E. Progressive supranuclear gaze palsy is in linkage disequilibrium with the tau and not the alpha-synuclein gene. *Neurology*, **1998**, 50, 270-273.
- Hisham A., Sreekala U., Pieters L., De Bruyne T., Van den Heuvel H., Claeys M. Epoxymurins A and B, two biogenetic precursors of Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 6913-6920.
- Höglinger G.U. Féger J., Prigent A., Michel P.P., Parain K., Champy P., Ruberg M., Oertel W.H., Hirsch E.C. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats, *J. Neurochem.*, **2003**, 84, 491-502.
- Höglinger G.-U., Lannuzel A., Khondiker M.E., Michel P.P., Duyckaerts C., Féger J., Champy P., Prigent A., Medja F., Lombès A., Oertel W.H., Ruberg M., Hirsch E.C. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy, *J. Neurochem.*, **2005**, 95, 930-939.
- Höglinger G.U. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons, *The J. Neurosci.*, **2007**, 27(29), 7827-7837.
- Hollenberg P.F. Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalysed xenobiotic metabolism *FASEB J.*, **1992** 686-694.
- Höllerhage M., Matusch A., Champy P., Lombès A., Ruberg M., Oertel W.H., Höglinger G.U. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies, *Exp. Neurol.*, **2009**, 220, 133-142.
- Höllerhage M., Matusch A., Champy P., Lombès A., Ruberg M., Oertel W.H., Höglinger G.U. The role of natural inhibitors of mitochondrial complex I in the aetiology of sporadic tau pathologies. *J. Neural. Transm.*, **2009b**, 116(2), 222. [Actes du 6th German Parkinson Congress of the German-Parkinson-Society (DPG) ; résumé].
- Houeto J.L. Maladie de Parkinson. *Rev. Prat.*, **2005**, 55, 1129-1134.
- Houin G., **1990**, Pharmacocinétique Édition ellipses. 352 p.
- Hoye T.R. An efficient and versatile synthesis of butenolide subunit of 4-hydroxylated annonaceous acetogenins. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 7517-7520.
- Hu T.-S., Wu Y.-L., Wu Y. The first total synthesis of annonacin, the most typical monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins. *Org. Lett.*, **2000**, 2(7), 887-889.

Bibliographie

- Hu T.-S., Yu Q., Wu Y.-L., Wu Y. Enantioselective syntheses of monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins tonkinicin and annonacin starting from carbohydrates. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66 (3), 853-861.
- Hutchinson J. **1964**, The Genera of flowering Plants: Dicotyledones. Vol. 1 Clarendo Press, Oxford, 516 p.
- Iribarne J.V., Thomson B.A.. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64(6), 2287-2294.
- Jussieu A.L. **1789**, Genera Plantarum. 283 p.
- Jolad S.D., Hoffmann J.J., Schram K.H., Cole J.R., Tempesta M.S., Kriek G.R., Bates R.B. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminata* Annonaceae, *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 3151-3153.
- Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. Matrix-associated ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53-68.
- Karas M. Gluckmann M., Schafer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 1-12.
- Kawai H., Makino Y., Ohta S. Inhibition of dopamine receptors by endogenous amines: Binding to striatal receptors and pharmacological effects on locomotor activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1669-1671.
- Kim D.-H., Woo M.-H. Corrosolin and compound-2: cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cherimolia*. *Yakhak Hoeji*, **1999**, 43, 584-590.
- Kim G.-S., Zeng L., Alali F., Rogers L.L., Wu F.-E., McLaughlin J.L., Sastrodihardjo S. Two new monotetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricaheptocin, from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 432-436.
- Kim G.-S., Zeng L., Alali F., Rogers L.L., Wu F.-E., Sastrodihardjo S., McLaughlin J.L. Muricoreacin and murihexocin C, monotetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, **1998b**, 49, 565-571.
- Knochenmuss R., Stortelder A., Breuker K., Zenobi R. Secondary ion-molecule reaction in matrix assisted laser desorption/ionisation *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 1237-1245.
- Kojima N., Tanaka T. Medicinal chemistry of Annonaceous acetogenins: Design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues. *Molecules*, **2009**, 14, 3621-3661.
- Kojima N., Morioka T., Urabe D., Yano M., Suga Y., Maezaki N., Ohashi-Kobayashi A., Fujimoto Y., Maeda M., Yamori T., Yoshimitsu T., Tanaka T. Convergent synthesis of fluorescence-labeled probes of Annonaceous acetogenins and visualization of their cell distribution. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**; 18 (24), 8630-8641.
- Koshimura I., Imai H., Hidano T., Endo K., Mochizuki H., Kondo T., Mizuno Y. Dimethoxyphenylethylamine and tetrahydropapaverine are toxic to the nigrostriatal system. *Brain Res.*, **1997**, 773, 108-116.
- Kotake Y., Tasaki Y., Makino Y., Ohta S., Hirobe M. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces parkinsonism in a primate. *Neurosci. Lett.*, **1996**, 217, 69-71.
- Kotake Y., Ohta S. Neuroprotective or neurotoxic activity of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and related compounds. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2853-2855.
- Kotake Y., Okuda K., Kamizono M., Matsumoto N., Tanahashi T., Hara H., Capparos-Lefèbvre D., Ohta S. Detection and determination of reticuline and *N*-methyl-coclaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, **2004**, 806, 75-78.

