HAL
open science

Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques : de la biodisponibilité de l'annonacine à l'exposition alimentaire.

Natacha Bonneau

To cite this version:

Natacha Bonneau. Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques : de la biodisponibilité de l'annonacine à l'exposition alimentaire.. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS271 . tel-01459289

HAL Id: tel-01459289

https://theses.hal.science/tel-01459289v1

Submitted on 7 Feb 2017

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.

NNT : 2015SACLS271

THÈSE DE DOCTORAT

DE

L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY

PRÉPARÉE À

L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE n° 569

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Spécialité de doctorat : Chimie des substances naturelles

par

Natacha BONNEAU

Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques : de la biodisponibilité de l'annonacine à l'exposition alimentaire.

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 18 décembre 2015 :

Composition du jury :

M. Robert Farinotti,	Professeur, Université Paris-Saclay,	Président
M. Thierry Hennebelle,	Professeur, Université Lille 2,	Rapporteur
Mme Christine Herrenknecht,	Professeur, Université de Nantes,	Rapporteur
Mme Séverine Derbré,	MCU, Université Angers,	Examinateur
M. David Touboul,	Chargé de Recherche, ICSN CNRS,	Examinateur
M. Pierre Champy,	Professeur, Université Paris-Saclay,	Directeur de thèse

“The best laid schemes, o’ Mice and Men

Gang aft agley”

Robert Burns, *To a Mouse* (1785)

Je tiens à remercier les Professeurs Christine Herrenknecht, Thierry Hennebelle, et Robert Farinotti ainsi que les Docteurs Séverine Derbré et David Touboul d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche pour le financement qui m'a été attribué.

Je remercie le Docteur Bruno Figadère et le Professeur Erwan Poupon pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de pharmacognosie.

Je remercie également le Docteur Alain Brunelle pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles dans le cadre de la collaboration entre les deux laboratoires.

Je remercie chaleureusement le Professeur Pierre Champy, mon directeur de thèse, pour m'avoir confiée ce projet, et pour m'en avoir beaucoup appris sur le sujet.

Je souhaiterais remercier le Professeur Michel Lebœuf pour m'avoir permis d'assister aux réunions bibliographiques, ainsi que les Docteurs François Roblot, Christophe Fourneau et Laurent Evanno, pour leur partage des connaissances lors des enseignements de travaux pratiques.

Je remercie mes collègues doctorants, anciens et nouveaux, pour les bons moments partagés.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué à ce projet :

- au Docteur David Touboul et à Isabelle Schmitz-Afonso pour m'avoir formée et accompagnée tout au long de ce projet.

- au Docteur Alexandre Maciuk pour l'acquisition du Q-TOF au sein du laboratoire.

- à Karine Leblanc pour son aide lors des analyses LC-UV et MS.

- à Jean Christophe Jullian et Camille Dejean, pour les analyses RMN.

- aux Docteurs Paul Coulerie et Valérie Kiagy, de l'Institut d'Agronomie Néo-Calédonien pour nous avoir fourni des extraits de fruits, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont collecté des fruits, en particulier Pr Guy Lewin, Dr Faustin Kabran, et Isabelle Cazin.

- à Valérie Domergue et son équipe, pour m'avoir permis de réaliser les expérimentations animales dans de bonnes conditions, ainsi qu'à Audrey Valentin, Blandine Séon-Méniel, François Sénejoux, qui tous à un moment ont pris de leur temps pour m'aider lors des prélèvements.

- à Alexandre Dubesset pour avoir isolé de l'annonacine lors de son stage de M1, et pour son implication dans les expérimentations animales.

- à Lamia Baloul pour sa quantification de la squamocine pendant son stage de M2.

- à Timothé Cynober pour avoir appliqué la quantification par ^{1}H RMN à de nombreux extraits bruts pendant son stage de M1.

- à Leïla Haddad, pour avoir réalisé des extraits pendant son stage de L3.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire de pharmacognosie et de l'équipe de spectrométrie de masse que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ces années.

Mes remerciements plus particuliers vont,

- à Marie et Hanane, pour votre enthousiasme. Cela a été un plaisir de travailler à vos côtés.

- à Abha, en souvenir des rats.

- à Alex, Inès et Grégoire. Parce que votre présence était essentielle.

- à Adam, pour ton écoute et nos échanges toujours enrichissants.

- à Pedro, pour nos très chouettes discussions.

- à Mehdi, parce que tu m'as tellement appris. C'est toujours un plaisir de discuter avec toi.

- à la Mehdi's team, pour tous les bons moments de brainstorming.

- aux Michels. Je vous aime tous toujours autant.

- à Elise et Dalia, pour votre soutien, même de loin.

- à Alice, Alice et Pauline pour vos encouragements et vos délicates attentions.

- à Aurélie, pour ton incroyable soutien. Je te suis infiniment reconnaissante d'avoir été là cette année.

- à Romain, pour avoir partagé ma vie pendant des années. Merci d'avoir été patient et de m'avoir soutenue dans tout ce que j'ai entrepris.

- à mes frères.

- à mes parents.

SOMMAIRE

Introduction générale.....5

Chapitre 1 : Annonaceae, acétogénines : données bibliographiques.....9

1. Généralités sur le genre *Annona* 11
1.1. Classification, origine et répartition géographique 11
1.2. Description des espèces étudiées 12
1.3. Emplois et usages 13
1.3.1. Culture et alimentation 13
1.3.2. Médecine traditionnelle humaine et vétérinaire 14
1.3.3. Médecine traditionnelle Caribéenne 15
1.3.4. Statut et emplois médicinaux en Occident 16
1.4. Composition chimique du genre *Annona* 17
2. Acétogénines d'Annonaceae 19
2.1. Structure et classifications 19
2.2. Répartition au sein des Annonaceae 22
2.3. Études qualitatives et quantitatives d'AAGs : travaux antérieurs 25
2.3.1. Études qualitatives 25
2.3.2. Études quantitatives sur acétogénines 37
2.4. Mécanisme d'action et activités pharmacologiques 42
2.4.1. Inhibition du complexe I mitochondrial 42
2.4.2. Relations structure-activité 44
2.4.3. Activités pharmacologiques et toxicité 45
3. Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques 49
3.1. Etudes épidémiologiques 51
3.1.1. Les parkinsonismes atypiques Guadeloupéens 51
3.1.2. Autres cas de parkinsonismes atypiques « tropicaux » 56
3.2. Discussion autour de l'implication des acétogénines 57
3.2.1. Au travers des études épidémiologiques 57
3.2.2. Hypothèses étiologiques : molécules potentiellement impliquées 58
4. Étude ADME de l'annonacine : travaux antérieurs 65

4.1. Absorption et distribution 65

4.2. Métabolisation de phase I 67

Chapitre 2 : Contribution à l'étude de la pharmacocinétique de l'annonacine chez le Rat 69

1. Introduction 71

2. Article 1 : Développement d'une méthode de quantification de l'annonacine, une neurotoxine environnementale, dans le plasma de Rat, et étude pharmacocinétique 73

2.1. Résumé 73

2.2. Article 73

2.3. Commentaires 83

2.3.1. Plan d'expérience 83

2.3.2. Développement de méthode 84

2.3.3. Résultats-discussion 85

2.3.4. Résultats complémentaires *in vivo* 86

2.3.5. Expériences *in vitro* 87

3. Article 2 : Développement d'une méthode de quantification de l'annonacine dans le cerveau de Rat par UPLC-MS/MS 89

3.1. Résumé 89

3.2. Article 89

3.3. Commentaires 111

3.3.1. Plan d'expérience 111

3.3.2. Développement de méthode 111

3.3.3. Résultats-discussion 111

4. Conclusion 113

Chapitre 3 : Exposition alimentaire aux acétogénines : étude qualitative et quantitative d'extraits de pulpes du genre *Annona* 115

1. Introduction 117

2. Article 3 : Le fruit d'*Annona squamosa* comme source potentielle de neurotoxines : de la quantification de la squamocine à la description d'acétogénines d'Annonaceae par analyse LC-MS/MS 119

2.1. Résumé 119

2.2. Article 119

2.3. Commentaires 173

2.3.1. Développement de méthode MS/MS 173

2.3.2. Traitement des données 179

3. Article 4 : Quantification globale d'AAGs par RMN quantitative : application à des extraits de pulpes d'*Annona muricata* 181

3.1. Résumé 181

3.2. Article 181

3.3. Commentaires 207

4. Recherche d'acétogénines dans la pulpe d'*Annona reticulata* 209

5. Perspectives : descriptif comparé d'AAGs présentes dans les pulpes de fruits de plusieurs espèces du genre *Annona*. 210

6. Conclusion 212

Conclusion générale 213

Bibliographie 217

Liste des Abréviations 233

Liste des Figures 235

Liste des Tableaux 237

Annexes 239

Communications 253

Introduction générale

Depuis la description en 1982 de l'uvaricine (Jolad *et al.*, 1982), première acétogénine d'Annonaceae (AAG) identifiée, cette classe de molécules a fait l'objet d'un engouement particulier, fortement lié à ses propriétés biologiques. En effet, la remarquable cytotoxicité des AAGs les a rapidement propulsées au rang de candidats-médicaments antitumoraux. Cette application n'a cependant toujours pas vu le jour, car cette cytotoxicité qui leur promettait un rapide essor s'est avérée peu spécifique, de par la nature même de leur principal mécanisme d'action : l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dotées d'une forte homogénéité structurale, toutes les AAGs présentent ce mécanisme d'action. Si des données précliniques semblent prometteuses, aucune acétogénine isolée n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché. C'est dans le cadre de compléments alimentaires que ces molécules font l'objet d'emplois, sous forme de poudres de drogues végétales en contenant.

Outre leur statut de molécules à potentiel thérapeutique, les AAGs sont également considérées comme des neurotoxines environnementales. Elles sont suspectées d'être responsables de phénomènes neurodégénératifs, suite à la mise en évidence par plusieurs études cas-contrôle d'un lien entre des syndromes parkinsoniens atypiques et la consommation de fruits et de tisanes de feuilles du genre *Annona* L. en Guadeloupe. Une telle association semble exister ailleurs en zone tropicale. Des études neurotoxicologiques *in vitro* et *in vivo*, menées principalement sur l'annonacine, AAG majoritaire dans l'espèce *Annona muricata* L., ont accru ces suspicions. Celles-ci sont d'autant plus fortes que la présence d'AAGs a été rapportée dans la pulpe des fruits de cet arbre cultivé, dans des produits alimentaires dérivés ainsi que dans des fruits des espèces proches.

L'ANSES a donc émis une saisine en 2010, encourageant la recherche sur les risques potentiellement liés à la consommation de fruits d'Annonaceae et à l'exposition aux AAGs. Outre des aspects épidémiologiques, relatifs à l'investigation sur le terrain auprès des patients et consommateurs d'Annonaceae, les travaux fondamentaux proposés passent par l'exploration de 3 volets pouvant relever du travail d'analyse propre à la pharmacognosie ou situés à la marge de celui-ci. Sont ainsi définis comme prioritaires :

1. la détermination de la biodisponibilité des AAGs, afin de savoir dans quelle mesure la quantité consommée parvient dans la circulation générale sous forme inchangée ;
2. la détermination de la distribution des AAGs dans l'organisme, la quantification dans le cerveau constituant un élément déterminant de leur implication potentielle dans les troubles neurologiques observés ;
3. la détermination de l'exposition potentielle aux AAGs dans le cadre alimentaire, notamment par leur dosage dans les fruits comestibles susceptibles d'en contenir, en particulier dans le genre *Annona*.

Au cours de ce travail, qui s'inscrit dans la suite des thèses de Pierre Champy (2005) puis de Jessica Le Ven (2012) au laboratoire, nous avons cherché à apporter des éléments de réponse à chacune de

ces interrogations, au travers d'analyses relatives à l'étude des AAGs dans des matrices animales ou alimentaires. Les travaux sont présentés suivant un plan conforme aux actions édictées par l'ANSES, dans un format de « thèse sur articles », qui comporte 4 manuscrits rédigés en langue anglaise (**1** à **4**). Tous sont accompagnés de données complémentaires, également en anglais, puis d'éléments additionnels en français. Ils comportent les parties expérimentales, qui ne font pas l'objet d'un chapitre différencié.

Ces articles sont précédés d'un chapitre d'introduction (**Chapitre 1**) présentant la famille des Annonaceae (dont les modifications récentes de leur classification interne) et le genre *Annona* (en particulier les espèces étudiées ici), puis les AAGs (caractéristiques générales et distribution, méthodes d'étude chromatographiques et spectrales relatives à notre travail expérimental, propriétés pharmacologiques, neurotoxicité, données pharmacocinétiques). Le lien entre Annonaceae et parkinsonismes atypiques y fait l'objet de mises au point, ainsi que l'engouement récent suscité par ce problème de santé publique.

Les données expérimentales obtenues sont ensuite proposées dans deux chapitres.

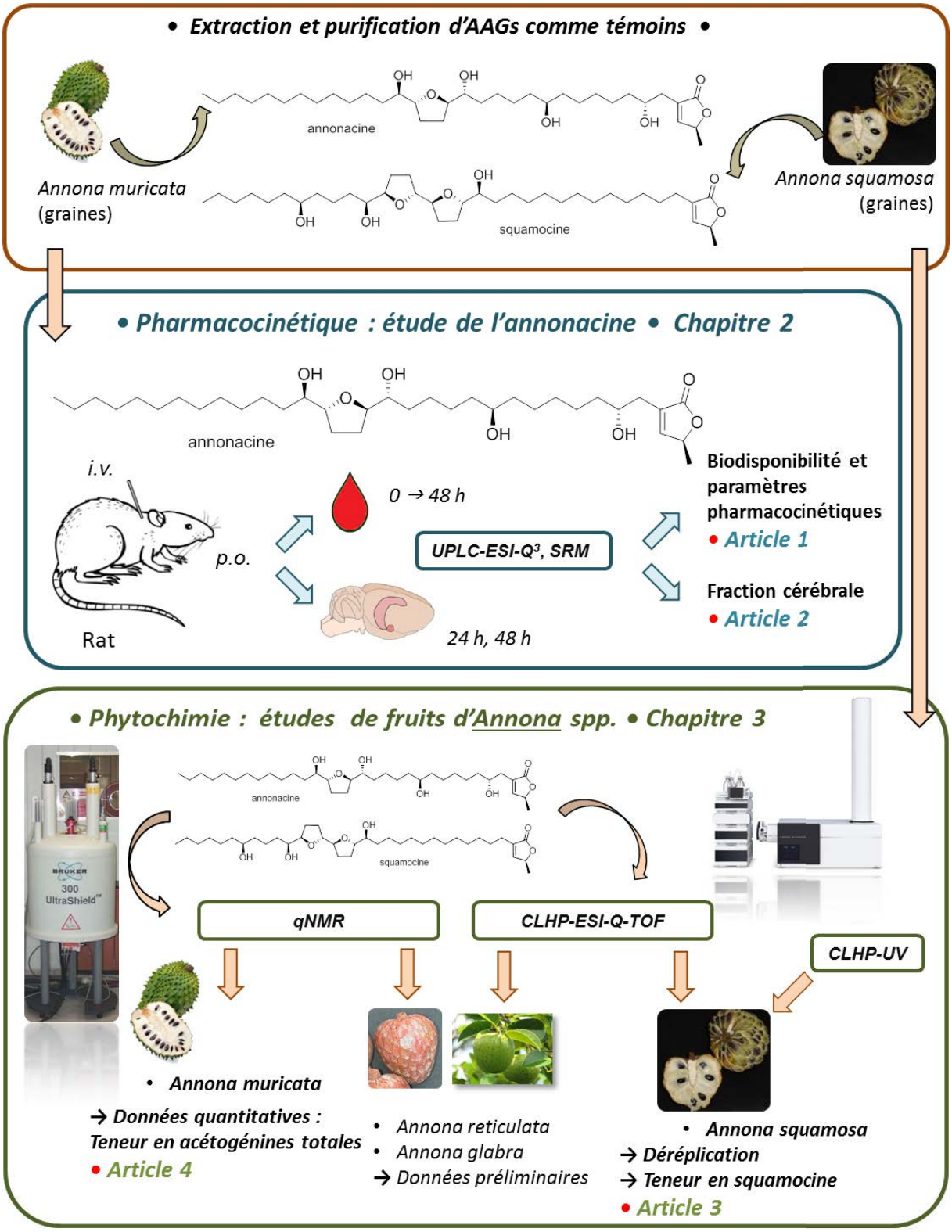
Le **chapitre 2** est relatif à la ***biodisponibilité et à la distribution d'une AAG-modèle****, l'annonacine* :

- L'**article 1** (*Journal of Chromatography B*, **2015**) présente une méthode de dosage de l'annonacine dans le plasma, puis son application à la détermination de la biodisponibilité de la molécule chez le Rat.
- L'**article 2** (soumis à *Toxicon*), directement connexe, présente le dosage de la molécule dans le cerveau des rats traités.

Le **chapitre 3** traite de l'***analyse chimique d'extraits bruts de fruits d'Annonaceae***, avec le développement de méthodes de dosage et une étude déréplicative par CLHP couplée à la spectrométrie de masse :

- L'**article 3** (à soumettre à *Food Chemistry*) présente l'étude de 4 lots de fruits d'*Annona squamosa* L., dont la composition est méconnue, avec l'identification et le dosage par CLHP-UV de l'AAG majoritaire et la description du profil des autres AAGs.
- L'**article 4** (à soumettre à *Phytochemical Analysis*) décrit la mise au point d'une méthode de dosage des acétogénines totales, par RMN monodimensionnelle du proton (^{1}H RMN), appliquée aux extraits bruts de 7 lots de fruits d'*A. muricata*.
- Quelques données expérimentales complémentaires, utiles pour la poursuite ultérieure de ce travail, sont ensuite brièvement présentées, ainsi que des perspectives et des données préliminaires relatives aux fruits d'*Annona reticulata* L.

Un bilan et des perspectives générales viennent conclure cet écrit.


• Extraction et purification d'AAGs comme témoins •
annonacine
squamocine
Annona muricata
(graines)
Annona squamosa
(graines)
• Pharmacocinétique : étude de l'annonacine • Chapitre 2
annonacine
i.v.
p.o.
Rat
0 → 48 h
24 h, 48 h
UPLC-ESI-Q³, SRM
Biodisponibilité et paramètres pharmacocinétiques
• Article 1
Fraction cérébrale
• Article 2
• Phytochimie : études de fruits d'Annona spp. • Chapitre 3
annonacine
squamocine
qNMR
CLHP-ESI-Q-TOF
CLHP-UV
• Annona muricata
→ Données quantitatives :
Teneur en acétogénines totales
• Article 4
• Annona reticulata
• Annona glabra
→ Données préliminaires
• Annona squamosa
→ Déréplication
→ Teneur en squamocine
• Article 3

Chapitre 1 : Annonaceae, acétogénines, données bibliographiques

1. Généralités sur le genre Annona 11
1.1. Classification, origine et répartition géographique 11
1.2. Description des espèces étudiées 12
1.3. Emplois et usages 13
1.3.1. Culture et alimentation 13
1.3.2. Médecine traditionnelle humaine et vétérinaire 14
1.3.3. Médecine traditionnelle Caribéenne 15
1.3.4. Statut et emplois médicinaux en Occident 16
1.4. Composition chimique du genre *Annona* 17
2. Acétogénines d'Annonaceae 19
2.1. Structure et classifications 19
2.2. Répartition au sein des Annonaceae 22
2.3. Études qualitatives et quantitatives d'AAGs : travaux antérieurs 25
2.3.1. Études qualitatives 25
2.3.2. Études quantitatives sur acétogénines 37
2.4. Mécanisme d'action et activités pharmacologiques 42
2.4.1. Inhibition du complexe I mitochondrial 42
2.4.2. Relations structure-activité 44
2.4.3. Activités pharmacologiques et toxicité 45
3. Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques 49
3.1. Etudes épidémiologiques 51
3.1.1. Les parkinsonismes atypiques Guadeloupéens 51
3.1.2. Autres cas de parkinsonismes atypiques « tropicaux » 56
3.2. Discussion autour de l'implication des acétogénines 57
3.2.1. Au travers des études épidémiologiques 57
3.2.2. Hypothèses étiologiques : molécules potentiellement impliquées 58
4. Étude ADME de l'annonacine : travaux antérieurs 65
4.1. Absorption et distribution 65
4.2. Métabolisation de phase I 67

1. Généralités sur le genre *Annona*

1.1. Classification, origine et répartition géographique

Les Annonaceae constituent une famille d'Angiospermes primitive, apparue il y a environ 90 Millions d'années (Pirie and Doyle, 2012), regroupant 110 genres et environ 2440 espèces (Couvreur *et al.*, 2015, 2012). Elle est composée principalement d'arbres, arbustes et lianes, répartis dans les régions tropicales, à l'exception des genres *Asimina* et *Deeringothamnus*, poussant dans les régions tempérées d'Amérique du Nord (Le Thomas et Doyle, 1993).

L'étude morphologique des pollens désigne la région afro/sud américaine du Gondwana comme le berceau de la famille. Cette assertion s'appuie sur la présence du type pollinique primitif, le caractère monoaperturé étant typique de la majorité des Magnoliids, ainsi que de toutes les principales lignées polliniques en Amérique du Sud. Les analyses cladistiques appuient cette hypothèse phytogéographique, selon laquelle au Crétacé Inférieur, la famille des Annonaceae aurait pris naissance dans une zone frontière entre le Gondwana et la Laurasie. La branche Laurasienne aurait donné naissance aux Anaxagoreae, tandis que la branche gondwanienne se serait diversifiée pour générer tous les autres clades. Le rapprochement de l'Afrique et de l'Asie par la suite expliquerait la présence de lignées communes entre ces deux continents (Le Thomas et Doyle, 1993) (**Annexe 1**). Les Annonaceae sont à présents réparties en trois zones géographiques : Américano-néotropicale, Africaine, et Australasienne. La répartition du genre *Annona* suit l'histoire phytogéographique de cette famille, étant néotropicale mais comprenant également quelques espèces africaines, il est à présent cultivé jusqu'en Europe et en Australasie (**Figure 1**).

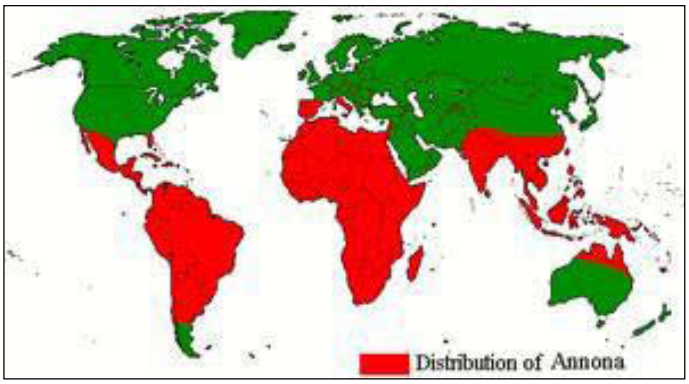


Figure 1 : Répartition du genre *Annona* (Pinto *et al*, 2005).

Depuis la première classification botanique de la famille par Rafinesque (1815) jusqu'à celle de Fries (1959), fondées principalement sur l'organisation du fruit et des caractéristiques morphologiques de l'appareil reproductif, de nombreuses révisions de classification du règne végétal ont été menées avec l'émergence de la cladistique au travers d'analyses phylogénétiques qui n'ont pas remis en question le caractère archaïque de cette famille. En témoignent les nombreuses pièces du périanthe, les sépales libres, les étamines libres disposées en spirales, et les carpelles indépendants.

Certaines caractéristiques permettent de classer sans ambiguïté les plantes dans la famille des Annonaceae, dont les principales sont présentées dans la Figure 2. S'il est ainsi aisé de dire l'appartenance à la famille des Annonaceae, il l'est beaucoup moins de la découper en clades, car certaines caractéristiques sont hautement polyphylétiques (Chatrou *et al.*, 2012a). L'organisation interne à cette famille a donc été sujette à de nombreux remaniements, le dernier en date ayant donné lieu à une refonte des sous-familles et tribus (Chatrou *et al.*, 2012b). De nouvelles clefs d'identification des genres au sein de cette organisation ont dû être développées (Couvreur *et al.*, 2012). Elles s'appuient sur des critères macromorphologiques de l'appareil végétatif, des fruits et des fleurs, voire des pollens. Les clefs descriptives du genre *Annona* dans les 3 zones géographiques de la famille sont indiquées dans l'**Annexe 1**. Des éléments relatifs à l'identification de ces espèces cultivées du genre ont été publiés très récemment (Larranaga et Hormaza, 2015).

1.2. Description des espèces étudiées

Le genre *Annona* L. comprend 162 espèces (Chatrou *et al.*, 2012b). Les 4 espèces *glabra, muricata, reticulata* et *squamosa*, abordées dans le manuscrit, ainsi que leurs principales caractéristiques macromorphologiques sont présentées ci-dessous (**Figure 2 et 3**). Elles présentent des fleurs trimères, et des fruits pseudosyncarpiques (résultant de la juxtaposition des carpelles) charnus.

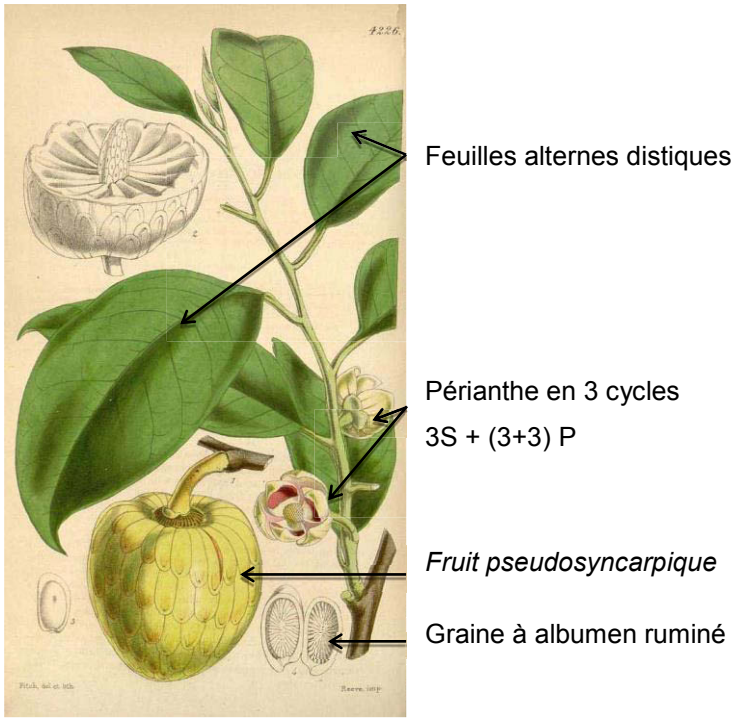


Figure 2 : *Annona glabra* (éléments communs aux Annonaceae ; en italique : caractéristique du genre *Annona*) Curtis's Botanical Magazine, vol. 72 [ser. 3, vol. 2]: t. 4226 (1846) [W.H. Fitch]

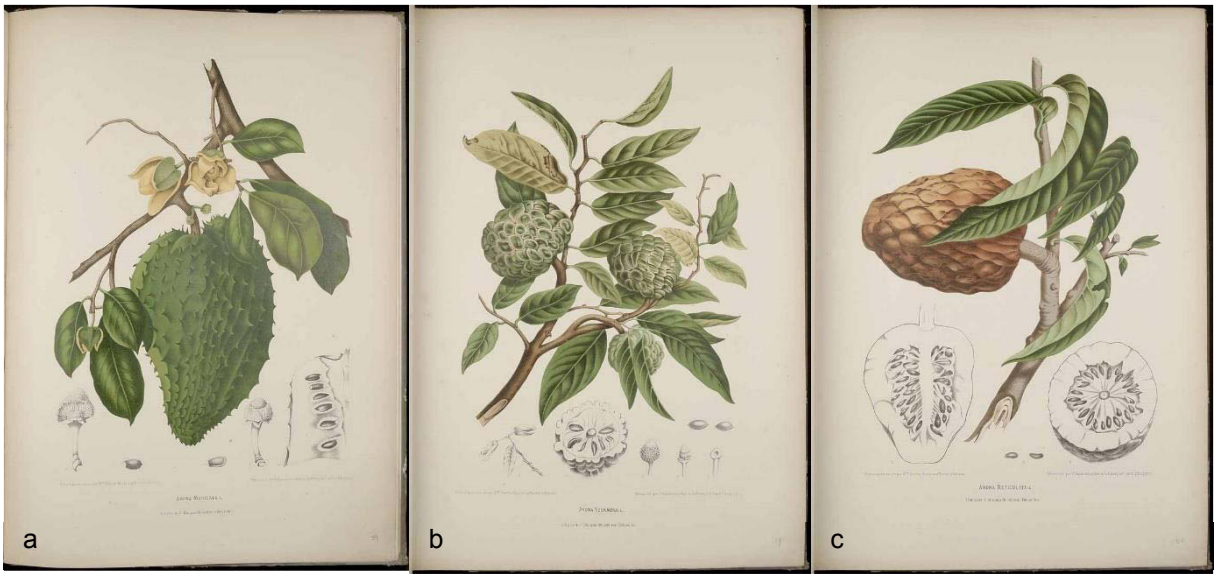


Figure 3 : Illustrations d'*Annona muricata* (a), *Annona squamosa* (b), *Annona reticulata* (c) Hoola van Nooten, B., Fleurs, fruits et feuillages choisis de l'île de Java: peints d'apres nature **(1880).**

1.3. Emplois et usages

1.3.1. Culture et alimentation

Le genre *Annona*, très largement distribué à la surface du globe, comporte de nombreuses espèces dont sept au moins (*cherimolia* [syn. : *cherimola*], *glabra*, *montana*, *muricata*, *reticulata*, *senegalensis*, *squamosa*) sont cultivées, ainsi qu'un hybride (*atemoya* = *cherimolia* x *squamosa*). Si les surfaces agricoles qui leurs sont consacrées et les rendements de production fruitière sont assez peu connus, il ressort des données actuelles que le Mexique est le premier producteur de corossol (Pinto *et al.*, 2005). Les pays producteurs sont présentés **Figure 4**.

Les cultures à des fins de consommation personnelle ou de vente sur les marchés locaux sont très répandues et difficiles à chiffrer (Pinto *et al.*, 2005). La consommation des fruits des espèces *A. glabra*, *reticulata* et *squamosa* au Brésil a été mentionnée par Auguste de Saint Hilaire au XIXe siècle (Brandão *et al.*, 2012). Même s'il est difficile de donner avec certitude leur origine géographique, *A. reticulata*, *et squamosa* viendraient respectivement des Antilles et d'Amérique centrale. *A. muricata* pourrait provenir d'une de ces deux localisations ou du nord de l'Amérique du Sud. Ces espèces auraient été par la suite répandues dans les autres continents par les colons espagnols.

A. muricata est l'espèce la plus consommée, de nombreux produits dérivés du corossol, son fruit, sont commercialisés sous forme de jus, nectars, ou encore bonbons.

1.3.2. Médecine traditionnelle humaine et vétérinaire

Les Annonaceae constituent une famille importante dans les médecines traditionnelles en zone tropicale. Le genre *Annona* est fréquemment employé en médecine populaire. Nous avons établi une carte des mentions d'usage traditionnel en médecine humaine ou vétérinaire des 4 espèces étudiées à partir de la base de données Prélude *via* le site ethnopharmacologia.org, et de la base de données Horizon *via* le site de l'Institut de Recherche et Développement (IRD) compilées avec des données récentes d'enquêtes ethnobotaniques mentionnant l'emploi des espèces étudiées *via* une recherche sur le site *Science Direct* (**Figure 4**).

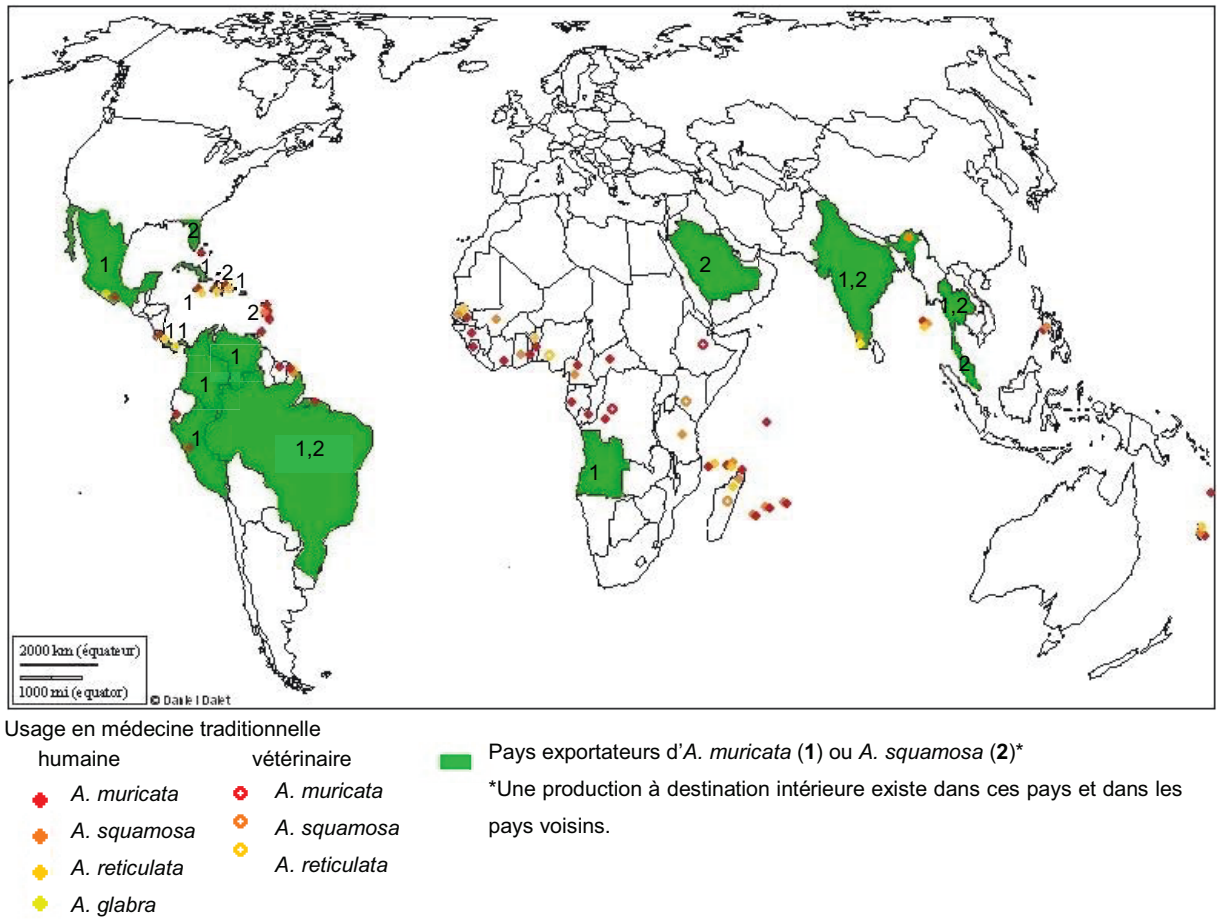


Figure 4 : Carte de la répartition des pays cultivant les espèces *A. muricata* et *squamosa* (Pinto *et al.*, 2005) et du recensement des mentions d'usage en médecine traditionnelle (Boulogne *et al.*, 2011; Chander *et al.*, 2014; Coelho-Ferreira, 2009; Heinrich *et al.*, 1992; Lans, 2006; Mafimisebi *et al.*, 2012; Mootoosamy and Fawzi Mahomoodally, 2014; Ningthoujam *et al.*, 2012; Ong and Kim, 2014; Prabhu *et al.*, 2014; Rageau, 1973; Razafindraibe *et al.*, 2013; Sreekeesoon and Mahomoodally, 2014; Tag *et al.*, 2012; Tene *et al.*, 2007; Yabesh *et al.*, 2014) (fond de carte : http://www.histgeo.ac-aix-marseille.fr)

À partir de ce recensement non exhaustif, nous pouvons observer que des utilisations médicinales traditionnelles ont été mentionnées dans un nombre important de régions différentes, et ont contribué à l'intérêt porté à ces espèces : en témoignent les nombreuses études chimiques et pharmacologiques

sur le sujet. L'espèce *A. muricata* est la plus utilisée, fréquemment sous forme de décoction des feuilles, pour des emplois très variés allant des insomnies, à l'hypertension ou aux troubles respiratoires ou digestifs. Les emplois d'*A. reticulata* sont assez similaires. Les graines d'*A. squamosa* sont rapportées comme pédiculicides et les feuilles utilisées en décoction contre le diabète. Il est à noter également que les fruits sont parfois utilisés comme astringents. Les seuls emplois mentionnés d'*A. glabra* à notre connaissance sont en Inde, à visée insecticide et parasiticide (Padmaja *et al.*, 1995).

1.3.3. Médecine traditionnelle Caribéenne

Le problème de santé publique motivant ce travail de thèse ayant été identifié dans les Antilles françaises, il semblait intéressant d'étudier de manière plus précise les emplois caribéens du genre. Deux espèces sont employées de façon plus importante et des données quantitatives d'usage sont disponibles.

Tableau 1 : Utilisations des espèces rapportées au cours d'études ethnobotaniques menées dans les Caraïbes (Boulogne *et al.*, 2011; Buraud, 2010; Lans, 2006; Longuefosse and Nossin, 1996; Picking *et al.*, 2015)

Espèces	Partie de plante	Préparation	Administration	Utilisation	Région	Fréquence*	Source
A. muricata	Feuille	écrasée	bain	rashs cutanés	Martinique	28	(Longuefosse, 1996)
	Feuille	écrasée	bain	sédatif		32	
	Feuille	décoction	orale	sédatif		68	
	Feuille	décoction	orale	douleur thoracique		5	
	Feuille	infusion	orale	inflammation		4	
	Bourgeon	décoction	orale	bronchite		2	
	Feuille	NR	NR	hypertension	Trinidad et Tobago	NR	(Lans, 2006)
	Feuille	en association	bain	dermatose	Guadeloupe : Iles Les Saintes	44 (TB) 61 (TH)	(Boulogne, 2011)
	Feuille	décoction	orale	insomnie	Guadeloupe : Marie Galante, La Désirade	29	(Buraud, 2010)
	Feuille	infusion (en association)	orale	insomnie		24	
	Feuille	Infusion decoction	orale	nervosité	Jamaïque	83	(Picking *et al.*, 2015)
A. squamosa	Feuille	décoction	orale	flatulences	Martinique	68	(Longuefosse, 1996)
	Feuille	décoction	orale	maladies du foie		38	

NR : non renseigné, TB : Terre Basse, TH : Terre Haute

* % = Nombre d'individus interrogés utilisant cette plante pour cette indication relativement au nombre d'individus utilisant des plantes pour cette indication

Des utilisations de feuilles d'*A. muricata*, souvent en infusion, pour des affections diverses, ont été rapportées en Martinique (Longuefosse and Nossin, 1996) et en Guadeloupe (Buraud, 2010; Caparros-Lefèbvre et Elbaz, 1999; Joseph, 1983), ainsi qu'à Trinidad et Tobago (Lans, 2006) et en Dominique (Arzoumanian, 2013) (**Tableau 1**).

La plante ne figure pas pour autant dans la « Pharmacopée caribéenne », la plus récente mise à jour datant de 2007 (TRAMIL, 2007). Cet ouvrage résulte des prospections du réseau TRAMIL (TRAditionnelle Médecine (des) ILes) qui recense les usages significatifs de la médecine traditionnelle

populaire dans le Bassin Caraïbe. Ceci pourrait s'expliquer par une trop faible convergence des usages sur les 24 secteurs géographiques investigués, bien que l'emploi des feuilles d'*A. muricata* comme sédatif soit converge en Martinique et en Guadeloupe, ou encore par la méthode d'investigation qui se focalise sur les pathologies les plus courantes dans chaque secteur, la recherche de plantes à emploi sédatif n'y étant pas forcément considérée comme prioritaire.

1.3.4. Statut et emplois médicinaux en Occident

Le genre *Annona* figure sur la liste éditée par l'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (*European Food Safety Agency* : EFSA, (EFSA, 2012) qui recense les plantes pouvant potentiellement présenter un risque pour la santé humaine, vis à vis d'une utilisation dans des compléments alimentaires ou à des fins alimentaires. Il est absent de l'Arrêté du 24 juin 2014[1], établissant la liste des plantes autorisées dans les compléments alimentaires en France et les conditions de leur emploi. L'ANSES a par ailleurs publié une saisine relative à la sécurité de consommation d'*A. muricata*, présentée plus loin.

Les espèces *A. muricata*, *reticulata* et *squamosa* figurent sur la liste « BelFrIt » (pour « Belgique France Italie »), qui vise à amorcer une harmonisation de l'emploi des plantes en tant qu'ingrédients de compléments alimentaires dans l'Union Européenne. Il y est précisé que l'utilisation des fruits uniquement est autorisée, sans les graines, et à condition d'indiquer la teneur en acétogénines. L'espèce *Asimina triloba* (L.) dont il est question plus loin fait également partie de ce projet BelFrIt .