Bibliographie

- Lacroix D., Sonnier M., Moncion A., Cheron G., Cresteil T. Expression of CYP 3A4 in the human liver; evidence that the shift between CYP 3A7 and CYP 3A7 occurs immediately after birth. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 247, 625-634.
- Lannuzel A., Michel P.P., Caparros-Lefèbvre D., Abaul J., Hocquemiller R., Ruberg M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: Potential role in atypical Parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord.*, **2002**, 17(1), 84-90.
- Lannuzel A., Michel P.P., Höglinger G.U., Champy P., Jousset A., Medja F., Lombès A., Darios F., Gleye C., Laurens A., Hocquemiller R., Hirsch E.C., Ruberg M. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism, *Neuroscience*, **2003**, 121, 287-296.
- Lannuzel A., **2006**. Les syndromes parkinsoniens atypiques des Caraïbes. *In*: Les syndromes parkinsoniens atypiques et secondaires, Tison F. (Éd.). Éd. Masson, pp 214-225.
- Lannuzel A., Höglinger G.U., Verhaeghe S., Gire L., Belson S., Escobar-Khondiker M., Poullain P., Oertel W.H., Hirsch E.C., Dubois B., Ruberg M. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: A common risk factor two closely related phenotypes? *Brain*, **2007**, 130, 816-827.
- Lapointe N., St-Hilaire M., Martinoli M.G., Blanchet J., Gould P., Rouillard C., Cicchetti F. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J.*, **2004**, 18(6),717-719.
- Laprévote O., Girard C., Das B.C., Laugel T., Roblot F., Lebœuf M., Cavé A. Location of epoxy rings in a long chain acetogenin by fast atom bombardment and linked scan (B/E) mass spectrometry of lithium cationized molecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 352-355.
- Laprévote O. Girard C., Das B.C., Laurens A., Cavé A. Desorption of lithium complexes of acetogenins by fast atom bombardment : Application to semi-quantitative analysis of crude plant extracts. *Analisis*, **1993**, 21, 207-210.
- Laprévote O., Roblot F., Hocquemiller R., Cavé A. Structural elucidation of acetogenins from Annonaceae by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Tetrahedron*, **1994**, 50 (28), 8479-8490.
- Laugel T. **1996**, Contribution à l'étude des inhibiteurs d'ACAT : développement de modèles d'étude biologique pour caractériser le pouvoir inhibiteur d'ACAT de certaines acétogénines. Thèse de l'Université Paris-Sud 11.
- Le Thomas A. Aubreville A. Annonaceae, dans *Flore du Gabon*, *Bot. J. Linn. Soc.* **1980**, 80, 91-124.
- Le Thomas A. Morphologie et palynologie des Annonacées africaines : interrelations phylogéniques. *Bothalia*, **1983**, 14, 825-831.
- Le Ven J., Allegrand J., Schmitz-Afonso I., Guérineau V., Touboul D., Buisson D., Akagah B., Laprévote O., Cresteil T., Lewin G., Champy P., **2010**. Phase I metabolism of annonacin, a neurotoxic acetogenin from the pulp of the food plant *Annona muricata* (Annonaceae). Poster présenté au *2010 Joint Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy and the Phytochemical Society of North America (St Petersburg Beach, USA, 10–14 juillet 2010)*.
- Le Ven J., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Buisson D., Akagah B., Cresteil T., Lewin G., Champy P. Annonaceae fruits and parkinsonism risk: Metabolisation study of annonacin, a model neurotoxin; evaluation of human exposure. *Toxicol. Lett.*, **2011**, 205(Suppl. 1), S50-S51. [Actes de *Eurotox 2011 – 47th Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, août 2011* ; résumé – présentation orale].
- Lebœuf M., Legueut C., Cavé A., Desconglolis J.-F., Forgacs P., Jacquemin H. Alcaloïdes des Annonaceae XXIX : alcaloïdes de l'*Annona muricata* L. *Planta Med.*, **1981**, 42, 37-44.

Bibliographie

Lebœuf M., Cavé A., Bhaumik P.K., Mukherjee B. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **1982a**, 21, 2783-2813.

Lebœuf M., Cavé A., Forgacs P., Tiberghien R., Provost J., Touché A., Jacquemin H. Alcaloïdes des Annonaceae XL : étude chimique et pharmacologique de l'*Annona montana* MACF. *Plant. Med. Phytother.*, **1982b**, 16, 169-184.

Lehéricy S., Hartmann A., Lannuzel A., Galanaud D., Delmaire C., Bienaimée M.J., Jodoin N., Roze E., Gaymard B., Vidailhet M. Magnetic resonance imaging lesion pattern in Guadeloupean Parkinsonism is distinct from progressive supranuclear palsy. *Brain*, **2010**, 133, 24.

Leys D. **2004**, Réussir l'internat, neurologie. Eds. Ellipses, Paris, 447 p.

Lewandowski M. Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. *Zeitschrift für Klinische Medizin*, **1900**, 40, 480-494.

Li C.-M., Mu Q., Hao X.-J., Sun H.-D., Zheng H.-L., Wu Y.-C. Three new bioactive Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Chin. Chem. Lett.*, **1994**, 5, 747-750.

Li C.-M., Tan N.-H., Zheng H.-L., Mu Q., Hao X.-J., He Y.-N., Zou J. Cyclopeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Phytochemistry*. **1998**, 48 (3), 555-556.

Li D.-Y. Yu J.-G., Luo X.-Z., Sun L., Yang S.-L. Muricatenol, a linear acetogenin from *Annona muricata* (Annonaceae). *Chin. Chem. Lett.*, **2000**, 11, 239-242.

Liaw C.-C., Chang F.-R., Lin C.-Y., Chou C.-J., Chiu H.-F., Wu M.-J., Wu Y.-C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 470-475.

Liaw C.-C., Wu T.-Y., Chang F.-R., Wu Y.-C. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. *Planta Med.*, **2010**, 76, 1390-1404.

Liaw C.-C., Liao W.-Y., Chen C.-S., Jao S.-C., Wu Y.-C., Shen C.-N., Wu S.-H. The calcium-chelating capability of tetrahydrofuranic moieties modulates the cytotoxicity of Annonaceous acetogenins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 7885-7891.

Litvan I. **1992**, Progressive supranuclear palsy. Oxford University Press, Oxford, New York, 287 p.

Litvan I., Agid Y., *et al.* Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): Report of the NINDS-SPSP International Workshop. *Neurology*, **1996**, 47, 1-9.

Litvan I. Atypical parkinsonism in the French West Indies (correspondence). *Lancet*, **1999**, 354, 1472-1473.

Lipinski C.-A., Lombardo F., Dominy B.-W., Feeney P.-J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1997**, 23, 3-25.

Longuefosse J.-L. **1995**. Cent plantes médicinales de la Caraïbe, vol 1. Ed. Gondwana, Martinique, 230 p.

Longuefosse J.-L., Nossin E.. Medical ethnobotany survey in Martinique. *J. Ethnopharmacol.*, **1996**, 53, 117-142.

Ludolph A.C. Tauopathies with parkinsonism : Clinical spectrum, neuropathologic basis, biological markers, and treatment options. *Eur. J. Neuro.*, **2009**, 16, 297-309.

Magassouba F.B., Diallo A., Kouyaté M., Mara F., Mara O., Bangoura O., Camara A., Traoré S., Diallo A.K., Zaoro M., Lamah K., Diallo S., Camara G., Traoré S., Kéita A., Camara M.K., Barry R., Kéita S.,

Bibliographie

Oularé K., Barry M.S., Donzo M., Camara K., Toté K., Berghe D.V., Totté J., Pieters L., Vlietinck A.J., Baldé A.M. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, 114, 44-53.

Mansuy D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis *C. R. Chimie*, **2007**, 10, 392-413.

Martin J.M. Stephen R., Madigosky S.R., Gu Z.-M., Zhou D., Wu J., McLaughlin J.L. Chemical defense in the zebra swallowtail butterfly, *Eurytides marcellus*, involving Annonaceous acetogenins. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62(1), 2-4.

McLaughlin J.L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71, 1311-1321.

Melot A. Fall D, Gleye C, Champy P. Apolar Annonaceous acetogenins from the fruit pulp of *Annona muricata*. *Molecules*, **2009**, 14(11), 4387-4395.

Ménez C. **2006**, Interactions de la miltéfosine avec la barrière intestinale : étude des mécanismes de capture et de transport sur un modèle *in vitro* de cellules Caco-2. Application à la conception d'une bithérapie antileishmanienne. Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud 11.

Morais L.C.S.L., Barbosa-Filho J.M., Almeida R.N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.*, **1998**, 62, 57-61.

Moussa C., Houziaux P., Danree B., Azerad R. Microbial models of mammalian metabolism: Fungal metabolism of phenolic and non phenolic *p*-cymene-related drugs and prodrugs. II. Metabolites of nonphenolic derivatives. *Drug Metabolism Dispos.*, **1997**, 25(3), 311-316.

Motoyama T., Yabunaka H, Miyoshi H. Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2089-2092.

Myint S.H., Laurens A., Hocquemiller R., Cavé A., Davoust D., Cortes D. Murisolin: A new cytotoxic mono-tetrahydrofuran- γ -lactone from *Annona muricata*. *Heterocycles*, **1990**, 31, 861-867.

Myint S.H., Cortes D., Laurens A., Hocquemiller R., Lebœuf M., Cavé A., Cotte J., Quéro A.-M. Solamin, a cytotoxic monotetrahydrofuranic γ -lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3335-3338.

Nakanishi S., Abe M., Yamamoto S., Murai M., Miyoshi H. Bis-THF motif of acetogenin binds to the third matrix-side loop of ND1 subunit in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1807(9), 1170-1176.

Naoi M., Maruyama Y., Nagy G.M. Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: Occurrence, metabolism and function in human brains. *Neurotoxicol.*, **2004**, 25, 193-204.

Nier A.O. A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *Rev. Sci. Instrum.*, **1947**, 18(6), 398-411.

Oasa M., Hattori Y., Konno H., Makabe H., Synthesis of Annonacin Isolated from *Annona densicoma* *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2010**, 74(6), 1274-1275.

Ouarradi A. E., Salard-Arnaud I., Buisson D. Biooxidation of methyl groups: application to the preparation of alcohol and acid metabolites of terfenadine, ebastine and analogues *Tetrahedron*, **2008**, 64, 11738-11744.

Parkinson J. **1817** An essay on the shaking palsy, London

Pajouhesh H., Lenz G.R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX*, **2005**, 2(4), 541-553.

Bibliographie

- Pardridge W.M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Methods Mol. Med.*, **2003**, 89, 385-399.
- Peters F.T., Dragan C.-A., Wilde D.R., Meyer M.R., Zapp J., Bureik M., Maurer H.H. Biotechnical synthesis of drug metabolites using human cytochrome P450 2D6 heterologously expressed in fission yeast exemplified for the designer drug metabolite 4'-hydroxymethyl- α -pyrrolidinobutyrophenone *Biochem. Pharmacol.*, **2007**, 74, 511-520.
- Pettit G.R., Mukku V.J., Cragg G., Herald D.L., Knight J.C., Herald C.L., Chapuis J.C. Antineoplastic agents. 558. *Ampleocissus sp.* cancer cell growth inhibitory constituents. *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71, 130-133.
- Pomper K.W., Lowe J.D., Crabtree S.B., Keller W. Identification of Annonaceous acetogenins in the ripe fruit of the North American pawpaw (*Asimina triloba*). *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, 8339-8343
- Potts L.F., Luzzio F.A., Hetman M., Champy P., Litvan I. Annonacin in *Asimina triloba* fruit: Implication for neurotoxicity. *Neurotoxicol.*, **2011**, sous presse.
- Richard D. Maladie de Parkinson, le traitement pharmacologique. *Monit. Hosp.*, **2006**, 186,10-20.
- Richardson J.C., Steele J., Olszewski J. Supranuclear ophtalmoplegia, pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia: A clinical report on eight cases of heterogenous system degeneration. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, **1963**, 88, 25-29.
- Rieser M.J. Kozlowski J.F., Wood K.V., McLaughlin J.L. Muricatacin: A simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annonaceae). *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 1137-1140.
- Rieser M.J., Hui Y.-H., Rupprecht J.K., Kozlowski J.F., Wood K.V., McLaughlin J.L., Hanson P.R., Zhuang Z., Hoye T.R. Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol centers on annonaceous acetogenins by ^1H and ^{19}F -NMR analysis of Mosher ester derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10203-10213.
- Rieser M.J., Fang X.-P., Rupprecht J.K., Hui Y.-H., Smith D.L., McLaughlin J.L. Bioactive single-ring acetogenins from seed extracts of *Annona muricata*. *Planta Med.*, **1993**, 59, 91-92.
- Rieser M.J., Fang X.-P., Anderson J.E., Miesbauer L.R., Smith D.L., McLaughlin J.L. Muricatetrocins A and B and gigantetrocin B : Three new cytotoxic monotetrahydrofuran ring acetogenins from *Annona muricata*. *Helv. Chim. Acta*, **1993b**, 76, 2433-2444.
- Rieser M.J., Gu Z.-M., Fang X.-P., Zeng L., Wood K.V., McLaughlin J.L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59, 100-108.
- Ríos J.L. Cortes D., Valverde S. Acetogenins, aporphinoids, and azaantraquinone from *Annona cherimolia* seeds. *Planta Med.*, **1989**, 55, 321-323.
- Rottscholl R., Lunow M., Jainsch B., de Andrade A., Respondek G., Höllerhage M., Champy P., Oertel W.H., Yamada E., Höglinger G. Gene–environment interaction in a mouse tauopathy-model. *Basal Ganglia*, **2011**, 13–45.
- Rottava I., Toniazzo G., Cortina P.F., Martello E., Grando C.E., Lerin L.A., Treichel H., Mossi A.J., De Oliveira D., Cansian R.L., Antunes O.A.C., Oestricher E.G. Screening of microorganisms for bioconversion of (-)- β -pinene and R-(+)-limonene to α -terpineol food. *Science and technology*, **2010**, 43, 1128-1131.
- Rupprecht J.K., Hui Y.-H., McLaughlin J.L. Annonaceous acetogenins: A review. *J. Nat. Prod.*, **1990**, 53, 237-278.
- Sai Y., Tsuji A. Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug discov. Today*, **2004**, 9(16), 712-720.