Il est à noter que de la poudre de feuilles de corossolier, proposée avec le statut de complément alimentaire, est cependant largement accessible *via* des sites de vente en ligne avec parfois des revendications thérapeutiques. De plus, l'offre du fruit comme complément alimentaire tend à se développer actuellement en Europe. D'autres Annonaceae sont commercialisées de la même manière (*Annona* spp. – feuilles ; *Asimina triloba* – feuilles, branches). Les fournisseurs sont principalement implantés en Amérique du Sud, aux Etats-Unis et en Chine.

---

[1] http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000029254516&categorieLien=id
Page consultée le 07/10/2015.

1.4. Composition chimique du genre *Annona*

Le genre *Annona* a fait l'objet de nombreux travaux, visant notamment à l'isolement de nouveaux alcaloïdes. Le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris-Saclay, où j'ai réalisé mon doctorat, a pris une part active à cette recherche dans les années 80-90.

Les principales classes de molécules retrouvées dans le genre sont répertoriées et illustrées par des exemples (**Figure 5**). De nombreux alcaloïdes isoquinoléiques ont été isolés du genre *Annona*, ainsi que des monoterpènes, diterpènes, des hétérosides cyanogènes et des tanins hydrolysables et condensés (Leboeuf *et al.*, 1980). Des cyclopeptides ont été isolés de graines d'*Annona muricata*, *glabra* et *squamosa* (Li *et al.*, 1999, 1997; Wélé *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014).

Plusieurs études portant sur les fruits d'*Annona muricata* ont par ailleurs été menées récemment, décrivant leurs composés aromatiques et phénoliques (Cheong *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2014). La présence d'alcaloïdes isoquinoléiques dans ces fruits a en outre été rapportée (Hasrat *et al.*, 1997).

Les Acétogénines d'Annonaceae, qui constituent par ailleurs une classe de molécules majeure dans le genre *Annona*, et en particulier dans les espèces étudiées au cours de ce travail, font l'objet d'une partie détaillée.

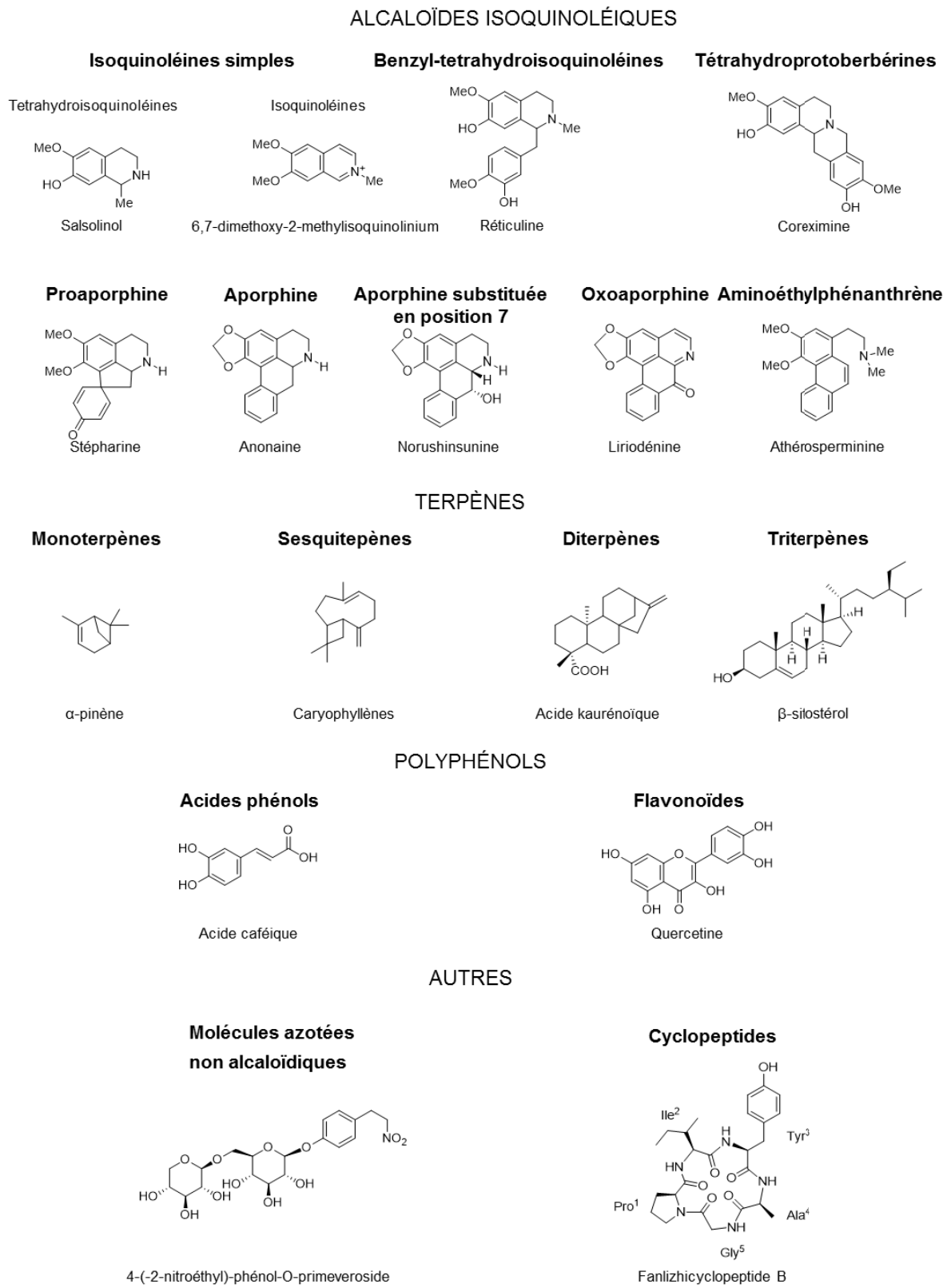


Figure 5 : Classes de métabolites secondaires isolés du genre *Annona* illustrées par des exemples. Les alcaloïdes isoquinoléiques cités ont tous été décrits, entre autres, dans l'espèce *A. muricata*.

2. Acétogénines d'Annonaceae

Les acétogénines d'Annonaceae, dotées d'une répartition chimiotaxonomique très étroite au sein du règne végétal, ont suscité un très grand intérêt depuis la caractérisation en 1982 de l'uvaricine (Jolad *et al.*, 1982) présentant une structure inédite, prélude à l'essor d'une nouvelle classe de molécules d'origine naturelle comptant aujourd'hui plus de 580 représentants, de structure très homogène et générant pourtant une grande diversité moléculaire.

2.1. Structure et classifications

Les acétogénines d'Annonaceae (AAGs) sont des molécules polyacétiques lipophiles, à longue chaîne carbonée non ramifiée en C_{35} ou C_{37}, terminée par une γ-méthyl-γ-lactone, et présentant 1 à 3 cycles THF en milieu de chaîne auxquels se substituent parfois des époxydes ou doubles liaisons, ainsi que des fonctions oxygénées. Les éléments structuraux caractéristiques sont reportés **Figure 6**. Les principales AAGs citées dans ce manuscrit sont reportées **Annexe 2**.

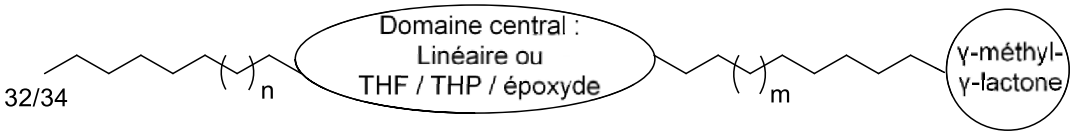


Figure 6 : Schéma général de structure d'une AAG.

Il existe deux classifications basées sur la nature de ces éléments : l'une a été établie lorsqu'environ 160 AAGs avaient été décrites (Cavé *et al.*, 1997). La nature des groupements THF détermine alors le type, tandis que la lactone terminale définit le sous-type (**Figure 7**).

Cette classification s'applique à la majorité des AAGs décrites à ce jour, mais ne tient pas compte de la découverte de nouveaux motifs structuraux en lieu et place des THF. Une autre classification a été amorcée en parallèle par Cortes *et al.* dès 1993 (Cortes *et al.*, 1993), augmentée par Zafra-Polo *et al.* en 1996 (Zafra-Polo *et al.*, 1996) puis par Bermejo *et al.* en 2005 (Bermejo *et al.*, 2005) pour atteindre sa forme actuelle en 6 types dictés toujours par les groupements de milieu de chaîne, mais répartis cette fois-ci en AAGs linéaires, époxydes, mono-THF, bis-THF, tri-THF et THP. La classification est définie par la combinaison des éléments structuraux décrits (**Figure 8**) ainsi que par la nature des substituants sur les AAGs linéaires. On remarquera que les AAGs de sous-type 2 (type L-B1) sont manifestement artefactuelles (Duret *et al.*, 1997). De par sa simplicité, l'emploi de la classification de Cavé *et al.* est préféré dans ce manuscrit.

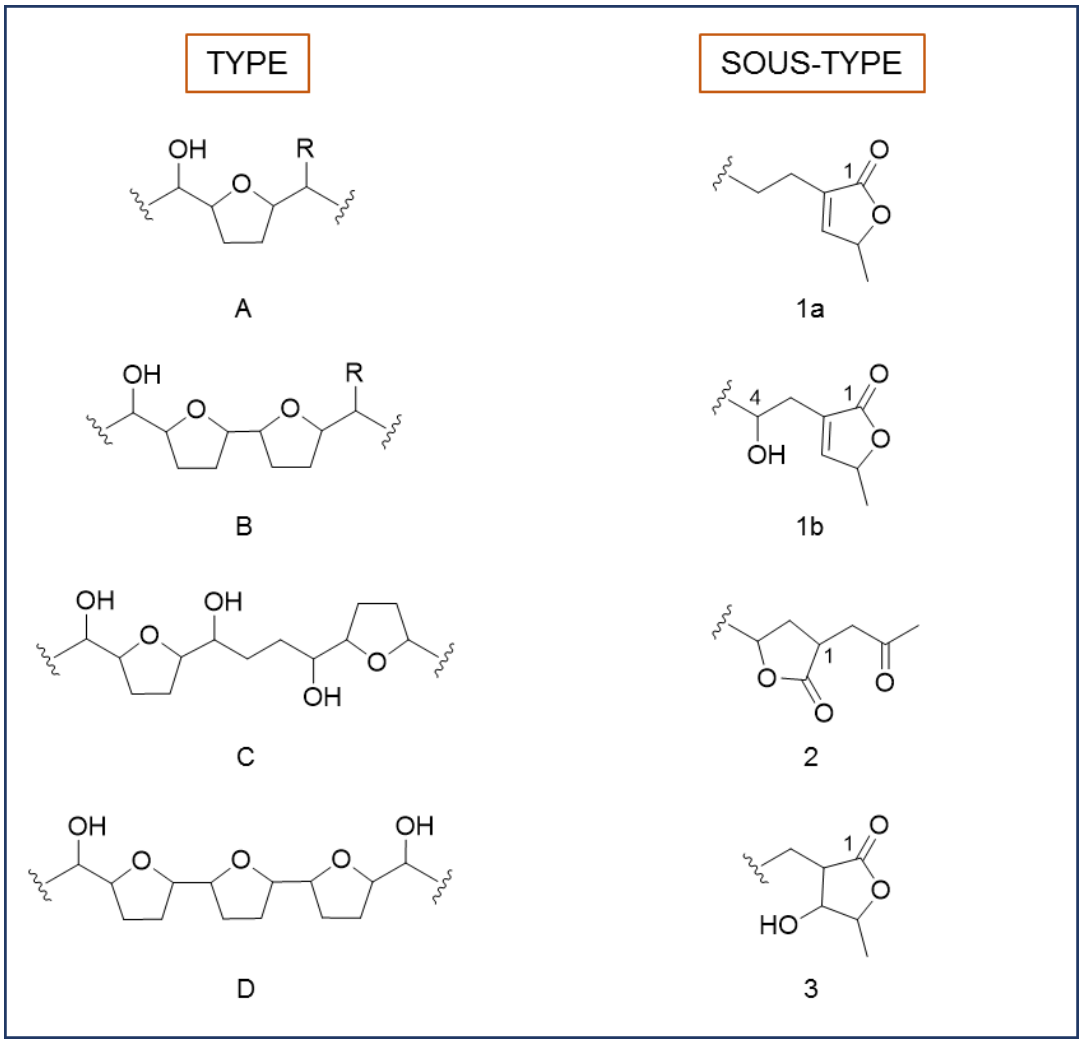


Figure 7 : Classification des acétogénines selon Cavé *et al*. (1997).

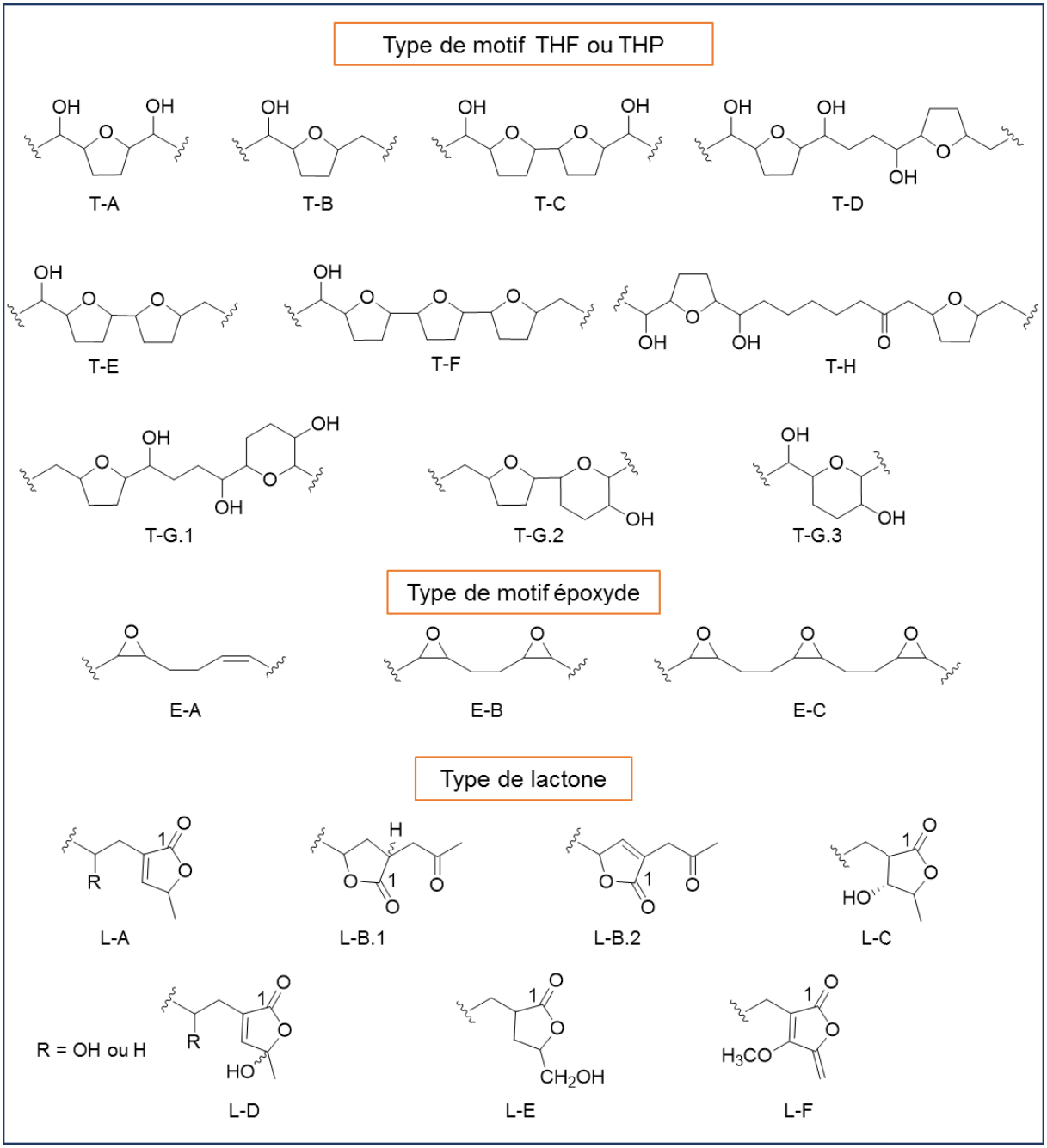


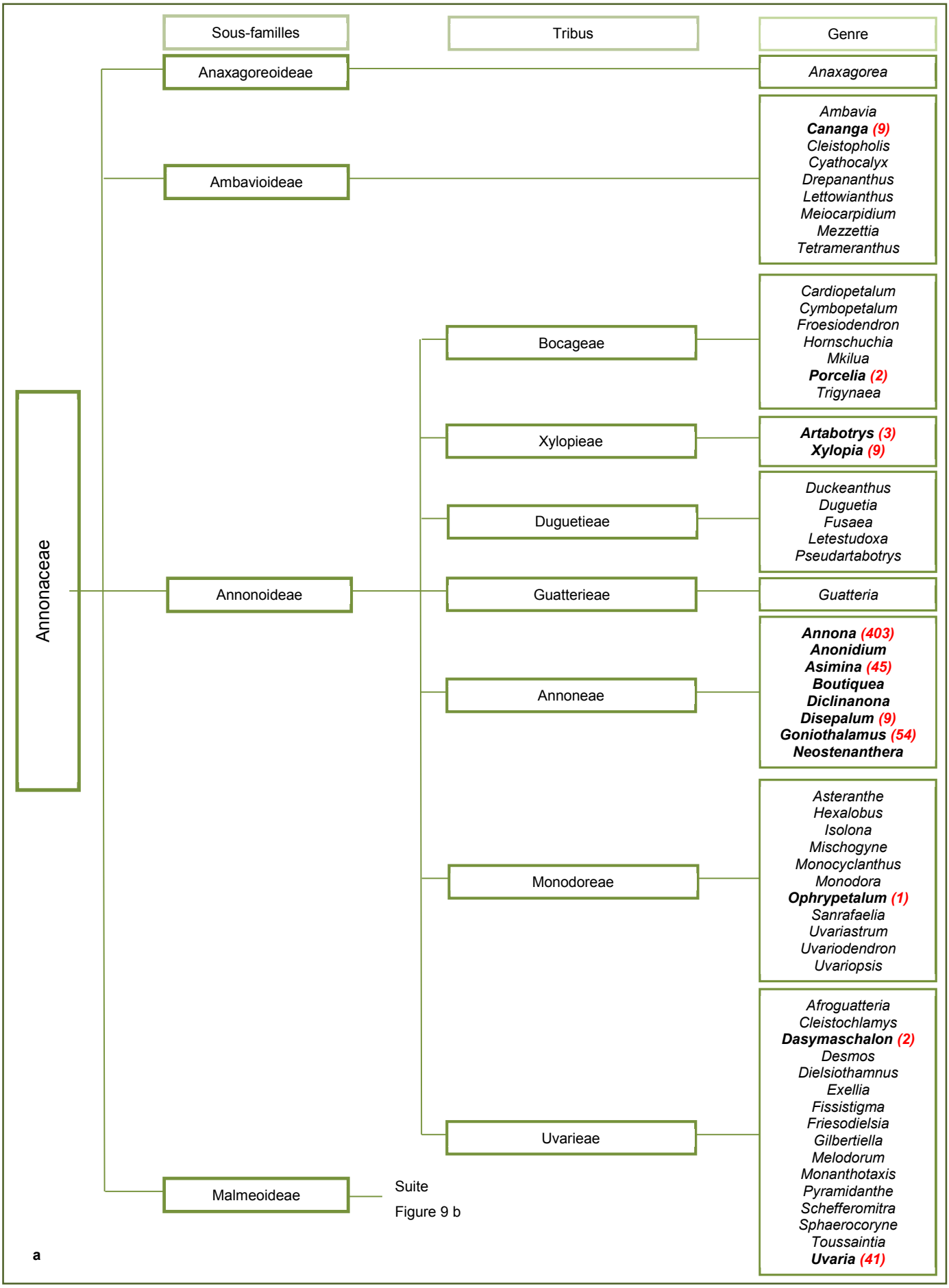
Figure 8 : Nomenclature de Cortes *et al*, augmentée par Bermejo *et al.* (2005).

2.2. Répartition au sein des Annonaceae

Depuis la revue de Bermejo *et al.* en 2005, 61 nouvelles acétogénines ont été isolées dont 36 dans le genre *Annona,* portant ainsi à 417 le nombre total d'AAGs qui en ont été isolées, suite à sa fusion avec le genre *Rollinia* (Rainer, 2007).

Les acétogénines d'Annonaceae ont été retrouvées à ce jour dans 14 genres répartis dans 3 des 4 sous-familles, à l'exception des Anaxagoroideae (**Figure 9**). Dix de ces genres appartiennent à la sous-famille des Annonoideae et au moins une mention de la présence d'AAGs a été faite dans 5 des 7 tribus la constituant. Cependant, à l'exception notable du genre *Uvaria*, le plus grand nombre d'AAGs découvertes se concentre chez les Annoneae et atteint son paroxysme dans le genre *Annona*. La présence d'AAGs chez les Ambavioideae n'a été rapportée qu'assez récemment (Wongsa *et al.*, 2011), dans le genre *Cananga* uniquement, et chez les Malmeoideae, dans la seule la tribu des Miliuseae dans 3 des 26 genres qu'elle renferme.

Ces inégalités de répartition ne peuvent être imputées à une tendance naturelle au sein de cette famille qui permettrait d'affiner les hypothèses chimiotaxonomiques, mais bien plutôt au prisme par lequel l'intérêt porté à certains genres a orienté les travaux de recherche. Ceux qui constituent une ressource facilement accessible ou valorisable, qui ont une importance économique, ou qui font l'objet d'usages traditionnels, ont été davantage étudiés. Aussi, le genre *Annona* a-t-il été prolifique en termes d'acétogénines décrites.


Sous-familles
Tribus
Genre
Annonaceae
Anaxagoreoideae
Anaxagorea
Ambavioideae
Ambavia
Cananga (9)
Cleistopholis
Cyathocalyx
Drepananthus
Lettowianthus
Meiocarpidium
Mezzettia
Tetrameranthus
Annonoideae
Bocageae
Cardiopetalum
Cymbopetalum
Froesiodendron
Hornschuchia
Mkilua
Porcelia (2)
Trigynaea
Xylopieae
Artabotrys (3)
Xylopia (9)
Duguetieae
Duckeanthus
Duguetia
Fusaea
Letestudoxa
Pseudartabotrys
Guatterieae
Guatteria
Annoneae
Annona (403)
Anonidium
Asimina (45)
Boutiquea
Diclinanona
Disepalum (9)
Goniothalamus (54)
Neostenanthera
Monodoreae
Asteranthe
Hexalobus
Isolona
Mischogyne
Monocyclanthus
Monodora
Ophrypetalum (1)
Sanrafaelia
Uvariastrum
Uvariodendron
Uvariopsis
Uvarieae
Afroguatteria
Cleistochlamys
Dasymaschalon (2)
Desmos
Dielsiothamnus
Exellia
Fissistigma
Friesodielsia
Gilbertiella
Melodorum
Monanthotaxis
Pyramidanthe
Schefferomitra
Sphaerocoryne
Toussaintia
Uvaria (41)
Malmeoideae
Suite
Figure 9 b
a

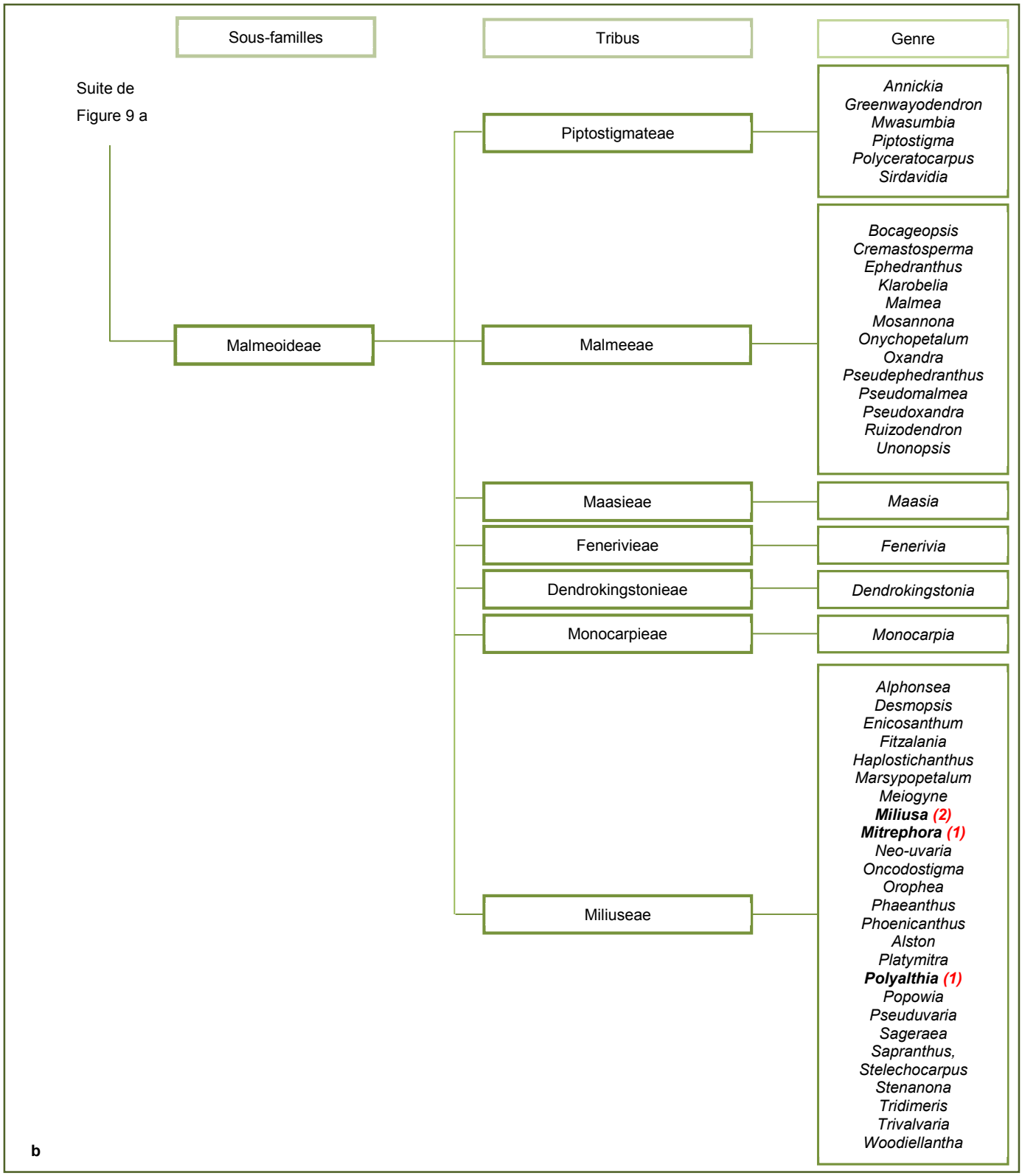


Figure 9 : Classification de la famille des Annonaceae jusqu'au genre (Chatrou et *al.*, 2012 ; 2015) et le nombre d'AAGs isolées - mise à jour depuis la dernière revue de Bermejo *et al.* (2005). (Alvarez Colom et al., 2009; Bajin ba Ndob et al., 2009; Barrachina et al., 2007; Bermejo et al., 2005; Chahboune et al., 2006; Chen et al., 2012a; da C. Alves et al., 2014; Eparvier et al., 2006; Fall et al., 2006; Forest et al., 2012; Liaw et al., 2008, 2005; Melot et al., 2009; Pimenta et al., 2005; Rodrigues dos Santos Lima et al., 2009; Santos et al., 2006; Sun et al., 2014; Wongsa et al., 2011; Yang et al., 2009c)

2.3. Études qualitatives et quantitatives d'AAGs : travaux antérieurs

Les acétogénines d'Annonaceae, sur lesquelles ont porté ce travail, sont présentées au travers des aspects relatifs à leur analyse.

2.3.1. Études qualitatives

La détermination structurale des AAGs est réalisée par des méthodes spectrales classiques, comprenant la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Dans le cadre de cette thèse, la spectrométrie de masse a principalement été employée, et fait donc l'objet d'une présentation spécifique ci-dessous.

2.3.1.1. Acétogénines et Spectrométrie de Masse (MS)

Dans la démarche d'élucidation structurale des acétogénines se pose le problème de détermination de la position des groupements fonctionnels oxygénés sur la chaîne carbonée, les corrélations longues distance en RMN ne permettant l'accès qu'à des éléments structuraux partiels. Le recours à la spectrométrie de masse a pour ce faire été systématique dès la publication initiale relative à l'uvaricine (Jolad *et al.*, 1982). De grandes avancées dans ce domaine ont été réalisées par le Pr. O. Laprévote, alors doctorant au laboratoire et dans l'équipe de Spectrométrie de Masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles. La collaboration entre ces deux laboratoires s'est depuis poursuivie dans le cadre de l'étude de ces molécules.

- *Ionisation électronique et ionisation chimique*

L'ionisation chimique et l'impact électronique étaient alors fréquemment employés (et le sont toujours pour la détermination structurale de molécules isolées) afin de générer en source des fragments informatifs (**Figure 10**). Ceux-ci résultent de la rupture en α entre les 2 carbones dans les enchaînements-O-CH_2-CH_2-O-, permettant de positionner le ou les THF. Des fragments résultant de la rupture en β de la lactone sont également observés. L'impact électronique étant une méthode d'ionisation dure, elle conduit à la formation d'ions instables par excès d'énergie ; aussi observe-t-on sur le spectre quantité d'ions fragments, dont certains résultant de plusieurs pertes d'eau, parfois au détriment de l'ion moléculaire $[M]^{+\cdot}$. Une étape de silylation est par ailleurs souvent nécessaire pour augmenter la volatilité des acétogénines, prérequis indispensable à l'ionisation par ce procédé. Ces sources sont le plus souvent couplées à un quadrupole qui est un analyseur présentant une résolution unitaire. Comme en témoignent de récents exemples de la littérature (Chahboune *et al.*, 2006; Wongsa *et al.*, 2011), si cela n'entrave en rien l'élucidation structurale de molécules isolées, cette technique est en revanche inapplicable à l'analyse de ces molécules lorsqu'elles se trouvent en mélange complexe.

L'ionisation chimique qui est une méthode assez douce, ne donne, quant à elle, pas systématiquement les fragments informatifs mentionnés ci-dessus. L'intensité des ions ainsi que la formation d'adduits $[M+H+G]^+$ sont modulés par le choix du gaz réactif (G). En présence de NH_3, l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ est majoritaire, tandis qu'en présence de CH_4, de plus faible affinité protonique, $[M+H]^+$ se fragmente et devient donc souvent minoritaire (Laprévote *et al.*, 1991). De nombreuses pertes d'eau

sur les fragments donnent parfois lieu à des résultats ambigüs conduisant à des erreurs d'interprétation (Laprévote et Das, 1994). Il devient alors important de trouver un moyen d'obtenir ces informations cruciales de façon sûre et reproductible.

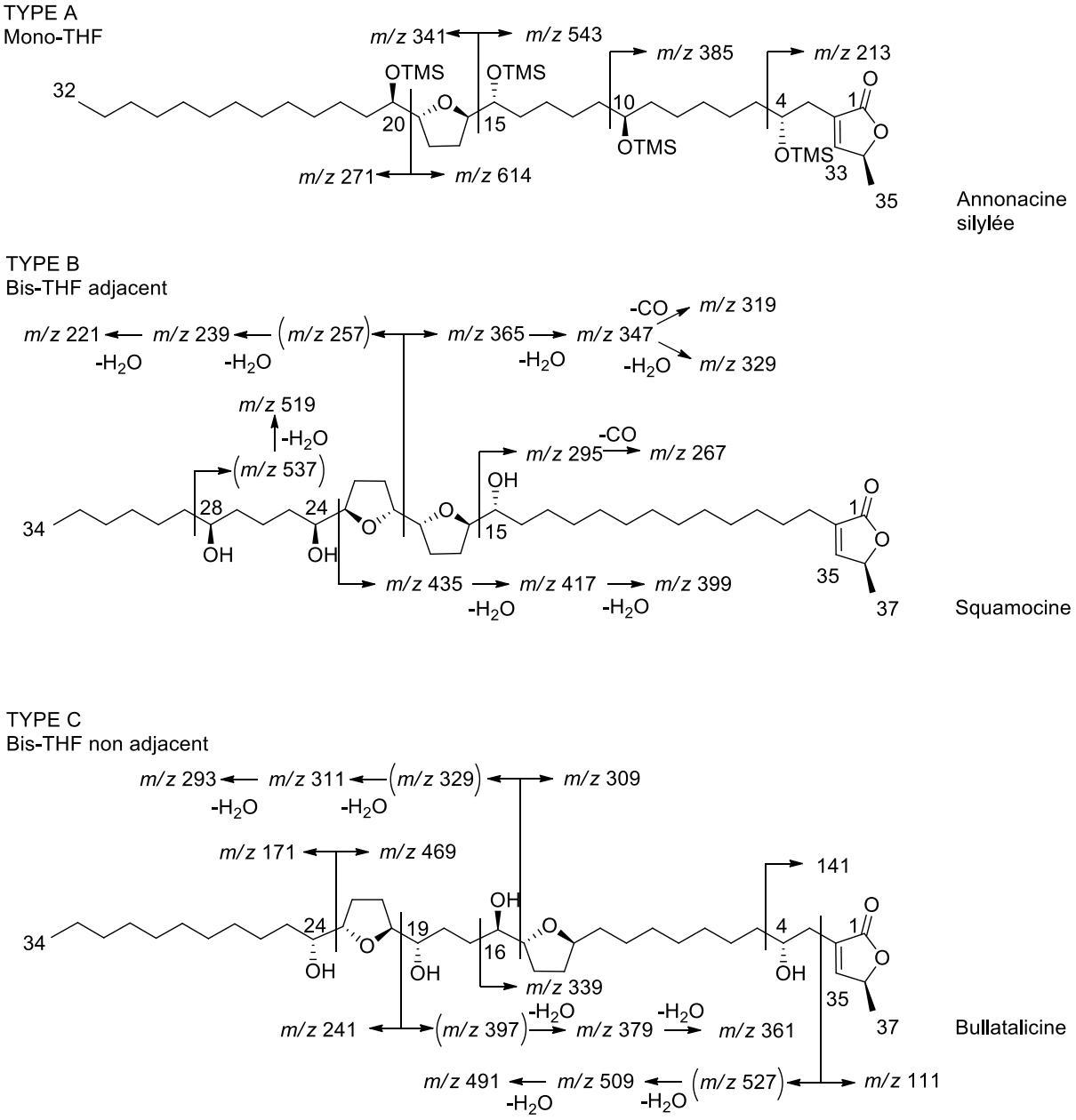


Figure 10 : Exemples de fragmentations obtenues par ionisation chimique ($[M+H]^+$) ou électronique ($[M]^{+\cdot}$). Les ions entre parenthèses ne sont pas observés sur les spectres. (Fujimoto *et al.*, 1988; Hui *et al.*, 1989; Mc Cloud *et al.*, 1987)

Des essais de désorption et d'ionisation chimique en mode négatif ont mis en évidence la formation d'énolates comme éléments intéressants dans le positionnement des fonctions OH (Laprévote *et al.*, 1991), qui ont conduit à suspecter les acétogénines de posséder des propriétés de complexation. Cette hypothèse a été mise à l'épreuve en présence de Na^+, K^+, et Li^+ (Laprévote *et al.*, 1992a). La démonstration de formation préférentielle de $[M+Li]^+$ a ouvert la voie à l'exploitation de cette propriété

de complexation au Lithium dans les travaux qui ont suivi. La formation de ces complexes $[M+Li]^+$ a été très utile au cours de cette thèse.

- *De l'intérêt du Lithium : démonstration par FAB-MS (Fast Atom Bombardment)*

Les spectres obtenus par FAB couplé à un analyseur magnétique à double focalisation, présentent les ions $[M+H]^+$, ainsi que des pertes d'eau et l'adduit $[M+Na]^+$. Par ajout de LiCl dans la matrice, le spectre est simplifié et seul l'ion $[M+Li]^+$ présente une grande intensité (Laprévote *et al.*, 1992b). Des expériences de dissociation induite par collision (CID) ont été menées dans un appareil à « géométrie conventionnelle » avec un balayage combiné à rapport B/E constant. Il en résulte d'intenses pertes d'eau à partir de l'ion $[M+H]^+$. En revanche, à partir de l'ion $[M+Li]^+$, celles-ci disparaissent au profit de fragments de faible intensité mais informatifs. Des pertes de CO, CO_2 et 112 uma sont caractéristiques de la γ-méthyl-γ–lactone. De nouveaux fragments permettent de positionner les fonctions THF ou époxyde sur la chaîne carbonée (Laprévote *et al.*, 1992a, 1992b). Cette méthode s'inspire par ailleurs de celles développées sur les acides gras pour placer les fonctions époxydes (Tomer *et al.*, 1986), qui implique un mécanisme de fragmentation « à charge piégée » c'est-à-dire à distance de la charge[2]. Des similitudes en termes de types de fragments ont conduit Laprévote *et al.* à envisager l'implication d'un mécanisme similaire pour les AAGs. Ces fragments ont cependant également été observés en conditions métastables, bien qu'en intensité encore plus faible. Or, la rupture « à charge piégée » requiert une énergie interne supérieure à celle des ions métastables. Laprévote *et al.* proposent donc que les fragments caractéristiques obtenus soient largement liés à la complexation au Lithium (Laprévote *et al.*, 1992b).

- *Vers une nomenclature générale*

Cette méthode a par la suite été appliquée à des acétogénines connues appartenant aux types A, B, C et aux sous-types lactoniques 1, 2, 3, dans le but de formaliser les voies de fragmentation observées jusqu'alors. Les expériences ont été menées sur des exemples représentatifs de la majorité des AAGs isolées, les AAGs à THF étant beaucoup plus abondantes que celles à époxydes ou à chaîne linéaire. Une première nomenclature a été établie (Laprévote et Das, 1994) puis complétée par la suite (Hue-Faucheur, 2002). Les ions comportant la partie lactone terminale sont notés A, B, C, D tandis que ceux comportant l'extrémité C-terminale sont désignés W, X, Y, Z (**Figure 11**).

Il s'agit du premier pas vers l'établissement de « règles » de fragmentation des AAGs, ouvrant la voie à leur identification partielle par le biais de schémas généraux caractéristiques des motifs structuraux.

---

[2] Par opposition aux fragmentations « induites par la charge »

Ces schémas sont hypothétiques dans le sens où la présence effective et l'intensité des ions diffèrent selon la méthode d'ionisation et les conditions de fragmentation employées.

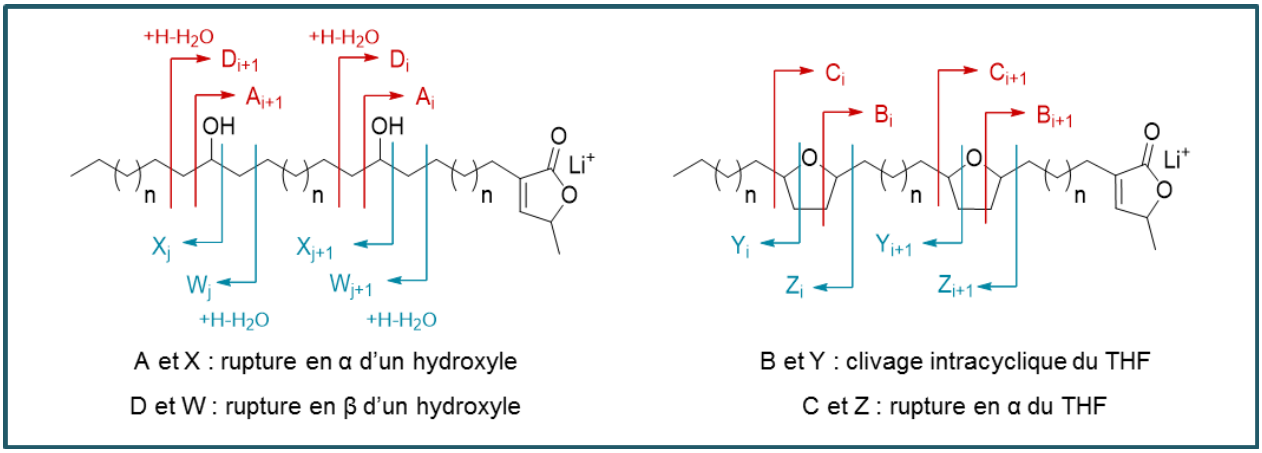


Figure 11 : Schéma général de fragmentation des acétogénines en présence de Li^+.