Bibliographie

- Schapira A.-H.-V. Complex I Inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Exp. Neurol.*, **2010**, 224, 331-335.
- Sherer T.B., Kim J. H., Bertabet R., Greenamyre J.T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp. Neurol.*, **2003**, 179, 9-16.
- Shimada H., Kozlowski J.F., McLaughlin J.L. Localisation in liposomal membranes of the THF ring moieties of Annonaceous acetogenins: Annonacin and sylvaticin as determined by ¹H RMN spectroscopy. *Pharmacol. Res.*, **1998**, 37, 357-364.
- Siflinger-Birnboim A., Del Becchio P.J., Cooper J.A., Blumenstock F.A., Shepard J.N., Malik. A.B., Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer, *J. Cell. Physiol.*, **1987**, 132, 111-117.
- Smith R. V., Rosazza J.P. Microbial models of mammalian metabolism. *J. Nat. Prod.*, **1983**, 46(1), 79-91.
- Sonnier M., Cresteil T. Delay ontogenesis of CYP 1A2 in the human liver. *Eur. J. Biochem.*, **1998**, 251, 893-898.
- Spichiger R.-E. **2004**. Botanique systématique des plantes à fleurs, 3^e Ed. Presse polytechnique et universitaire, Lausanne, 413 p.
- Seltzer S., Stevens K.D. The preparation of *cis*- β -acetylacrylic acid. *J. Org. Chem.*, **1968**, 33(7), 2708-2711.
- Stevens K.D., Seltzer S. Thiocyanate-catalyzed *cis-trans* isomerization of *cis*- β -acetylacrylic acid. A model for maleyacetacetic acid. *J. Org. Chem.*, **1968**, 33(10), 3922-3928.
- Steele J.C., Richardson J.C., Olszewski J. Progressive supranuclear palsy. *Arch. Neurol.*, **1964**, 10, 333-359.
- Steele J.C. Progressive supranuclear palsy. *Brain.*, **1972**; 95(4), 693-704.
- Steele J.C, Morris H.R., Lees A.J., Perez-Tur J., McGeer P.L. Atypical parkinsonism in the French West Indies – *correspondence*. *Lancet*, **1999**, 354, 1474.
- Steele J.C., Caparros-Lefèbvre D., Lees A., Sacks O. Progressive supranuclear palsy and its relation to pacific foci of the parkinsonism-dementia complex and Guadeloupean Parkinsonism. *Parkinsonism Relat. Disord.*, **2002**, 9, 39-54.
- Sun N.-J., New cytotoxic fatty acid from *Desmos cochinchensis* (Annonaceae). *Nat. Prod. Lett.*, **1995**, 7, 35-41.
- Takada M., Kuwabara K., Nakato H., Tanaka A., Iwamura H., Miyoshi H. Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1460, 302-310.
- Takhtajan A. **1986**. Floristic regions of the world. University of California. Press Berkeley, 401 p.
- Tanaka K., Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. (*en japonais*) About Laser Ionization Mass Spectrometry 14-Kai BMS Danwakai Koen Yoshishu (Collected Lecture Cores for 14th BMS Talks) **1987**.
- Tison F. **2006**. Les syndromes parkinsoniens atypiques et secondaires. Ed. Masson, Paris, 305 p.
- Tolosa E., Calandrella D., Gallardo M. Carribean parkinsonism and other atypical Parkinsonism disorders. *Parkinsonism Disord.*, **2004**, 10, 29-26.

Bibliographie

Tormo J.-R., Gallardo T., González M.C., Bermejo A., Cabedo N., Andreu I., Estornell E. Annonaceous acetogenins as inhibitor of mitochondrial complex I. *Curr. Topics Phytochem.*, **1999a**, 69-126.

Tormo J.-R., González M.C., Cortes D., Estornell E. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using Annonaceous acetogenins. *Archiv. Biochem. Biophysics*, **1999b**, 119-126.

Tormo J.-R., Gallardo T., Aragón R., Cortes D., Estornell E. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Chem.-Bio. Interact.*, **1999c**, 122, 171-183.

Tormo J.-R., Estornell E., Gallardo T., González M.C., Cavé A., Granell S., Cortes D., Zafra-Polo M. C. γ -Lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 681-684.

Tóth A., Veszelka S., Nakagawa S., Niwa M., Deli M.A. Patented *in vitro* Blood-Brain Barrier models in CNS. *Drug Discov.*, **2011**, 6, 107-118.

Verpillat P., Camuzat A., Hannequin D., Thomas-Anterion C., Puel M., Belliard S., Dubois B., Didic M., Michel B.F., Lacomblez L., Moreaud O., Sellal F., Golfier V., Campion D., Clerget-Darpoux F., Brice A. Association between the extended tau haplotype and frontotemporal dementia. *Arch. Neurol.*, **2002**, 59, 935-939.

Villar A., Mares M., Rios J.L., Canton E., Gobernado M. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. *Pharmazie*, **1987**, 42, 248-250.

Walker B. A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor. *Phys. Rev.*, **1929**, 34(1), 157-160.

Walker J.W. Pollen morphology, phytogeography and phylogeny of the Annonaceae. *Contrib. Gray Herb. Harvard Univ.*, **1971**, 202, 1-132.

Waechter A.-I. Glaucanetin and 10-hydroxyglaucanetin, two new acetogenins from *Annona glauca*. *Nat. Prod. Lett.*, **1997**, 10, 205-212.

Watanabe H., Ikeda M., Watanabe K., Kikuchi T. Effects on central dopaminergic systems of D-coclaurine and D-reticuline, extracted from *Magnolia salicifolia*. *Planta Med.*, **1981**, 42, 213-222.

Watanabe T., Watanabe K., Kikuchi T. Effects of D-coclaurine and D reticuline, benzyltetrahydroisoquinoline alkaloids, on levels of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid in the mouse striatum. *J. Pharmacobiodyn.*, **1983**, 6, 793-796.

Weiss N., Miller F., Cazaubon S., Couraud P. O. Partie I : biologie de la barrière hématoencéphalique *Rev. Neurol.*, **2009**, 12 p.

Weksler B.B., Subileau E.A., Perrière N., Charneau P., Holloway K., Leveque M., Tricoire-Leignel H., Nicotra A., Bourdoulous S., Turowski P., Male D.K., Roux F., Greenwood J., Romero I. A., Couraud P. O. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* **2005**, 19(13), 1872-1874.

Wélé A., Zhang Y., Ndoye I., Brouard J.P., Pousset J.L., Bodo B. A cytotoxic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimolia*. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 67, 1577-1579.

Williams R.T., **1959**. Detoxication mechanisms 2nd Ed. : Chapman and Hall, London.

Woo M.-H., Kim D.-H., Fotopoulos S.S., McLaughlin J.L. Annocherin and (2,4)-*cis*- and *trans*-annocherinones, monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins with a C-7 carbonyl group from *Annona cherimolia*. *J. Nat. Prod.*, **1999a**, 62, 1250-1255.

Bibliographie

- Woo M.-H., Chung S.-O., Kim D.-H. *Cis*-annonacin and (2,4)-*cis*- and *trans*-isoannonacins: cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cherimolia*. *Arch. Pharm. Res.*, **1999b**, 22, 524-528.
- Wu F.-E., Sastrodihardjo S., Gu Z.-M., Zeng L., Zhao G.-X., Zhang Y., McLaughlin J.L., Sastrodihardjo S. Two new cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, annomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1995a**, 58, 830-836.
- Wu F.-E., Zeng L., Gu Z.-M., Zhao G.-X., Zhang Y., Schwedler J.T., McLaughlin J. L., Sastrodihardjo S. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1995b**, 58, 902-908.
- Wu F.-E., Zeng L., Gu Z.-M., Zhao G.-X., Zhang Y., Schwedler J.T., McLaughlin J.L., Sastrodihardjo S. New bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, annomuricin C and muricatocin C from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1995c**, 58, 909-915.
- Wu F.-E., Zhao G.-X., Zeng L., Zhang Y., Schwedler J.T., McLaughlin J.L., Sastrodihardjo S. Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2,4-*trans* and *cis*)-10R-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1995d**, 58, 1430-1437.
- Yamada E., de Andrade A., Respondek G., Mussner S., Champy P., Oertel W. Gene-environment interaction in a mouse model of a tauopathy. *J. Neural. Transm.*, **2009**, 116(2), 222-223. [Actes du 6th German Parkinson Congress of the German-Parkinson-Society (DPG) ; résumé].
- Yang R.-Z., Yu J.-G., Zhu J.-X., Yu D.-L., Luo X.-Z., Sun L., Yang S.-L. Annonaceous acetogenins from *Annona muricata* 2. *Acta Botanica Yunnanica (Yunnan Zhiwu Yanjiu)*, **1994**, 16, 187-190.
- Yang H., Li X., Tang Y., Zhang N., Chen J., Cai B. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2009**, 49(1), 140-144.
- Yim S.-K., Jung H.-C., Pan J.-G., Kang H.-S., Ahn T., Yun C.-H. Functional expression of mammalian NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase on the cell surface of *Escherichia coli*. *Protein Expr. Pur.*, **2006**, 49, 292-298.
- Yu J.-G., Gui H.-Q., Luo X.-Z., Sun L., Zhu P., Yu Z.-L. Studies on the chemical constituents of *Annona muricata*. *Yaoxue Xuebao*, **1997**, 32, 431-437.
- Yu J.-G., Gui H.-Q., Luo X.-Z., Sun L. Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. *Phytochemistry*, **1998**, 49, 1689-1692.
- Zafra-Polo M.-C., Figadère B., Gallardo T., Tormo J.-R., Cortes D. Natural acetogenins from Annonaceae : Synthesis and mechanism of action. *Phytochemistry*, **1998**, 48(7), 1087-1117.
- Zeng L., Wu F.-E., McLaughlin J. L. Annohexocin, a novel mono-THF acetogenin with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 1865-1868.
- Zeng L., Wu F.-E., Oberlies N.H., McLaughlin J.L. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59, 1035-1042.
- Zeng L., Wu F.-E., Gu Z.-M., Mc Laughlin J.L. Murihexocins A and B, two novel mono-THF acetogenins with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). *Tetrahedron Lett.*, **1995b**, 36, 5291-5294.

Annexes

Annexe 1 : acétogénines de type E en C35 isolée d'*A. muricata*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	Époxydes	C=C	Cétone	Configuration	Bibliographie
chatenaytrienines-1 + 2	E1a	512	C ₃₅ H ₆₀ O ₂	-	-	13/11 17/15 21/19	-	-	Gleye C. 1998a
chatenaytrienines-3 + 4	E1a	512	C ₃₅ H ₆₀ O ₂	-	-	13/15 17/19 21/23	-	-	Gleye C. 1998a
muricadiénine	E1a	514	C ₃₅ H ₆₂ O ₂	-	-	15/19	-	-	Gleye C. 1998a
muridiénine-1	E1a	514	C ₃₅ H ₆₂ O ₂	-	-	13/17	-	c-c	Gleye C. 1996; Gleye C. 1998a
muridiénine-2	E1a	514	C ₃₅ H ₆₂ O ₂	-	-	15/21	-	c-c	Gleye C. 1996; Gleye C. 1998a
épomuricenine A	E1a	530	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	-	[15,16]	19	-	-	Gleye F. 1993
épomuricenine B	E1a	530	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	-	[13,14]	17	-	-	Gleye F. 1993
époxy murine A	E1a	530	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	-	[15,16]	19	-	-	Hisham A. 1993
époxy murine B	E1a	530	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	-	[19,20]	15	-	-	Hisham A. 1993
sabadeline	E1a	530	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	-	[17,18]	13	-	-	Gleye C. 1999
épomurinine A	E1a	532	C ₃₅ H ₆₄ O ₃	-	[15,16]	-	-	-	Melot A. 2009
épomurinine A	E1a	532	C ₃₅ H ₆₄ O ₃	-	[13,14]	-	-	-	Melot A. 2009
diépomuricanine	E1a	546	C ₃₅ H ₆₂ O ₄	-	[15,16],[19,20]	-	-	-	Laprévote O. 1992; Gleye F. 1993; Hisham A.
cohibine A	E1a	548	C ₃₅ H ₆₄ O ₄	15,16	-	19	-	th-c	Gleye C. 1997
cohibine B	E1a	548	C ₃₅ H ₆₄ O ₄	13,14	-	17	-	th-c	Gleye C. 1997
corépoxy lone	E1a	560	C ₃₅ H ₆₀ O ₅	-	[15,16],[19,20]	-	10	-	Gromek D. 1993
murihexol	E1b	582	C ₃₅ H ₆₆ O ₈	4,10,15,16,19,20	-	-	-	th-er	Yu J.-G. 1998
dohéxocine	E1b	582	C ₃₅ H ₆₆ O ₈	4,10,15,16,19,20	-	-	-	th-th	Yu J.-G. 1998