- *Fragmentation en FAB-MS/MS*

En FAB-analyseur à double focalisation avec CID, l'énergie de collision se situe entre 1000 et 10 000 eV. Les ions A, B et C permettent d'identifier le type d'acétogénine en se basant sur la présence de pics ayant des écarts de masse particuliers. Des exemples illustrant chacun des types sont représentés sur la **Figure 12**. L'ion Y_2 confirme l'identité d'un motif bis-THF, et les ions X permettent de placer les fonctions OH qui se situent entre le THF et la lactone, mais non adjacentes au THF. Ceci a été observé pour toutes les acétogénines analysées par Laprévote *et al.* (Laprévote et Das, 1994) à l'exception de la sylvaticine qui présente un ion X3. L'inconstance du fragment C1 est à noter sur les bis-THF. L'ion Y1 que l'on pourrait attendre est systématiquement absent, au contraire des ions B1 et B2. La présence de l'ion Z2 a par ailleurs été rapportée de façon anecdotique. Des mécanismes ont été proposés par Laprévote *et al.* pour la formation des ions B1 et Y2 (**Figure 13**).

La nature du sous-type est quant à elle mise en évidence par les intensités relatives des différents ions. Le sous-type 1 se caractérise par une perte systématique de 112. Pour le sous-type 1b, son intensité relative est de 100 %, elle s'élève seulement à 20-50 % pour le sous-type 1a. Les ions les plus intenses sont alors $[M+Li-H_2O]^+$ et $[M+Li-CO_2]^+$. Pour le sous-type 2, l'ion $[M+Li-CO_2]^+$ est le plus intense. Les ions les plus abondants du sous-type 3 sont $[M+Li-H_2O]^+$ et $[M+Li-CO_2]^+$. Le mécanisme proposé par Laprévote *et al.* pour la rupture en β de la lactone de sous-type 1a est présenté **Figure 13**.

Aucune perte d'eau n'est observée à partir des fragments informatifs, contrairement à ce qui se produit en ionisation électronique ou chimique, limitant ainsi les ambiguïtés structurales. En outre, l'analyseur utilisé apporte une bonne précision sur la mesure de masse.

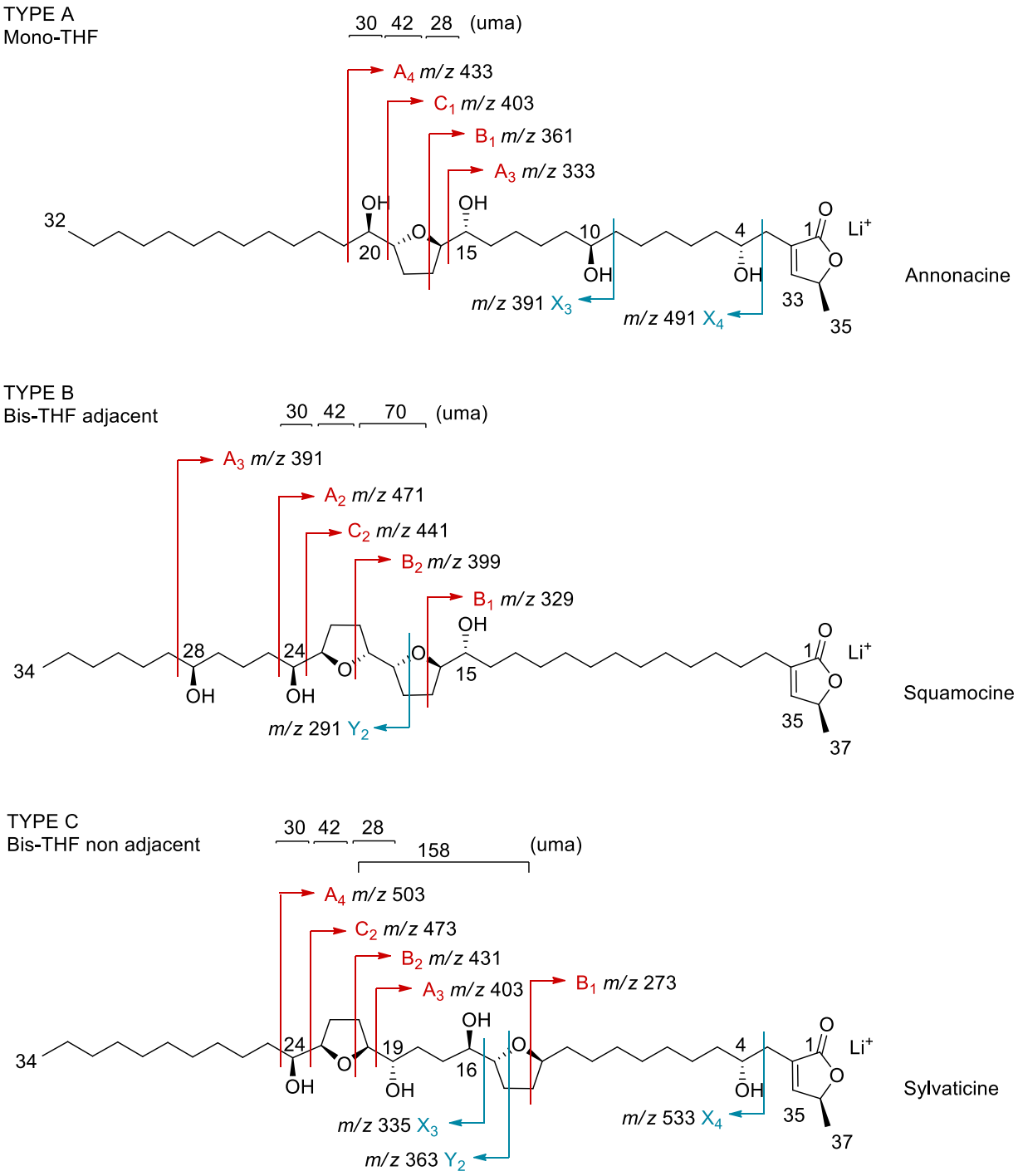


Figure 12 : Détermination du type d'acétogénine par l'étude des fragments caractéristiques obtenus par FAB-MS en présence de LiCl (Laprévote et Das, 1994).

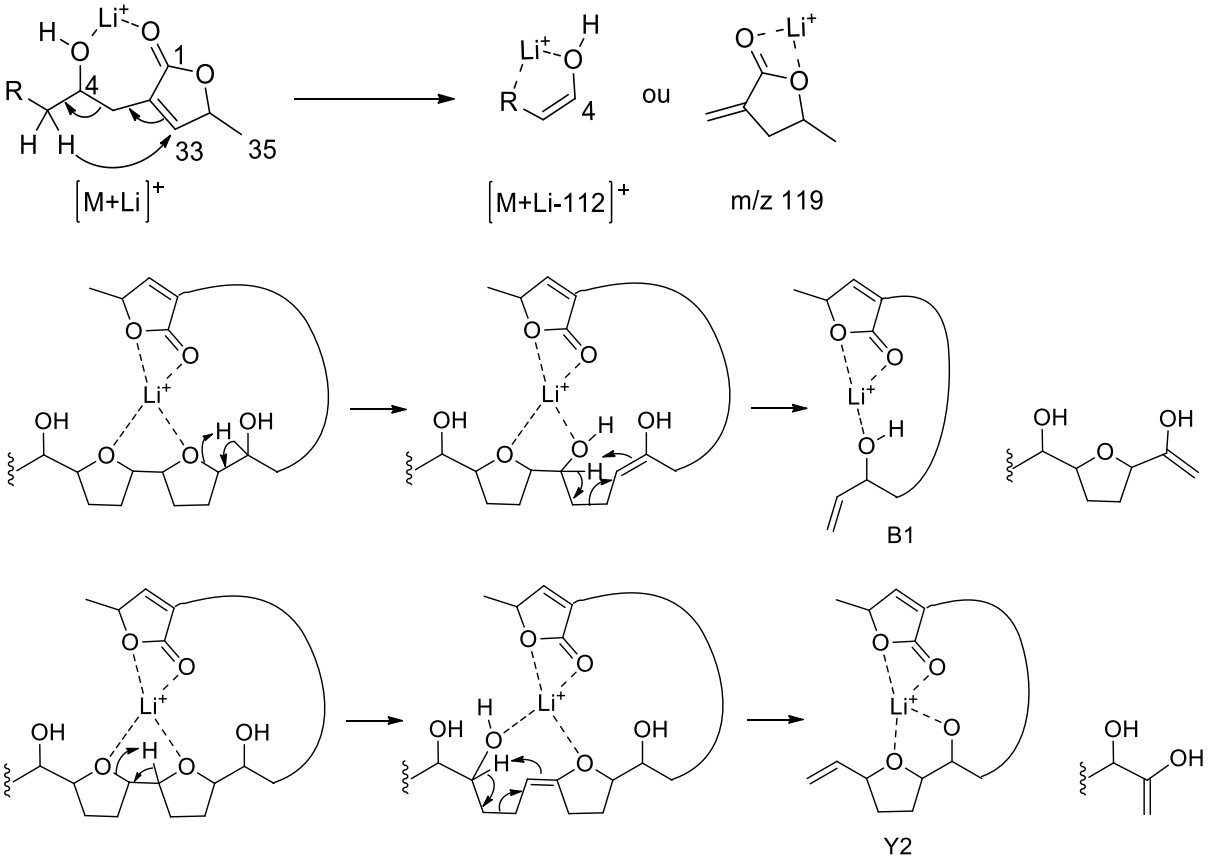


Figure 13 : Mécanismes de fragmentation proposés par Laprévote *et al.* (1994) en présence de Lithium.

- *Couplage LC-MS/MS : vers l'étude de mélanges complexes*

De nouvelles méthodes ont dû être développées par la suite, en vue d'une adaptation à l'évolution instrumentale[3] (Allegrand *et al.*, 2010). Aussi la caractérisation d'AAGs par MALDI-TOF-TOF et ESI-LTQ-Orbitrap® a-t-elle été entreprise, ces instruments possédant tous deux une très bonne précision en masse. Des processus de CID (Dissociation Induite par Collision) respectivement de haute et basse énergie sont utilisés. Si la méthode développée sur le MALDI-TOF-TOF génère tous les fragments A, B, C, X, Y, Z, permettant de caractériser le type d'AAG en présence, elle n'est en revanche pas adaptée à l'étude de mélanges complexes, à l'instar du FAB-MS, dans la mesure où elle ne saurait distinguer les fragments issus d'acétogénines de même *m/z*.

Au contraire le second instrument possède une source Electrospray (ESI) qui peut bénéficier d'un couplage avec la chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou encore avec l'UHPLC ou la SFC[4], apportant par là même une dimension supplémentaire de séparation (Le Ven *et al.*, 2012). En introduction directe, le mode négatif apporte un très faible rapport signal/bruit pour les AAGs (Allegrand

[3]Les sources FAB couplées aux analyseurs électrostatique et magnétique n'étant plus que très rarement employées.

[4] UHPLC : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Pression ; SFC : Chromatographie en Fluide Supercritique.

et al., 2010) ce qui explique qu'il ait été abandonné au profit du mode positif. L'Orbitrap® confère aux résultats une précision en masse inférieure à 2 ppm, permettant de générer des formules brutes sans ambiguïté ce qui en fait un analyseur de choix pour mener une étude de déréplication sur des mélanges complexes.

- *Fragmentation par (+)-ESI-LTQ-Orbitrap®*

La méthode a été optimisée avec le Lithium employé en infusion post-colonne, et une énergie de collision de 50 eV.

Les fragments obtenus, bien que moins nombreux qu'en FAB-MS/MS, permettent néanmoins de déterminer le type d'AAG et de positionner le ou les THF ainsi que les fonctions hydroxyles situées entre les THF et la lactone, y compris les fonctions adjacentes aux THF. Ils sont illustrés par des exemples (**Figure 14**).

Le sous-type 1 étant le plus fréquent, seul celui-ci a été exploré. Le sous-type 1a donne un fragment X_4 majoritaire, tandis que pour le sous-type 1b l'ion correspondant à la perte de lactone est moins marquée mais peut tout de même atteindre une intensité relative de 70 %, comme dans le cas de la squamocine (**Figure 15**).

- *FAB-MS/MS vs ESI-LTQ-Orbitrap® : comparaison des fragments*

Concernant la caractérisation du type d'AAG, seuls les fragments B voire Y persistent avec une intensité significative en ESI-LTQ-Orbitrap®, les fragments A et C ont disparu (**Figure 15**).

Certaines différences sont à noter concernant les AAGs de type C, bien que ce ne soient pas les mêmes qui aient été utilisées comme modèles dans l'une et l'autre méthode. Les fragments B1 et B2 attendus sont absents du spectre de la gigantécine en ESI-MS/MS. En outre, le fragment Y1 est présent tandis qu'en FAB-MS/MS on retrouve Y2.

Des pertes conjointes d'H_2O, H_2 ou CO_2 sont par ailleurs observées à partir des différents fragments, complexifiant les spectres, contrairement à ce qui se produit en FAB-MS/MS.

La récente méthode développée au laboratoire, si elle produit de façon moins systématique que la FAB-MS/MS en son temps les fragments utiles au placement des fonctions oxygénées sur la chaîne carbonée, apporte en revanche une dimension séparative par le couplage chromatographique permettant de distinguer les isomères entre eux. Elle permet ainsi de travailler sur des acétogénines en mélange, et non plus uniquement sur des molécules isolées.

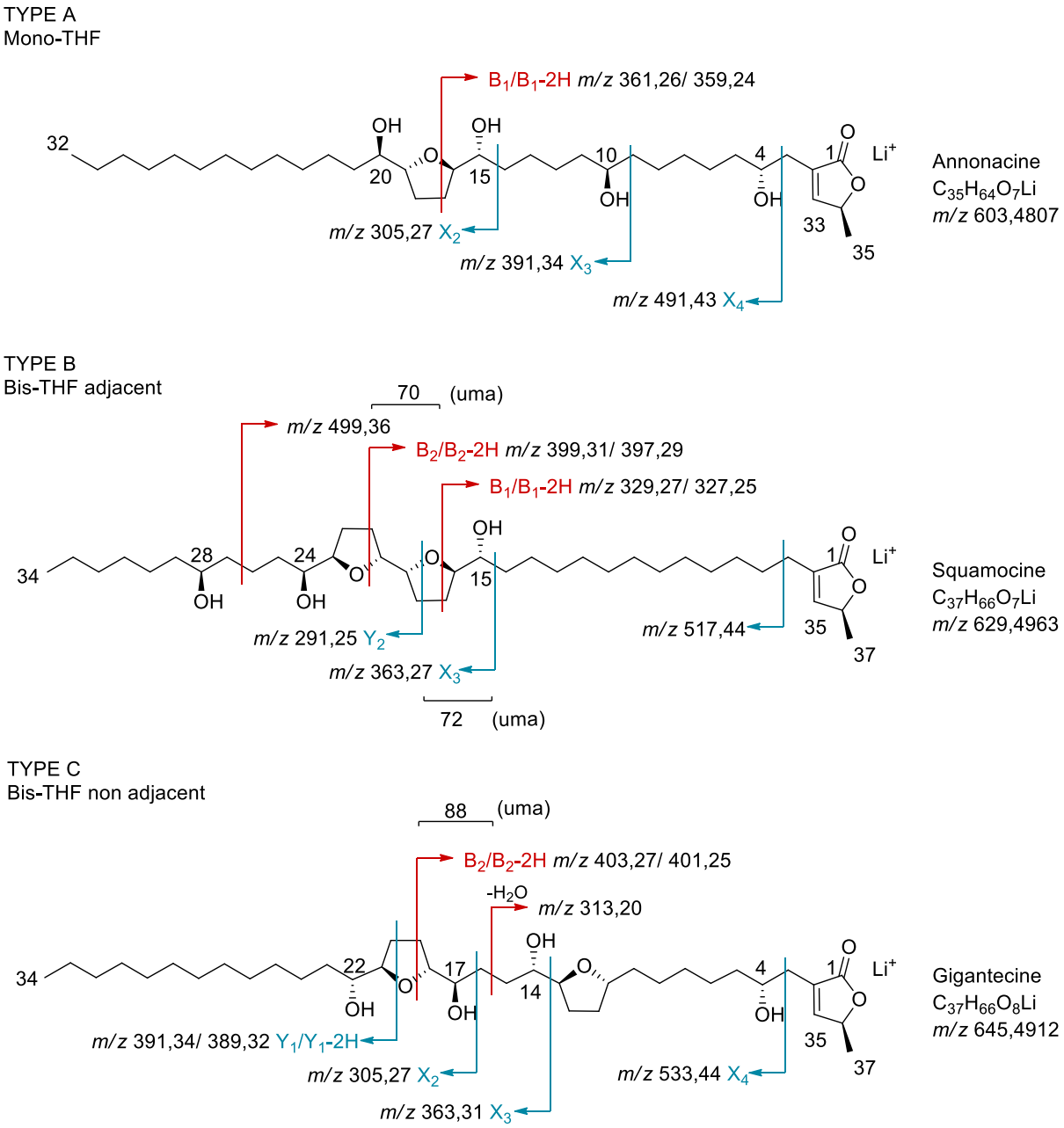


Figure 14 : Fragments obtenus par ESI-LTQ-Orbitrap® en mode MS/MS avec infusion d'iodure de lithium (Le Ven *et al.*, 2012).

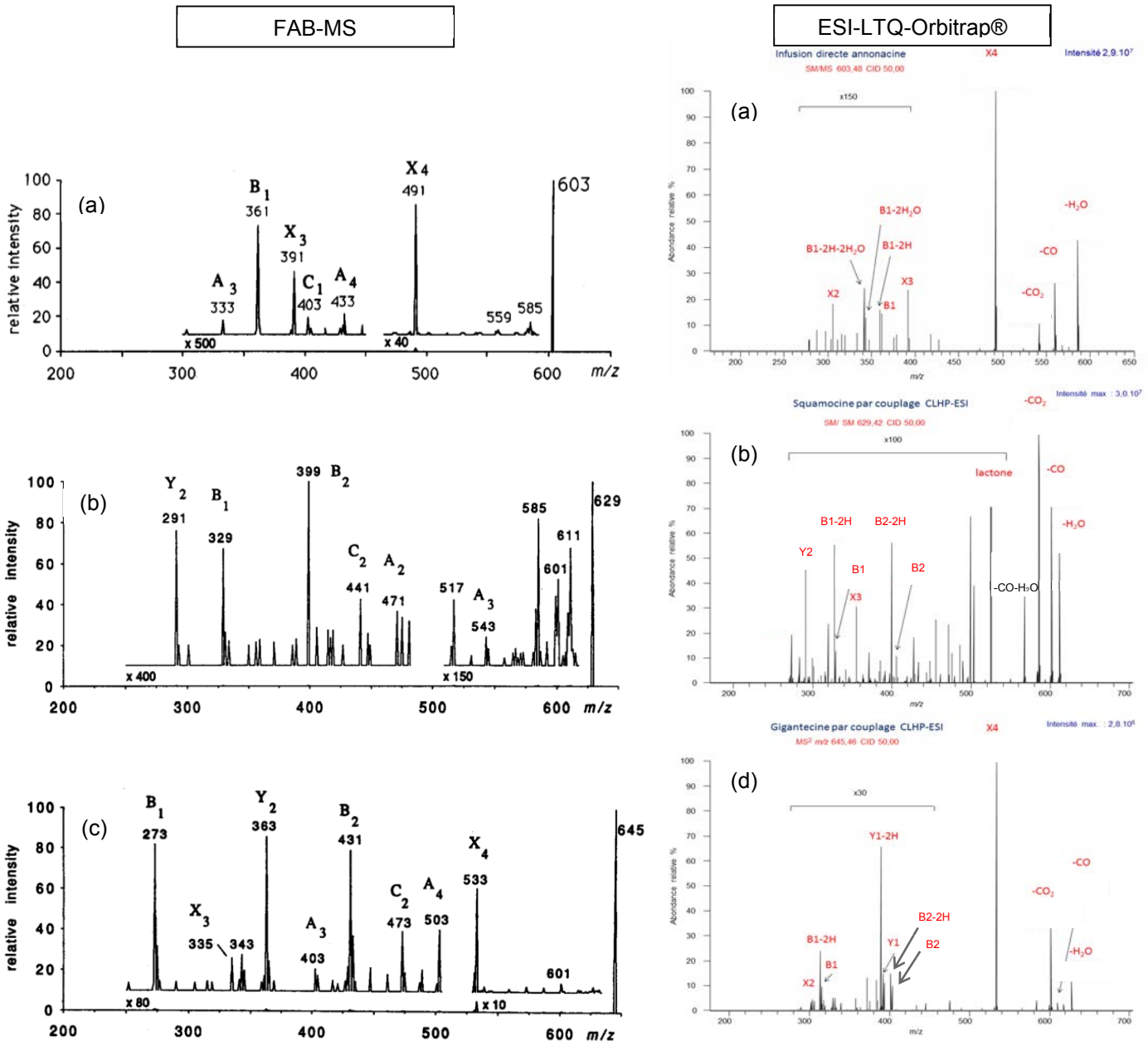


Figure 15 : Comparaison des spectres MS/MS d'acétogénines de type A (a) annonacine, B (b) squamocine, et C (c) sylvaticine et (d) gigantécine obtenus en présence de Lithium par FAB-MS et ESI-LTQ-Orbitrap® (EC = 50 eV). Reproductions (Laprévote et Das, 1994; Le Ven, 2012).

2.3.1.2. Déreplication d'extraits bruts du genre *Annona*

Les extraits bruts d'annones renferment un nombre très important d'AAGs différentes et il serait impossible d'en fournir une liste exhaustive consécutive à leur isolement. Seules les acétogénines majoritaires, ou découvertes à l'occasion de fractionnements bioguidés sont généralement rapportées.

On entend par déréplication, la détermination de la composition d'un extrait, n'employant pas ou peu d'étape de purification préalable et donc sans en isoler les constituants. L'établissement de profils LC-

UV d'extraits bruts issus du genre *Annona* permet de signaler la présence de certaines molécules en dopant l'extrait à l'aide de témoins auparavant isolés (Gromek *et al.*, 1994; Le Ven, 2012)

Plusieurs études effectuées sur des molécules connues en mélange ont permis d'établir quelques règles concernant l'élution des AAGs en phase inverse (Gromek *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1997b). Elles sont résumées par Gu *et al.* comme suit :

- à longueur de chaîne identique, les molécules possédant plus d'hydroxyles sont plus polaires et sont éluées plus rapidement ;

- à longueur de chaîne et nombre d'hydroxyles identiques, la séparation est conditionnée par les groupements THF et l'ordre d'élution est le suivant : bis-THF adjacent (type B) > bis-THF non adjacent (type C) > mono THF (type A) ;

- si tous les groupements fonctionnels sont identiques, les AAGs en C_{35} sont plus polaires que les AAGs en C_{37} et leur élution est plus rapide ;

- le déplacement d'un hydroxyle en position 4 à une autre position sur la chaîne augmente la polarité, ce qui s'explique par la liaison hydrogène formée entre l'hydrogène du OH en C-4 et le carbonyle de la lactone. Une AAG de sous-type 1b sera donc plus retenue qu'un analogue de sous-type 1a.

La méthode d'analyse d'extraits par CLHP-UV présente cependant plusieurs inconvénients. Seules les acétogénines de sous-type 1 possèdent un groupement chromophore, la lactone α,β-insaturée. Les autres sous-types sont donc indétectables et même s'ils sont peu rencontrés, il convient de garder à l'esprit que ce mode de détection introduit un biais, et ne peut se targuer d'être exhaustif. En outre, le maximum d'absorption se situe à 210 nm, ce qui confère un manque de spécificité à cette méthode, un grand nombre de composés pouvant également absorber à cette longueur d'onde.

L'analyse du chromatogramme obtenu par LC-UV permet certes d'avoir une idée de la composition du mélange en comparant les temps de rétentions des pics d'intérêts à ceux des témoins employés, mais ces informations se limitent à la polarité des molécules en présence.

Présence d'acétogénines en mélanges complexes

Il apparaît donc difficile de déterminer les pics chromatographiques correspondant à des acétogénines potentielles au sein d'échantillons d'une grande complexité. L'apport des analyses couplées à la spectrométrie de masse devient alors crucial pour confirmer la présence d'acétogénines.

Pour ce faire, Gu *et al.* se fondent dans un premier temps sur la présence d'ions adduits caractéristiques $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ en présence d'acétate d'ammonium dans la phase mobile en LC/(+)-ESI-MS sur molécules pures, l'ion $[M+Na]^+$ étant le plus intense (Gu *et al.*, 1997b). Toujours sur molécules

pures, ils procèdent ensuite à des analyses LC/(+)-ESI-CID-MS, employant une énergie de collision de 20 eV, où 3 à 5 pertes d'eau sont observées à partir de $[M+H]^+$, enrichissant ainsi le panel d'ions caractéristiques. L'analyseur utilisé est un triple quadrupôle, la précision sur la mesure de masse n'est donc pas suffisante pour générer une formule brute fiable.

Partant de ces constatations, la démarche de Gu *et al.* sur des extraits bruts est la suivante : après avoir calculé les poids moléculaires attendus de différentes structures d'acétogénines (**Figure 16**), les valeurs de *m/z* correspondant aux ions $[M+Na]^+$ sont extraites du TIC (*Total Ion Chromatogram*). Chaque *m/z* sélectionné est donc représenté en fonction du temps sur un SIC (*Selected Ion Chromatogram*). Sur ces SIC, les spectres extraits de chaque pic chromatographique sont étudiés, et s'ils contiennent les schémas d'ions cités précédemment, ils sont reconnus comme résultant de la présence d'acétogénines. Pour vérification, les SIC issus des $[M+H]^+$ et pertes d'eau sont également comparés avec ceux qui sont issus de $[M+Na]^+$. Seuls les pics apparaissant à des temps de rétention identiques sur chacun des SIC issu du massif d'ions attendu sont attribués aux acétogénines. Leur méthode, bien que multipliant le nombre de SIC et donc de données à recouper, remplit néanmoins l'objectif fixé de repérer les AAGs au sein d'un extrait brut. Ceci est mû le plus souvent par une volonté de sélectionner des sources potentielles d'AAGs ou dans le but d'isoler des molécules de structures inédites avec en tête l'exploration de la diversité chimique végétale, ou bien responsables de l'activité d'un extrait (Gu *et al.*, 1997a), connues ou non. Ainsi, outre la possibilité d'utiliser des témoins dans le but de rapporter la présence d'AAGs connues, cette méthode permet de répondre plus généralement à la question de la présence d'AAGs dans un échantillon donné.

Table 2. Expected Molecular Weights of Different Structural Types of Annonaceous Acetogenins

	bis-THF (or THP)[a]					mono-THF (or THP)[b]			
	C_{37}		C_{35}			C_{37}		C_{35}	
no. of OH groups[c]	w/o[d]	w/[e]	w/o[d]	w/[e]	no. of OH groups[c]	w/o[d]	w/[e]	w/o[d]	w/[e]
5	654	652	626	624	6	656	654	628	626
4	638	636	610	608	5	640	638	612	610
3	622	620	594	592	4	624	622	596	594
2	606	604	578	576	3	608	606	580	578
					2	592	590	564	562

[a] Bis-tetrahydrofuran ring (THF) or tetrohydropyran ring (THP). [b] Mono-tetrahydrofuran ring (THF) or tetrahydropyran ring (THP). [c] Number of hydroxyl groups present in the molecule. [d] Possession of no double bonds. [e] Possession of one double bond.

Figure 16 : Liste des masses d'acétogénines attendues. Reproduction (Gu *et al.*, 1997b).

Structures d'acétogénines en mélange complexe

Lorsque que l'objectif n'est plus seulement d'attester de la présence d'AAGs, mais d'avoir une idée plus complète de la composition en AAGs totales, issues de diverses sources, il devient intéressant d'obtenir des informations structurales concernant les groupements essentiellement impliqués dans la Relation Structure Activité (RSA) (voir section 2.4) sans avoir besoin de les isoler.

Toute la difficulté consiste ensuite à pouvoir donner des éléments de structures partiels de manière à déterminer le type et le sous-type des acétogénines en présence, sans que cela ne nécessite leur isolement. Dans l'étude de Gu *et al.*(1997b) les informations structurales obtenues se résument à la perte de 112 uma à partir de l'ion $[M+Na]^+$ des AAGs de sous type 1b en LC-MS/MS.

L'utilisation de LC/(+)-ESI-LTQ-Orbitrap® en combinaison avec de l'iodure de lithium (LiI) en infusion post-colonne, mentionnée précédemment, apparait alors d'autant plus intéressante à la lumière de ces résultats. Cette méthode a été appliquée à l'étude de divers produits alimentaires à base de corossol ou de chérimole. Environ 200 acétogénines ont été détectées dans le nectar de corossol étudié (Le Ven *et al.*, 2012), et 80 dans l'alcool de chérimole (Le Ven *et al.*, 2014).

L'avantage de cette méthode réside dans la complexation des AAGs avec des ions Li^+ de façon plus spécifique que les autres constituants de l'extrait. Il en résulte une augmentation du signal des AAGs, avec des ions $[M+Li]^+$, et de façon concomitante, la disparition des ions $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ ce qui change considérablement l'aspect du chromatogramme ionique total. Il devient alors quasiment superposable au chromatogramme obtenu par détection UV 210 nm (**Figure 17**).

L'analyse des données obtenues de cette façon consiste en plusieurs étapes. A l'instar de Gu *et al.* mais de façon plus exhaustive, une liste de formules brutes a été établie, correspondant aux AAGs existant potentiellement sur la base de l'homogénéité structurale de cette classe. Cette liste est générée en partant des formules les plus simples en C_{35} et C_{37} du sous-type 1, desquelles des décréments de 2 uma sont soustraits et auxquelles est ajouté un nombre n d'atomes d'oxygène pour donner des formules de type $C_{35}H_{66-2x}O_{2+n}$ et $C_{37}H_{70-2x}O_{2+n}$. Les valeurs de *m/z* théoriques de $[M+Li]^+$ ont été calculées et recherchés dans le TIC. Puis chaque ion d'intérêt retrouvé dans le TIC a fait l'objet d'une fragmentation par CID.

Comme cela est décrit dans la partie 2.3.1.1, la question de la détermination des structures a nécessité de mettre au point la méthode sur les acétogénines pures, en étudiant leur mode de fragmentation avec le nouvel appareillage employé. La LC-MS a permis de repérer les AAG sur la base des formules brutes incluant du Lithium. Puis en LC-MS/MS, les ions reconnus comme correspondant à des AAGs ont été fragmentés par CID, donnant accès à des éléments de structure.

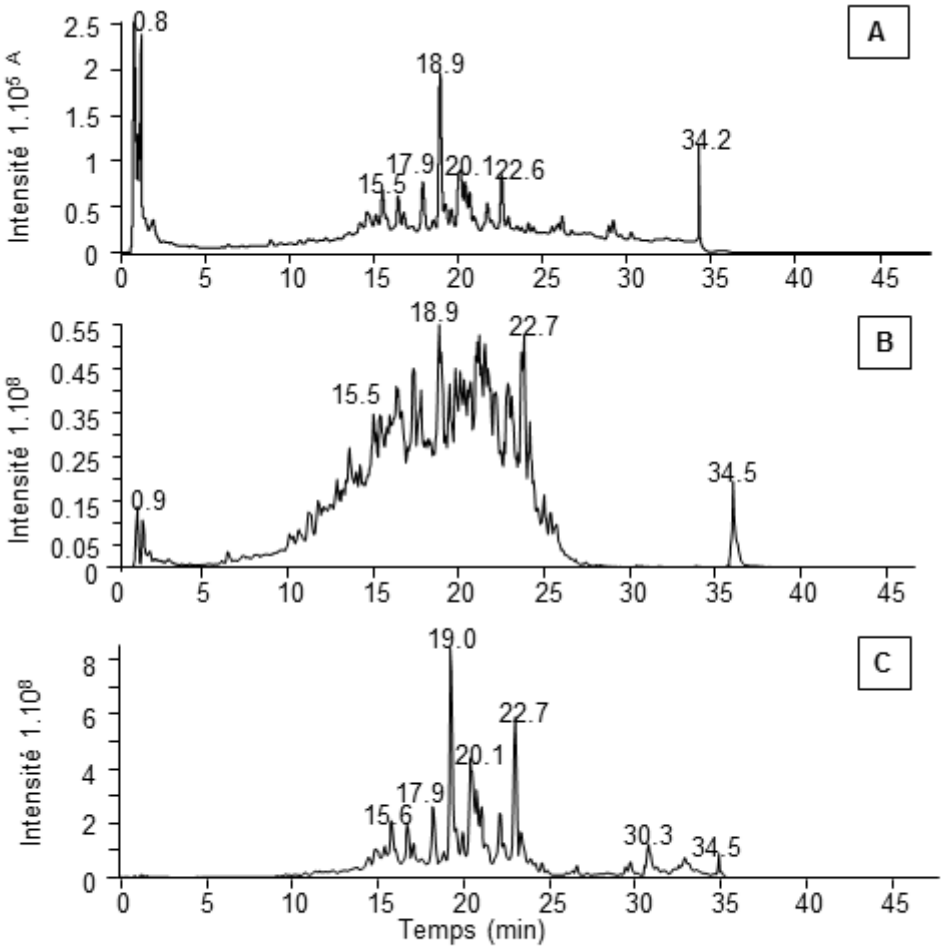


Figure 17 : Chromatogrammes de l'extrait de nectar d'*A. muricata* : (A) UV, λ = 210 nm (B) Chromatogramme ionique total (C) Chromatogramme ionique total avec infusion au lithium post-colonne (Le Ven, 2012).

Cette méthode a permis de mettre en évidence quantité d'acétogénines différentes dans un même extrait issu de produits alimentaires (Le Ven *et al.*, 2014, 2012), parfois de structure inédite. Leur nombre est nettement supérieur à celui attendu au vu d'études antérieures (Champy *et al.*, 2009). Cela tient à sa sensibilité (LOD 2.10^{-10} M), donnant accès à des composés minoritaires, présents en trop faible quantité pour être détectés habituellement par LC-UV (LOD 5.10^{-7} M) (Le Ven, 2012).

2.3.2. Études quantitatives sur les acétogénines

Quelques études quantitatives ont été entreprises, avec deux objectifs divergents. Le premier est d'assurer la qualité de matières premières telles que les graines ou les branches en vue d'une exploitation comme source renouvelable d'acétogénines (Yang *et al.*, 2009a) ; l'autre est de nature exploratoire, avec une évaluation de la quantité d'acétogénines ingérée par consommation alimentaire, dans une problématique d'étude toxicologique (Le Ven, 2012).

2.3.2.1. LC-UV

Dans le cadre de notre problématique, la quantification des AAGs est un élément important. La première tentative de quantification « en ligne » d'AAGs a été entreprise en 1994 par Gromek *et al.* au laboratoire où j'ai réalisé mon doctorat, sur un extrait de graines d'*A. muricata* (**Figure 18**).

Dans ce travail, la longueur d'onde utilisée pour la détection est λ = 210 nm, la limite de détection (LOD) est de $4{,}2.10^{-6}$ M. L'annonacine est utilisée comme standard pour réaliser un étalonnage externe. Une gamme d'annonacine a été préparée de $0{,}125\text{-}2{,}5.10^{-1}$ mg/mL. La teneur en annonacine des graines a été évaluée à environ 1 % avec cette méthode.

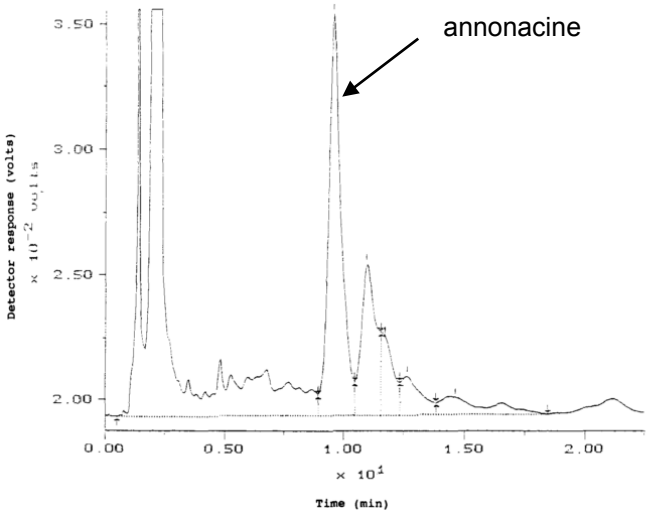


Figure 18 : Chromatogramme UV d'extrait de graines d'*A. muricata*. Reproduction de (Gromek et al., 1994). La séparation a été effectuée sur une colonne Waters µBondapak® C_{18}, (300 x 3,9 mm, taille des particules : 10 µm) avec une élution isocratique (acétonitrile / eau 70 : 30 (v/v) ; à un débit de 1,5 mL.min^{-1} ; le volume d'injection est de 10 µL).

Dans l'optique d'apporter des informations plus fiables sur la quantité globale d'AAGs présentes dans des extraits de graines, Yang *et al.* ont fait le choix de doser huit acétogénines bis-THF, considérées comme majoritaires dans un extrait de graines d'*A. squamosa* (**Figure 19**). La méthode a ensuite été appliquée à des échantillons issus de cinq espèces d'*Annona.*

Ils obtiennent ainsi une meilleure séparation que Gromek *et al.* sur un extrait brut assez semblable (**Figure 19**). On note dans cette étude l'intérêt d'utiliser un témoin pour chaque acétogénine à doser dans la mesure où les droites d'étalonnage ont des pentes étonnamment différentes pour des molécules à groupement chromophore identique, et dont certaines sont diastéréoisomères. Aucun commentaire n'est formulé à ce propos. Les quantités totales d'acétogénines dosées dans les graines des espèces *A. squamosa*, *glabra*, *muricata*, *reticulata* et *bullata* vont de 1,7 à 2,3 mg/g. Avec 0,3 à 0,6 mg/g, la bullatacine est l'AAG présente en plus grande quantité. On remarque cependant qu'aucune AAG mono-THF n'a été dosée. Les AAGs quantifiées permettent d'estimer la quantité totale dans l'extrait de d'*A.*

squamosa dans la mesure où les acétogénines dosées sont majoritaires (Figure 19). En revanche les chromatogrammes des autres extraits bruts ne sont pas disponibles. En particulier, pour *A. muricata*, on s'attend à ce que l'annonacine soit l'acétogénine majoritaire comme pour les études précédentes où la teneur annoncée dans les graines variait d'environ 2 à 10 mg/g (Gromek *et al.*, 1994; Le Ven, 2012). Si l'on ne peut pas exclure une surestimation liée à de potentielles co-élutions dans l'analyse de Gromek *et al.*, il apparaîtrait tout à fait étonnant que l'annonacine ne contribue pas fortement au *pool* d'AAG de l'extrait. Or elle n'est pas dosée dans l'étude de Yang *et al.*, car cette étude est focalisée sur les AAGs bis-THF ; on ne peut donc dans ce cas pas extrapoler la quantité totale des AAGs dosées au contenu global des graines en acétogénines, au moins pour cette espèce.

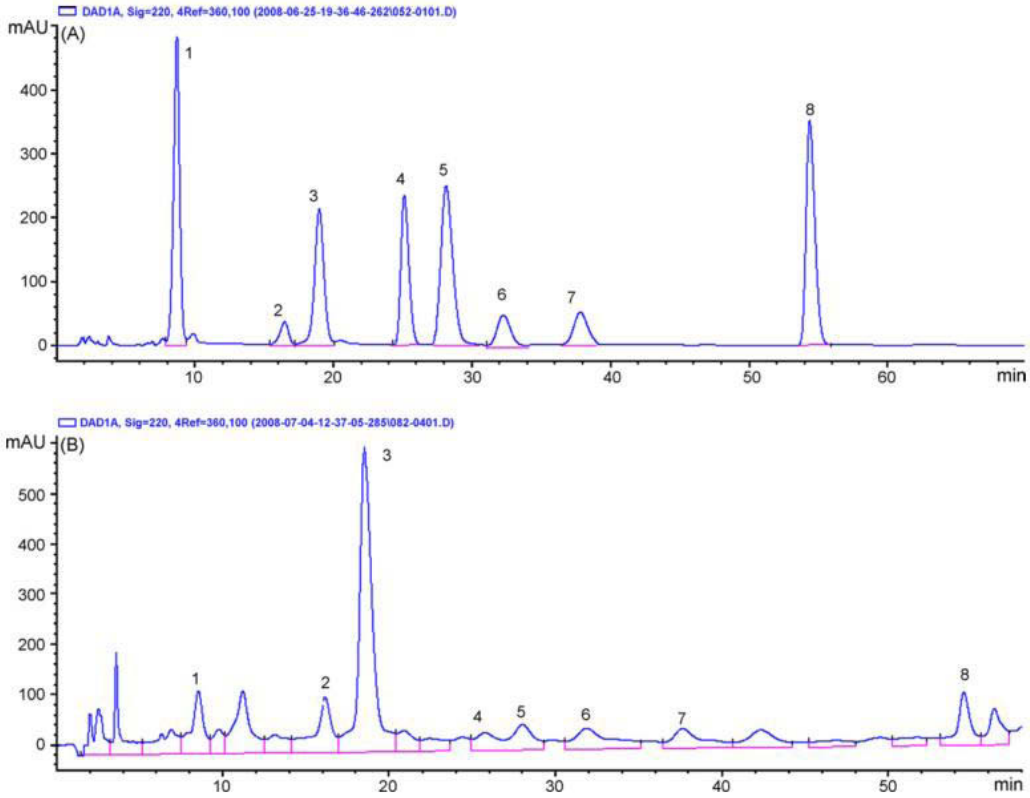


Fig. 2. Reprehensive HPLC chromatograms of reference compounds (A) and SFE extract of *A. squamosa* seeds (B). Peak identification: (1) 12,15-cis-squamostatin-A; (2) squamostatin-A; (3) bullatacin; (4) squamostatin-D; (5) squamocin; (6) isodesacetyluvaricin; (7) asiminecin; (8) desacetyluvaricin.