Annexe 2 : acétogénines de type E en C37 isolée d'*A. muricata*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	Époxydes	C=C	Cétone	Configuration	Bibliographie
chatenaytrienine-3	E1a	540	C ₃₇ H ₆₄ O ₂		-	13/17	-	-	Gleye C. 1998d
muridienine-3	E1a	542	C ₃₇ H ₆₆ O ₂	-	-	13/17	-	-	Gleye C. 1998d
muridienine-4	E1a	542	C ₃₇ H ₆₆ O ₂	-	-	17/21	-	-	Gleye C. 1998d
épomusenine A	E1a	558	C ₃₇ H ₆₆ O ₃	-	[17,18]	21	-	-	Melot A. 2009
épomusenin B	E1a	558	C ₃₇ H ₆₆ O ₃	-	[15,16]	19	-	-	Melot A. 2009
montécristine	E1a	574	C ₃₇ H ₆₆ O ₄	13,14	-	17,21	-	th-c-c	Gleye C. 1997c
cohibine A	E1a	576	C ₃₇ H ₆₈ O ₄	17,18	-	21	-	th-c	Gleye C. 1997
cohibine B	E1a	576	C ₃₇ H ₆₈ O ₄	15,16	-	19	-	th-c	Gleye C. 1997
muricatenol	E1b	608	C ₃₇ H ₆₈ O ₆	4,10,18,19	-	14	-	c-th	Li D. 2000

Annexe 3 : acétogénines de type A en C35 isolée d'*A muricata*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
panatelline (<i>cis</i> -)	A1a	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	13,18	[14,17]	-	-	<i>th/c/th</i>	Gleye C. 1998a
solamine	A1a	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Myint S.H. 1991, Hisham A. 1993, Gleye C. 1998a
solamine (<i>cis</i> -)	A1a	564	C ₃₅ H ₆₄ O ₅	15,20	[16,19]	-	-	<i>th/c/th</i>	Gleye C. 1998a
muricine-D	A1b	568	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,19,22,23	[15,18]			<i>t/th-th</i>	Chang F.-R. 2001
muricine-E	A1b	568	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,19,22,23	[15,12]			<i>t/th-th</i>	Chang F.-R. 2001
corossolone	A1a	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	15,20	[16,19]	10	-	<i>th/t/th</i>	Myint S.H. 1991, Cortes D. 1991
corossoline	A1a	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Myint S.H. 1991, Cortes D. 1991
murisoline	A1b	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	4,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Myint S.H. 1990, Bories C. 1991, Cortes D. 1991
muricine-H	A1a	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	19,24,25	[15,18]			<i>t/th-th</i>	Liaw C.C. 2002
annonacine-10-one	A1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,15,20	[16,19]	10	-	<i>th/t/th</i>	Cortes D. 1991, Rieser M.-J. 1993, Wu F.-E. Yu J.-G. 1997, Gui H.-Q. 1999
annonacine-10-one (<i>cis</i> -)	A1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,15,20	[16,19]	10	-	<i>th/c/th</i>	Rieser M.-J. 1996
Neoannonacinone	A1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,15,20	[16,19]	10	-	<i>th/t/th</i>	Yang R.-Z. 1994
muricine-F	A1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,21,27,28	[17,20]		24	<i>t/th-th</i>	Chang F.-R. 2001
annonacine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Rieser M.-J. 1991, Cortes D. 1991, Rieser M.-J. 1993a, Wu F.-E. 1995, Yu J.-G. 1997, Yu J.-G. 1998,
<i>cis</i> -annonacine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/c/th</i>	Rieser M.-J. 1996
annonacine A	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/er</i>	Wu F.-E. 1995b, Yu J.-G. 1997, YU J.-G. 1998, Gui H.-Q. 1992
annonacine B	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Yu J.-G. 1997, Gui H.-Q. 1992
Arianacine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,12,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Rieser M.-J. 1996

densicomacine (13,14- <i>erythro</i>)	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,14,17,18	[10,13]	-	-	<i>t/er-th</i>	Gui H.-Q. 1992
densicomacine (13,14- <i>threo</i>)	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,14,17,18	[10,13]	-	-	<i>t/th-th</i>	Gui H.-Q. 1992
gigantetrocine A	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,14,17,18	[10,13]	-	-	<i>t/th-th</i>	Rieser M.-J. 1993a, Rieser M.-J. 1993c, Li C.-M. 1994, Wu F.-E. 1995
gigantétrocine B	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,14,17,18	[10,13]	-	-	<i>t/th-th</i>	Rieser M.-J. 1993b
Gigantétronenine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,14,17,18	[10,13]	-	-	<i>t/th-th</i>	Wu F.-E. 1995c
Goniothalamicine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,13,18	[14,17]	-	-	<i>th/t/th</i>	Rieser M.-J. 1993, [189], [246]
goniothalamicine (<i>cis</i> -)	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,13,18	[14,17]	-	-	<i>th/c/th</i>	Rieser M.-J. 1996
Javoricine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,12,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Rieser M.-J. 1996
muricatétrocine A	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,16,19,20	[12,15]	-	-	<i>t/er ou th-th</i>	Rieser M.-J. 1993a, Wu F.-E. 1995
muricatétrocine B	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,16,19,20	[12,15]	-	-	<i>t/er ou th-th</i>	Rieser M.-J. 1993b, Wu F.-E. 1995
muricine-A	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,19,26,27	[15,18]			<i>t/th-th</i>	Chang F.-R. 2001
muricine-B	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,19,26,27	[15,18]			<i>t/th-th</i>	Chang F.-R. 2001
muricine-C	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,21,24,25	[17,20]			<i>t/th-th</i>	Chang F.-R. 2001
muricatine C	A1b	610	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	4,15,20,25	[16,19]	10	-	<i>th/t/th</i>	Li C.-M. 1994
muricatine A	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,14,17,18,23	[10,13]	-	-	<i>t/th-th/er</i>	Li C.-M. 1994
muricatine B	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,14,17,18,23	[10,13]	-	-	<i>t/th-th/er</i>	Li C.-M. 1994
annomuricine A	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,11,15,20	[16,19]	-	-	<i>th-th/t/er</i>	Wu F.-E. 1995
annomuricine B	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,11,15,20	[16,19]	-	-	<i>er-th/t/th</i>	Wu F.-E. 1995
annomuricin C	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,11,15,20	[16,19]	-	-	<i>th-th/t/th</i>	Wu F.-E. 1995c
annomuricine E	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,11,15,20	[16,19]	-	-	<i>er-th/t/th</i>	Kim G.-S. 1998
annopentocine A	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,16,19,20	[12,15]	-	-	<i>t/th-th</i>	Zen L. 1996
annopentocine B	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,16,19,20	[12,15]	-	-	<i>t/th-th</i>	Zen L. 1996
annopentocine C	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,16,19,20	[12,15]	-	-	<i>th/t-er</i>	Zen L. 1996
Muricapentocine	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,8,12,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Kim G.-S. 1998
Muricatalicine	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,7,13,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Gui H.-Q. 1996, YU J.-G. 1997, Gui H.-Q. 1992