Figure 19 : Chromatogrammes des 8 acétogénines dosées et d'un extrait de graines *d'A. squamosa.* Reproduction (Yang *et al.*, 2009a). La séparation a été effectuée sur colonne C_{18} Agilent Zorbax Extend® (250 mm × 4,6 mm, taille des particules 5 µm) avec un débit de 1 mL.min^{-1}. La phase mobile est constituée d'eau/méthanol (15 : 85) pendant 40 min puis consiste en un gradient pour atteindre (5 : 95) en 20 min.

La très grande quantité d'AAGs de structures proches présentes dans un échantillon conduit à des co-élutions qu'il est difficile de contourner parfaitement. Ce problème a été rencontré au laboratoire lors de l'analyse de fruits d'*Annona muricata* (Champy *et al.*, 2005).

L'augmentation du pouvoir résolutif des colonnes, de même que l'optimisation de la phase mobile ont cependant permis de fortement améliorer la résolution des pics chromatographiques dans des études ultérieures menées sur des fruits, des produits dérivés, ou encore sur des compléments alimentaires (Le Ven, 2012) (**Figure 20**). L'annonacine présente dans les extraits a été dosée par étalonnage externe. L'étendue de la gamme réalisée est $8{,}4.10^{-4}$ à $1{,}6.10^{-5}$ M. Sur la base de ces résultats, une estimation de la quantité totale en AAG est proposée par les auteurs. A titre d'exemple, les nectars renferment environ 10 mg/mL d'annonacine (**Tableau 2**) et par extrapolation environ 10 fois plus d'acétogénines totales (**Tableau 3**). Ces données ont été obtenues par extrapolation de l'intégration UV de l'ensemble des AAGs, en employant la gamme d'étalonnage obtenue pour l'annonacine. Ces valeurs ne sont donc qu'indicatives.

Tableau 2 : Étude de la teneur en annonacine de divers produits alimentaires à base de corossol. (Le Ven, 2012).

Produit	Teneur en annonacine
Purée de fruits brésilienne	0,2 mg/kg
Jus de fruit brésilien	16,9 mg/L
Nectar brésilien	16,2 mg/L
Nectar guyanais	1,4 mg/L
Jus de fruit péruvien	5,5 mg/L
Pulpe de fruit vietnamien	0,5 mg/kg
Pulpe de fruits malgaches	1 mg/kg
Gélules Raintree® (feuilles, poudre)	2,1 g/kg
Gélules Nutrivastevia®	2,1 g/kg
Poudre Nutrivastevia®	4,6 g/kg
Gélules Maximize® (feuilles, poudre)	≤ 0,4 g/kg
Teinture mère de feuilles	≤ 6,7 mg/L
Bonbons	37,2 mg/kg
Confiture	131,7 mg/kg

Tableau 3 : Estimation de la teneur en acétogénines totales de produits à base de corossol. (Le Ven, 2012).

Produit	Teneur estimée en acétogénines totales
Nectars	30-120 mg/L
Pulpe de fruits	180-250 mg/kg
Compléments alimentaires à base de feuille	17-40 g/kg
Bonbons	250 mg/kg
Confiture	880 mg/kg

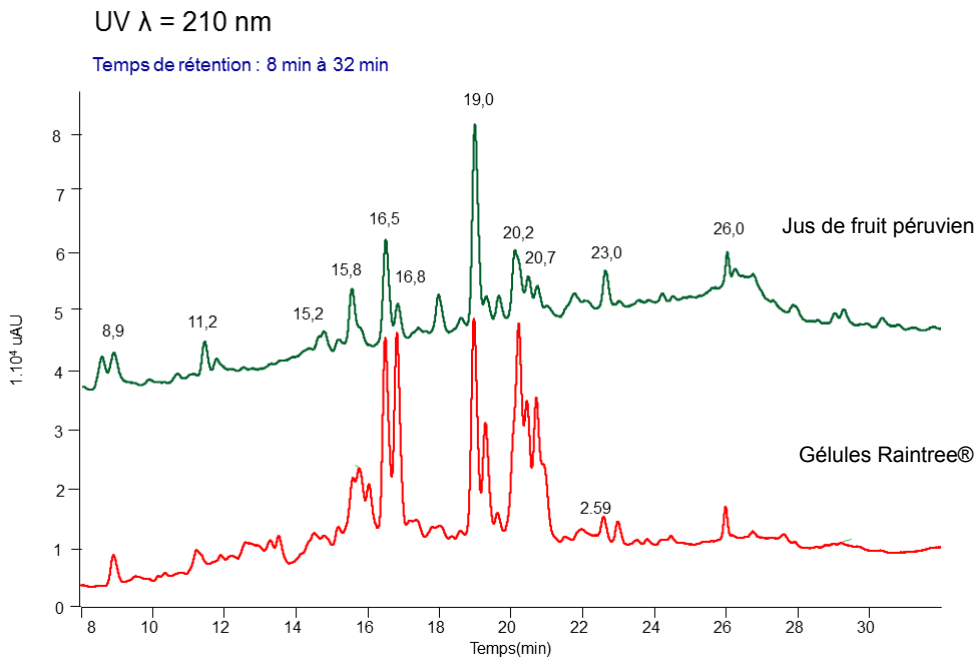


Figure 20 : Chromatogrammes obtenus à partir d'extraits de produits et compléments alimentaires Reproduction de (Le Ven, 2012). La séparation est effectuée sur une colonne Waters Sunfire® C_{18} (100×2,1 mm, taille des particules : 3,5 µm). La longueur d'onde λ a été fixée à 210 nm. L'élution a été réalisée avec une phase mobile constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), avec le gradient A / B suivant : 35 : 65 à 30 : 70 en 5 min, suivi d'un plateau de 15 min puis une augmentation à 100 % de B en 10 min qui se termine par un plateau de 5 min. Le débit est de 0,3 mL.min^{-1}. Le volume d'injection est de 10 µL. La LOD est de 5.10^{-7} M.

2.3.2.2. MS/LC-MS

Dans le but de contourner le problème du manque de spécificité soulevé par la LC-UV, et en vue d'utiliser une méthode de détection plus sensible, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a également été utilisée pour le dosage d'acétogénines.

La première estimation de la quantité d'annonacine et d'acétogénines de même masse [596 Da, $C_{35}H_{64}O_7$] dans des produits de consommation humaine, à savoir des tisanes de feuilles d'*Annona muricata*, et de la pulpe de corossol, avait été obtenue en MALDI-TOF avec l'utilisation d'une autre acétogénine mono-THF, la solamine marquée ^{18}O, comme étalon interne (Champy *et al.*, 2005). Cette méthode de quantification est peu précise, mais fournit tout de même l'ordre de grandeur (environ 20 mg/kg) de la teneur de la pulpe en annonacine. On peut cependant noter que la teneur obtenue est 10 fois supérieure aux résultats plus récents de Le Ven *et al.* L'étude ayant été réalisée sur un seul fruit, il est difficile de déterminer si la méthode doit être incriminée ou si ces résultats sont imputables à une variation liée à la provenance géographique (Sénégal) ou encore à la période de récolte.

Une étude de la variation saisonnière du contenu en AAGs des branches d'*Asimina triloba*, a été entreprise par Gu *et al.* (Gu *et al.*, 1999) dans une optique d'optimisation de l'exploitation des ressources

végétales. Une méthode par ajouts dosés de trois AAGs (bullatacine, asimicine et trilobacine) a été utilisée dans le but de palier à toute éventuelle interférence de la matrice ou variation instrumentale. De façon intéressante, un changement saisonnier a effectivement été mis en évidence, se traduisant par un pic au niveau des AAGs dosées, au mois de Mai.

Un dosage gravimétrique de l'annonacine, c'est-à-dire par pesée de la masse obtenue après purification, a par ailleurs été réalisé dans la pulpe du fruit d'*Asimina triloba* avec un résultat de 0,0701 ± 0,0305 mg/g (Potts *et al.*, 2012).

Dans des articles récents, la FDA propose également le dosage d'acétogénines individuelles (annonacine, squamocine) dans des fruits d'*Asimina triloba* (Levine *et al.*, 2015), d'*Annona atemoya*, *A. mucosa*, *A. muricata*, *A. squamosa*, ainsi que dans des compléments alimentaires à base de feuilles d'*Annona muricata* (Höllerhage *et al.*, 2015). Un spectromètre avec analyseur Orbitrap® est utilisé en modes positif et négatif : l'intensité des ions $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+HCOO]^-$ est additionnée. Un étalonnage externe est effectué grâce aux étalons fournis par notre laboratoire. Aucun détail n'est cependant donné en termes de validation analytique. Les résultats sont donnés sous forme de teneur dans les extraits bruts ou dans le matériel végétal desséché. Aucune indication n'est cependant fournie concernant la teneur par fruit ou dans la pulpe fraîche.

2.3.2.3. Conclusion

Les méthodes de quantification développées à ce jour, que ce soit par détection UV ou MS ont ceci en commun qu'elles nécessitent la réalisation d'une gamme à partir de chaque molécule que l'on souhaite doser. En effets, la réponse diffère d'une acétogénine à l'autre, en MS où le pourcentage d'ionisation n'est pas identique entre deux structures, mais également en UV où l'on s'attendrait pourtant à des obtenir des droites de calibration aux pentes parallèles, pour des chromophores identiques. Ainsi, si les résultats LC-UV ont tout de même donné lieu à des extrapolations sur la quantité totale d'AAGs à partir du dosage d'une seule molécule, il ne s'agissait là que d'une première approche, qui a néanmoins le mérite de donner l'ordre de grandeur des teneurs de différents produits (Le Ven, 2012). Les AAGs, présentant toutes un risque toxique, semblent devoir être dosées dans leur ensemble. À ce stade, une méthode reste à mettre en place. C'est ce que nous nous sommes attelés à développer, par une approche de RMN quantitative présentée dans le chapitre 3 (**article 4**). Au cours de la rédaction de cet article, une méthode similaire a été développée par une équipe brésilienne, et appliquée à des feuilles d'*A. muricata* (Teixeira Machado *et al.*, 2014). Cet article sera présenté dans la partie correspondante.

2.4. Mécanisme d'action et activités pharmacologiques

2.4.1. Inhibition du complexe I mitochondrial

La première hypothèse concernant le mécanisme d'action des acétogénines a été émise (Londershausen *et al.*, 1991), en partant d'un constat de toxicité non spécifique à l'égard des cellules issues d'insectes et des cellules de mammifères. Le mécanisme pressenti impliquait la chaîne

respiratoire mitochondriale (**Figure 21**). La mort d'insectes traités survenait par léthargie et diminution progressive de la mobilité, comme suite à un traitement par la roténone. Les auteurs ont donc investigué la déplétion en ATP parallèlement à la mort des larves d'insectes traitées par différentes acétogénines. L'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire (NADH-ubiquinone-oxydoréductase) a été mise en évidence, expliquant la déplétion en ATP, qui conduit à la mort cellulaire par apoptose (Derbré *et al.*, 2005) ou par nécrose, en fonction de la dose. Les CI_{50} mesurées sur complexes I issus d'insectes (0,8 µM), de champignons (0,3 µM), de cellules musculaires cardiaques bovines (< 0,1 µM) confirment la non-spécificité de la toxicité observée, cette enzyme étant largement conservée dans l'évolution (Degli Esposti, 1998).

Cette hypothèse a été étayée par une autre étude (Degli Esposti *et al.*, 1994) démontrant la puissance de l'activité inhibitrice des acétogénines sur le complexe I, supérieure à celle de la roténone qui possède une forte activité. Plusieurs AAGs ont en effets été testées en présence de particules sous-mitochondriales de coeur de boeuf, avec des CI_{50} de l'ordre du nM (pour 1 nM de complexe I et la décyl-ubiquinone comme accepteur d'électrons). Certaines acétogénines semblent donc être les plus puissants inhibiteurs de NADH-ubiquinone-oxydoréductase connus.

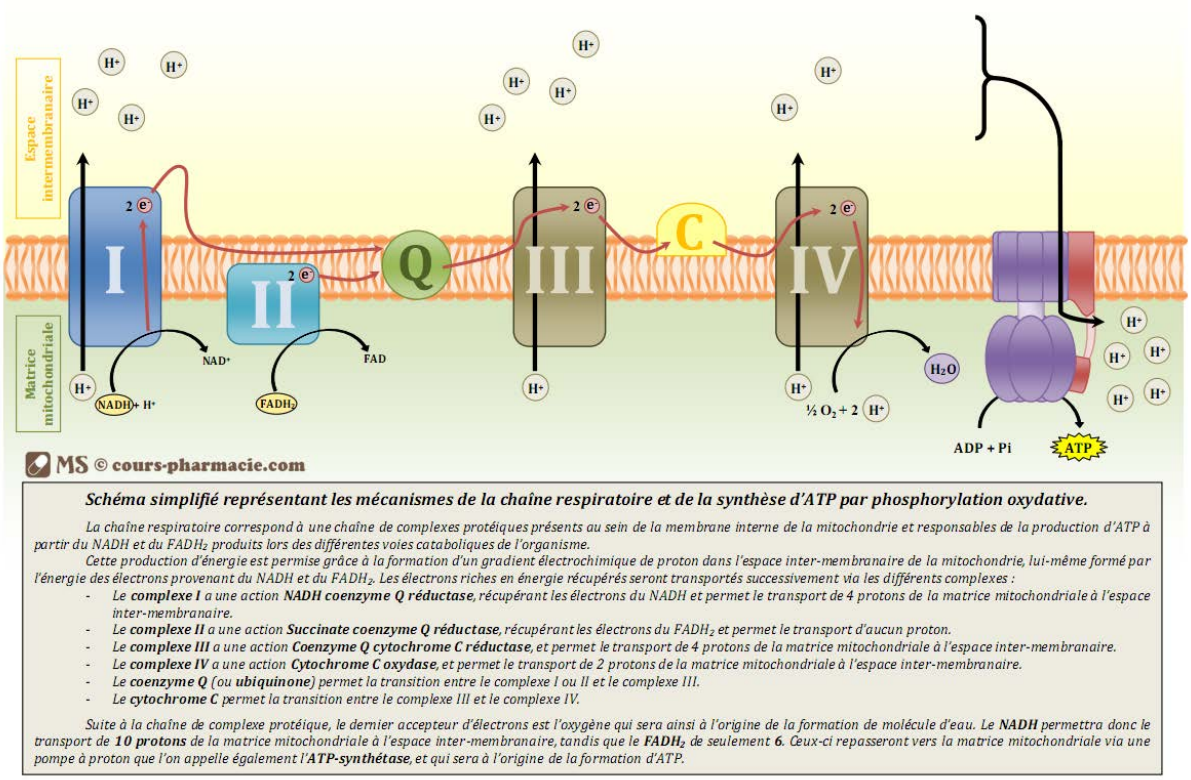


Figure 21 : Schéma simplifié de la chaîne respiratoire mitochondriale. Reproduction de Matthieu Simon[5].

[5] http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/chaine-respiratoire-et-phosphorylation-oxydative.html

2.4.2. Relations structure-activité

La grande flexibilité conférée aux acétogénines par la présence d'une longue chaîne carbonée, ainsi que les nombreux centres chiraux, rendent difficile toute prédiction concernant le pouvoir inhibiteur potentiel d'une molécule de cette classe. Bien qu'elles possèdent toutes cette propriété, de façon plus ou moins marquée, des tendances se dégagent grâce aux nombreuses études de relations structure activité publiées (Bermejo *et al.*, 2005; Duval, 2003). Divers motifs structuraux ont été comparés : le nombre de THF, leur stéréochimie, et la présence d'hydroxyles sur les carbones adjacents aux THF ; la structure de la lactone terminale ; la longueur de l'espaceur entre la lactone et le domaine polyoxygéné central ainsi que son degré de substitution (**Figure 22**).

Les acétogénines présentent une plus forte activité lorsque le domaine central comporte 2 groupements THF (types B ou C) (Landolt *et al.*, 1995). Si la stéréochimie n'a pas de répercussion sur l'activité observée sur la fraction subcellulaire, elle joue en revanche un rôle primordial dans les tests de cytotoxicité (Duval, 2003; Sinha *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009c), ce qui peut en partie expliquer l'absence de corrélation claire entre les résultats. À ce titre, les tests présentant uniquement des résultats issus d'études sur l'inhibition du complexe I ne peuvent en aucun cas présager de la toxicité d'une molécule sur des cellules tumorales.

Il est à noter que les fonctions hydroxyles du domaine central jouent également un rôle non négligeable dans la cytotoxicité des acétogénines. En effets, celle-ci chute fortement lorsqu'ils sont supprimés (Duret *et al.*, 1999). Qui plus est, leur implication dans l'adressage aux mitochondries, conjointement au système THF a été mise en évidence avec une squamocine hémisynthétique, couplée à une sonde fluorescente (Derbré *et al.*, 2005, 2008).

L'espaceur alkyle entre la lactone et le THF a pour longueur optimale 13 atomes de carbones, comme pour la majorité des acétogénines naturelles, dont les plus actives – par exemple, la bullatacine (rolliniastatine-2). Cet espaceur conditionne le positionnement de la lactone et du domaine central sur l'enzyme, et apparaît en cela comme un facteur crucial au pouvoir inhibiteur constaté lors de tests sur des fractions subcellulaires (Takada *et al.*, 2000).

Concernant la lactone, Landolt *et al.* (Landolt *et al.*, 1995) montrent que l'inhibition du complexe I par le sous-type 2 est plus marquée que par le sous-type 1. Si la suppression pure et simple du buténolide naturel entraîne une perte totale d'activité, il est substituable par un autre hétérocycle ; en témoignent les activités retrouvées avec des molécules présentant une extrêmité lactonique modifiée (Kojima and Tanaka, 2009; Kuwabara *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2000) ou remplacée par un autre pharmacophore (Duval *et al.*, 2006).

Suite aux constatations de non concordance entre les valeurs d'inhibition du complexe I et de cytotoxicité pour une même molécule (Duval, 2003), d'autres cibles potentielles ont été recherchées. Au laboratoire, des interactions covalentes ont été mises en évidence entre une squamocine hémisynthétique fluorescente et 7 protéines mitochondriales, cytosoliques et du réticulum endoplasmique, suggérant d'autres mécanismes impliqués dans la cytotoxicité des acétogénines

(Derbré *et al.*, 2008). Il a par ailleurs été montré que la cytotoxicité des AAGs pouvait être reliée à la chélation des groupements THF au calcium intra et extracellulaire, menant ainsi à la formation de complexes hydrophobes (Liaw *et al.*, 2011).

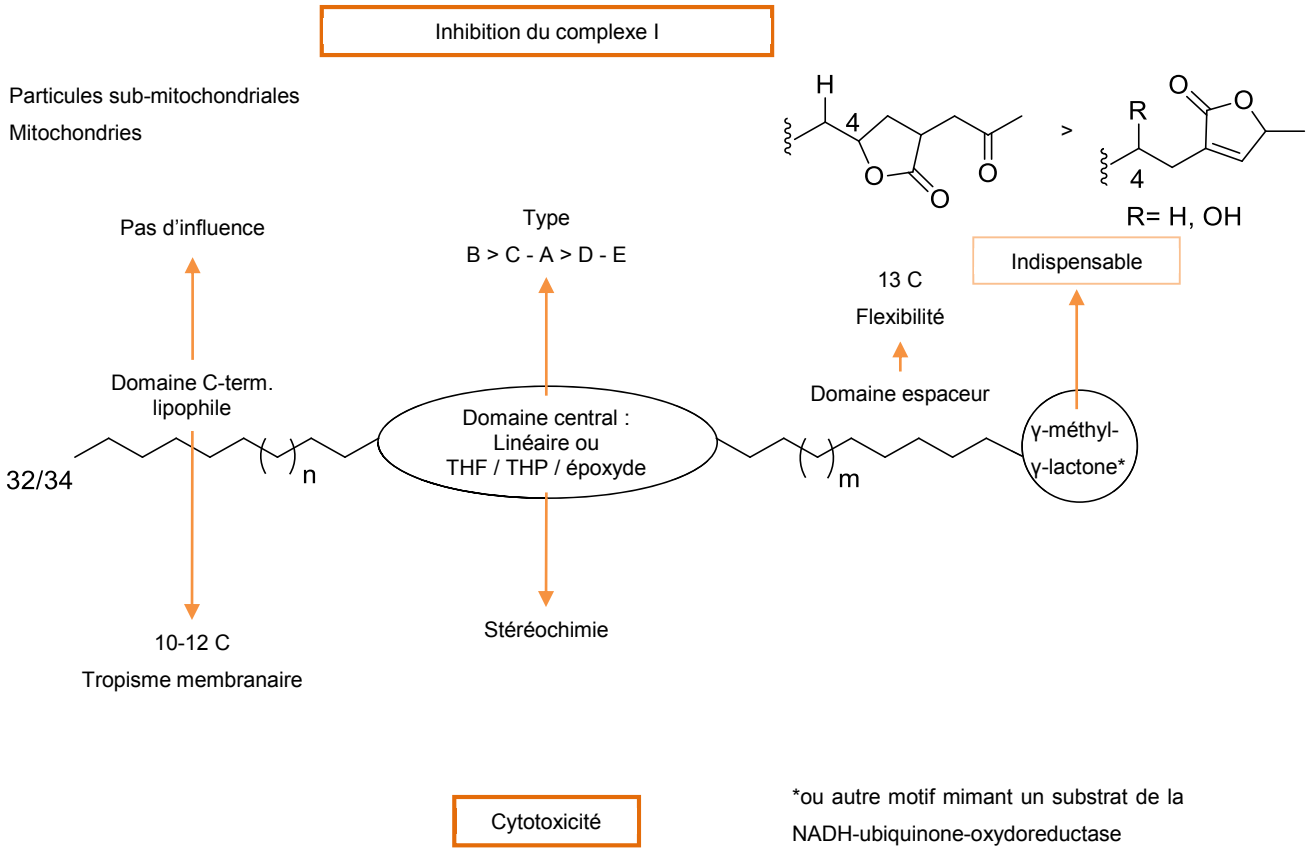


Figure 22 : Schéma général des relations structure-activité des acétogénines étudiées (Yang et al., 2009c).

2.4.3. Activités pharmacologiques et toxicité

Un large panel d'activités a été mis en évidence pour les acétogénines, molécules antiparasitaires, insecticides et acaricides, qui justifie nombre d'usages traditionnels d'Annonaceae, ainsi que de nombreux dépôts de brevets (Champy, 2011). La plus étudiée est l'activité cytotoxique et antitumorale, qui représente des enjeux importants (Mc Laughlin, 2008).

2.4.3.1. Etudes *in vitro*

De nombreux tests de cytotoxicité ont été pratiqués avec des acétogénines isolées, sur des lignées tumorales variées, montrant des activités allant du nM au µM (Yang *et al.*, 2009b). Rares sont en revanche les études (George *et al.*, 2012) comparant la toxicité sur cellules tumorales et sur cellules saines pour en tirer des conclusions quant à une éventuelle sélectivité d'action, argument majeur dans l'optique du développement d'antitumoraux. La reconnaissance d'une cible aussi peu spécifique que le complexe I mitochondrial contribue à alimenter le scepticisme quant à leur pouvoir sélectif. Cependant,

une cytotoxicité notable est mentionnée sur des cellules cancéreuses résistantes à plusieurs molécules classiquement utilisées (MDR, *multi-drug resistant*), en l'occurrence par surexpression de P-glycoprotéines, ouvrant la voie à l'investigation d'une potentielle utilisation sur les tumeurs résistantes.

2.4.3.2. Etudes *in vivo*

Dans l'optique de développement d'antitumoraux, des études ont été menées sur des modèles animaux de tumeur greffée.

- *Extraits riches en acétogénines*

Dans un modèle de souris ayant subi une transplantation de cellules de tumeur hépatique humaine, un extrait de graines d'*Annona squamosa* contenant environ 260 mg/g de bullatacine (majoritaire), et environ 50 mg/g d'une autre acétogénine, administré quotidiennement par voie orale à raison de 18 mg/kg, a provoqué une inhibition de la croissance tumorale supérieure au témoin cyclophosphamide (CTX, 30 mg/kg) (Chen *et al.*, 2012b). Ces résultats prometteurs ont conduit les auteurs à compléter cette expérience par des administrations d'acétogénines isolées par voie intrapéritonéale chez des rongeurs (Chen *et al.*, 2013). L'activité antitumorale et la toxicité de la bullatacine (type B), de l'annosquamine B (type A) et de l'annosquatine B (type C) ont été évaluées chez la Souris aux doses journalières de 25 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg en i.p pendant 10 jours (5 jours pour la bullatacine). L'injection d'une dose unique à 100 µg/kg est bien tolérée par l'ensemble des animaux pour chaque molécule. En revanche des injections répétées de bullatacine (la plus cytotoxique des trois molécules testées) ont entraîné une perte de poids dans tous les groupes et une augmentation significative des marqueurs biochimiques témoignant de lésions rénales et hépatiques aux 2 doses supérieures, soit à partir de 250 µg/kg cumulés. L'analyse histologique n'a en revanche mis en évidence aucun changement particulier au niveau de ces organes. Deux morts sont survenues au bout cinq jours avec des doses de 100 µg/kg de bullatacine, tandis que les deux autres AAGs étaient bien tolérées. C'est pourquoi l'activité antitumorale de la bullatacine a été seulement évaluée aux deux doses inférieures. Le taux d'inhibition de la croissance tumorale est d'environ 62 % après 5 jours de traitement à 25 µg/kg/j et 50 µg/kg/j. Pour l'annosquamine B et l'annosquatine B, le taux augmente de façon dose dépendante pour atteindre respectivement 54 et 59 % à 10 jours de traitement. La toxicité subchronique par voie intraveineuse de la bullatacine a par la suite été évaluée pendant 3 semaines chez le Rat aux doses de 200 et 300 µg/kg/j. Les pertes de poids observées n'étaient pas différentes du groupe contrôle. En revanche les indicateurs biochimiques témoignent à nouveau d'une néphro- et d'une hépatotoxicité. L'expression de facteurs pro-apoptotiques a été mise en évidence dans le foie et les reins (Chen *et al.*, 2013).

Ces rares résultats, rendant compte d'études d'activité et de toxicité menées en parallèle, donnent en premier lieu à penser que l'utilisation d'acétogénines en tant qu'agents antitumoraux est prometteuse dans la mesure où une activité comparable au témoin CTX est observée pour la bullatacine, à dose bien moindre, et sans mise en évidence de toxicité sur une période équivalente à celle du traitement.

La toxicité avérée suite à l'administration subchronique par voie intraveineuse met cependant en avant la nécessité d'études plus complètes pour parvenir à statuer sur un rapport bénéfice/risque.

Dans une optique de développement de pesticides issus de ressources « vertes », la génotoxicité d'un extrait de graines d'*Annona squamosa* (extrait CH_2Cl_2/MeOH 1:1 de graines délipidées à l'hexane, « contenant 57 % d'acétogénines dont l'isosquamocine ») a été investiguée au travers des tests comète et des micronoyaux et de la recherche d'aberrations chromosomiques, après administration orale chez le Rat Wistar à 75, 150 et 300 mg/kg. Des dommages doses-dépendants sur l'ADN ont pu être mis en évidence, ainsi que l'augmentation de la fréquence des micronoyaux. Une induction significative d'aberrations chromosomiques est observée aux deux doses supérieures. Par ailleurs, un stress oxydant plasmatique est mis en évidence, avec une augmentation de l'aldéhyde malonique (MDA), témoin de la peroxydation lipidique, une diminution du glutathion (GSH) et de l'activité de la glutathion-*S*-transférase (GST). La génotoxicité mise en évidence dans cette étude pourrait donc être médiée par des espèces oxygénées réactives (Grover *et al.*, 2009). Les auteurs recommandent la prudence quant à l'usage d'extraits comme pesticides, jusqu'à ce que des tests complémentaires de mutagénèse permettent d'évaluer les risques encourus.

Des études spécifiques à la neurotoxicité potentielle des AAGs ont également été réalisées. Elles sont présentées dans la partie 3.2.2.2.

- *Compléments alimentaires*

Suite à la commercialisation de compléments alimentaires affichant des « propriétés anticancéreuses », plusieurs ont été utilisés pour réaliser des études sur rongeur. Une augmentation du temps de latence d'apparition de la tumeur est observée dans un modèle de carcinogénèse mammaire induite par *N*-méthyl-*N*-nitrosourée (MNU) (Cuendet *et al.*, 2008). Celui-ci passe de 55 jours lorsque seul le MNU est administré, à 66 jours lorsque les rates se voient incorporer dans leur alimentation quotidienne 1,25 à 2,5 g/kg d'extrait d'*Asimina triloba* issu de gélules vendues par Nature's Sunshine Products aux États-Unis comme complément alimentaire, et supposé contenir 73 mg d'acétogénines/g de poudre. Il semblerait donc que l'initiation du processus tumoral ait été retardée, ou bien que la croissance tumorale ait été inhibée pendant un court laps de temps. Il est cependant à souligner que ce régime alimentaire n'a eu d'impact ni sur l'évolution ni sur le nombre de tumeurs développées par les animaux au cours de l'étude.

Une autre étude porte sur les gélules de la marque Raintree® préparées à partir de feuilles et branches d'*A. muricata,* administrées en suspension par voie orale à des souris ayant subi une xénogreffe de tumeur pancréatique. Une inhibition de respectivement de 60 et 50 % de la croissance tumorale a été observée aux doses de 50 et 100 mg/kg par rapport aux témoins (Torres *et al.*, 2012).

Ces résultats soulignent l'intérêt, potentiellement non négligeable, de l'utilisation d'extraits standardisés, proposée en complément des protocoles classiques de chimiothérapie.

2.4.3.3. Etudes cliniques

Malgré les résultats prometteurs d'études *in vitro* puis *in vivo*, aucun laboratoire pharmaceutique ne s'est vraiment emparé du projet de développement d'anticancéreux à partir d'acétogénines isolées ou en mélange. Des efforts importants de recherche ont notamment été menés aux États-Unis, dans le laboratoire du Pr. Jerry L. McLaughlin (Purdue University), spécialiste américain des acétogénines.

Devant ce manque d'engouement, McLaughlin a rejoint la société Natural Sunshine's Products® pour mettre au point des gélules d'extraits de branches d'*Asimina triloba*, qu'elle commercialise sous le nom de PawPawCell Reg™ sous le statut de complément alimentaire. D'après l'étiquette, 17 mg d'acétogénines sont apportés par prise, soit 50 mg par jour environ, si l'on se conforme aux instructions. La méthode de dosage n'est pas précisée par le fabricant.

McLaughlin *et al.* justifient la commercialisation de cet extrait en dehors du cadre pharmaceutique, par le fait que les fruits d'*Asimina triloba* sont consommés traditionnellement et devraient donc être sans danger pour l'Homme (McLaughlin, 2008). C'est oublier que la composition diffère d'une partie de plante à l'autre, et à ce stade aucune étude comparative des teneurs en acétogénines entre les branches et la pulpe de fruit n'avait été menée.

D'après le site de Nature Sunshine[6], ces compléments alimentaires ont cependant été administrés à une centaine de patients atteints de cancers en phase 4, en sus de leur traitement, mais aucun résultat de l'étude n'est disponible. McLaughlin se défend d'une quelconque revendication anticancéreuse sur ces produits (à juste titre puisqu'il est commercialisé en tant que complément alimentaire), alors même que le but assumé est l'emploi comme traitement adjuvant des chimiothérapies anticancéreuses.

Récemment a été rapporté le premier cas d'efficacité, sans effets indésirables, de la consommation de tisane à base de feuilles d'*Annona muricata* comme adjuvants de chimiothérapie, chez une patiente atteinte d'un cancer du sein. Après une tumorectomie, suivie d'une chimiothérapie, associées à de la radiothérapie, une hormonothérapie a été entreprise suite à l'apparition de métastases pulmonaires, quatre ans après le diagnostic initial. Un traitement par chimiothérapie a été amorcé à nouveau trois ans plus tard, et ce, pendant un an et demi, jusqu'à la découverte de métastases dans le foie. A partir de ce moment, la patiente prend du Xeloda®, et commence à consommer des infusions de feuilles (10-12 feuilles / 250 mL). En l'espace de sept mois, les marqueurs tumoraux chutent considérablement, les taux devenant 2 à 20 fois plus faibles selon les marqueurs. La patiente a continué à consommer les infusions pendant 5 années en parallèle du Xeloda® et son état est stable depuis ce temps, tandis que la durée moyenne de survie est de quelques mois avec le Xeloda® seul dans ces conditions. Par ailleurs, pendant un intervalle de quelques mois où la patiente a arrêté les infusions, les marqueurs des fonctions hépatiques ont augmenté, puis sont revenus à la normale suite à la reprise des infusions (Hansra *et al.*, 2014).

---

[6] http://www.naturessunshine.com/us/product/paw-paw-cell-reg-180-caps/515/. Page consultée le 07/10/2015.

Aucune étude clinique n'a donc à ce jour été menée à grande échelle sur des drogues végétales ou extraits d'*Annona* spp ou d'*Asimina* spp, ni sur des acétogénines isolées. La publication de ce cas clinique permet d'espérer voir se développer une évaluation du rapport bénéfice/risque de l'association de produits contenant des acétogénines aux protocoles de chimiothérapie, en particulier en cas de tumeurs chimiorésistantes. Le cas publié ne fait pas état d'interactions médicamenteuses ou d'effets secondaires. La notion de dose est en revanche, peu explicite.

Il est cependant préférable qu'un tel produit adjuvant, de fait médicament par fonction, corresponde à une qualité pharmaceutique et il est donc essentiel qu'il soit commercialisé en tant que médicament. La question du statut d'un tel produit se pose : celui de médicament traditionnel amélioré n'est pas revendicable en Europe ou aux États-Unis ; celui de médicament à base de plantes d'usage traditionnel est inadapté pour l'indication (Chinou, 2014). La mise sur le marché d'un médicament « classique » à base de plantes aux États-Unis (le Crofelemer®, obtenu à partir d'un latex de *Croton* sp., indiqué *p.o.* dans la diarrhée associée au VIH) montre la possibilité réglementaire d'un tel développement (Mader, 2013). Cela permettrait de contrôler la distribution, de sorte que la prise résulte exclusivement d'un accompagnement d'une maladie déclarée.

3. Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques

Les maladies neurodégénératives sont définies par la perte progressive d'une ou de plusieurs populations neuronales, associée à la formation d'agrégats protéiques pathologiques.

La maladie de Parkinson constitue la deuxième maladie neurodégénérative à l'échelle mondiale (OMS, 2006). Cette pathologie est généralement idiopathique. Ses manifestations sont essentiellement motrices. Les signes visibles les plus courants sont les tremblements de repos, une rigidité, et une akinésie se traduisant le plus souvent par une lenteur (bradykinésie) et un retard à l'initiation des mouvements. Ces signes sont accompagnés d'une altération de la posture. Dans la maladie de Parkinson, la neurodégénérescence touche essentiellement la voie nigrostriée, avec une mort des neurones dopaminergiques de la substance noire (*locus niger*, *substantia nigra*) et une disparition de leurs projections striatales. La substance noire appartient au circuit de noyaux du tronc cérébral impliqué dans le contrôle du mouvement faisant intervenir les ganglions de la base. On observe chez les malades un déficit de la transmission dopaminergique de la voie touchée. Les symptômes sont généralement atténués, au moins de façon temporaire, par l'administration de *L*-DOPA, précurseur de la dopamine traversant la barrière hémato-encéphalique. De plus, la maladie se caractérise par la présence de corps de Lewy intraneuronaux, inclusions observables dans les cellules en dégénérescence du *locus niger*, constituées d'agrégats d'α-synucléine et d'ubiquitine.

Les causes de la maladie semblent être multifactorielles. Douze gènes dont les mutations sont responsables des formes familiales de maladie de Parkinson, autosomiques récessives ou dominantes, ont été identifiés. Ils sont responsables d'environ 10 % des cas (Spatola and Wider, 2014). Dans les formes sporadiques, majoritaires, on admet l'influence de facteurs environnementaux associés à des facteurs génétiques de prédisposition. Ces contributions génétiques et environnementales sont encore

très mal comprises. Cependant, plusieurs neurotoxines environnementales susceptibles d'induire la maladie ont été identifiées. Les inhibiteurs du complexe I mitochondrial sont notamment incriminés ou suspectés d'être une cause de parkinsonisme. Plusieurs sont employés pour générer des modèles de parkinsonisme chez l'animal (1-méthyl-4-phényl-pyridine (MPTP) ou son métabolite actif, le 1-méthyl-4-phényl-pyridinium (MPP^+) ; roténone) (Beal, 2001, 2000; Camilleri and Vassallo, 2014; Johnson and Bobrovskaya, 2015; Schapira and Schrag, 2011) (**Figure 23**).

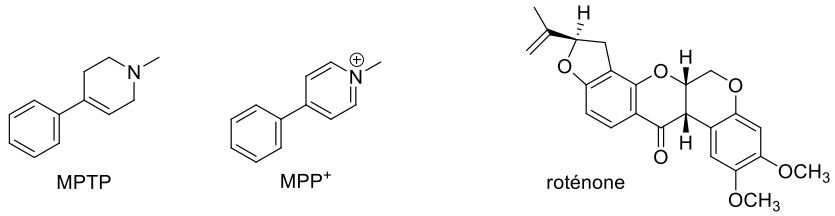


Figure 23 : Neurotoxines environnementales impliquées dans des parkinsonismes : MPTP, MPP^+, roténone.

Il convient de différencier la maladie de Parkinson idiopathique d'autres formes de parkinsonisme qui peuvent être considérées comme des entités nosologiques à part entière. Leur distinction est cependant parfois complexe. Des critères fondés sur les signes cliniques ont donc été standardisés dans le but de réduire les diagnostics erronés. Spécificité et sensibilité du diagnostic de la maladie de Parkinson ont de ce fait été améliorées, bien qu'environ 10 % des patients se voient encore reclassés post-mortem, le diagnostic de certitude étant histologique. Ces erreurs sont couramment liées à des formes proches de parkinsonismes, dont les critères diagnostiques sont inférieurs à ceux de la maladie de Parkinson (Tolosa *et al.*, 2006). Ces autres parkinsonismes sont généralement désignés par le terme de « parkinsonismes atypiques » : en plus des troubles moteurs cités précédemment, on observe d'autres signes d'anomalies motrices et posturales, ainsi qu'un déficit cognitif.

La paralysie supranucléaire progressive (PSP), ou syndrome de Steele-Richardson-Olszewski est le principal de ces syndromes (Steele and Caparros-Lefèbvre, 2005). Regard figé (paralysie supranucléaire engendrant des troubles oculomoteurs), instabilité posturale et chutes associées en sont les principales manifestations. Les tremblements de repos sont rares, les patients ne répondent généralement pas à la *L*-DOPA. Une bradykinésie symétrique ainsi qu'une dysautonomie et un syndrome frontal, consistant en des troubles comportementaux ou cognitifs, peuvent être présents. Par ailleurs, des enchevêtrements neurofibrillaires de protéine tau sont souvent observés au niveau du tronc cérébral (Borroni *et al.*, 2011; Burn and Lees, 2002; Im *et al.*, 2015). Cette protéine associée aux microtubules (MAPT, *Microtubules Associated Protein Tau*), qui les stabilise et qui assure un rôle dans le transport axonal, s'agrège au niveau intraneuronal ou intra-astrocytaire dans de nombreuses maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer (Wagner *et al.*, 2015). Les isoformes surexprimées ou agrégées et le degré de phosphorylation de tau varient d'une pathologie à l'autre.

Ces syndromes parkinsoniens atypiques désignent donc de façon générale un ensemble de symptômes qui diffèrent de ceux retrouvés dans la maladie de Parkinson idiopathique, qui ne sont pas ou peu atténués par la prise de *L*-DOPA, tandis que sur le plan neurologique la même dégénérescence progressive de neurones dopaminergiques a lieu. Elle est accompagnée de la dégénérescence d'autres types neuronaux dans d'autres aires, qui engendrent les signes associés. Dans le cas de la PSP, l'ensemble du circuit des ganglions de la base dégénère, des aires corticales étant également touchées.

3.1. Etudes épidémiologiques

La prévalence de la maladie de Parkinson est d'environ 827/100.000 personnes en France[7], et 100 à 200 /100.000 dans le monde (OMS, 2006). Elle touche environ 1 % de la population française âgée de plus de 65 ans[8].

En Europe et aux Etats-Unis, la maladie de Parkinson constitue la forme principale de parkinsonisme rencontrée, la PSP et les autres parkinsonismes dits atypiques y contribuant seulement à hauteur de respectivement 4 et 20 % (Jecmenica-Lukic *et al.*, 2014).

3.1.1. Les parkinsonismes atypiques Guadeloupéens

L'étude des patients accueillis pour une suspicion de maladie de Parkinson en 1995 et 1996 au service de neurologie du CHU de Pointe-à-Pitre, en Guadeloupe, a mis en évidence une proportion inhabituellement élevée de syndromes parkinsoniens atypiques résistants à la *L*-DOPA. Au vu de cette constatation, une étude cas-témoin a été menée pendant 2 ans auprès des personnes admises dans le service, concernant leur exposition à des facteurs de risque variés. Seules les habitudes alimentaires de ces patients les démarquent des parkinsoniens idiopathiques de l'archipel : tous présentent une forte consommation de fruits d'annones, *Annona muricata*, *squamosa* et *reticulata*, ainsi que d'infusions médicinales à base des feuilles de ces espèces. L'hypothèse d'un lien entre la survenue de parkinsonismes atypiques et la consommation d'annones a ainsi été soulevée par le Dr Caparros-Lefèbvre (Caparros-Lefèbvre et Elbaz, 1999).

Les patients parkinsoniens de cette étude initiale (septembre 1996 à août 1998, n = 87) ont été classés en 4 sous-groupes : maladie de parkinson idiopathique (22), PSP (31), parkinsonisme atypique à tableau clinique proche de la PSP (30), et parkinsonisme atypique avec maladie des motoneurones (MND, 4). Des patients-contrôles, admis au service de neurologie pour troubles bénins, sans signe de neurodégénérescence, ont été inclus à titre comparatif dans cette analyse. Dans cette étude, 75 % des parkinsoniens admis présentaient une forme atypique assimilée à la PSP, ce qui est largement

[7] http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-04/guide_parcours_de_soins_parkinson.pdf Page consultée le 07/10/2015.

[8] http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/maladie-de-parkinson Page consultée le 07/10/2015.

supérieur au taux déclaré en Europe ou aux Etats-Unis. La plupart des patients étaient d'origine afrocaribéenne, avec quelques individus d'origine caucasienne et indienne.

L'interrogatoire des patients a mis en évidence une association significative entre la pathologie et la consommation de fruits ou d'infusions de feuilles d'annones (une fois par mois ou plus pendant depuis 2 ans ou plus), par rapport aux parkinsoniens idiopathique et aux contrôles (**Tableau 4**). Par ailleurs, après l'arrêt de la consommation de ces produits, les troubles de la démarche, la bradykinésie et la rigidité ont diminué chez 6 patients (4 présentant un parkinsonisme atypique et 2 une probable PSP), et 29 patients suivis sur 3 ans sont restés dans un état stable (Caparros-Lèfebvre et Elbaz, 1999). Ces patients, jeunes au sein de la cohorte, témoignent potentiellement d'effets symptomatiques liés aux annones. Une implication des alcaloïdes benzylisoquinoléiques est possible pour cette observation spécifique (voir plus loin).

Les auteurs rappellent cependant que ces conclusions s'appuient sur un faible nombre de patients, et qu'une étude cas-témoin de plus grande envergure est nécessaire pour la confirmation de cette hypothèse étiologique.

Tableau 4 : Étude comparée de la consommation de corossol ou de tisane de feuilles de corossolier, entre les sujets atteints de la maladie de parkinson, de parkinsonisme atypique, ou non malades (Caparros-Lefèbvre et Elbaz, 1999). Le nombre d'individus dans chaque catégorie (n), le nombre d'individus consommateurs et leur proportion (%) par catégorie sont reportés dans le tableau.

Consommation	Maladie de Parkinson	Parkinsonisme atypique et PSP				Contrôles
		Parkinsonisme atypique	PSP	Parkinsonisme atypique et MND	Total	
	(n=22)	(n=30)	(n=31)	(n=4)	(n=65)	(n=65)
Fruit	13 (59 %)	30 (100 %)	29 (94 %)	4 (100 %)	63 (97 %)	39 (60 %)
Tisane	4 (18 %)	24 (80 %)	26 (84 %)	4 (100 %)	54 (83 %)	28 (43 %)
Fruit ou tisane	16 (73 %)	32 (100 %)	30 (100 %)	4 (100 %)	65 (100 %)	45 (69 %)

De 1996 à 2001, 220 patients ont été inclus dans l'étude, permettant une meilleure définition du phénotype guadeloupéen désigné à ce stade UP (« *unknown parkinsonism* ») dont les symptômes sont proches de ceux de la PSP, avec une instabilité posturale précoce plus importante, entraînant des chutes (Caparros-Lefèbvre *et al.*, 2002). La similitude de ces syndromes est bien illustrée par le cas de 4 patients UP ayant fait l'objet d'une reclassification en PSP quelques mois avant leur mort, du fait de la manifestation d'une ophtalmoplégie. Les grandes similitudes cliniques observées entre les patients atteints d'UP et du syndrome PDC (*Parkinson-Dementia Complex*) de l'île de Guam sont soulignées par les auteurs (**Tableau 5**). Enfin, les troubles cognitifs observés chez les patients guadeloupéens se distinguent des démences de types Alzheimer, avec notamment un syndrome frontal.

Tableau 5 : Comparaison des phénotypes PSP et UP, cohorte 1996-2001 (Caparros-Lefèbvre *et al.*, 2002)

Symptômes	**Parkinsonismes atypiques**	
	PSP	**UP**
	(n=58)	(n=96)
dopa résistant	x	x
instabilité posturale	x	modérée
chutes	précoces	tardives
ophtalmoplégie	x	
paralysie pseudo bulbaire	x	x
signes du lobe frontal	x	x
syndrome de rigidité-akinésie symétrique des muscles axiaux		x
déficits cognitifs précoces		x
dystonie		4 patients

parkinsonisme-sclérose latérale amyotrophique (P-SLA) (n=15)

maladie de parkinson (MP) (n=51)

Total (n=220)

En 2002, la cohorte était de 253 patients, dont 196 parkinsoniens atypiques. La poursuite de cette étude entre 2003 et 2005, incluant de nouveaux patients, majoritairement Afro-caribéens (n total=160 ; 129 patients incidents), a permis de mieux caractériser la pathologie, dorénavant qualifiée de « parkinsonisme guadeloupéen », scindée en 2 phénotypes principaux (Lannuzel *et al.*, 2007) :

- un syndrome PSP-*like*, différant de la PSP par des tremblements fréquents, une dysautonomie et des hallucinations. Tous les patients présentant une dysfonction oculomotrice ont été regroupés sous cette catégorie (Gd-PSP) ;
- les patients ne présentant pas de trouble oculomoteur mais une démence ont été regroupés sous l'entité Gd-PDC.

Les signes cliniques majeurs des trois principales entités de l'étude : maladie de Parkinson (MP), Gd-PSP et Gd-PDC sont reportés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Signes cliniques comparés des patients MP, Gd-PSP et Gd-PDC, cohorte 2003-2005 (Lannuzel *et al.*, 2007).

Symptômes	MP	Parkinsonismes atypiques	
		Gd-PSP	Gd-PDC
	(n=50)	(n=51)	(n=50)
parkinsoniens			
tremblements	asymétriques (90%)	bilatéraux (56%)	bilatéraux (44%)
bradykinésie	6 %	12 %	9 %
rigidité	4 %	4 %	4 %
réponse à L-DOPA	bonne (>50 % chez 82 % des patients)	mauvaise (<30 % chez 96 % des patients)	mauvaise (<30 % chez 76 % des patients)
instabilité posturale		82 %	70 %
chutes		69 %	40 %
non parkinsoniens			
ophtalmoplégie = dysfonction oculo-motricesupranucléaire	_	100 %	_
dysarthrie/dysphagie	_	41 %	14 %
incontinence urinaire	tardive	précoce	précoce
hypotension orthostatique	tardive (16 %)	précoce (41 %)	précoce (24 %)
dysfonction érectile	38 %	62 %	50 %
Mouvements oculaires rapides (REM)	22 %	20 %	28 %
hallucinations		59 %	52 %
démence	10 %	92 %	100 %

A ce stade, près de 250 parkinsoniens atypiques ont permis la définition d'une nouvelle entité nosologique, le « parkinsonisme guadeloupéen », avec 2 phénotypes. Des données séméiologiques complémentaires ont été obtenues, avec caractérisation de l'ophtalmoplégie et de la fréquence de tremblement, mise en évidence d'un myoclonus d'origine corticale très fréquent dans le phénotype Gd-PSP (Apartis *et al.*, 2008; Lannuzel *et al.*, 2008), ainsi que d'anomalies du sommeil à mouvements oculaires rapides (« *Rapid Eye Movements sleep Behaviour Didorders* ») (Cohen, 2007). Des IRM

comparatives entre patients Gd-PSP et atteints d'une PSP classique ont permis la mise en évidence de différences notables entre ces pathologies (Léhéricy *et al.*, 2010).

Enfin, l'examen anatomopathologique de trois patients à diagnostic de PSP probable (i.e. Gd-PSP) a montré une neurodégénérescence du tronc cérébral et dans une moindre mesure du cortex cérébral. D'abondants agrégats de protéine tau neuronaux et gliaux étaient observables. Aucun de ces patients n'était porteur d'une mutation sur le gène codant pour cette protéine (Caparros-Lefèbvre *et al.*, 2002).

L'association de ces parkinsonismes à la consommation d'Annonaceae a fait l'objet d'une étude complémentaire (Lannuzel *et al.*, 2007) chez 44 patients Gd-PSP ou Gd-PDC, 26 patients MP et 88 témoins formant 2 groupes contrôles d'âges moyens similaires à ceux des groupes MP et Gd-P. Ils ont été répartis en 2 catégories : petits consommateurs (< 10 fruits ou tasses par jour pendant 1 an), et grands consommateurs (≥10 fruits ou tasses par jour pendant 1 an). Ces données sont exprimées en équivalents nombres de fruits ou tasses consommés par jour pendant 1 an, obtenus par le nombre de fruit/jour multiplié par le nombre d'années de consommation (**Tableau 7**). Ce changement de catégorisation par rapport à la précédente étude reflète davantage la prise sur le long terme, et élève le seuil de tolérance, même si l'absence de distinction tisane / fruit et le seuil de définition des groupes apparaissent peu pertinents (Lannuzel 2007).

Tableau 7 : Consommation d'*A. muricata* par les patients parkinsoniens en Guadeloupe (Lannuzel *et al.*, 2007).

grands consommateurs (≥10 prise-année)	MP	Gd-PSP	Gd-PDC	Contrôle 1	Contrôle 2	Total Contrôle
	(n=26) (63,9 ± 2,5)	(n=21) (72,3±1,0)	(n=23) (72,5±1,4)	(n=50) (63,1 ± 0,8)	(n=75) (72,9 ± 1,0)	(n=88)
Fruit	4 %	52 %	61 %	12 %	16 %	14 %
Tisane	16 %	52 %	30 %	0 %	7 %	3,5 %
Fruit ou tisane	20 %	76 %	74 %			

L'âge est exprimé en (m ± SEM) ; contrôle 1 : *vs* MP ; contrôle 2 : *vs* Gd-PSP, Gd-PDC.

Les trois quarts des patients Gd-PSP et Gd-PDC étaient donc de gros consommateurs de fruits ou tisanes, contre seulement un cinquième pour les patients MP. La consommation se trouve être faible chez les témoins, comme chez les patients MP. Cependant tous les patients atteints de parkinsonisme atypique n'étaient pas de gros consommateurs, ce qui donne à penser que d'autres facteurs environnementaux ou génétiques sont probablement impliqués, soit en tant qu'agents neurotoxiques, soit pour expliquer une différence potentielle de susceptibilité aux neurotoxines d'Annonaceae. On peut légitimement suspecter un déterminisme génétique, cependant la répartition ethnique des patients n'est pas significativement différente de celle de la population générale guadeloupéenne. La maladie étant une tauopathie, le gène tau a été investigué dans une cohorte de 50 patients atypiques (Gd-PSP : 33,

Gd-PDC : 17), en comparaison avec 40 parkinsoniens idiopathiques et 183 sujets sains guadeloupéens. La majorité des guadeloupéens afro-caribéens, malades ou non, étaient homozygotes pour l'haplotype H1 du gène tau (5 % d'hétérozygotes porteurs de l'allèle H2, contre 20 % chez les caucasiens). L'haplotype H1, associé à la PSP chez les caucasiens (subhaplotype H1), ne semble pas constituer un facteur de risque pour la Gd-PSP et la Gd-PDC. Le polymorphisme génétique observé ne semble pas incriminé (Camuzat *et al,* 2008).

On notera que très récemment, un « cluster » d'ALS-PDC a été identifié par Lannuzel *et al.* (2015) sur l'île de Marie-Galante en Guadeloupe (Lannuzel *et al.*, 2015). L'incidence de chacune des pathologies est importante. Le tableau clinique évoque fortement une pathologie endémique de l'île de Guam, évoquée plus loin.

3.1.2. Autres cas de parkinsonismes atypiques « tropicaux »

L'examen de 10 patients parkinsoniens en Martinique, mené par Caparros-Lefèbvre *et al.* (2002) a révélé que la moitié d'entre eux présentait un syndrome atypique. Ces cas n'ont cependant pas fait l'objet d'une caractérisation précise et l'exposition aux annones ou à d'autres facteurs de risque n'est pas rapportée.

L'observation de cas de parkinsonismes atypiques, au tableau clinique très proche de celui de Guadeloupe, manifestement associés à une forte consommation d'Annonaceae, a également été effectuée en Nouvelle-Calédonie. Un compte-rendu clinique portant sur 33 patients parkinsoniens, dont 15 présentaient les signes d'un parkinsonisme atypique, a été publié. Les patients sont répartis de façon homogène au sein de 3 groupes d'origines ethniques différentes. 73 % des parkinsoniens atypiques étaient des consommateurs réguliers d'Annonaceae, contre seulement 39 % des individus atteints de la maladie de Parkinson idiopathique (Angibaud *et al.*, 2004).

Une étude menée à Londres (Chaudhuri *et al.*, 2000) a montré que 20 à 25 % d'une cohorte de 115 patients parkinsoniens d'origine afrocaribéenne ou indienne ne répondait pas ou peu à la *L*-DOPA, contre seulement 7 % des 148 patients caucasiens contrôles. Trois à quatre fois plus de parkinsonismes atypiques en comptant PSP et MSA (*multi-system amyotrophy*, atrophie multi-système) sont donc observés. Dans cette étude, aucune évaluation de l'étiologie et *a fortiori* de la consommation d'annones n'a été effectuée, mais on peut remarquer que ces populations sont traditionnellement consommatrices de ces fruits, qui sont importés.

Une forme de parkinsonisme atypique, très semblable au parkinsonisme guadeloupéen dans sa symptomatologie, a été décrite sur l'île américaine de Guam, dans le Pacifique, au sein de la population indigène (indiens Chamorro) (Caparros-Lefèbvre et Steele, 2005). Le parkinsonisme atypique observé, proche de la PSP (des troubles oculomoteurs sont notamment présents) est associé à une démence, le syndrome étant dénommé « PDC » pour *Parkinsonism Dementia Complex*. Une association à une maladie des motoneurones (SLA, sclérose latérale amyotrophique) est possible. Des démences séniles isolées (démence des iles Marianne, « *Mariana dementia* ») sont également relevées. Les proportions

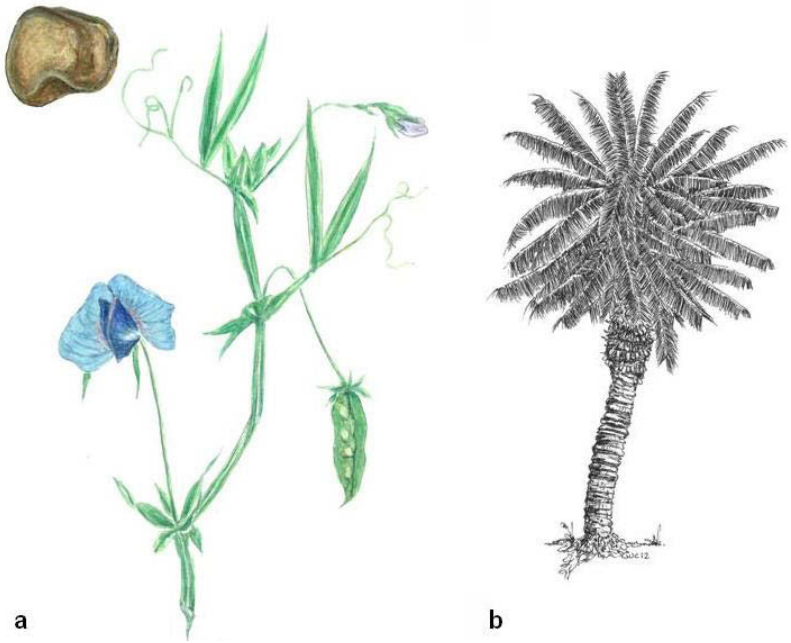
inhabituelles de ces syndromes ont, comme en Guadeloupe, attiré l'attention sur une cause environnementale possible. L'incidence de ces pathologies tend à décliner. De nombreuses hypothèses étiologiques ont été proposées, parmi lesquelles l'implication des « graines » de palmier de Sagou (*Cycas circinalis*, Cycadaceae) est actuellement retenue. Les embryons de cette plante constituent un élément important de l'alimentation traditionnelle. Plusieurs neurotoxines potentielles ont été identifiées, parmi lesquelles la β-*N*-méthyl-amino-*L*-alanine (BMAA) (Banack *et al.*, 2006; Cox, 2003; Karamyan V.T., 2008; Papapetropoulos, 2007), un acide aminé neuroexcitateur produit par des cyanobactéries et présent à différents niveaux de la chaine alimentaire (Qiu *et al.*, 2012). Cette molécule est proche de la β-oxalyl-amino-alanine (BOAA) des graines de *Lathyrus sativus* (Fabaceae), une plante consommée lors de famines, responsable d'épidémies historiques de SLA (Enneking, 2011; Spencer *et al.*, 1986) (**Figure 24**). Il est possible que les Annonaceae, qui croissent sur l'ile, contribuent également aux signes de parkinsonisme et à la démence, comme le suggèrent R. Steele, le descripteur de la PSP et spécialiste du syndrome de Guam, et D. Caparros-Lefèbvre (Caparros-Lefèbvre *et al.*, 2002; Steele, 1999).

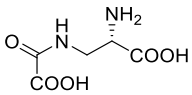
3.2. Discussion autour de l'implication des acétogénines

3.2.1. Au travers des études épidémiologiques

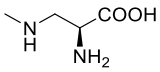
Force est de constater que l'investigation d'autres facteurs environnementaux n'a pas été menée par les auteurs ayant décrit les parkinsonismes atypiques en Guadeloupe et en Nouvelle-Calédonie. Si la corrélation entre la consommation d'annones a été mise en évidence (section 3.1.1.), il n'est pas exclu que d'autres facteurs soient également corrélés à cette pathologie. A priori, l'exposition aux pesticides, aux peintures ou aux métaux lourds n'était pas un facteur de risque relevé aux cours des interrogatoires des patients guadeloupéens (Lannuzel, communication personnelle).

Ainsi, une étude à plus grande échelle et avec une diversité géographique plus importante permettrait de mesurer l'incidence des parkinsonismes guadeloupéens, de rechercher l'existence de la pathologie dans d'autres aires tropicales ou dans d'autres populations consommatrices d'annones, de mettre à l'épreuve l'hypothèse de l'implication des Annonaceae et enfin de comprendre si d'autres facteurs sont impliqués. Un travail de réévaluation semble être en cours en Guadeloupe et d'investigation en Martinique et en Guyane est en cours, sous la direction d'A. Lannuzel (Lannuzel *et al.*, 2015).





Lathyrus sativus
β-*N*-oxalyl-amino-*L*-alanine ("BOAA") =
acide β-*N*-oxalyl-*L*-α,β-diaminopropionique ("ODAP")



Cycas micronesica
β-*N*-méthylamino-*L*-alanine
("BMAA")

→ *agonistes glutamatergiques*

Figure 24 : Plantes alimentaires neurotoxiques et toxines incriminées : (a) gesse cultivée ; (b) palmier de Sagou. Illustrations : J.C. Guéguen, Reproduction de (Bonneau *et al.*, 2012).

3.2.2. Hypothèses étiologiques : molécules potentiellement impliquées

3.2.2.1. Alcaloïdes benzyl-tétrahydroisoquinoléiques

La problématique de l'étiologie de ces parkinsonismes guadeloupéens intéresse le laboratoire depuis le début des années 2000. La majeure partie des travaux présentés ci-dessous est issue de cette recherche réalisée dans le cadre d'un réseau collaboratif impliquant des neurologues de Marbürg puis Munich (Pr. G.U. Höglinger) et le laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'ICSN (Pr. Olivier Laprévote, Dr. Alain Brunelle, Dr. David Touboul).

Dès la première description des parkinsonismes guadeloupéens, Caparros-Lefèbvre *et al.* ont avancé l'hypothèse selon laquelle les alcaloïdes benzyl-tétrahydroisoquinoléiques (BnTHiQ), marqueurs chimiotaxonomiques des Annonaceae, pourraient être à l'origine de la pathologie (Caparros-Lefèbvre et Elbaz, 1999).

De structure proche de la dopamine (**Figure 25**), ces alcaloïdes pourraient en effets interférer avec la transmission dopaminergique (Nagatsu, 2002). Les isoquinoléines, les benzyl-tétrahydroisoquinoléines

et les aporphines sont connues pour leur affinité pour des récepteurs aux neuroamines et pour des effets centraux chez le rongeur, déjà mis en évidence pour la réticuline (antagoniste dopaminergique) (Banning *et al.*, 1980; Morais *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1981), pour des aporphines du fruit d'*A. muricata* (Hasrat *et al.*, 1997) ou pour un *totum* alcaloïdique des parties aériennes d'*A. cherimolia* (Martínez-Vázquez *et al.*, 2012). On rappellera que l'apomorphine, aporphine hémisynthétique, est employée en thérapeutique comme agoniste dopaminergique D2.

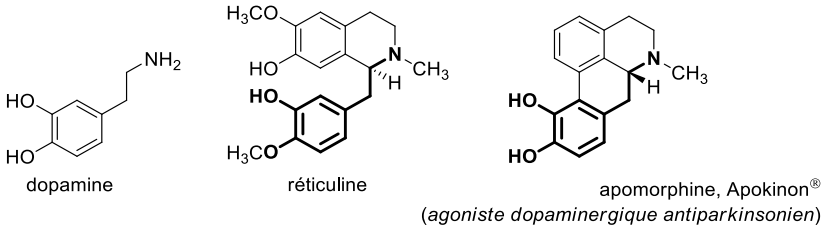


Figure 25 : Analogie structurale de la réticuline, alcaloïde majoritaire d'*A. muricata*, avec la dopamine et l'apomorphine.

Cependant, bien que leur contribution ne puisse être exclue tout à fait, ces alcaloïdes n'apparaissent pas comme les molécules les plus susceptibles d'induire une neurodégénérescence marquée. S'il a été montré que la 1-Bn-THIQ pouvait induire un parkinsonisme après administration sous-cutanée chez le primate (Kotake *et al.*, 1996), Collins souligne à juste titre, en réponse à l'hypothèse étiologique séminale de Caparros-Lefèbvre *et al.*, que les études expérimentales menées sur cette classe de molécules sont ambigües et ne montrent qu'une relativement faible neurotoxicité (Collins, 1999). Cette assertion est étayée par des données expérimentales spécifiques : une étude particulière de la toxicité des alcaloïdes de l'*A. muricata* a été menée sur des cultures primaires mésencéphaliques embryonnaires de rats (Lannuzel *et al.*, 2002). Une mort apoptotique dose-dépendante a été observée pour le *totum* alcaloïdique des écorces et pour les alcaloïdes majoritaires purifiés, dans les neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques (majoritairement GABAergiques) (**Tableau 8**), mais à des concentrations assez élevées, proches de celles mesurées pour le MPP^+ dans des paradigmes similaires. Cette activité, indépendante d'une recapture par les neurones dopaminergiques, est peut être liée à un potentiel modéré d'inhibition du complexe I, observé pour ces molécules (Champy, 2004; Höllerhage *et al.*, 2009).

Tableau 8 : Toxicité des alcaloïdes d'A. muricata sur des cultures primaires mésencéphaliques d'embryons de rats (Lannuzel *et al.*, 2002) ; potentiel inhibiteur du complexe I (Champy, 2004).

	Totum alcaloïdique (écorce* ; feuilles)**	**Anonaine**	**Coreximine**		**Réticuline**	
CI_{50},TH^+ à 24h*	18 µg/mL	nd	4,3 µg/mL	13 µM	100 µg/mL	304 µM
CI_{100}, TH^+ à 24h*	30 µg/mL	nd	10 µg/mL	30 µM	300 µg/mL	912 µM
CI_{50} complexe I**	2,75±0,06 µM (exprimé en réticuline)	3,40±0,17 µM	nd		20 % d'inhibition à 65 µM	

* TH+ : mort des neurones dopaminergiques (i.e. révélés avec un anticorps anti-tyrosine hydroxylase) ; ** activité NADH oxydase spécifique, particules sous-mitochondriales de cœur de bœuf, décylubiquinone ; annonacine dans ce modèle : CI_{50} = 1,9 ± 0,3 nM ; nd : non déterminé.

Sans remettre en cause la force de l'association entre Annonaceae et parkinsonisme atypique guadeloupéen, l'examen de la littérature suggère donc l'implication d'autres molécules présentes dans les produits consommés par les malades au cours de leur vie.

3.2.2.2. Acide kaurénoïque

A la lumière de la composition d'*Annona* spp, abordée dans le chapitre 1, il était légitime de se pencher sur le cas des diterpènes. L'acide *ent*-kaurénoïque (Figure 5) a été retrouvé en forte quantité dans la pulpe d'*Annona cherimolia* (66 mg/fruit) et sa cytotoxicité est connue (Costa-Lotufo *et al.*, 2002). En conséquence, il a été testé sur cultures primaires de striatum embryonnaire de Rat, jusqu'à la concentration de 50 µM (Guillopé *et al.*, 2011). Aucune mort neuronale, ni astrogliose, n'a été rapportée, l'écartant ainsi des candidats à la neurotoxicité.

3.2.2.3. Acétogénines

- *Composition des produits incriminés*

Champy *et al.* (Champy, 2005) ont montré que les acétogénines étaient extraites en quantité non négligeable, contrairement à ce qui était attendu, lors de la préparation d'infusions de feuilles d'*Annona muricata*. Ainsi la quantité d'annonacine estimée par tasse était de 0,1 mg. Les fruits se sont révélés contenir encore plus d'annonacine, estimée à 15 mg par fruit par la même méthode. Ces résultats ont permis d'identifier l'alimentation comme élément prépondérant d'exposition. Par la suite, d'autres études ont exploré la présence d'acétogénines dans la pulpe de fruits d'autres espèces d'Annonaceae (Champy *et al.*, 2005; Höllerhage *et al.*, 2015; Levine *et al.*, 2015; Melot *et al.*, 2009; Pomper *et al.*, 2009; Potts *et al.*, 2012) ou de produits dérivés (Le Ven *et al.*, 2012, 2014), confortant l'hypothèse de la consommation alimentaire comme source principale d'exposition (section 2.3.2). Fortement cytotoxiques, susceptibles de traverser les membranes biologiques de manière passive, dotées d'un mécanisme d'action commun à celui de plusieurs neurotoxines environnementales responsables de parkinsonismes, les acétogénines d'Annonaceae sont apparues comme des candidates étiologiques.

- *Mécanisme d'action et neurotoxicité*

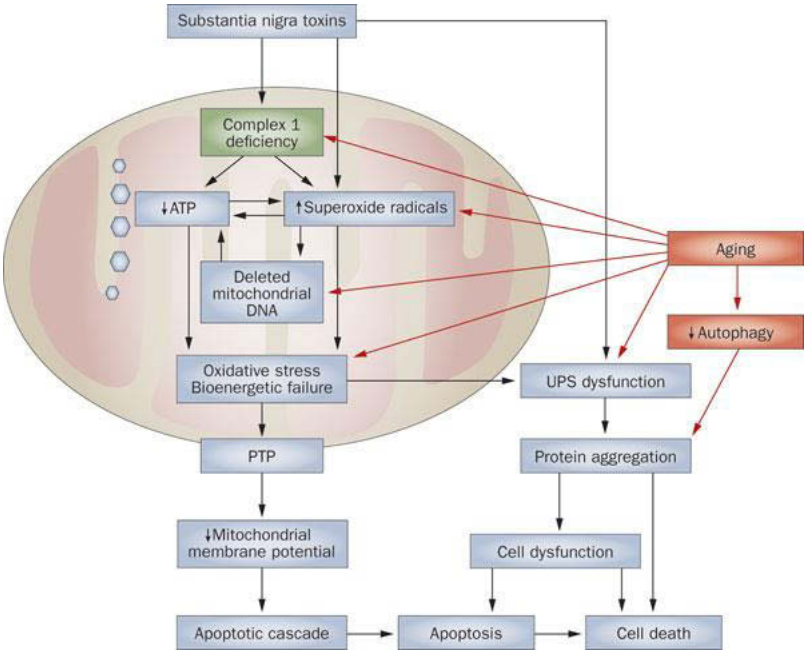


Figure 26 : Rôle du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale dans la neurodégénérescence. Reproduction de (Schapira and Schrag, 2011).

Le principal mécanisme d'action connu des acétogénines est l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (cf 2.4.1). Or ce mécanisme est impliqué dans la mort neuronale dans la maladie de Parkinson idiopathique et dans la PSP (**Figure 26**) (Schapira, 2010). Une inhibition par un agent exogène est susceptible d'induire une neurodégénérescence, comme dans le cas du MPTP, via son métabolite actif le MPP^+ ou, comme cela est proposé pour la roténone (**Figure 23**), un pesticide naturel possédant le même mécanisme d'action, désignée comme neurotoxine environnementale responsable de parkinsonismes en milieu rural : son emploi en Europe a été interdit pour ce motif.

Des études menées sur cultures primaires embryonnaires mésencéphaliques et corticales de Rat ont montré que l'annonacine, à des concentrations de l'ordre du nM, provoquait une déplétion en ATP et une neurodégénérescence non spécifique (Lannuzel *et al.*, 2003; Potts *et al.*, 2011). Une hyperphosphorylation et une redistribution de la protéine tau, accompagnée d'un recrutement des mitochondries vers le corps cellulaire et d'un effondrement des réseaux microtubulaires ont été mises en évidence dans des cultures primaires striatales. Des données complémentaires ont été obtenues en microscopie électronique, avec marquage de tau (Escobar Khondiker, 2007). De tels résultats ont pu être reproduits avec d'autres acétogénines (9 composés, issus des genres *Annona* et *Dasymaschalon* : isoannonacine, annonacinone, bullatacine, squamocine, solamine, sootepensines -A et -B, tonkinensine-C, tonkinine-C) et avec divers inhibiteurs lipophiles du complexe I (Höllerhage *et al.*, 2009; Schapira, 2010). Les effets observés sont corrélés au potentiel inhibiteur du complexe I mais également à la lipophilie des molécules testées. Ces données sont résumées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Neurotoxicité des acétogénines : principales données expérimentales *in vitro*.

Cultures primaires mésencéphaliques : → annonacine	**Mort neuronale (à 24 h) :** - neurones dopaminergiques : CI_{50} = 18±4 nM - neurones totaux : CI_{50} = 27±5 nM **Mécanisme :** - sauvetage des neurones par stimulation de la glycolyse anaérobie / fermentation lactique (glucose) - pas de sauvetage par les antiglutamatergiques ou les antioxydants	(Lannuzel *et al.*, 2003)
Cultures primaires striatales : → annonacine	**Mort neuronale (à 48 h) :** - neurones totaux : CI_{50} ~ 50 nM **Tauopathie :** - accumulation de tau hyperphosphorylé dans le soma de 60 % des neurones à 100 nM - pas d'augmentation de la transcription de tau - en lien avec l'inhibition du complexe I	(Escobar-Khondiker *et al.*, 2007)
Cultures primaires striatales :	**Tau et mort neuronale *vs* caractéristiques physicochimiques et du inhibition complexe I ***	(Höllerhage *et al.*, 2009)

	CI_{50} – cplx I (homogénat de cerveau)	CE_{50} – ATP (6 h)	CI_{50} - mort (48 h)	CE_5 Tau (48 h)
→ annonacine	54,8 nM	134 nM	60,8 nM	44,1 nM
→ squamocine	1,4 nM	2,9 nM	1,1 nM	0,6 nM
→ bullatacine	0,9 nM	3,6 nM	1,1 nM	0,6 nM
→ autres AAGs				

Cultures primaires corticales : - annonacine - extrait du fruit d'*As. triloba***	**Mort neuronale (48 h)** CI_{50} ~ 50 nM (env. 30 µg/mL) CI_{50} ~ 47.9 µg/mL	(Potts *et al.*, 2012)
Lignée LUHMES – neurones mésencéphaliques humains : - annonacine	- 25 nM, 48 h : viabilité ~ 60 %, ATP ~ 64 % - ↑ mRNA de tau, isoforme 4R, mais pas 3R, via ↑ mRNA du facteur d'épissage SRSF2 - Attribué à l'inhibition du complexe I	(Bruch *et al.*, 2014)

* CE_5 Tau : concentration à laquelle 5 % des neurones ont un marquage somatique Tau.

** contre-extrait AcOEt d'un extrait méthanolique de pulpe.

Une évaluation très récente, sur cette lignée LHUMES, de la cytotoxicité d'extraits de compléments alimentaires et de fruits contenant de l'annonacine et de la squamocine a été rapportée. Aucune corrélation entre doses d'AAGs et mort cellulaire n'est cependant proposée (Höllerhage *et al.*, 2015).

En outre, une évaluation de la neurotoxicité de l'annonacine a été réalisée dans plusieurs paradigmes chez l'animal. Ces travaux sont résumés dans le **Tableau 10**. Ils indiquent que l'annonacine est susceptible d'induire une neurodégénérescence étendue, particulièrement marquée au niveau du tronc

cérébral chez le Rat (Champy *et al.*, 2004), de la même manière que la roténone (Höglinger *et al.*, 2006). L'annonacine est cependant bien mieux tolérée que cette dernière. Aucun animal n'est décédé chez les animaux traités.

L'administration par voie sous-cutanée à des souris transfectées par le gène tau humain muté (mutation R406W, responsable de la démence frontotemporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP 17), de phénotype assez proche du Gd-PDC, autosomique dominante) a été réalisée, en comparaison à une souche *wild type*. Chez les animaux transgéniques, l'annonacine induit une accumulation de tau hyperphosphorylé dans les neurones du cortex, de l'hippocampe et du striatum, avec une augmentation de la concentration de la protéine – principalement phosphorylée, médiée par une diminution de sa dégradation protéasomique et par une augmentation de l'activité de plusieurs de ses kinases. Ces effets ne sont pas, dans leur majorité, observés chez les souris R406W-/-. Ces données montrent que l'annonacine est susceptible d'aggraver la tauopathie rencontrée dans la lignée transgénique (Yamada *et al.*, 2014). Un travail complémentaire a été réalisé sur cette lignée et chez des souris *wild type* dans des conditions beaucoup plus proches de l'exposition humaine : du jus de corossol a remplacé l'eau de boisson des animaux pendant 1 an, donnant des résultats similaires, mais surtout induisant une accumulation de tau hyperphosphorylé chez les souris *wild type*. Bien que moindre par rapport aux souris transgéniques, l'apparition d'une tauopathie dans ce groupe d'animaux constitue un très fort argument en faveur de l'implication des annones et des AAGs dans les parkinsonismes guadeloupéens (Rottscholl *et al.*, 2015). Dans aucun de ces modèles l'agrégation de la protéine tau n'est observée.

Tableau 10 : Neurotoxicité des acétogénines : principales données expérimentales *in vivo*.

Rat Wistar mâle, subchronique	Annonacine, 1,3 à 7,6 mg/kg/jour, i.v. continu, 28 jours	- Comportement et motricité non affectés. - Neurodégénérescence étendue (pertes neuronales). - Astrogliose. - Déplétion en ATP (mesure : cortex). - pas d'accumulation de tau ou d'α-synucléine.	(Champy, 2004; Champy *et al.*, 2004)
Souris mâle, subchronique ; transfection tau : - tau humain mutation R406W mutant +/+ * - Souris non transfectées	Annonacine 6 et 9 mg/kg/jour, 3 jours, s.c. continu	- Accumulation de tau hyperphosphorylée.	(Yamada *et al.*, 2014)
Souris mâle, chronique : transfection tau : - Humain, *wild type* +/+ - Humain mutation R406W mutant +/+ * - Souris non transfectées	Jus de corossol (teneur en annonacine : 16,2 mg/L ; soit env. 0,5 mg/kg/jour ; annonacine et analogues : env. 0,9 mg/kg/jour), p.o., 1 an.** Contrôle : eau	- Motricité normale. - Comportement (peur, anxiété) altéré chez tous les animaux traités. - Pas de mort neuronale. - Accumulation de tau hyperphosphorylé : R406W +/+ >> Humain WT > souris WT, induite par le traitement.	(Rottscholl *et al.*, 2015)

* La mutation R406W est responsable de parkinsonisme familial avec démence.

** contient également 18 mg/L d'isoquinoléines totales.

WT : *wild type* (souche sauvage)

Notre problématique se pose donc en ces termes : les acétogénines d'Annonaceae sont neurotoxiques dans de nombreux modèles cellulaires et animaux, et une récente étude, la première rapportant une exposition par voie orale aux acétogénines sur le long terme, rapporte une hyperphosphorylation de Tau, élément caractéristique de la maladie. Elles sont de fait, les molécules les plus susceptibles d'être responsables des parkinsonismes atypiques, bien que leur contribution s'inscrive très probablement dans un contexte multifactoriel (Yamada *et al.*, 2014). Les fruits et remèdes traditionnels contenant des acétogénines sont cependant consommés depuis longtemps sans qu'aient été rapportées d'anomalies jusqu'à la publication de l'étude de Caparros-Lefèbvre en 1999. Il est donc vraisemblable que la susceptibilité individuelle, impliquant en partie des variations au niveau de l'ADME, tienne une large place dans le développement de cette maladie.

4. Étude ADME de l'annonacine : travaux antérieurs

Le devenir d'une substance exogène dans l'organisme suit quatre étapes distinctes selon le schéma ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion). Malgré l'engouement suscité par les acétogénines en raison de leur potentiel antitumoral, peu de ces aspects ont été abordés alors même qu'ils constituent une étape essentielle dans le développement de médicaments.

Les travaux *in vivo* évoqués précédemment, relatant les effets antitumoraux ou toxiques observés sur rongeurs après administration par voie orale d'un aliment contenant des acétogénines, apportent la preuve indirecte, du fait de l'activité constatée, que ces molécules sont absorbées, donc capables de passer la barrière intestinale (Chen *et al.*, 2012c; Rottscholl *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'annonacine avait été détectée dans des cerveaux de rats auxquels elle avait été administrée par voie intra-veineuse, indiquant par là-même la possibilité de passage de la barrière hématoencéphalique (Champy, 2004). Dans le but de mieux appréhender leur contribution dans le cadre de la problématique du parkinsonisme atypique, il convient de s'intéresser à leur biodisponibilité et de savoir dans quelle mesure elles peuvent se distribuer dans le cerveau. De précédents travaux réalisés par Le Ven *et al.* au laboratoire et dans l'équipe de Spectrométrie de Masse de l'ICSN (Le Ven, 2012) ont porté sur les aspects de métabolisation de phase I de l'annonacine, d'approche de l'absorption et de la distribution.

4.1. Absorption et distribution

Le Ven *et al.* ont appliqué la règle de Lipinski (Lipinski, 2004) à l'annonacine afin de prédire sa perméabilité membranaire (**Tableau 11** : Tableau prédictif du passage des barrières physiologiques pour l'annonacine, obtenu par simulation avec le logiciel ChemDraw®. Reproduction de Le Ven, 2012. Il en résulte que ses propriétés physico-chimiques sont peu favorables à la diffusion passive au travers des membranes physiologiques, ce qui laisse envisager une très faible absorption intestinale, ou bien suggère un mécanisme d'absorption actif pour expliquer, malgré tout, les activités mentionnées précédemment.

Tableau 11 : Tableau prédictif du passage des barrières physiologiques pour l'annonacine, obtenu par simulation avec le logiciel ChemDraw®. Reproduction de Le Ven, 2012.