Muricatalin	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,14,15,17,18	[10,13]	-	-	<i>t/er/er-th</i>	Gui H.-Q. 1995, Yu J.-G. 1997, Gui H.-Q. 1992
muricatocine A	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,12,15,20	[16,19]	-	-	<i>ps er-th/t/th</i>	Li C.M. 1994
muricatocine B	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,12,15,20	[16,19]	-	-	<i>ps er-th/t/er</i>	Wu F.-E. 1995b
muricatocine C	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,10,12,15,20	[16,19]	-	-	<i>ps th-th/t/er</i>	Wu F.-E. 1995c
muricatine-A	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,14,17,18,23	[10,13]			<i>t/th-th</i>	Zafra-Polo M.C. 1996
muricatine-B	A1b	612	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	4,14,17,18,23	[10,13]			<i>t/th-th</i>	Zafra-Polo M.C. 1996
Annohéxocine	A1b	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,8,10,12,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/er</i>	Zeng L. 1995
Muricoreacine	A1b	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,8,10,16,19,20	[12,15]	-	-	<i>ps er-t/th-er</i>	Kim G.-S. 1998b
murihéxocine A	A1b	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,7,8,16,19,20	[16,19]	-	-	<i>th-t/th-th</i>	Zeng L. 1995b
murihéxocine B	A1b	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,7,8,16,19,20	[16,19]	-	-	<i>th-t/th-th</i>	Zeng L. 1995b
murihéxocine C	A1b	628	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	4,7,8,16,19,20	[16,19]	-	-	<i>th-t/th-er</i>	Kim G.-S. 1998b
4-desoxyhowiicine B	A1a								Yang R.-Z. 1994
howiicine A	A1b								Yang R.-Z. 1994
howiicine B	A1b								Yang R.-Z. 1994

Annexe 4 : acétogénines de type A en C37 isolée d'*A. muricata*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
reticulatacine (<i>cis</i> -)	A1a	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	17,22	[18,21]	-	-	<i>th/t/th</i>	Gleye C. 1998a
uvariamicine I (<i>cis</i> -)	A1a	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Gleye C. 1998a
uvariamicine IV (<i>cis</i> -)	A1a	592	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	13,18	[14,17]	-	-	<i>th/t/th</i>	Gleye C. 1998a
reticulatacine-10-one (<i>cis</i> -)	A1a	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	17,22	[18,21]	10	-	<i>th/c/th</i>	Gleye C. 1998a
muricine-I	A1a	606	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	19,24,25	[15,18]	-	28	<i>t/th-th</i>	Liaw C.C. 2002
Annomutacine	A1b	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	4,10,17,22	[18,21]	-	-	<i>th/t/er</i>	Wu F.-E. 1995d

Annexe 5 : acétogénines de type B en C35 isolée d'*A. muricata*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyl	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
robustocine	B1a	562	C ₃₅ H ₆₂ O ₅	18	[10,13] + [14,17]	0	0	<i>t/th/c/th</i>	Gleye C. 2000
annocatacine-B	B1b	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	4,23	[15,18] + [19,22]	0	0	<i>c/th/t/th</i>	Chang F.R. 2003
annoncatacine-A	B1b	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	4,23	[15,18] + [19,22]	0	0	<i>t/th/c/th</i>	Chang F.R. 2003

Annexe 6 : acétogénines de type C en C37 isolée d'*A. muricata*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
gigantecine	C1b	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	4,14,17,22	[10,13] + [18,21]	-	-	<i>t/th-th/t/th</i>	Gui H.-Q. 1999

Annexe 7 : acétogénines de type A en C35 isolée d'*A. cherimolia*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
corrossoline	A1a	580	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/th</i>	Kim D.-H. 1999
annocherine	A1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,15,20	[16,19]	7	-	<i>th/t/th</i>	Woo M.-H. 1999a
<i>cis</i> -annonacine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/c/th</i>	Woo M.-H. 1999b
varaderine	A1b	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	4,9,13,18	[14,17]	-	-	<i>th/t/th</i>	Duret P. 1997
jetein	A3	598	C ₃₅ H ₆₆ O ₇	10,15,20	[16,19]	-	-	<i>th/t/er</i>	Cortes D. 1991b, Cortes D. 1993

Annexe 8 : acétogénines de type B en C35 isolée d'*A. cherimolia*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
squamocin -l	B1a	578	C ₃₅ H ₆₂ O ₆	13,22	[14,21]	-	-	<i>er/t/th/t/th</i>	Cortes D. 1991c, Cortes D. 1993, Duret P 1994, Chen C.-Y. 1999
molvizarin e	B1b	594	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	4,13,22	[14,21]	-	-	<i>th/t/th/t/er</i>	Cortes D. 1991c, Cortes D. 1993
itrabine	B3	596	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	13,22,33	[14,21]	-	-	<i>th/t/th/t/er</i>	Cortes D. 1991b, Cortes D. 1993