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
Aire polaire de surface (PSA)	107 Å	-	≤ 60-70 Å

Dans l'intention d'éclaircir ce point, des modèles *in vitro* de barrières physiologiques ont été utilisés. Ils consistent en une culture à confluence de cellules jointives sur des inserts poreux dans des puits de culture, définissant deux pôles distincts. La mesure des concentrations d'annonacine à chacun des pôles permet de mettre en évidence un éventuel passage trans-cellulaire. L'étude sur cellules Caco-2 mimant la barrière intestinale, a été menée par Le Ven *et al.* (Le Ven, 2012), mais n'a pas permis de conclure du fait de difficultés techniques rencontrées. L'annonacine n'a en effets pas pu être détectée lors de tests de diffusion au travers de l'insert, et ce, malgré la grande sensibilité de la méthode employée, témoignant d'une adsorption sur le matériel employé. Une expérience similaire a été menée en parallèle sur cellules hCMEC/D3 (lignée immortalisée endothéliale microvasculaire cérébrale) pour l'approche de distribution cérébrale au travers du modèle de barrière hémato-encéphalique, et s'est heurtée aux mêmes écueils. Les modèles *in vitro*, bien qu'utiles en première approche pour limiter l'expérimentation animale, se sont avérés incompatibles avec les caractéristiques physicochimiques de l'annonacine, d'où la nécessité d'études *in vivo* dans la poursuite de ces travaux.

Plusieurs acétogénines, dont l'annonacine en dispersion en phase solide dans le PEG 4000 ont fait l'objet d'une étude d'absorption, réalisée par perfusion sur intestin de Rat (**Figure 27**) (Dang *et al.*, 2012). Le taux d'absorption, calculé en fonction des concentrations des perfusats d'entrée et de sortie, est d'environ 50 % pour les quatre acétogénines testées avec la formulation dans le PEG 4000.Ce taux reste constant pour les concentrations testées (200 µg/mL à 500 µg/mL), sans différence notable entre chacun des quatre segments : duodenum, jejunum, iléon et côlon. L'expérience n'a en revanche pas été menée sur les molécules dissoutes dans le tampon phosphate, du fait d'une trop faible solubilité (213 µg/mL pour l'annonacine). Les travaux des auteurs, orientés vers le potentiel pharmaceutique des acétogénines, tendent à montrer une augmentation de la perméabilité au niveau intestinal grâce à leur formulation. Ils ne permettent pas de conclure quant à leur absorption dans le cadre de l'alimentation ni au passage dans la circulation générale.

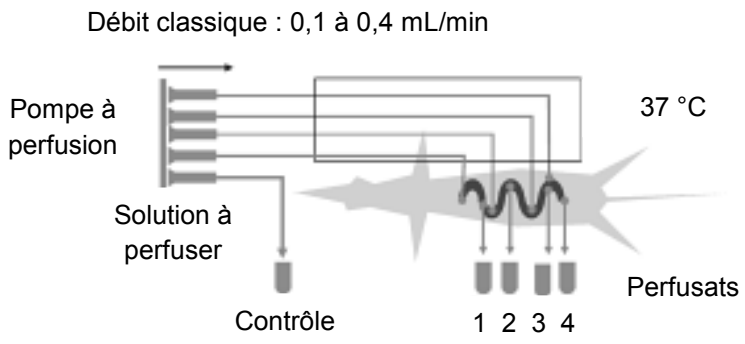


Figure 27 : Schéma du procédé de perfusion intestinale en quatre sites (1=duodenum, 2=jejunum, 3=iléon, 4=côlon). Reproduction (Li, 2011).

4.2. Métabolisation de phase I

Les réactions de phase I correspondent à l'ensemble des bioconversions de xénobiotiques, permettant leur fonctionnalisation. Elles peuvent être de type oxydation, hydrolyse et réduction. Elles facilitent par la suite la prise en charge des molécules exogènes par les enzymes de phase II, qui elles, effectuent des réactions de conjugaison consistant à augmenter leur polarité dans le but de favoriser leur excrétion. La majorité des oxydations est effectuée par des enzymes appartenant à la super-famille des mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP) et des hémoprotéines (Guengerich, 2006)

Les travaux réalisés *in vitro* sur des modèles de microsomes hépatiques par Le Ven *et al.* (Le Ven, 2012; Ven *et al.*, 2011) ont permis de mettre en évidence une très faible métabolisation de phase I, inférieure à 1 %. Les métabolites observés, de formule brute $C_{35}H_{64}O_8$, résultent exclusivement d'une monooxygénation de l'annonacine, correspondant à une hydroxylation sur la chaîne carbonée ou sur la lactone. Les expériences sur microsomes hépatiques de rat ont montré la formation de 25 métabolites, classés en trois groupes en fonction de leur temps de rétention (**Figure 28**). Dans les microsomes humains, seuls les trois métabolites majoritaires du Rat sont retrouvés. Leurs structures ont été déterminées par CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap® sur extrait brut du milieu de culture, selon un procédé similaire à celui décrit dans la section 2.3.1.2.2 et confirmées par RMN, à l'aide de métabolites produits par hémisynthèse. Des études en présence d'inhibiteurs spécifiques de certaines isoformes du cytochrome P450 ont permis d'identifier celles qui étaient les plus vraisemblablement impliquées (**Figure 29**). La mise en évidence de cette faible métabolisation de phase I implique, dans le cadre de notre problématique, soit une forte métabolisation de phase II, soit une faible biodisponibilité qui permet d'expliquer l'absence de toxicité évidente des acétogénines en prise aigüe.

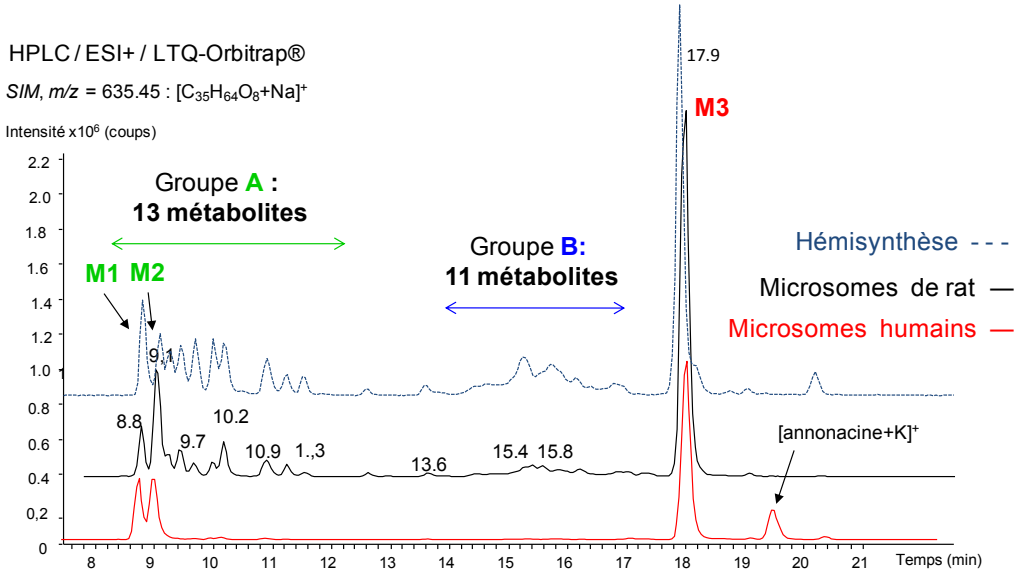


Figure 28 : Comparaison des chromatogrammes acquis en mode Single Ion Monitoring (SIM, *m/z* = 635,45) du brut d'échantillon de métabolisation obtenu sur microsomes humains, de rats, et par hémisynthèse. Reproduction de Le Ven, 2012.

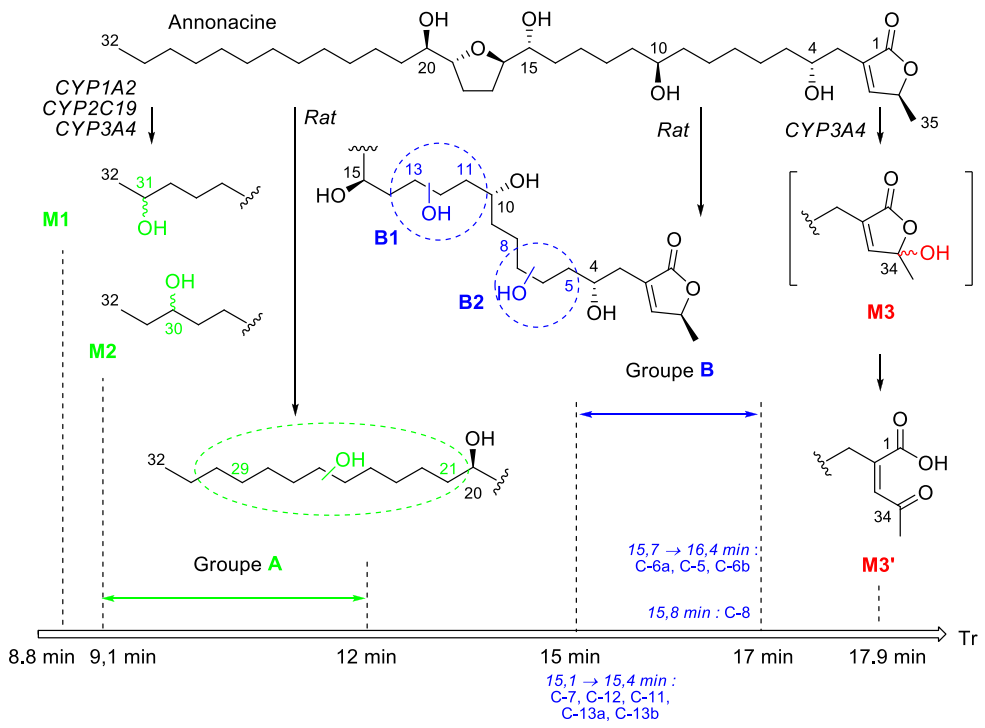


Figure 29 : Résumé des métabolites de phase I de l'annonacine. Reproduction (Le Ven, 2012).

Après que les acétogénines aient été suspectées d'être impliquées dans la survenue de ces formes atypiques de parkinsonisme, l'Agence National de Sécurité Sanitaire (ANSES) a publié en 2010[9] une saisine, mettant en avant plusieurs pistes d'investigation et relevant notamment l'importance de mener des études au sujet :

- de la biodisponibilité,
- de la distribution dans les organes
- de l'exposition via l'alimentation

Comme cela était précisé dans l'introduction générale, notre plan de travail s'articule donc autour de ces axes, avec pour objectif d'apporter des éléments de réponse dans chacune de ces problématiques. A la suite des travaux de J. Le Ven, c'est vers un modèle in vivo que nous nous sommes tournés pour l'étude d'aspects pharmacocinétiques relatifs à l'exposition par voie orale aux AAGs. L'annonacine a été conservée comme AAG modèle. Ces résultats sont présentés dans les 2 articles constituant le chapitre 2.

[9] https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-l%E2%80%99agence-fran%C3%A7aise-de-s%C3%A9curit%C3%A9-sanitaire-des-aliments-relatif-aux-risques-li%C3%A9s-%C3%A0-l-0 Page consultée le 07/10/2015.

Chapitre 2 : Contribution à l'étude de la pharmacocinétique de l'annonacine chez le rat

1. Introduction 71
2. Article 1 : Développement d'une méthode de quantification de l'annonacine, une neurotoxine environnementale, dans le plasma de Rat, et étude pharmacocinétique 73
2.1. Résumé 73
2.2. Article 73
2.3. Commentaires 83
2.3.1. Plan d'expérience 83
2.3.2. Développement de méthode 84
2.3.3. Résultats-discussion 85
2.3.4. Résultats complémentaires *in vivo* 86
2.3.5. Expériences *in vitro* 87
3. Article 2 : Développement d'une méthode de quantification de l'annonacine dans le cerveau de Rat par UPLC-MS/MS 89
3.1. Résumé 89
3.2. Article 89
3.3. Commentaires 111
3.3.1. Plan d'expérience 111
3.3.2. Développement de méthode 111
3.3.3. Résultats-discussion 111
4. Conclusion 113

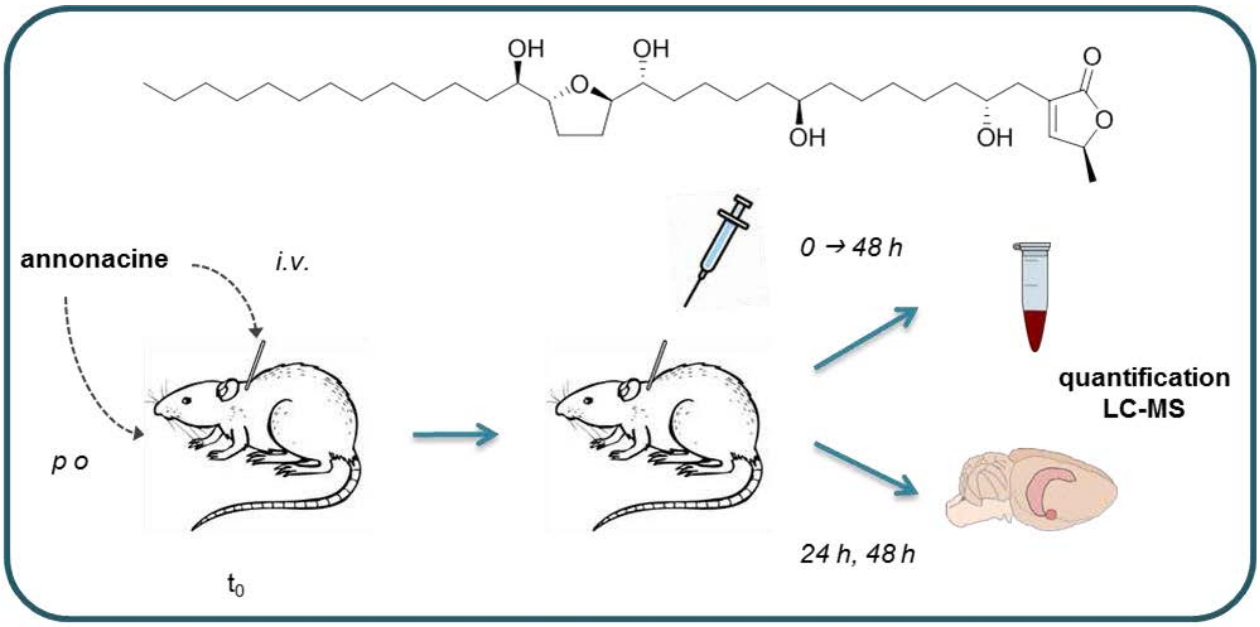
1. Introduction

Il convenait dans un premier temps d'obtenir des informations concernant la biodisponibilité et la distribution des acétogénines dans l'organisme. L'annonacine, l'AAG majoritaire du fruit d'*Annona muricata*, ayant été utilisée auparavant comme AAG modèle pour les études de neurotoxicité et de métabolisation, elle s'est imposée comme modèle pour notre étude de biodisponibilité et de distribution : nous avons cherché à mesurer les quantités de molécule susceptibles de passer dans la circulation générale et dans le cerveau après administration par voie orale. Cette étude est présentée en deux articles.

Le premier article s'articule autour du développement et de la validation d'une méthode de dosage de l'annonacine dans le plasma de Rat par UPLC-MS/MS. Son application dans le cadre d'une étude cinétique menée chez le Rat, après administration d'annonacine par voie intraveineuse et par voie orale est également présentée.

Le deuxième article porte sur le développement et la validation de la méthode sur le même appareillage, dans une matrice différente, à savoir l'homogénat de cerveau de Rat. L'application de cette méthode au dosage dans le cerveau des animaux de l'étude précédente est rapportée.

Les analyses ont été réalisées au laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'ICSN, dans le cadre de la collaboration avec notre unité.



2. Article 1 : Développement d'une méthode de quantification de l'annonacine, une neurotoxine environnementale, dans le plasma de Rat, et étude pharmacocinétique

Method development for quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study

Article paru dans Journal of Chromatography B (Bonneau et al, 2015)

2.1. Résumé

L'annonacine est une neurotoxine environnementale présente dans la pulpe de plusieurs fruits d'Annonaceae (par exemple *Annona muricata* et *Asimina triloba*), dont la consommation a été reliée à la survenue de parkinsonismes atypiques avec démence. Les paramètres pharmacocinétiques de cette molécule sont inconnus. Une méthode de quantification dans le plasma de rat a été développée, avec emploi de l'annonacinone, un proche analogue, en tant qu'étalon interne. L'extraction liquide/liquide à partir du plasma a été réalisée avec de l'acétate d'éthyle, permettant une récupération efficace de l'annonacine. La quantification a été réalisée par UPLC-MS/MS en mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*), basé sur la perte de γ-méthyl-γ-lactone (transition de -112 uma) à partir des adduits sodium $[M+Na]^+$ de ces molécules, pour l'annonacine et l'étalon interne. La limite de quantification a été estimée à 0,25 ng/mL. Malgré un fort effet-matrice, une bonne linéarité a été obtenue dans les gammes distinctes allant de 0,25 à 10 ng/mL et de 10 à 100 ng/mL. Les évaluations de précision intra- et inter-jour ont donné des coefficients de variation inférieurs à 10 % et la précision était de ± 10 %. Cette méthode a été appliquée à une étude pharmacocinétique chez le Rat. Après administration orale de 10 mg/kg d'annonacine, la C_{max} calculée était de 7,9±1,5 ng/mL, le T_{max} de 0,25 h. La demi-vie ($T_{1/2}$) était de 4,8 ± 0,7h et le volume de distribution apparent de 387,9 ± 64,6 L. La biodisponibilité de l'annonacine serait ainsi de 3,2 ± 0,3 % de la dose ingérée.

2.2. Article

Journal of Chromatography B, 1004 (2015) 46–52

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Method development for quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC–MS/MS and application to a pharmacokinetic study

Natacha Bonneau[a], Isabelle Schmitz-Afonso[b,1], Alain Brunelle[b], David Touboul[b], Pierre Champy[a,•]

[a] Laboratoire de Pharmacognosie-Chimie des Substances Naturelles, UMR-BioCIS, CNRS, University Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 9290, Châtenay-Malabry, France

[b] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS-ICSN UPR2301, Université Paris-Sud, Labex LERMIT, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 July 2015
Received in revised form
21 September 2015
Accepted 24 September 2015

Keywords:
Acetogenin
Annonaceae
Annonacin
Bioavailability
Rat plasma
UPLC–MS/MS

ABSTRACT

Annonacin is an environmental neurotoxin identified in the pulp of several fruits of the Annonaceae family (for example in *Annona muricata*, *Asimina triloba*), whose consumption was linked with the occurrence of sporadic atypical Parkinsonism with dementia. Pharmacokinetic parameters of this molecule are unknown. A method for its quantification in Rat plasma was developed, using its analogue annonacinone as an internal standard. Extraction from plasma was performed using ethylacetate with a good recovery. Quantification was performed by UPLC–MS/MS in SRM mode, based on the loss of the γ-methyl-γ-lactone (• 112 amu) from the sodium-cationized species $[M+Na]^+$ of both annonacin and internal standard. The limit of quantification was 0.25 ng/mL. Despite strong matrix effects, a good linearity was obtained over two distinct ranges 0.25–10 ng/mL and 10–100 ng/mL. The intra- and inter-day precisions (RSD) were lower than 10%, while accuracy was within • 10%. This method was applied to a pharmacokinetic study in the Rat. After oral administration of 10 mg/kg annonacin, a C_{max} of 7.9 • 1.5 ng/mL was reached at T_{max} 0.25 h; $T_{1/2}$ was 4.8• 0.7 h and apparent distribution volume was 387.9 • 64.6 L. The bioavailability of annonacin was estimated to be 3.2 • 0.3% of the ingested dose.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Annonaceous acetogenins (AAGs) constitute a class of lipophilic polyketides specifically distributed in the Annonaceae plant family [1]. These compounds have been extensively studied as antitumoral drug-candidates [2,3]. More recently, AAGs have been proposed as dietary neurotoxins [4,5], possibly responsible for clusters of Parkinsonism/dementia in tropical populations, as evidenced by epidemiological studies conducted in the French West Indies [6]. Consistent with this hypothesis, AAGs are potent inhibitors of mitochondrial complex I [1,5] and were evidenced to be neurotoxic in vivo, in rodent models of neurodegeneration and of tauopathies, after intravenous or subcutaneous sub-chronic administration [7,8].

AAGs were identified in several pantropical fruits such as soursop (*Annona muricata*) [9]. Recent methodological development allowed their detection in other Annonaceae-derived food products [10,11], revealing alimentary exposure to constitute a possibly wide public health problem. The most abundant AAG in soursop is annonacin [10,12], which was also evidenced in high amounts in the fruit pulp of the north-American pawpaw (*Asimina triloba*) [13,14]. Hence it has become a major concern to evaluate the pharmacokinetic parameters of this molecule, as the chef-de-file of AAGs, as part of sanitary risk evaluation [15]. Pharmacological study of an Annonaceae extract suggested intestinal absorption of these

Abbreviations: AAG, Annonaceous acetogenin; amu, atomic mass unit; AUC, area under curve; Cl, clearance; EMA, Eropean Medicines Agency; F_{obs} apparent bioavailability; IS, internal standard; LLOQ, lower limit of quantification; MF, matrix factor; MQC, medium concentration quality control; QC, quality control; ULOQ, upper limit of quantification; RSD, relative standard deviation; SRM, selected reaction monitoring; $T_{1/2}$, half-life time; T_{max}, time of maximum concentration; UPLC–MS/MS, ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; Vz, distribution volume.

• Corresponding author. Tel.:+33 1 46 83 56 39.
E-mail address: pierre.champy@u-psud.fr (P. Champy).
[1] present address: Normandie Univ, COBRA, UMR 6014 and FR 3038; Université de Rouen; INSA Rouen; CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.039
1570-0232/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

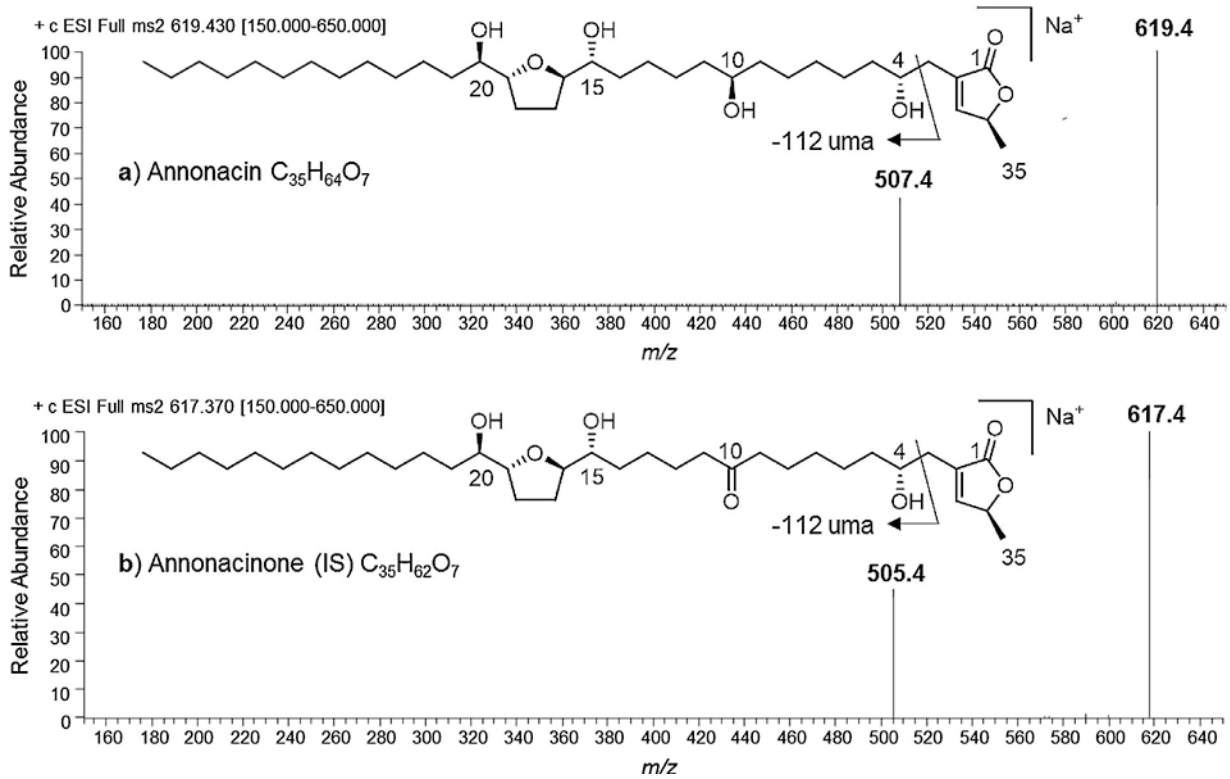


Fig. 1. Production mass spectra of $[M+Na]^+$ adducts of (**a**) annonacin and (**b**) annonacinone (IS).

compounds, with the observation of an antitumoral activity in mice after oral-route administration [16]. Nevertheless, Dang et al. evidenced the possible uptake of AAGs by intestinal epithelium in an ex-vivo Rat model [17]. Although a method for the quantification of the AAG bullatacin (rollinastatin-2) in Rat plasma by single ion monitoring HPLC-ESI–MS was published [18], no data about the bioavailability of any AAG is available, to our knowledge. In this context, we developed a method for the extraction and quantification of annonacin in Rat plasma. This process was validated according to EMA guidelines [19], and then applied to a preliminary pharmacokinetic study in the Rat.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

Annonacin and annonacinone (internal standard, IS) (purity > 97%) were purified from the seeds of *Annona muricata* L., as previously described [1]. Ethylacetate, ethanol and DMSO were supplied by Carlo Erba SDS (Val de Reuil, France). Isopropanol (HPLC-grade) was supplied by Fischer Scientific SAS (Illkirch, France). Methanol and acetonitrile (HPLC-grade) were supplied by JT Baker (Paris, France). Ultra-pure water was prepared in-house with a Millipore Milli-Q purification system (Darmstad, Germany). Olive oil (European Pharmacopoeia-compliant) was supplied by Cooper (Melun, France). Wistar Rat plasma was purchased from Janvier (St Quentin-Fallavier, France).

2.2. UPLC–MS/MS method

Analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 RSLC system. Successful chromatographic separation between annonacin and IS was obtained at 40 °C with an Acquity UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm • 100 mm, 1.7 μm, Waters, Guyancourt, France) attached to an Acquity UPLC BEH C_{18} VanGuard pre-column (2.1 • 5 mm, 1.7 μm), with an isocratic mobile phase consisting of water-acetonitrile 35:65 during 1 min, then a water-acetonitrile gradient from 35:65–15:85 in 5 min, at a flow rate of 0.5 mL/min. A 2 min isopropanol-acetonitrile 50:50 washout was applied after each run.

Mass spectra were recorded with a Triple quadrupole TSQ Vantage EMR (Thermo Scientific, Les Ulis, France), equipped with a heated ESI source in the positive ion mode. The source parameters were set as follows: spray voltage 2000 V, vaporizer temperature 350 °C, sheath gas (N_2) pressure 45 psi, auxiliary gas pressure (N_2) 20 psi, capillary temperature 300 °C. Analysis was performed under the Selected Reaction Monitoring (SRM) mode using the transitions *m/z* 619.4 g 507.4 for annonacin and *m/z* 617.4 g 505.4 for the IS, with collision energies set at 36 eV and 37 eV for annonacin and for the IS, respectively. Data acquisition was performed using Thermo Scientific Xcalibur 2.1 software system.

2.3. Preparation of calibration standards and quality control

Stock solutions of annonacin and IS were prepared at a concentration of 1 mg/mL in methanol and stored at • 20 °C. Working standard solutions of annonacin ranging from 1 ng/mL to 1 μg/mL were prepared daily by successive dilutions of stock solution in methanol. Stock solution of IS was diluted daily to prepare a working solution at a concentration of 100 ng/mL.

Calibration standards were prepared by spiking 100 μL of pooled plasma with 10 μL of IS working solution to reach the concentration 10 ng/mL and with 10 μL of annonacin in solution of appropriate concentration, to reach concentrations of 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2.5; 5; 7.5; 10; 15; 20; 25; 50; 75; 100 ng/mL, respectively. In order to evaluate intra- and inter-day precisions and accuracy, Quality Control (QC) samples were prepared in plasma at concentrations 0.25; 0.75; 2.5; 10; 100 ng/mL.

2.4. Sample preparation

Each plasma aliquot (100 μL) was transferred in a polypropylene microtube and spiked with 10 μL of IS, then extracted by vortex-mixing for 30 s with 500 μL ethylacetate. The sample was then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min, and the upper phase was transferred into a 5 mL glass tube for evaporation under reduced pressure at ambient temperature with a Speed Vacuum. The residue was reconstituted in 100 μL of acetonitrile by 15 s vortex-mixing, and transferred in a polypropylene microtube for a 5 min centrifugation step at 10,000 rpm. The solution was then transferred in a glass vial, and 5 μL were injected in triplicate for analysis. Each sample was extracted twice.

2.5. Method validation

The method was evaluated for selectivity, carry-over, linearity, accuracy, precision, matrix effect, extraction recovery, stability, and validated according to the EMA guideline on bioanalytical method validation [19].

2.5.1. Selectivity

Selectivity was evaluated on 6 individual blank plasma samples. The method was considered selective (absence of interfering component in the matrix) when the response areas at the retention times of annonacin and of the IS respectively were less than 20% of the lower limit of quantification (LLOQ) for annonacin, and less than 5% for the IS.

2.5.2. Carry-over

Carry-over was evaluated in a blank analytical run following the injection of the upper limit of quantification (ULOQ). It was considered there was no carry-over when the response areas at the retention times of annonacin and of the IS respectively were less than 20% of the LLOQ for annonacin and less than 5% for the IS.

2.5.3. Calibration curve and lower limit of quantification (LLOQ)

Calibration curve was designed to cover the expected range of concentration for plasma samples, after preliminary studies were conducted. Calibration curves were prepared for each run of analysis, plotting the peak area ratio (y) of annonacin to the IS as a function of the nominal concentration of each calibration level (x) and then fitted by linear regression. The LLOQ was defined as the lowest concentration of calibration curve with a back calculation accuracy expressed as relative error within • 20% and a precision within • 20%. Calibration curves were accepted when back calculated concentrations of the calibration standards were within • 15%.

2.5.4. Accuracy and precision

Accuracy and precision were evaluated at 5 different concentration levels, including the LLOQ (0.25 ng/mL), low (LQC; 0.75 ng/mL), medium (MQC; 10 ng/mL) and the ULOQ (100 ng/mL), with 5 replicates a day, and at three different days.

2.5.5. Matrix effect

Matrix effect was investigated by comparison of the peak areas of post-extraction spiked samples at LLOQ and ULOQ, in 3 individual plasma samples versus standard solutions of the same levels. This was performed in triplicate on each plasma sample. The IS-normalized matrix factor (IS-MF) was calculated. Matrix effect was considered acceptable if the RSD of the IS-MF obtained from the 3 individual plasma samples was less than 15%.

Table 1
Precision and accuracy for the determination of annonacin concentration in Rat plasma ($n = 5$).

Concentration	Within-run		Between-run	
(ng/mL)	Precision (RSD%)	Accuracy (mean • SD%)	Precision (RSD%)	Accuracy (mean • SD%)
0.25	7.6	93.2 • 4.6	10.3	92.1 • 11.1
0.75	4.0	100.1 • 2.6	5.1	94.7 • 5.6
2.5	5.5	96.4 • 6.1	6.6	89.1 • 7.0
10	3.6	98.2 • 4.1	3.4	94.6 • 4.3
100	4.3	108.6 • 5.1	4.1	105.2 • 5.5

2.5.6. Extraction recovery

Extraction recovery was evaluated by comparison of the peak areas of extracted samples versus post-extraction spiked samples at the LLOQ, MQC and ULOQ, in triplicate. Absolute recoveries for annonacin and for the IS are presented.

2.5.7. Stability

In order to investigate the stability of annonacin in Rat plasma during sample processing and storage, evaluation was performed in triplicate on bench-top for 3 h, at • 20 °C for 3 months, under three freeze-thaw cycles, and for 24 h on the autosampler at 4 °C.

2.6. Application to Pharmacokinetic study

2.6.1. Animals and treatment

Twelve male Wistar rats (300 • 20 g), pre-implanted with a catheter in the jugular vein, were supplied by Charles River (St. Quentin-Fallavier, France). They were fasted with free access to water for 12 h before the experiment. Annonacin was administered by intravenous (i.v.; 0.5 mg/kg) or oral route (p.o.; 10 mg/kg). After administration, animals had free access to food and water. About 300 μL of their blood were collected periodically in heparinized tubes via the catheter, and were immediately centrifuged at 7500 rpm for 10 min, then stored at • 20 °C until analysis. For intravenous administration, 300 μL of an annonacin solution prepared in DMSO–ethanol–water (5:5:90, v/v/v) were injected via the catheter. Blood was collected at time points 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2; 4; 6; 8; 24; 48 h after administration. For oral route, 1 mL of annonacin solution in DMSO-olive oil (5:95, v/v) was administered by gavage. Blood was sampled at time points 0.25; 2; 3; 4; 6; 8; 22; 24; 28; 32 h. Animals were treated according to European Community Council Directive 86/609/EEC.

2.6.2. Data analysis

Non compartmental analysis was performed with the “lin-up log-down” method on each data set from individual rats to obtain the main pharmacokinetic parameters, using PK Solver Excel Add-in.

3. Results and discussion

3.1. Method development

3.1.1. Selection of the IS

Annonacin and other AAGs are not commercially available compounds, and isotope-labeled annonacin was not available. Annonacinone was therefore selected as an Internal Standard (IS), because of its structural similarity to annonacin, resulting in a similar fragmentation pattern [10] with the same specific loss of γ-methyl-γ-lactone (• 112 amu). Indeed the structure of the IS is identical to that of annonacin

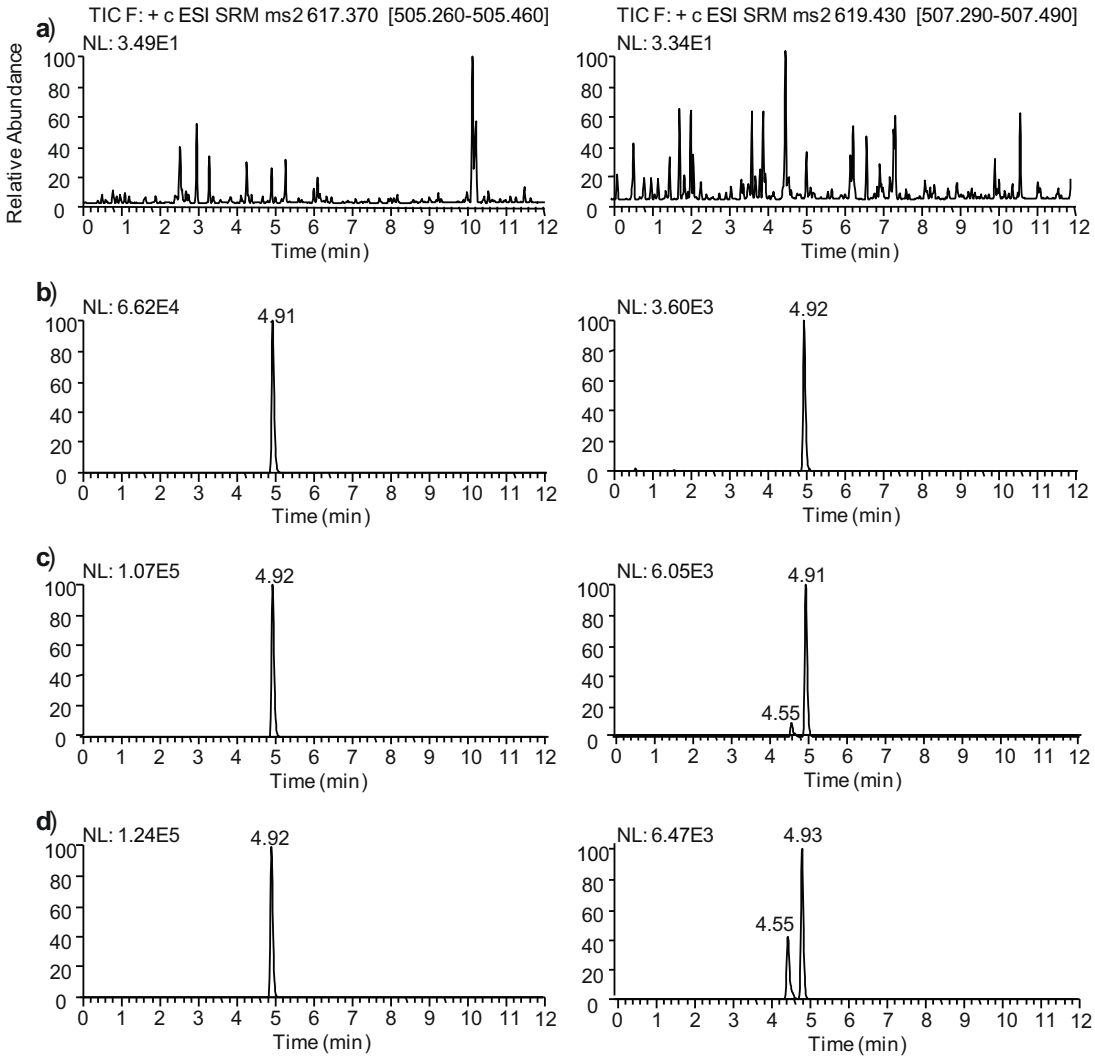


Fig. 2. Typical chromatograms showing (a) blank plasma, (b) Internal standard-spiked in plasma, (c) LQC in plasma, (d) plasma sample 48 h after i.v. administration, spiked with the IS; Left column: MS^2 of *m/z* 617.4 ion; Right column: MS^2 of *m/z* 619.4.

except for a ketone instead of a hydroxyl-group at C-10 (Fig. 1).

3.1.2. Optimization of UPLC–MS/MS conditions

Full scan MS of annonacin and of the IS showed that $[M+Na]^+$ ions (*m/z* 619.4 and *m/z* 617.4, respectively) were more abundant than $[M+H]^+$ ions (*m/z* 597.4 and *m/z* 595.4, respectively). Moreover, only non specific water losses were observed from fragmentation of the $[M+H]^+$ ions of annonacin and of the IS, whereas fragmentation of $[M+Na]^+$ ions exclusively led to a specific loss of 112 amu, corresponding to loss of the lactonic ring (Fig. 1) [20]. Hence, the SRM mode was used to monitor the transitions *m/z* 619.4 g 507.4 and *m/z* 617.4 g 505.4, for annonacin and the IS, respectively. Different chromatographic conditions, using methanol, acetonitrile and formic acid, were tested in order to separate annonacin from the IS, along with optimizing peak shapes. An acetonitrile–water gradient was finally selected as it led to the best separation, along with retention times close enough to minimize matrix effects (see Section 3.2.5). Under these conditions, retention times of annonacin and of the IS were 4.55 and 4.92 min, respectively (Fig. 2). The [M + 2] isotope of the IS is detected on the *m/z* 619.4 g 507.4 transition.

3.1.3. Sample preparation

For plasma sample preparation, protein precipitation with methanol was first tested, but resulted in important signal suppression (not shown). Liquid/liquid extraction of plasma with ethylacetate was then performed resulting in signal enhancement and providing satisfying recovery (see Sections 3.2.5 and 3.2.6).

Table 2
Extraction recovery of annonacin and IS ($n = 3$, mean • Δ_{max}%) and evaluation of matrix effect on 3 individual Rat plasma samples ($n = 3$, mean • RSD%)

	Concentration (ng/mL)	Absolute recovery (%)	IS-relative recovery (%)	IS normalised Matrix Factor (%)
Annonacin	0.25	48.0 • 9.5	91.9 • 15.4	105.6 • 6.0
	10	56.5 • 4.8	113.5 • 14.1	86.0 • 7.0
	100	46.9 • 10.7	105.3 • 16.5	48.3 • 3.8
IS	10	48.5 • 9.3		

Table 3
Stability of annonacin in Rat plasma ($n = 3$).

Conditions	Concentration (ng/mL)	Precision (RSD%)	Accuracy (%) mean	• SD
Bench-top stability (3 h at room temperature)	0.25	6.8	112.3	7.7
	10	3.6	88.4	3.2
	100	1.8	104.1	1.9
Long term stability (3 months at • 20 °C)	0.25	11.3	102.0	11.5
	10	2.1	85.7	1.8
	100	1.9	102.6	1.9
Freeze–thaw stability (3 cycles)	0.25	4.6	86.9	4.0
	10	1.4	91.3	1.3
	100	6.1	85.7	5.2
Post preparation stability (24 h in autosampler at 4 °C)	0.25	4.4	95.6	4.2
	10	10.6	99.4	10.6
	100	3.9	99.6	3.9

3.2. Method validation

3.2.1. Selectivity

For the different blank matrices tested, no endogenous compound was detected at the expected retention times of annonacin and of the IS. Typical chromatograms are shown in Fig. 2.

3.2.2. Carry-over

No carry over was observed during the analysis, as assessed after injection of annonacin at the ULOQ, nor of the IS at working concentration.

3.2.3. Calibration curve and LLOQ

In order to obtain satisfying linearity ($R^2 > 0.990$), 2 calibration ranges prepared in plasma were considered. Best fitting was obtained with weighted ($1/x$) least square linear regression from 0.25 to 10 ng/mL (determined with 8 calibration concentrations). From 10 to 100 ng/mL, the calibration curve (7 calibration concentrations) was obtained by simple linear regression. Typical model equations were: $y = 2.528.10^{\bullet\ 2} \bullet\ x + 2.587.10^{\bullet\ 3}$ ($R^2 = 0.992$) and $y = 2.327.10^{\bullet\ 2} \bullet\ x + 8.461.10^{\bullet\ 3}$ ($R^2 = 0.998$), respectively, where y is the peak area ratio of annonacin over IS, and x is the concentration of annonacin in plasma. Back calculated concentrations of the calibration standards were within • 15% of the nominal value and • 20% for LLOQ of annonacin, which was defined at 0.25 ng/mL. The necessity to use two different fittings for the entire calibration is justified by important matrix effects that could not be avoided by any modification of the analysis method (see Section 3.2.5).

3.2.4. Accuracy and precision

Quality control (QC) samples at 5 different concentrations of annonacin, including the LLOQ and the ULOQ, were prepared at 3 different days, with 5 replicates per day, independently from the calibration standards. Within and between run precisions were less than • 15% and • 20% for the QC and the LLOQ, respectively. Moreover, within and between run accuracies were less than • 15% and • 20% of the nominal concentration for the QC and the LLOQ, respectively (Table 1).

3.2.5. Matrix effect

A high absolute matrix effect was observed, with signal enhancement for both annonacin and the IS. However, at the LLOQ and the MQC, no relative matrix effect was observed. On the contrary, a high relative matrix was observed at the ULOQ (Table 2). Despite these differences, IS-relative matrix factor evaluated on 3 different plasma samples was within 15% at each concentration, which is the acceptance limit.

3.2.6. Extraction recovery

Extraction recovery was evaluated with the LLOQ, MQC and ULOQ, in triplicate (Table 2). Although absolute recovery was quite low, recovery of annonacin relatively to the IS was acceptable with a ratio close to 100% and a maximal error near 15%, calculated as:

$$\Delta_{(BE/PE)} \bullet\ 100 \bullet\ \frac{(\text{mean}_{PE} \bullet\ SD_{BE} \bullet\ \text{mean}_{BE} \bullet\ SD_{PE})}{(\text{mean}_{PE})^2}$$

with BE and PE being the areas before and after extraction, respectively.

3.2.7. Stability

Stability study was performed in triplicate at three concentration levels. LLOQ, MQC and ULOQ were within • 15% of their nominal concentration, showing no loss of annonacin during sample storage and processing (Table 3).

The developed extraction protocol of annonacin from Rat plasma and the quantification method, by UPLC–MS/MS in the SRM mode using an IS, complies with the validation methods and standards set in the EMA guideline on bioanalytical method validation [19].

3.3. Pharmacokinetic study

The method was applied to the study of the bioavailability of annonacin in rats, after intravenous single dose administration at the concentration of 0.5 mg/kg compared with oral single dose administration at the concentration of 10 mg/kg ($n = 6$ per route). Intravenous dose was limited by annonacin solubility in a vehicule compatible with this administration route. Anticipating a possibly low bioavailability, a higher dose was chosen for oral administration in order to make quantitation possible. These doses were based on the tolerance observed in previous experiments (unpublished results). Indeed, no sign of acute toxicity was observed at these doses. The mean plasma concentration time curves are shown in Fig. 3. An important inter-individual variability was observed, for both i.v. and p.o. administrations.

The main pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis, for i.v. and oral routes (Table 4). In regard to dose-treatment, C_{max} observed after i.v. administration was lower than that observed by Chen et al. [17] after i.v. administration of bullatacin, an AAG of lower polarity than annonacin, at 2 mg/kg

Table 4
Main pharmacokinetic parameters of annonacin after single dose administration to rats (mean • SE, $n = 6$).

Parameters	Unit	Intravenous route (0.5 mg/kg)	Oral route (10 mg/kg)
$AUC_{(0-t)}$	ng/mL h	72.1 • 11.5	50.3 • 4.2
$AUC_{(0-\infty)}$	ng/mL h	85.2 • 12.9	55.2 • 3.3
$MRT_{(0-\infty)}$	h	20.9 • 2.4	16.0 • 1.5
$T_{1/2}$	h	15.2 • 1.1	4.8 • 0.7
Vz_obs or [a]Vz/F_obs	L	43.6 • 7.0	387.9 • 64.6
Cl_obs or [b]Cl/F_obs	L/h	2.1 • 0.5	55.5 • 3.8
C_{max}	ng/mL	15.9 • 3.7	7.9 • 1.5

For oral route, parameters are: [a] Vz/F_obs: apparent volume of distribution associated with terminal phase; [b] Cl/F_obs: apparent clearance after oral administration.

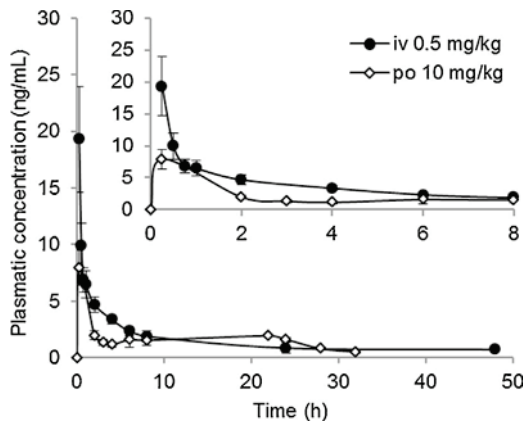


Fig. 3. Mean concentration time curve of annonacin in Rat plasma after single intravenous administration of 0.5 mg/kg and after single oral administration of 10 mg/kg (mean • SE, $n = 6$).

during a 7 h follow-up[4]. A very high distribution volume (Vz) was observed for i.v. route. $T_{1/2}$ was approximately 15 h, while Chen et al. calculated $T_{1/2}$ to be 5 h for bullatacin after i.v. administration.

A very high apparent distribution volume (Vz/F_obs) was calculated for oral administration, suggesting high distribution to tissue or to blood cellular compartment. Rapid absorption was observed after oral administration (T_{max} = 0.25 h). It was followed by a first elimination phase, then by a phase of increasing concentration from 6 h to 22 h, possibly due to release from tissue compartment.

Bioavailability was calculated as follows:

$$F\% = \left(\frac{AUC_{po}}{AUC_{iv}}\right) \cdot \left(\frac{Dose_{iv}}{Dode_{po}}\right) \cdot 100$$

resulting in $F_{0-\infty}$ = 3.2 • 0.3% (mean • Δ_{max}). This first estimation thus evidences the low availability of annonacin.

4. Conclusion

A sensitive UPLC–MS/MS method for quantification of annonacin in Rat plasma was developed and validated. The LLOQ at 0.25 ng/mL allowed its application to a preliminary pharmacokinetic study, evidencing a low bioavailability for this molecule. Although AAGs have been in the center of attention for years now, in the fields of anticancer drug development [3] and of environmental neurotoxicology, no approach of bioavailability had been proposed yet. This experiment should be completed with increasing doses in order to investigate the linearity of the pharmacokinetic parameters. However, these results show that annonacin is indeed absorbed when administered by oral route, which is the mode of environmental exposure to this compound. The low bioavailability observed here offers insight into a low brain exposure to AAGs, comparatively to levels of dietary intake in Annonaceae consumers. It gives clue to the absence of acute toxicity of alimentary products containing annonacin, and might justify the fact that Annonaceae fruits containing high levels of this cytotoxic compound (e.g. *Annona muricata, Asimina triloba*) reached an edible status in Human and are cultivated as commercially-valuable crops.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr Valérie Domergue and her staff (plateforme AnimEx, Institut Paris-Sud d'Innovation Paris-Sud), to Karine Leblanc (service HPLC, BioCIS) and to Alexandre Dubesset, Inès Miladi and Blandine Séon-Méniel for valuable technical assistance.

References

[1] A. Bermejo, I. Barrachina, E. Estornell, D. Cortes, Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action, Nat. Prod. Rep. 22 (2005) 269–303.
[2] C.-C. Liaw, T.-Y. Wu, F.-R. Chang, Y.-C. Wu, Historic perspectives on Annonaceous acetogenins: from the chemical bench to preclinical trials, Planta Med. 76 (2010) 1390–1404.
[3] J.L. McLaughlin, Paw Paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products, J. Nat. Prod. 71 (2008) 1311–1321.
[4] M. Höllerhage, A. Matusch, P. Champy, A. Lombès, M. Ruberg, W.H. Oertel, G.U. Höglinger, Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies, Exp. Neurol. 220 (2009) 133–142.
[5] A.H.V. Schapira, Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration, Exp. Neurol. 224 (2010) 331–335.
[6] D. Caparros-Lefèbvre, J. Steele, Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism-dementia complex of Guam, and environmental toxic hypotheses, Environ. Toxicol. Pharmacol. 19 (2005) 407–413.
[7] P. Champy, G.U. Höglinger, J. Féger, C. Gleye, A. Laurens, V. Guérineau, O. Laprévote, F. Medja, P.P. Michel, A. Lannuzel, E.C. Hirsch, M. Ruberg, Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe, J. Neurochem. 88 (2004) 63–69.
[8] E.S. Yamada, G. Respondek, S. Müssner, A. de Andrade, M. Höllerhage, C. Depienne, A. Rastetter, A. Tarze, B. Friguet, M. Salama, P. Champy, W.H. Oertel, G.U. Höglinger, Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice, Exp. Neurol. 253 (2014) 113–125.
[9] P. Champy, V. Guérineau, O. Laprévote, MALDI-TOF MS profiling of Annonaceous acetogenins in *Annona muricata* products for human consumption, Molecules 14 (2009) 5235–5246.
[10] J. Le Ven, I. Schmitz-Afonso, G. Lewin, O. Laprévote, A. Brunelle, D. Touboul, P. Champy, Comprehensive characterization of Annonaceous acetogenins within a complex extract by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap® using post-column lithium infusion, J.Mass Spectrom. 47 (2012) 1500–1509.
[11] J. Le Ven, I. Schmitz-Afonso, G. Lewin, A. Brunelle, D. Touboul, P. Champy, Identification of the environmental neurotoxins Annonaceous acetogenins in an *Annona cherimolia* Mill. alcoholic beverage using HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap®, J. Agric. Food Chem. 62 (2014) 8696–8704.
[12] P. Champy, A. Melot, M. Ruberg, A. Lannuzel, O. Laprévote, A. Laurens, R. Hocquemiller, Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical Parkinsonism in Guadeloupe, Mov. Disorder 20 (2005) 893–896.
[13] L.F. Potts, F.A. Luzzio, S.C. Smith, M. Hetman, P. Champy, I. Litvan, Annonacin in *Asimina triloba* fruit: implication for neurotoxicity, Neurotoxicology 33 (2012) 53–58.
[14] R.A. Levine, K.M. Richards, K. Tran, R. Luo, A.L. Thomas, R.E. Smith, Determination of neurotoxic acetogenins in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit by LC-HRMS, J. Agric. Food Chem. 63 (2015) 1053–1056.
[15] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (French food safety agency), Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif

aux risques liés à la consommation de corossol et de ses préparations (Saisine 2008-SA-0171), AFSSA, Saint Denis, 2010.
[16] M.P. Torres, S. Rachagani, V. Purohit, P. Pandey, S. Joshi, E.D. Moore, S.L. Johansson, P.K. Singh, A.K. Ganti, S.K. Batra, Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism, Cancer Lett. 323 (2012) 29–40.
[17] H.-Z. Feng Y.-J. Dang, L. Zhang, C.-Y. Zhu C.-H. Hu, In situ absorption in rat intestinal tract of solid dispersion of Annonaceous acetogenins, Gastroenterol. Res. Pract. 2012 (879676) (2012).
[18] Y. Chen, J. Chen, S. Liu, C. Xu, H. Xu, B. Cai, X. Li, W. Ju, Determination of bullatacin in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 897 (2012) 94–97.
[19] European Medicines Agency, Guideline on Bioanalytical Method Validation, EMA, London, 2011.
[20] J. Allegrand, I. Schmitz-Afonso, V. Guérineau, A. Giuliani, J. Le Ven, P. Champy, D. Touboul, O. Laprévote, Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high and low collision energy, Rapid Commun. Mass Spectrom. 24 (2010) 3602–3608.

2.3. Commentaires

2.3.1. Plan d'expérience

2.3.1.1. Choix du modèle animal

Peu de littérature est disponible sur la toxicité des AAG chez le Rat (Champy *et al.*, 2004), mais il a cependant été choisi comme modèle de rongeur dans la mesure où il permet d'effectuer un suivi cinétique par individu, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires. En outre des données de métabolisation de phase I avaient été obtenues sur microsomes de rats (Chapitre 1 section 4.2). Il apparaissait donc plus intéressant de travailler sur le même rongeur.

2.3.1.2. Choix des doses

Des données de toxicité aigüe concernant les AAGs avaient été obtenues sur Souris (Duret, 1997 ; Laugel, 1996). L'annonacine administrée par voie orale aux doses de 100 mg/kg et 200 mg/kg avait entraîné la mort de tous les individus en 1,5 h et 0,5 h. Les doses de 10 mg/kg et 30 mg/kg n'avaient en revanche pas provoqué leur mort au bout de 24 h. Les expériences menées récemment par Yamada *et al.* (2014), montrent, chez des souris normales ou porteuses de la mutation R406W+/+ (voir chapitre 1) une forte toxicité de l'annonacine administrée en continu par voie sous-cutanée, avec, après 3 jours de traitement : 100 % de mortalité à 12 mg/kg/j ; 13 % à 9 mg/kg/j et 6 % à 6 mg/kg/j.

Aucune mention de tests de doses d'annonacine par voie intraveineuse n'a été rapportée. Des données portant sur la rolliniastatine-1 (AAG de type B-1b) et l'annonacine par voie orale étaient cependant identiques. La rolliniastatine-1, testée par voie intrapéritonéale avait une DL50 de 5 mg/kg à 48 h. Aucune mort n'avait été rapportée à la dose de 2,5 mg/kg (Duret, 1997). Cette dose avait donc dans un premier temps été choisie pour être testée par voie intraveineuse chez le Rat.

Des problèmes de solubilité de l'annonacine dans des véhicules compatibles avec l'injection par voie intraveineuse ont été rencontrés. De nombreux essais de diverses combinaisons d'annonacine solubilisée dans le DMSO (10 mg/mL), d'éthanol, de propylène glycol, de polyéthylène glycol 300 et 400 et d'eau ppi ont été réalisés dans le but d'obtenir une solution limpide pendant plus de 10 minutes. La meilleure combinaison s'est avérée être DMSO (annonacine) 5 % / ethanol 5 % / eau ppi 90 %. La quantité maximale de liquide injectée à l'animal étant de 300 µL, la quantité administrée par voie i.v. était de 0,5 mg/kg, soit 5 fois moins que la dose initialement prévue.

Des tests de dose maximale pouvant être utilisée ont été effectués au préalable à toute étude cinétique. Pour la voie orale, 75 mg/kg et 100 mg/kg ont été administrés à 2 rats par dose. Par voie intraveineuse, les doses de 0,2 mg/kg et 0,5 mg/kg ont été testées sur 1 rat et 4 rats respectivement. Le taux de survie était de 100 % à 24 h.

La plus forte dose a donc été utilisée pour chacune des voies dans le but de quantifier les concentrations plasmatiques.

Six rats ont été traités par voie intraveineuse dans un premier temps, sur un intervalle de 24 h. Cependant les échantillons ont subi une contamination, visible dans le plasma prélevé à t_0 avant l'injection d'annonacine, probablement en cours de préparation. Ceci ôtait toute spécificité aux résultats, les rendant inexploitables.

Trois rats ont par la suite été traités par voie orale à la concentration de 100 mg/kg, dont seulement deux ont pu faire l'objet de prélèvements sanguins, des problèmes d'obstruction du cathéter posé dans la veine jugulaire ayant été rencontrés pour l'un d'entre eux. Les résultats entre ces deux rats sont discordants, une variation importante de la concentration a été retrouvée pour les premiers prélèvements.

Cependant ces premiers résultats nous ont permis de constater un rebond de concentration plasmatique au prélèvement 24 h après administration par voie orale. Il a sur cette base été décidé de dorénavant poursuivre les prélèvements jusqu'à 48 h. En outre ces premières expériences ont permis de vérifier que l'annonacine était quantifiable dans le plasma après administration à ces concentrations. La dose de 0,5 mg/kg a donc été maintenue pour la voie i.v., et la dose pour la voie orale a été abaissée à 10 mg/kg pour limiter la consommation d'annonacine. Ces doses ont été administrées à 9 rats pour chaque voie.

2.3.2. Développement de la méthode

2.3.2.1. Préparation d'échantillon

Plusieurs tests de préparation d'échantillon ont été réalisés en amont, sur solution d'Albumine Bovine (BSA) dans le PBS ou sur plasma de Rat, avec pour objectif d'obtenir un bon rendement d'extraction pour l'annonacine. Pour rompre les liaisons aux protéines plasmatiques, des agents dénaturants tels que l'urée (3 M) et le SDS (0,1 M) ont été ajoutés avant extraction L/L par l'acétate d'éthyle. Des extractions à différents pH ont également été menées avec de l'HCl (1 M ; 0,1 M) ou du NaOH (1 M, 0,1 M) dans le but de rompre d'éventuelles liaisons covalentes entre l'annonacine et les protéines plasmatiques[10]. Des essais de préparation par extraction sur phase solide (SPE) ont été entrepris mais abandonnés par la suite devant le manque de répétabilité des résultats obtenus par ce dispositif. La précipitation protéique a également été testée dans le MeOH, l'acétonitrile et l'acétone. D'importantes variations entre les triplicats de préparations identiques rendaient les résultats ininterprétables.

En outre, la quantification avait été effectuée en CLHP-UV à des concentrations supérieures à celles attendues *in vivo* pour que l'annonacine soit détectée par cette méthode. Des conditions de préparation d'échantillon inadaptées, et le manque de specificité de l'absorption à 210 nm pourraient également

[10] http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf

être mis en cause dans ces variations. Ces préparations impliquaient par ailleurs pour certaines, des produits qui n'étaient pas forcément compatibles avec la détection par spectrométrie de masse.

La précipitation protéique dans le MeOH a été testée à nouveau par la suite, avec détection en spectrométrie de masse, mais un effet matrice induisant une forte diminution de signal avait été observé. L'extraction L/L par l'AcOEt lui a été préférée, car induisant une augmentation du signal.

2.3.2.2. Optimisation en UPLC-MS

Le choix du Triple Quadripôle pour la quantification permettait a priori d'avoir une bonne sensibilité lorsqu'il est utilisé en mode SRM (Selected Reaction Monitoring). Entre outre, ce mode de détection basé sur une transition choisie, procure à la méthode une bonne sélectivité. Le choix du mode positif s'est appuyé sur des travaux préliminaires (Le Ven, 2012). L'ion $[M+Na]^+$ de l'annonacine étant majoritaire, et l'ion correspondant à la perte de 112 uma sur le spectre d'ions produits l'étant également, cette transition a été choisie pour la quantification. Le spectre d'ions produits est visible en supplément de l'**article 2**.

2.3.3. Résultats-discussion

Une méthode de quantification de l'annonacine dans le plasma de Rat a été mise au point et validée sur une gamme de concentrations applicable aux résultats obtenus *in vivo*.

Cette méthode est sensible, et spécifique mais l'étendue de linéarité est inférieure à celle rapportée pour une autre AAG, la bullatacine, elle aussi dosée dans le plasma de Rat. Les résultats de l'étude portaient sur des injections i.v. uniquement. Les rats y étaient traités à des doses supérieures (2,5 mg/kg). Le profil plasmatique obtenu est du même ordre de grandeur que nos résultats.

Les rats ont été traités aux doses de 0,5 mg/kg par voie i.v. et 10 mg/kg par voie orale. Les résultats obtenus sur six rats par voie sont présentés.

Les profils plasmatiques obtenus après administration par voie orale montrent un pic d'absorption aux environs de 30 min, une chute des concentrations puis un rebond d'importance moyenne. Ces profils pourraient correspondre à un cycle entéro-hépatique ou à un relargage dans le compartiment sanguin. Cependant des études complémentaires seraient nécessaires pour étayer ces hypothèses.

La biodisponibilité absolue se définit comme la fraction d'une substance administrée par voie extravasculaire qui atteint la circulation générale sous forme inchangée. Elle est calculée par rapport à la voie intraveineuse $F\ \% = (AUC_{ev} \times Dose_{iv}) / (AUC_{iv} \times Dose_{ev})$[11]

[11] http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/La_biodisponibilite_et_son_evaluation.pdf

La biodisponibilité de l'annonacine est estimée à 3 %, après calcul des AUC sur le complément d'excel PKSolver®. Le calcul a été fait par la méthode « lin-up log down » classiquement employée dans ce type d'études. Les profils cinétiques individuels des rats ont été inclus sur la condition que la droite formée par les 3 derniers points de prélèvements présente un $R^2 > 0,8$, dans le but de vérifier la cohérence de la demi-vie d'élimination calculée.

Il est important de noter que seules les concentrations totales d'annonacine dans le plasma ont pu être calculées. La fraction libre d'annonacine n'a pas pu être déterminée (voir section **2.3.5.1**). La biodisponibilité estimée concerne donc la quantité totale d'annonacine dans le plasma, et non la quantité réellement disponible aux sites actifs, vraisemblablement très inférieure. Une forte liaison aux protéines plasmatiques est en effets suspectée, au vu des rendements d'extraction absolus de seulement 50 % environ.

Il s'agit de la première estimation de biodisponibilité d'une AAG. Cependant l'extrapolation de cette biodisponibilité à d'autres doses est difficilement applicable dans la mesure où la cinétique n'est pas forcément linéaire. Les résultats non répétables obtenus à 100 mg/kg vont davantage dans le sens d'une cinétique non linéaire dans la mesure où les concentrations aux points de prélèvements n'étaient pas 10 fois supérieures, à celles obtenues à la dose de 10 mg/kg. Il serait intéressant de tester au moins 2 autres doses pour chacune des 2 voies, dans le but d'obtenir des informations à ce sujet.

2.3.4. Résultats complémentaires *in vivo*

Les profils plasmatiques des 2 rats traités *per os* à 100 mg/kg qui ont pu être prélevés sont présentés **Figure 30**. Un important rebond est visible à 24 h. Les résultats sont très différents d'un individu à l'autre mais tendent tout de même vers une cinétique non linéaire, dans la mesure où les concentrations à 15 minutes sont de l'ordre de 5 à 10 ng/mL pour une administration de 10 mg/kg (**article 1**). Or les concentrations mesurées pour la doses de 100 mg/kg sont du même ordre de grandeur ou 3 fois supérieures seulement selon l'individu.

Les profils des premiers essais à 0,5 mg/kg par voie iv des rats exclus de l'étude pour cause de contamination lors de la préparation d'échantillon sont également présentés dans la **Figure 30**.

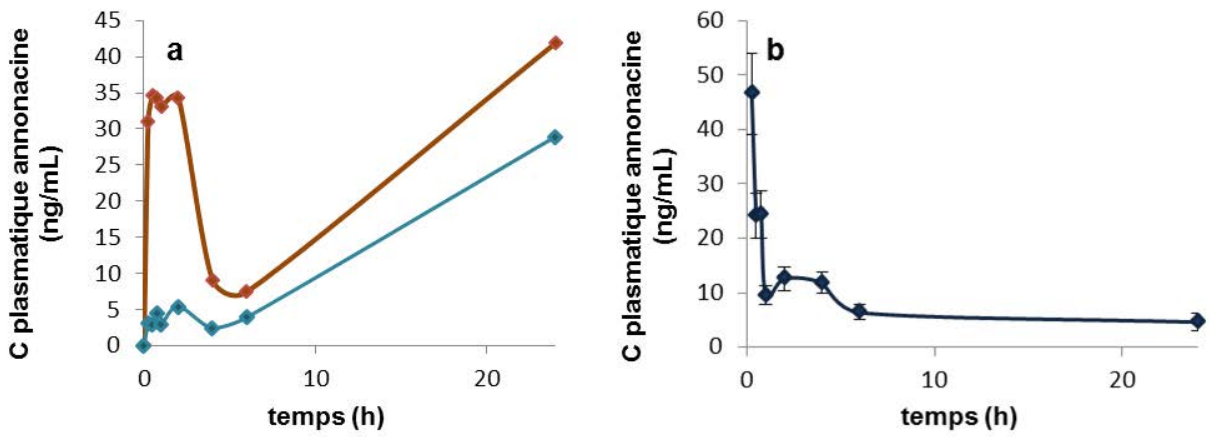


Figure 30 : Profils des concentrations plasmatiques en annonacine a) Profils individuels de 2 rats traités à la dose de 100 mg/kg par voie orale, b) Profil moyen de 7 rats traités par voie i.v. à 0,5 mg/kg dont les plasma à t_0 étaient contaminés (moyenne ± erreur standard).

Concernant les autres rats, traités par voie orale à 10 mg/kg et i.v. à 0,5 mg/kg, le choix de les inclure dans le calcul des paramètres pharmacocinétiques moyens a reposé sur la fiabilité de leur profil individuel, au regard de la ½ vie d'élimination calculée. En effet, le R^2 obtenu à partir des trois derniers points prélevés a permis une estimation de sa fiabilité, en vérifiant que la pente était descendante, celle-ci ayant un impact sur le calcul par le logiciel de la ½ vie d'élimination. Les profils individuels ont été retenus pour un $R^2 > 0,8$. Trois rats ont ainsi été exclus dans chaque voie. L'un d'eux a par ailleurs présenté une importante perte de poids en cours d'expérience, ce qui avait conduit à l'exclusion de son profil. Les paramètres moyens rapportés dans l'article ont donc été calculés sur la base de six rats par voie.

2.3.5. Expériences *in vitro*

2.3.5.1. Liaison aux protéines plasmatiques

Des essais pour déterminer le pourcentage de liaison de l'annonacine aux protéines plasmatiques ont été entrepris. La méthode la plus facilement réalisable au laboratoire consistait à utiliser un dispositif d'ultrafiltration (Oravcová, 1996) (Amicon ultracel® 0,5 ; filtre 30 kDa). Les premières tentatives d'ultrafiltration à 20 µg/mL sur albumine seule, ou eau MilliQ avec détection par CLHP-UV se sont révélées infructueuses, l'annonacine n'étant pas détectée.

L'expérience a par la suite été réitérée, dans l'eau MilliQ, aux concentrations de 10 et 100 ng/mL avec détection en UPLC-MS/MS. L'annonacine n'a pas pu être détectée dans le filtrat, en confirmant l'incompatibilité avec ce dispositif. Aucune estimation de la liaison aux protéines plasmatiques n'a donc pu être donnée.

2.3.5.2. Répartition de l'annonacine au sein du compartiment sanguin

Dans le but de connaître la répartition de l'annonacine dans le compartiment sanguin, une expérience a été menée sur le sang regroupé de plusieurs rats, dans le but de s'affranchir de variations individuelles. L'annonacine a été mise en contact du sang à 27°C à différentes concentrations et différents temps avant centrifugation pour récupération du plasma. Chaque expérience a été répétée trois fois, excepté aux temps 15 et 30 min : seulement deux réplicats ont été préparés. Le plasma a ensuite été dosé selon la méthode décrite dans l'**article 1**. Les résultats (Tableau 12) montrent peu de différence inhérente au temps de contact. La concentration moyenne calculée dans le plasma varie de 61 à 65 % de la concentration d'annonacine sanguine. L'hématocrite étant d'environ 0,4, le volume occupé par le plasma est d'environ 0,6 mL pour 1 mL de sang. Ces résultats tendent ainsi vers une répartition homogène de l'annonacine entre les compartiments cellulaire et plasmatique. Une incubation à 37 °C sur différents temps pourrait compléter ces résultats.

Tableau 12 : Résultats de l'étude de la distribution de l'annonacine dans le compartiment sanguin.

$C_{annonacine}$ dans le sang (ng/mL)	$C_{annonacine}$ calculée dans le plasma (ng/mL)															fraction plasmatique
	temps de contact avant centrifugation (min)												tous temps de contact			
	0			5			15			30						
	moyenne	SD	CV (%)	moyenne	SD	CV (%)	moyenne	SD	CV (%)	moyenne	SD	CV (%)	moyenne	SD	CV (%)	%
1	0,62	0,1	15,6	0,72	0,0	3,0	0,65	0,0	5,3	0,62	0,0	6,4	0,65	0,03	5,1	65
10	6,6	0,2	2,6	6,8	0,2	3,4	5,6	1,5	26,5	6,3	1,0	16,7	6,3	0,6	10,1	63
100	47,9	3,4	7,2	60,0	5,5	9,2	53,5	26,2	48,9	80,7	3,7	4,6	60,5	11,0	18,2	61

3. Article 2 : Développement d'une méthode de quantification de l'annonacine dans le cerveau de Rat par UPLC-MS/MS

Quantification of the environnemental neurotoxin annonacin in Rat brain by UPLC-MS/MS.

Soumis à Toxicon

3.1. Résumé

L'annonacine, une Acétogénine d'Annonaceae, est une neurotoxine environnementale présente dans la pulpe de plusieurs fruits de la famille des Annonaceae, dont la consommation a été liée à l'occurrence de parkinsonismes atypiques associés à une démence. Une méthode de quantification dans des homogénats de cerveaux de rats a été mise au point par UPLC-MS/MS en mode « selected reaction monitoring » (SRM). Elle a été développée et validée. Cette méthode a été appliquée à la quantification d'annonacine dans le cerveau d'animaux traités à des doses de 0,5 mg/kg par voie intraveineuse et 10 mg/kg ou 100 mg/kg par voie orale.

3.2. Article

Short Communication – soumis à Toxicon

Quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat brain by UPLC-MS/MS

Natacha BONNEAU[a], Isabelle SCHMITZ-AFONSO[b,‡], Alain BRUNELLE[b], David TOUBOUL[b], Pierre CHAMPY[a,*]

[a] Laboratoire de Pharmacognosie, BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, UFR Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92290, Châtenay-Malabry, France.

[b] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, Université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

[‡] present address: Normandie Univ., COBRA, UMR 6014 and FR 3038; Université de Rouen; INSA Rouen; CNRS, IRCOF, 1 Rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 46 83 56 39. E-mail address: pierre.champy@u-psud.fr

Highlights

- Annonacin is proposed as a food neurotoxin acting upon long-term exposure.
- A quantification method of annonacin in brain homogenates was developed.
- UPLC-MS/MS was used, with an analogue of annonacin as internal standard.
- The method was applied after administration by intravenous and oral route in rats.
- Annonacin appears to have very low distribution in the Rat brain by both routes.

Abstract

The Annonaceous acetogenin annonacin is an environmental neurotoxin identified in the pulp of several fruits of the Annonaceae family, which consumption was linked to the occurrence of sporadic atypical Parkinsonism with dementia. A method for its quantification in Rat brain homogenates by UPLC-MS/MS in selected reaction monitoring (SRM) mode was developed and validated. This method was applied to the quantitation of annonacin in Rat brain after intravenous (0.5 mg/kg) and oral (10 mg/kg, 100 mg/kg) administration.

Keywords: acetogenin, Annonaceae, annonacin, distribution, Rat brain, UPLC-MS/MS.

Abbreviations

AAG: Annonaceous acetogenin; amu: atomic mass unit; CI: confidence interval; EMA: European Medicines Agency; IS: internal standard; i.v.: intravenous; LLOQ: lower limit of quantification; MPTP: 1-methyl-4-phenyl-pyridine; MQC: medium concentration quality control; QC: quality control; RSD: relative standard deviation; s.c.: subcutaneous; SRM: selected reaction monitoring; ULOQ: upper limit of quantification; UPLC-MS/MS: ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

38 Annonaceous acetogenins (AAGs) are lipophilic polyketides distributed in the Annonaceae tropical plant
39 family. Numerous AAGs have been found in several parts of different species (Bermejo et al., 2005),
40 including worldwide consumed fruits like soursop (*Annona muricata* L.), or leaves used as herbal teas
41 in traditional medicine (Champy et al., 2005). AAGs are potent inhibitors of mitochondrial complex I
42 (NADH ubiquinone oxydo-reductase), with IC_{50} ranging from 10 µM to 10^{-4} nM – annonacin, the main
43 AAG in *A. muricata*, reaching about 30 nM in bovine sub-mitochondrial particles (Champy, 2011; Degli
44 Esposti, 1998). These compounds are proposed as pesticidal and antitumoral candidates, among other
45 activities (McLaughlin, 2008) implying non-specific cytotoxicity (Bermejo et al., 2005). Moreover, seeds
46 of species known to contain high amounts of AAGs, like *Annona squamosa* L., have acute toxicity after
47 ingestion and are only used externally in traditional medicine (Champy, 2011). Case-control studies onto
48 unusually high prevalence of atypical parkinsonism in the French West Indies underlined a connexion
49 with dietary and medicinal consumption of soursop and of other Annonaceae (Lannuzel et al., 2007).
50 The disease, named "Guadeloupean parkinsonism", is a combination of parkinsonian symptoms
51 resistant to dopa-therapy, associated with other motor signs and with frontotemporal dementia. It was
52 thoroughly characterized clinically (Lannuzel et al., 2007). Interestingly, neuronal Tau fibrils
53 accumulation was evidenced at the autopsy of three patients (Caparros-Lefèbvre et al., 2002). Related
54 cases associated with Annonaceae were also reported in New-Caledonia (Angibaud et al., 2004). A
55 remarkably similar Parkinson-Dementia Complex was described in the island of Guam, in which the
56 implication of Annonaceae was also proposed (Caparros-Lefèbvre and Steele, 2005). AAGs share the
57 mechanism of action of rotenone, a formerly widely used natural pesticide, which spreading has been
58 forbidden in the European Union since 2008, due to neurotoxicity concern. This molecule is used to
59 elaborate animal models of parkinsonism (Johnson and Bobrovskaya, 2015), like MPTP, another well-
60 known complex I inhibitor. Nevertheless, a complex I dysfunction was observed in idiopathic and atypical
61 parkinsonian patients, bringing consistency to the hypothesis that AAGs could be involved in such
62 neurodegenerative disorders (Schapira, 2010). The hypothetic role of annonacin and of other AAGs in
63 the induction of neurodegeneration and of tauopathies was comforted by *in vitro* (Höllerhage et al., 2009)
64 and *in vivo* experiments. In the Rat, annonacin induced neurodegeneration and neuroinflammation,
65 mostly in the basal ganglia, after subchronic continuous i.v. administration (3.8 and 7.6 mg/kg/day, 28
66 days) despite any sign of systemic toxicity (Champy et al., 2004). A short term treatment by continuous
67 s.c. administration of annonacin at 6 and 9 mg/kg/day during 3 days increased Tau protein accumulation

68 and phosphorylation in Human tau-transfected mice, evidencing synergistic effects between annonacin
69 and the R406W-tau mutation (Yamada et al., 2014). Similar observations were made in wild type and
70 Human tau-transfected mice fed with *A. muricata* juice containing AAGs, over a 1 year-period (Rottscholl
71 et al., 2011, 2015). Recent methodological developments allowed the detection of AAGs in several
72 Annonaceae derived food products (Le Ven et al., 2012, 2014). Annonacin, the most abundant
73 acetogenin in soursop, was also evidenced in high amounts in the paw paw fruit (*Asimina triloba*
74 Dunnal.) which is grown and consumed in North America (Levine et al., 2015; Potts et al., 2012). The
75 dietary human exposure to AAGs was determined as overcoming the mg level for consumption of a
76 single food product (Champy et al., 2005; Levine et al., 2015; Potts et al., 2012). Nevertheless, dietary
77 supplements aiming at cancer prevention containing Annonaceae are gaining popularity in western
78 countries. Dealing with a worldwide-spread alimentary exposure could give another tone to what was
79 initially thought as a local problem. The French Food Safety Agency expressed its concern towards
80 these issues, prompting at pharmacokinetic investigations (AFSSA, 2010). Regarding the
81 aforementioned neurotoxicity of annonacin, getting an insight of its body distribution, especially in the
82 brain after oral administration, appears then to be relevant. The already published methods for the
83 quantification of AAGs in Rat plasma use single ion monitoring HPLC-ESI-MS for the AAG bullatacin
84 (rolliniastatin-2) (Chen et al., 2012), or selected reaction monitoring for annonacin (Bonneau et al.,
85 2015). Our latest study put in light a very weak oral bioavailability for annonacin (Bonneau et al., 2015).
86 We have adapted and validated our UPLC-MS/MS quantitative method to brain homogenate as a
87 different matrix.

88 Annonacin and annonacinone (internal standard, IS) (purity > 97 %) were purified from the seeds of
89 *Annona muricata* L., as previously described (Bermejo et al., 2005). Thirty male Wistar rats (300 ± 20
90 g) were supplied by Charles River (St Quentin-Fallavier, France). Animals were treated according to
91 European Community Council Directive 86/609/EEC. They were fasted with free access to water for 12
92 h before the experiment. Annonacin was administered by intravenous (i.v.; 0.5 mg/kg, n=17) or oral
93 route (10 mg/kg, n=8 or 100 mg/kg, n=5). For i.v. administration, rats were pre-implanted with a catheter
94 in the jugular vein. 300 µL of an annonacin solution prepared in DMSO-ethanol-water (5:5:90, v/v/v)
95 were injected. For oral route, 1 mL of an annonacin solution in DMSO-olive oil (European
96 Pharmacopoeia grade) (5:95, v/v) was delivered by intragastric administration. Eight other rats were
97 used as controls. After administration, animals had free access to food and water. Rats were

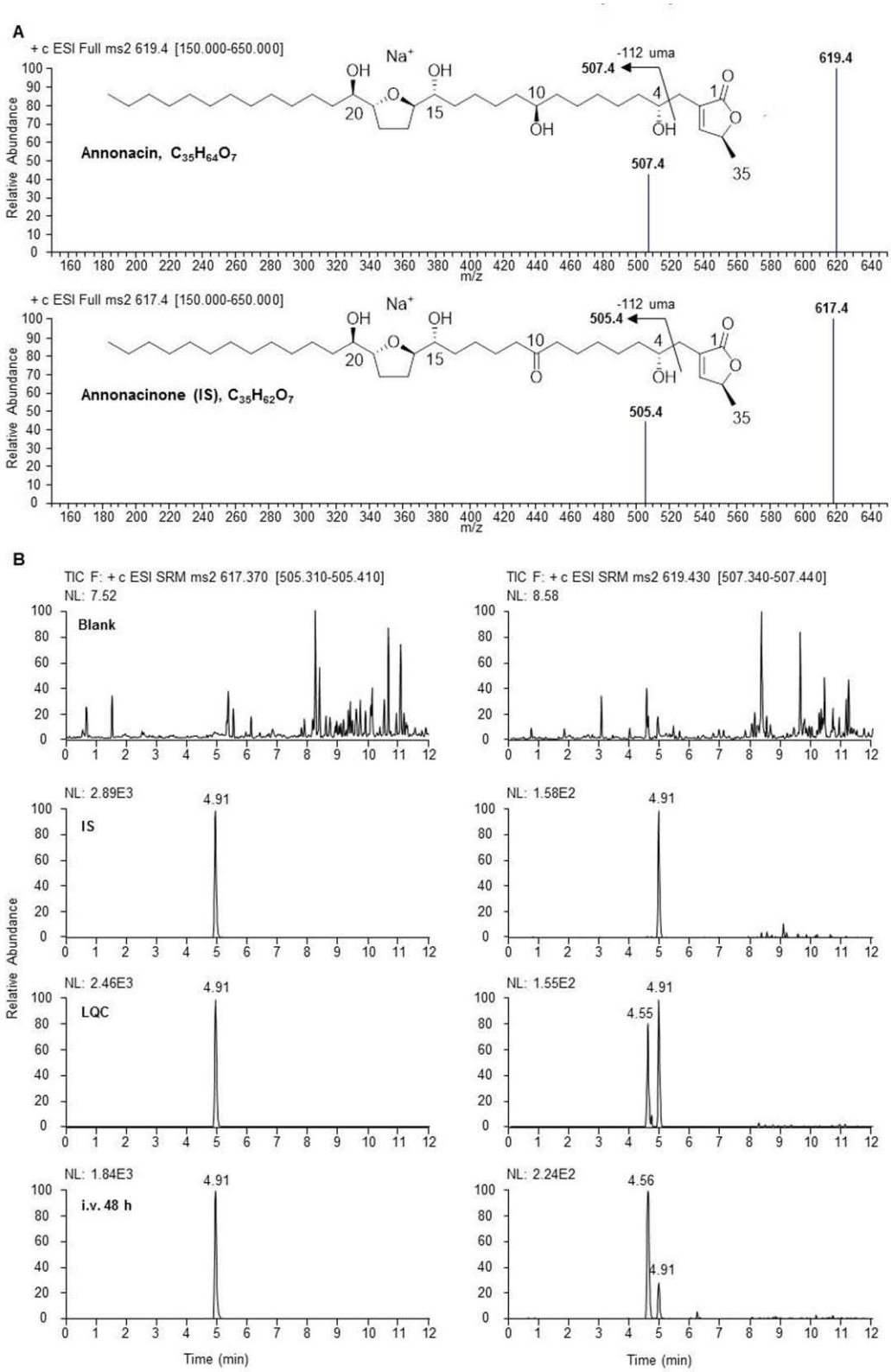
98 anesthetized with 56 mg/kg sodium pentobarbital i.p. and sacrificed by transcardial perfusion, 24 or 48
99 h later. Brains were frozen in dry ice and stored at -20°C until analysis. Each Rat brain was individually
100 sonicated in methanol (0.2 g/mL). An aliquot of each homogenate (1 mL) was transferred in a
101 polypropylene microtube and spiked with 10 µL of IS, then centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes,
102 and the upper phase was transferred into a 5 mL glass tube for evaporation under reduced pressure at
103 40°C with a SpeedVacuum. The residue was reconstituted in 100 µL of acetonitrile by 15 seconds
104 vortex-mixing, and transferred in a polypropylene microtube for a 5 minutes centrifugation step at 10,000
105 rpm. The solution was then transferred in a glass vial, and 5 µL were injected in triplicate for UPLC-
106 MS/MS analysis. Analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 RSLC system equipped with
107 Acquity UPLC BEH C_{18} column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm, Waters, Guyancourt, France) and pre-column
108 (2.1 × 5 mm, 1.7 µm), with an isocratic mobile phase consisting of water-acetonitrile 35:65 during 1
109 minute, then a water-acetonitrile gradient from 35:65 to 15:85 in 5 minutes, at a flow rate of 0.5 mL/min,
110 at 40°C. A 2 minutes isopropanol-acetonitrile 50:50 washout was applied after each run. Mass
111 spectrometry analyses were performed under Selected Reaction Monitoring (SRM) mode using the
112 transitions *m/z* 619.4 → *m/z* 507.4 for annonacin and *m/z* 617.4 → *m/z* 505.4 for IS (Fig. 1A), with a
113 Triple quadrupole TSQ Vantage EMR (Thermo Scientific, Les Ulis, France), equipped with a heated ESI
114 source in the positive ion mode (conditions: see supplementary data). The method was evaluated for
115 selectivity, carry-over, linearity, accuracy, precision, matrix effect, extraction recovery, and stability, and
116 then validated following the EMA guideline on bioanalytical method validation (see supplementary data)
117 (EMA, 2011).

118 A satisfactory linearity (R^2 > 0.990) was obtained for the calibration range with weighted (1/x) least
119 square linear regression, *i.e.* from 0.25 to 25 ng/g using 10 calibration concentrations. The typical model
120 equation was $y = 0.201x - 9.836.10^{-3}$ (R^2 = 0.999), where *y* is the peak area ratio of annonacin to IS and
121 *x* is the concentration of annonacin in the brain (ng/g). Back calculated concentrations of the calibration
122 standards were within ± 15 % of the nominal value and ± 20 % for the lower limit of quantification (LLOQ)
123 of annonacin, which was defined as 0.25 ng/g. Quality control (QC) samples at 4 different
124 concentrations, including those corresponding to the LLOQ and the upper LOQ (ULOQ), were prepared
125 at 2 different days, with 3 replicates a day, independently from the calibration standards. Within- and
126 between-run precisions were less than ± 15 %. Moreover, within- and between-run accuracies were less
127 than ± 15 % of the nominal concentration (Suppl. Table S1). A stability study, performed at LLOQ,

128 medium QC (MQC) and ULOQ, showed no loss of annonacin during sample storage and processing

129 (Suppl. Table S4).

130



131

132 **Fig. 1. A**) Fragment ion mass spectra of $[M+Na]^+$ annonacin and annonacinone molecules cationized
133 by sodium (IS). **B**) Chromatograms showing from top to down: blank brain homogenate; IS-spiked
134 homogenate; LQC in homogenate; brain sample 48 h after i.v. administration (10 mg/kg), spiked with
135 IS; Left column: MS^2 of *m/z* 617.4 ion; Right column: MS^2 of *m/z* 619.4 ion (the [M+2] isotope of IS
136 is also detected).

137

138 The method was applied to the determination of the ratio of annonacin reaching the Rat brain, after
139 intravenous single dose administration of 0.5 mg/kg, and at 24 h and 48 h. A comparison with oral single
140 dose of 100 mg/kg after 24 h was performed. The detection being readily possible under these
141 conditions, further experiments were conducted at a lower oral dose (10 mg/kg) after 48 h. The typical
142 chromatograms are shown in Fig. 1B. These doses were of the same order of magnitude as those used
143 in rodents neurotoxicity models (Champy et al., 2004; Yamada et al., 2014). No sign of acute toxicity
144 was observed. Sacrifice of the animals was performed by transcardial perfusion to ensure blood removal
145 from the brain parenchyma, so as to avoid non-specific detection. The mean concentrations of
146 annonacin in brain, together with the percentages of the administered doses detected in brain are shown
147 in Fig. 2. A very weak proportion of the administered dose was found for each time and route. Only
148 $12.5.10^{-4}$ % and $8.4.10^{-4}$ % of the administered dose was detected in the brain after intravenous
149 administration at 24 h and 48 h, respectively. An even weaker proportion of annonacin administered by
150 oral route was found in brain ($1.1.10^{-4}$ % for 10 mg/kg at 48 h). Given the estimated bioavailability of
151 annonacin (about 3 %) (Bonneau et al., 2015), a weaker proportion was expected, in regard to i.v.
152 administration. It is noteworthy that the proportion of annonacin reaching the brain is homogenous at
153 the two doses used.

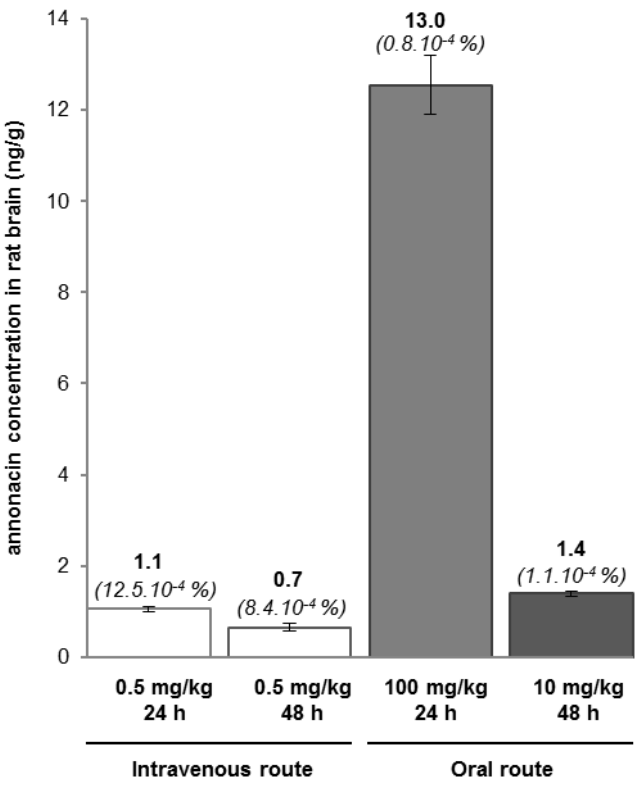


Fig. 2. Quantitation of annonacin in the brain of rats (ng/g), after i.v. administration of 0.5 mg/kg at 24 h (n=7) and 48 h (n=10), and after oral administration at 24 h (100 mg/kg, n=5) and 48 h (10 mg/kg, n=8); Means are expressed with 95 % CI as error bars *(italics: % of the administered dose)*.

Although AAGs have been the center of attention for years in the fields of anticancer drug development and of environmental neurotoxicology, no brain quantitation had been performed yet. Our results show that only a very weak proportion of annonacin is inclined to cross the Blood Brain Barrier, possibly in a passive way (Höllerhage et al., 2009). However, neurodegeneration was reported in rodents treated with doses at the mg/kg level, on a subchronic or chronic basis (Champy et al., 2004; Yamada et al., 2014). A direct extrapolation to Human is obviously impossible, but these findings suggest a low access to the brain parenchyma of Annonaceae consumers. This might explain the apparent low prevalence of atypical Parkinsonism in populations usually relying on these plants. Interestingly, no link between their consumption and dementia or motor impairment was established according to traditional habits records. So far, our measurements do not rule out the etiological hypothesis of an association between AAGs and cases of neurodegeneration.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr V. Domergue and her staff (plateforme AnimEx, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique) and to A. Dubesset, I. Miladi, B. Séon-Méniel and A. Valentin for valuable technical assistance.

Conflicts of interest

The authors declare they have no conflict of interest.

References

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 du 28 avril 2010, AFSSA, Maison-Alfort, 7p.

Angibaud, G., Gaultier, C., Rascol, O, 2004. Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia. Mov. Disord. 19, 603–604. doi: 10.1002/mds.20104

Bermejo, A., Barrachina, I., Estornell, E., Cortes, D., 2005. Acetogenins from Annonaceae : recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. Nat. Prod. Rep. 22, 269–303. doi: 10.1039/B500186M.

Bonneau, N., Schmitz-Afonso, I., Touboul, D., Brunelle, A., Champy, P., 2015. Method development for quantitation of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. J. Chromatogr. B. 1004, 46–52. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.09.039.

Caparros-Lefèbvre, D., Sergeant, N. Lees, A., Camuzat, A., Daniel, S., Lannuzel, A., Brice, A., Tolosa, E., Delacourte, A., Duyckaerts, C., 2002. Guadeloupean Parkinsonism: A cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. Brain 125, 801–811. doi: 10.1093/brain/awf086.

Caparros-Lefèbvre, D., Steele, J., 2005. Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism-dementia complex of Guam, and environmental toxic hypotheses. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19(3), 407-413. doi:10.1016/j.etap.2004.12.052.

Champy, P., Höglinger, G.U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévote, O., Medja, F., Lombès, A., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, E.C., Ruberg, M., 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: Possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. J. Neurochem. 88(1), 63–69. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02138.x.

Champy, P., Melot, A., Guérineau, V., Gleye, C., Fall, D., Höglinger, G.U., Ruberg, M., Lannuzel, A., Laprévote, O., Laurens, A., Hocquemiller, R., 2005. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. Mov. Disord. 20, 1629–1633. doi:10.1002/mds.20632

Champy, P., 2011. Acetogenins from the seeds of the custard apple (*Annona squamosa* L.) and their health outcomes, in: Preedy, V.R., Watson, R.R., Patel, V.B. (Eds.), Nuts and seeds in health and disease prevention. Elsevier, Amsterdam, pp. 429–437. doi:10.1016/B978-0-12-375688-6.10051-9

Chen, Y., Chen, J., Liu, S., Xu, C., Xu, H., Cai, B., Li, X., Ju, W., 2012. Determination of bullatacin in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B 897, 94–97. doi:10.1016/j.jchromb.2012.03.044

Degli Esposti, M., 1998. Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: An overview. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1364, 222–235. doi:10.1016/S0005-2728(98)00029-2.

EMA (European Medicines Agency), 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2), EMA, London, 23 p.

Höllerhage, M., Matusch, A., Champy, P., Lombès, A., Ruberg, M., Oertel, W.H., Höglinger, G.U., 2009. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic tau pathologies. Exp. Neurol. 220, 133–142. doi:10.1016/j.expneurol.2009.08.004.

220 Johnson, M.E., Bobrovskaya, L., 2015. An update on the rotenone models of Parkinson's disease:
221 Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene–environment
222 interactions. Neurotoxicology 46, 101–116. doi:10.1016/j.neuro.2014.12.002

223 Lannuzel, A., Höglinger, G.U., Verhaeghe, S., Gire, L., Belson, S., Escobar-Khondiker, M., Poullain,
224 P., Oertel, W.H., Hirsch, E.C., Dubois, B., Ruberg, M., 2007. Atypical parkinsonism in
225 Guadeloupe: A common risk factor for two closely related phenotypes? Brain 130, 816–827. doi:
226 10.1093/brain/awl347.

227 Le Ven, J., Schmitz-Afonso, I., Lewin, G., Laprévote, O., Brunelle, A., Touboul, D., Champy, P., 2012.
228 Comprehensive characterization of Annonaceous acetogenins within a complex extract by
229 HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap® using post-column lithium infusion. J. Mass Spectrom. 47, 1500–1509.
230 doi: 10.1002/jms.3092.

231 Le Ven, J., Schmitz-Afonso, I., Lewin, G., Brunelle, A., Touboul, D., Champy, P., 2014. Identification of
232 the environmental neurotoxins Annonaceous acetogenins in an *Annona cherimola* Mill. alcoholic
233 beverage using HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap®. J. Agric. Food Chem. 62, 8696–8704. doi :
234 10.1021/jf501174j.

235 Levine, R.A., Richards, K.M., Tran, K., Luo, R., Thomas, A.L., Smith, R.E., 2015. Determination of
236 neurotoxic acetogenins in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit by LC-HRMS. J. Agric. Food Chem. 63,
237 1053–1056. doi:10.1021/jf504500g

238 McLaughlin, J.L., 2008. Paw Paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to
239 commercial products. J. Nat. Prod. 71(7), 1311–1321. doi: 10.1021/np800191t.

240 Potts, L.F., Luzzio, F.A., Smith, S.C., Hetman, M., Champy, P., Litvan, I., 2012. Annonacin in *Asimina*
241 *triloba* fruit: implication for neurotoxicity. Neurotoxicology 33, 53–58.
242 doi:10.1016/j.neuro.2011.10.009

243 Rottscholl, R., Lunow, M., Jainsch, B., de Andrade, A., Respondek, G., Höllerhage, M., Champy, P.,
244 Oertel, W.H., Yamada, E., Höglinger, G.U., 2011 Gene–environment interaction in a mouse
245 tauopathy-model. Basal Ganglia 1, 29.

Rottscholl, R., Lunow, M., Jainsch, B., Respondek, G., Höllerhage, M., Bony, E., Le Ven, J., Guérineau, V., Schmitz-Afonso, I., Champy, P., Borta, A., Oertel, W.H., Yamada, E., Höglinger, G., 2015. The R406W Gene-environment interaction in MAPT transgenic mice chronically exposed to *Annona muricata* L. fruit juice. Submitted to Neurobiol. Aging.

Schapira, A.H.V., 2010. Complex I: Inhibitors, inhibition and neurodegeneration (commentary). Exp. Neurol. 224(10), 331–335. doi:10.1016/j.expneurol.2010.03.028.

Yamada, E.S., Respondek, G., Müssner, S., de Andrade, A.C.F., Höllerhage, M., Depienne, C., Rastetter, A., Tarze, A., Friguet, B., Salama, M., Champy, P., Oertel, W.H., Höglinger, G.U., 2014. Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phophorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. Exp. Neurol. 253,113–125. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.12.017.

Quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat brain by UPLC-MS/MS

Supplementary information

Natacha BONNEAU[a], Isabelle SCHMITZ-AFONSO[b, ‡], Alain BRUNELLE[b], David TOUBOUL[b], Pierre CHAMPY[a,*]

[a] Laboratoire de Pharmacognosie, BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, UFR Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92290, Châtenay-Malabry, France.

[b] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, Université Paris-Saclay, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

[‡] present address: Normandie Univ., COBRA, UMR 6014 and FR 3038; Université de Rouen; INSA Rouen; CNRS, IRCOF, 1 Rue Tesni.re, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 46 83 56 39. E-mail address: pierre.champy@u-psud.fr

1. Selection of IS and UPLC-MS/MS conditions *page 2*

2. Preparation of calibration standards and quality control *page 2*

3. Method validation *page 3*

Table S1. Precision and accuracy for the determination of annonacin concentration in Rat brain (n = 5) *page 4*

Table S2. Evaluation of matrix effect on 3 individual Rat brain homogenates (mean±RSD%) *page 5*

Table S3. Extraction recovery of annonacin and IS (n = 3, mean ± Δ_{max} %). *page 6*

Table S4. Stability of annonacin in Rat brain homogenates (n = 3). *page 6*

Abbreviations *page 7*

References *page 7*

27 **1. Selection of IS and UPLC-MS/MS conditions**

28 Annonacin and other AAGs, including isotope-labeled compounds, are not commercially available.
29 Annonacinone (IS) was therefore selected as an Internal Standard (IS), because of its structural
30 similarity to annonacin, resulting in a similar fragmentation pattern (Allegrand et al., 2010) with the same
31 specific loss of γ-methyl-γ-lactone (-112 amu). Indeed the structure of IS is identical to that of annonacin
32 except for a ketone instead of a hydroxyl-group at C-10 (Fig. 1A). The UPLC-MS/MS analysis conditions
33 were identical to those previously developed for plasma analysis (Bonneau et al., 2015).

34 A full scan MS of annonacin and IS shows that $[M+Na]^+$ ions (*m/z* 619.4 and *m/z* 617.4, respectively)
35 were more abundant than $[M+H]^+$ ions (*m/z* 597.4 and *m/z* 595.4, respectively). Moreover, only non-
36 specific water losses were observed when fragmenting $[M+H]^+$ ions of annonacin and IS, whereas
37 fragmentation of $[M+Na]^+$ ions exclusively led to a specific loss of 112 amu, corresponding to the loss of
38 the lactonic ring. Hence, the SRM mode was used to monitor the transitions *m/z* 619.4 → *m/z* 507.4 and
39 *m/z* 617.4 → *m/z* 505.4, for annonacin and IS, respectively. The [M+2] isotope of IS is also detected
40 when monitoring the transition *m/z* 619.4 → *m/z* 507.4 (Fig. 1B).

41 The source parameters were set as follows: spray voltage 2,000 V, vaporizer temperature 350 °C,
42 sheath gas (N_2) pressure 45 psi (~3.1 bars), auxiliary gas pressure (N_2) 20 psi (~1.4) bar, capillary
43 temperature 300 °C. The collision energies were set at 36 eV and 37 eV for annonacin and for the IS,
44 respectively. The data acquisition and processing were performed using Thermo Scientific Xcalibur 2.1
45 software.

46

47 **2. Preparation of calibration standards and quality control**

48 Stock solutions of annonacin and IS were prepared at the concentration of 1 mg/mL in methanol and
49 stored at - 20 °C. Working standard solutions of annonacin ranging from 5 to 500 ng/mL were prepared
50 daily by successive dilutions of a stock solution in methanol. The stock solution of IS was diluted daily
51 to prepare a working solution at the concentration 100 ng/mL.

52 The calibration standards were prepared by spiking 1 mL of pooled rat brain homogenate obtained by
53 sonication in methanol (0.2 g/mL) with 10 µL of IS working solution to reach the concentration of 5 ng/g

54 and with 10 µL of annonacin in solution of appropriate concentration, to reach 0.25; 0.375; 0.5; 1; 2.5;
55 3.75; 5; 10; 12.5; and 25 ng/g concentrations, respectively. In order to evaluate intra- and inter-day
56 precisions and accuracy, Quality Control (QC) samples were prepared in brain homogenate at the
57 concentrations of 0.25; 0.5; 5; 25 ng/g.

58

59 **3. Method validation**

60 The method was evaluated for selectivity, carry-over, linearity, accuracy, precision, matrix effect,
61 extraction recovery, and stability, and validated according to the EMA guideline on bioanalytical method
62 validation (EMA, 2011).

63 *3.1. Selectivity*

64 Selectivity was evaluated on individual brain homogenates. The method was considered selective
65 (absence of interfering component in the matrix) when the response areas at the retention times of
66 annonacin and of IS were respectively less than 20 % of the lower limit of quantification (LLOQ) for
67 annonacin, and less than 5 % for IS. For the different blank matrices tested, no interfering compound
68 was detected at the expected retention times of annonacin and IS.

69 *3.2. Carry-over*

70 Carry-over was evaluated in a blank analytical run following the injection of the upper limit of
71 quantification (ULOQ). It was considered there was no carry-over when the response areas at the
72 retention times of annonacin and of IS were respectively less than 20 % of the LLOQ for annonacin and
73 less than 5 % for IS. No carry-over was observed during the analysis, as assessed after injection of
74 annonacin at ULOQ, neither for IS at working concentration.

75 *3.3. Calibration curve and lower limit of quantification (LLOQ)*

76 A calibration curve was designed to cover the expected range of concentration for brain samples.
77 Calibration curves were prepared for each run of analysis, plotting the peak area ratio y of annonacin to
78 IS as a function of the nominal concentration of each calibration level x and then fitted by linear
79 regression. The LLOQ was defined as the lowest concentration in the calibration curve with a back
80 calculation accuracy expressed as relative error within ± 20 % and a precision within ± 20 %. The

81 calibration curves were accepted when back calculated concentrations of the calibration standards were
82 within ± 15 %.

83 *3.4. Accuracy and precision*

84 Accuracy and precision were evaluated at 4 concentration levels, including LLOQ (0.25 ng/g), low (LQC;
85 0.5 ng/g), medium (MQC; 5 ng/g) and ULOQ (25 ng/g), with 3 replicates a day, and at two different days.

86 Quality control (QC) samples at 4 different concentrations, including LLOQ and ULOQ, were prepared
87 at 2 different days, with 3 replicates a day, independently of the calibration standards. Within- and
88 between-run precisions were less than ± 15 %. Moreover, within- and between-run accuracies were less
89 than ± 15 % of the nominal concentration (Table S1).

90

91 **Table S1.** Precision and accuracy for the determination of annonacin in Rat brain (n = 3).

	Within-run			Between-run		
concentration	precision	accuracy %		precision	accuracy %	
(ng/g)	(RSD %)	mean	±SD	(RSD %)	mean	±SD
0.25	10.0	113.9	8.0	9.0	114.3	10.3
0.50	5.8	105.8	7.9	5.6	102.6	5.8
5	8.3	93.1	1.1	3.3	100.6	9.0
25	3.4	90.1	4.5	14.0	100.2	11.4

92

93 *3.5. Matrix effect*

94 The matrix effect was investigated by comparison of the peak areas of post-extraction spiked samples
95 at LLOQ and ULOQ, in 3 individual homogenates samples *versus* standard solutions of the same levels.
96 This was performed in triplicate on each homogenate. IS-normalized matrix factor (IS-MF) was
97 calculated. The matrix effect was considered acceptable if the RSD of IS-MF obtained from the 3
98 individual rat brains was less than 15 %.

99 A high absolute matrix effect was observed, with signal enhancement for both annonacin and IS. High
100 relative matrix effect was observed at the LLOQ and ULOQ (Table S2). Despite these differences, IS-
101 relative matrix factor evaluated on 3 different brain samples was within 15 % at each concentration.

102

103 **Table S2.** Evaluation of matrix effect on 3 individual Rat brain homogenates (mean±RSD%)

n = 3 individual brain homogenates	Conc. (ng/g)	Matrix Factor %		IS normalized Matrix Factor %	
		mean	±RSD	mean	±RSD
annonacin	0.25	502	6	294	6
	25	279	13	148	4
IS	5	171	4		

104

105

106 *3.6. Extraction recovery*

107 The extraction recovery was evaluated by comparison of the peak areas of extracted samples *versus*
108 post-extraction spiked samples at LLOQ and ULOQ, in triplicate. Recovery for annonacin relative to IS,
109 as well as absolute recoveries for annonacin and IS are presented.

110 The extraction recovery was evaluated at LLOQ, and ULOQ, in triplicate (Table S3). Absolute recovery
111 was very low. However, the relative recovery was reproducible, with a maximal error of 15 %, calculated
112 as:

113 $$\Delta_{(BE/PE)} = 100*(mean_{PE}*SD_{BE}+mean_{BE}*SD_{PE})/(mean_{PE})^2$$

114 where BE is the area before extraction and PE the area after extraction.

115

116 **Table S3.** Extraction recovery of annonacin and IS (n = 3, mean ± Δ_{max} %).

n = 3	Concentration (ng/g)	Absolute recovery %		Relative recovery %	
		mean	$\pm\Delta_{max}$	mean	$\pm\Delta_{max}$
Annonacin	0.25	5.0	1.2	56.2	7.8
	25	10.7	1.5	66.1	4.2
Annonacinone	5	7.2	2.6		

117

118 *3.7. Stability*

119 The stability of annonacin during sample processing and storage was evaluated in triplicate at room
120 temperature during 4 h, under three freeze-thaw cycles, and during 24 h on the autosampler at 4 °C.

121 The stability study was performed in triplicate at three concentration levels. LLOQ, MQC and ULOQ
122 were within ± 15 % of their nominal concentration, showing no loss of annonacin during the process
123 (Table S4).

124

125 **Table S4.** Stability of annonacin in Rat brain homogenates (n = 3).

n = 3	Concentration (ng/g)	% of nominal concentration	
		mean	±SD
4 h RT	0.25	110	7
	25	93	3
3 cycles -20 °C - RT	0.25	108	5
	25	92	5
24 h autosampler 4 °C	0.25	102	2
	25	91	1

126

127

128 **Abbreviations**

129 AAG: Annonaceous acetogenin; amu: atomic mass unit; EMA: European Medicines Agency; IS: internal
130 standard; LLOQ: lower limit of quantification; MF: matrix factor; MQC: medium concentration quality
131 control; QC: quality control; RSD: relative standard deviation; SRM: selected reaction monitoring; ULOQ:
132 upper limit of quantification; UPLC-MS/MS: ultra-performance liquid chromatography tandem mass
133 spectrometry.

134

135 **References**

136 Allegrand, J., Schmitz-Afonso, I., Guérineau, V., Giuliani, A., Le Ven, J., Champy, P., Touboul, D.,
137 Laprévote, O., 2010. Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high
138 and low collision energy. Rapid Commun. Mass Spectrom. 24, 3602–3608. doi:
139 10.1002/rcm.4805.

140 Bonneau, N., Schmitz-Afonso, I., Touboul, D., Brunelle, A., Champy, P., 2015. Method development for
141 quantitation of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC-MS/MS and its
142 application to a pharmacokinetic study. J. Chromatogr. B. 1004, 46–52. doi:
143 10.1016/j.jchromb.2015.09.039.

144 European Medicines Agency, 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation
145 (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2), EMA, London, 23 p.

146

3.3. Commentaires

3.3.1. Plan d'expérience

L'annonacine a été dosée dans le cerveau des rats impliqués dans l'étude de biodisponibilité, ainsi que dans ceux sur lesquels les tests de doses avaient été effectués. En l'absence d'un nombre suffisant de réplicats à 75 mg/kg *per os* et 0,2 mg/kg i.v., les résultats de ces doses n'ont pas été exploités. En outre, l'un des rats traités à 10 mg/kg par voie orale a été exclu des résultats présentés dans la mesure où une perte de poids supérieure à 10 % a été observée chez cet animal. Les données obtenues sont représentées **Figure 31**. Tous les animaux ont subi une perfusion transcardiaque au moment du sacrifice.

3.3.2. Développement de la méthode

Les échantillons ont été préparés par précipitation protéique dans le MeOH.

La méthode UPLC-MS/MS est identique à celle présentée section 2.3.2.2.

L'adaptation de la méthode utilisée précédemment à une matrice différente a nécessité une validation de même nature. Cependant, du fait de la difficulté à se procurer de l'homogénat de cerveau, l'évaluation de la répétabilité a été réduite à 2 jours au lieu de 3, et 3 réplicats d'extraction par concentration au lieu de 5. L'effet matrice a également été évalué sur 3 cerveaux uniquement.

3.3.3. Résultats-discussion

La méthode développée a permis de quantifier l'annonacine dans le cerveau des rats traités.

Les quantités exprimées en ng d'annonacine par ng de cerveau étaient de : 1,1 ng/g (IC_{95}=0,12) ; 0,7 ng/g (IC_{95}=0,17) ; 13 ng/g (IC_{95}=1,27) 1,7 ng/g (IC_{95}=0,52), pour respectivement des prélèvements effectués 24 h après administration de 0,5 mg/kg i.v., 48 h après administration de 0,5 mg/kg i.v., 24 h après administration de 100 mg/kg p.o., 48 h après administration de 10 mg/kg p.o.

Les rapports entre les quantités dosées dans les cerveaux et administrées étaient très faibles pour chacune des 2 voies (**Figure 31**), de l'ordre de 10^{-6} pour la voie i.v., et 10^{-7} pour la voie orale. Une différence significative est à noter entre les proportions à 24 et 48 h pour la voie i.v., allant dans le sens d'une diminution de concentration.

De façon intéressante, les proportions obtenues après administration par voie orale de 10 et 100 mg/kg sont du même ordre de grandeur, ce qui suggérerait une proportionnalité entre les doses administrées et quantifiées. Cependant les données ne sont pas directement comparables au vu des temps de prélèvement différents.

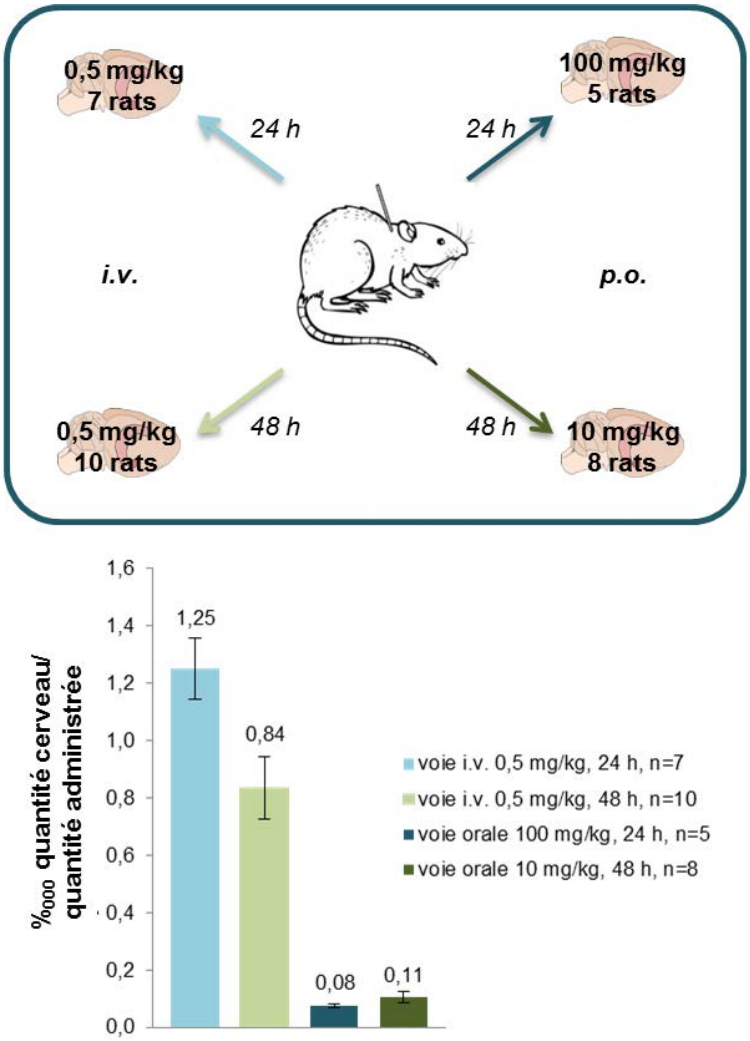


Figure 31 : a) Dosage de l'annonacine dans le cerveau de Rat, nombre d'individu par dose, temps de prélèvement, et voie d'administration. b) Proportion d'annonacine administrée retrouvée dans le cerveau des rats (barre d'erreur : IC_{95}).

Au vu de la biodisponibilité de 3 % estimée précédemment (**article 1**), on s'attendrait à des quantités dosées pour la voie orale encore inférieures à celles obtenues. Cependant pour davantage d'information concernant la distribution dans le cerveau, l'étude devrait être complétée par des temps de prélèvements et doses supplémentaires pour chacune des 2 voies.

4. Conclusion

La mise au point de méthodes dotées d'une très grande sensibilité a permis de procéder au dosage de l'annonacine dans le plasma et le cerveau de Rat. Une première estimation de la biodisponibilité d'une acétogénine a ainsi pu être donnée, celle-ci s'élevant à environ 3 % pour l'annonacine après administration *per os*. De même, l'annonacine a pu quantifiée pour la première fois dans le cerveau, bien que sa détection ait déjà été mentionnée lors d'expériences de neurotoxicité. Ces résultats ont mis en évidence une très faible proportion d'annonacine dans le cerveau après administration unique. Les données obtenues sur les quantités dans le plasma et le cerveau ont été comparées, cependant aucune corrélation de dose à temps de prélévements identiques n'a été trouvée. Ceci est dû en partie au fait que peu de données étaient disponibles à 48 h pour la voie orale, la concentration d'annonacine étant la plupart du temps inférieure à la limite de quantification. Concernant la voie i.v., les variations sont trop importantes pour relier de façon linéaire les concentrations plasmatiques et cerébrales. Pour compléter les applications des méthodes développées, le nombre de doses testées devrait être augmenté dans le but obtenir davantage d'informations sur la biodisponibilité. En outre une étude de distribution à des temps de prélèvements différents pourrait être menée.

Chapitre 3 : Exposition alimentaire aux acétogénines : étude qualitative et quantitative d'extraits de pulpes du genre *Annona*

1. Introduction 117

2. Article 3 : Le fruit d'*Annona squamosa* comme source potentielle de neurotoxines : de la quantification de la squamocine à la description d'acétogénines d'Annonaceae par analyse LC-MS/MS 119

2.1. Résumé 119

2.2. Article 119

2.3. Commentaires 173

2.3.1. Développement de méthode MS/MS 173

2.3.2. Traitement des données 179

3. Article 4 : Quantification globale d'AAGs par RMN quantitative : application à des extraits de pulpes d'*Annona muricata* 181

3.1. Résumé 181

3.2. Article 181

3.3. Commentaires 207

4. Recherche d'acétogénines dans la pulpe d'*Annona reticulata* 209

5. Perspectives : descriptif comparé d'AAGs présentes dans les pulpes de fruits de plusieurs espèces du genre *Annona*. 210

6. Conclusion 212

1. Introduction

Dans le cadre de notre problématique d'estimation de l'exposition potentielle aux acétogénines par le biais de l'alimentation, plusieurs orientations ont été suivies. Nous nous sommes d'une part intéressés à des aspects quantitatifs sur extraits bruts, en utilisant une méthodologie déjà bien connue pour ce type de molécules (CLHP-UV), et nous avons d'autre part développé une méthode originale permettant l'estimation de la quantité totale d'AAGs (quantification par RMN). Par ailleurs, des aspects qualitatifs ont été abordés par la description d'AAGs présentes dans ces extraits, s'inspirant d'une méthodologie développée antérieurement sur un appareillage différent. La pulpe de fruits de plusieurs lots d'origines diverses et d'espèces différentes ont été étudiées. Les intérêts et limites de chaque méthode sont discutés dans les introductions des **articles 3** et **4**. Dans les articles suivants, deux molécules principales ont été utilisées comme références pour le développement de méthodes : l'annonacine et la squamocine, dont le mode d'obtention et les données spectrales sont indiqués dans l'**Annexe 3**. Elles ont été choisies pour la mise au point de la quantification en RMN comme représentantes des deux sous-types les plus courants d'AAGs : sous-types 1a et 1b (**article 3**) ; mais également en spectrométrie de masse pour optimiser la détection des ions parents et des fragments générés par CID, afin d'obtenir des informations sur deux types et sous-types d'acétogénines différentes (**article 4**), qui plus est, majoritaires dans les espèces *muricata* et *squamosa* étudiées.

La quantification par LC-UV de l'acétogénine majoritaire dans plusieurs lots de fruits d'*Annona squamosa* est présentée dans l'**article 3**. Y sont également annotées, à la suite d'analyses par CLHP-ESI-Q-TOF, les AAGs s'ionisant avec le plus d'intensité. Ces expériences ont été réalisées avec le concours de Lamia Baloul qui a procédé à la quantification de la squamocine en CLHP-UV au cours de son stage de M2.

Le développement d'une méthode de routine en ^{1}H RMN pour la quantification d'AAGs totales dans un extrait est exposé dans l'**article 4**, appliqué à des extraits bruts issus de fruits d'*Annona muricata*. Les expériences menées dans ce cadre sur l'appareil à champs 400 MHz ont été réalisées par Jean-Christophe Jullian. Timothé Cynober a préparé les échantillons pour l'analyse RMN en routine au cours de son stage de M1.

Les premières données et perspectives d'application à d'autres espèces du genre *Annona* sont également présentées brièvement.

2. Article 3 : Le fruit d'*Annona squamosa* comme source potentielle de neurotoxines : de la quantification de la squamocine à la description d'acétogénines d'Annonaceae par analyse LC-MS/MS

The fruit of Annona squamosa *L. as a source of environmental neurotoxins:*

From quantification of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis

Running title: Annonaceous acetogenins in the fruit of Annona squamosa

En preparation pour Food Chemistry.

2.1. Résumé

Les acétogénines d'Annonaceae (AAGs) sont des neurotoxines potentiellement responsables de parkinsonismes atypiques associés à des démences, par la consommation de fruits comestibles d'Annonaceae. Elles ont été identifiées dans des produits dérivés de fruits de plusieurs espèces d'*Annona*, mais il est encore incertain qu'*A. squamosa* L. (pomme cannelle), une espèce largement cultivée, présente un risque. Nous rapportons ici l'identification de la squamocine dans des pulpes de fruits en provenance d'Asie, des Caraïbes et de l'Océan Indien. La squamocine a été quantifiée par CLHP-UV, avec des teneurs variant de 13,5 à 36,4 mg/fruit. L'analyse de la composition des pulpes s'est poursuivie par CLHP-ESI-Q-TOF, menant à une description plus complète des AAGs en présence ; aboutissement d'un développement de méthode effectué à l'aide de quatre AAGs utilisées comme molécules de référence. Vingt-cinq formules brutes d'AAGs ont été retrouvées. Les principales acétogénines ont été décrites, dont la bullatacine (rolliniastatine-2) et l'annonacine. Cette étude met en évidence une certaine homogénéité concernant les principales AAGs retrouvées mais aussi des disparités au sein d'une même espèce, et montre que la consommation d'*A. squamosa* devrait être considérée comme un facteur de risque pour les troubles neurodégénératifs.

2.2. Article

Manuscript for submission to *Food Chemistry*

The fruit of *Annona squamosa* L. as a source of environmental neurotoxins: From quantification of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis.

Running title: **Annonaceous acetogenins in the fruit of *Annona squamosa***

Natacha BONNEAU, Lamia BALOUL, Idensi BAJIN BA NDOB [a], François SÉNÉJOUX [b], Pierre CHAMPY*

Affiliation: Laboratoire de Pharmacognosie, BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, UFR Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92290, Châtenay-Malabry, France.

a. *Present address*: Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelles (IPHAMETRA), CENAREST, Libreville, BP26641, Gabon.

b. *Present address*: Laboratoire de Pharmacognosie, Equipe ECREIN. UMR 1019 INRA-UDA, Faculté de Pharmacie, Université d'Auvergne, 28 Place Henri Dunant BP 38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 46 83 56 39; Fax: +33 1 46 83 55 99; E-mail address: pierre.champy@u-psud.fr

Abstract

Annonaceous acetogenins (AAGs) are neurotoxins possibly responsible for atypical Parkinsonism / dementia clusters, *via* the consumption of edible Annonaceae fruits. They were firmly identified in fruit-derived products from several *Annona* species, but it is unclear whether the widely cultivated species *Annona squamosa* L. (custard-apple) is at risk. We here report the unambiguous identification of squamocin in pulps from Asia, the Caribbean and Indian Ocean. It was quantified by HPLC-UV, evidencing a content of 13.5 to 36.4 mg/fruit. Pulps were further investigated by HPLC-ESI-Q-TOF, towards a global description of AAGs, with methodological development using 4 representative standards. AAGs with 25 different raw formulas could be detected. The main AAGs were annotated, including bullatacin (rolliniastatin-2) and annonacin. This study evidences homogeneity for the main AAGs, as well as some discrepancies within the species, and shows that *A. squamosa* shall be considered as a risk factor for neurodegenerative disorders.

Highlights

- The neurotoxins Annonaceous acetogenins (AAGs) were detected in the fruit of *A. squamosa*.
- Squamocin was unambiguously determined as the main AAG, whatever the geographical origin.
- A valid quantification of squamocin evidenced significant exposure of consumers.
- A method was set for annotation of the main AAGs, using HPLC-ESI-Q-TOF.
- Common features and variations and in qualitative composition are depicted.

Abbreviations:

AAG: Annonaceous acetogenin; amu: atomic mass unit; CID: Collision Induced Dissociation; EIC: Extracted Ion Chromatogram; HPLC-MS/MS: High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification; RSD: Relative standard deviation; Rt: Retention time; THF: Tetrahydrofuran; TIC: Total Ion Current.

Keywords: *Annona squamosa* L.; Annonaceous acetogenins; Annonacin; Atypical Parkinsonism; Bullatacin; HPLC-MS/MS; Squamocin.

1 Introduction

According to cases-control studies, the consumption of *Annona* fruits and herbal teas has been linked to atypical forms of Parkinsonism / dementia in the French West Indies, which were mirrored in other tropical areas (Caparros-Lefèbvre and Elbaz, 1999; Caparros-Lefèbvre et al., 2002; Caparros-Lefèbvre and Steele, 2005; Lannuzel et al., 2007). Annonaceous acetogenins (AAGs), a group of lipophilic molecules distributed in the Annonaceae family, are suspected to be involved (Champy, 2008). To date, more than 450 AAGs were described, all displaying homogeneous structures (Bermejo et al., 2005). These molecules are generally constituted of 35 or 37 carbon atoms, with an oxygenated aliphatic chain bearing a terminal butyrolactone. Their classification, as established by Cavé *et al*