Annexe 9 : acétogénines de type B en C37 isolée d'*A. cherimolia*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
asimicine	B1b	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	4,15,24	[16,22]	-	-	th/t/th/t/th	Rios J.-L. 1989
motriline	B1a	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	15,24,29	[16,22]	-	-	th/t/th/t/er	Cortes D. 1991c, Cortes D. 1993
rolliniastatine-2	B1b	622	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	4,15,24	[16,22]	-	-	th/c/th/c/er	Cortes D. 1991c, Cortes D. 1993
laherradurine	B3	624	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	15,24,35	[16,22]	-	-	th/t/th/t/er	Rios J.-L. 1989, Cortes D. 1991b, Cortes D. 1993
10-hydroxyasimicine	B1b	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	4,10,15,24	[16,22]	-	-	th/t/th/t/th	Waetcher A. 1997

Annexe 10 : acétogénines de type C en C35 isolée d'*A. cherimolia*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
aromine A	C1a	590	C ₃₅ H ₆₀ O ₇	15,20	[4,7] + [16,19]	9	-	t-th/t/th	Chen C.-Y. 1999

Annexe 11 : acétogénines de type C en C37 isolée d'*A. cherimolia*

Nom	Type	Masse	Formule brute	Hydroxyles	THF	Cétone	C=C	Configuration THF	Bibliographie
almunequine	C1a	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	16,19,24,28	[15,10] + [18,23]	-	-	t/th-th/t-er	Cortes D. 1993, Duret P. 1994
cherimoline -1	C1b	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	4,16,17,24	[15,10] + [18,23]	-	-	t/th-th/t/er	Cortes D. 1984, Rios J.-L. 1989, Rupprecht J.-K. 1990, Cortes D. 1993
cherimoline -2	C1b	638	C ₃₇ H ₆₆ O ₈	4,16,17,24	[15,10] + [18,23]	-	-	t/th-th/t/th	Cortes D. 1993
otivarine	C3	640	C ₃₇ H ₆₈ O ₈	16,19,24,35	[15,10] + [18,23]	-	-	t/th-th/t-er	Cortes D. 1991b, Cortes D. 1993

Sources d'images

Sources photographiques : google le images ou wikipédia, sauf précisions dans les légendes, et :

Figure 25, 26 : Litvan I. **1992**, Progressive supranuclear palsy. Oxford University Press, Oxford, New York, 287 p.

Figure 31 : Tison F. **2006**. Les syndromes parkinsoniens atypiques et secondaires. Ed. Masson, Paris, 305 p.

Figure 39 : Estornell E., Tormo J.R., Gallardo T., Gonzalez M.C., Cortes D. Differential interaction of antitumor Annonaceous acetogenins with the target enzyme, mitochondrial complex I. communication. International Congress " 2000 years of Natural Products Research- Past, present and future". Amsterdam, 26-30 juillet **1999**.

Figure 42 : Derbré S., Gil S., Taverna M., Boursier C., Nicolas V., Demey-Thomas E., Vinh J., Susin S.A., Hocquemiller R., Poupon E. Highly cytotoxic and neurotoxic acetogenins of the *Annonaceae*: New putative biological targets of squamocin detected by activity-based protein profiling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 5741-5744.

Figure 43 : Escobar-Khondiker M., Höllerhage M., Muriel M.P., Champy P., Bach A., Depienne C., Respondek G., Yamada E.S., Lannuzel A., Yagi T., Hirsch E.C., Oertel W.H., Jacob R., Michel P.P., Ruberg M., Höglinger G.U. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci.* 2007 Jul 18;27(29):7827-37.

Figure 146 : Guengerich F.P. Cytochromes P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.*, **2006**, 8(1), 101-111.

◆ Résumé

Dans les Antilles françaises, une proportion anormalement élevée de parkinsonismes atypiques sporadiques – des tauopathies – est observée. Un lien avec la consommation de plantes de la famille des Annonaceae, en particulier *Annona muricata* L. (corossol) a été démontré. Les acétogénines d'Annonaceae, des inhibiteurs puissants du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, sont considérées comme des toxines candidates. L'annonacine, une acétogénine représentative, majoritaire dans *A. muricata*, est neurotoxique *in vitro* et *in vivo*. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments a exprimé ses doutes quant à ce problème de santé publique. Elle insiste sur l'importance d'évaluer l'exposition des consommateurs d'Annonaceae aux acétogénines, et de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de ces molécules. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à répondre à ces interrogations, avec l'annonacine pour modèle.

Après l'analyse structurale d'acétogénines étalons, une méthode de déréplication puissante et innovante a été mise au point par CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap[®] avec infusion post-colonne de lithium. Les profils complets des acétogénines d'extraits bruts issus d'un nectar d'*A. muricata* et d'un alcool d'*Annona cherimolia* Mill. (annone, chérimole) ont été élucidés, mettant en évidence une composition plus complexe et plus variée que celle envisagée dans la littérature. *A. cherimolia* n'avait pas été identifiée comme une source d'exposition jusqu'à maintenant. Des données quantitatives ont été obtenues par CLHP-DAD-MS, à partir d'une quinzaine d'échantillons de produits commerciaux, confirmant une exposition humaine importante à ces molécules par voie alimentaire, *via* des produits d'origines géographiques, de statuts et de modes d'obtention variés.

Des travaux préliminaires d'étude du passage de l'annonacine à travers des membranes biologiques ont été amorcés (modèles de barrières intestinale – Caco-2 – et hémato-encéphalique – hCMEC/D3). Une étude de métabolisation de phase I de l'annonacine sur microsomes de foie de Rat a permis d'identifier 25 métabolites mono-hydroxylés par CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap[®]. Seuls trois d'entre eux sont observés avec des microsomes humains. Ces métabolites ont été obtenus par hémisynthèse (bioconversion, catalysée par porphyrines) et leur structure a été déterminée. Les résultats montrent que cette étape de métabolisation n'est pas cruciale dans le devenir de l'annonacine, et ne peut expliquer de susceptibilité différentielle aux acétogénines.

Après la présentation de rappels concernant les Annonaceae, les parkinsonismes et leurs formes atypiques guadeloupéennes et tropicales, puis d'aspects méthodologiques en spectrométrie de masse, nos travaux de phytochimie analytique, d'analyse métabolique, d'hémisynthèse et de détermination structurale sont présentés, et discutés en regard d'un problème de santé publique potentiellement large et préoccupant.

◆ Mots clés

Acétogénines d'Annonaceae, *Annona cherimolia* Mill., *Annona muricata* L., Annonaceae, annonacine, CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap[®], déréplication, Parkinsonisme atypique, métabolisation de phase I, neurotoxine environnementale.

◆ Laboratoire de Pharmacognosie- CNRS UMR 8076

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex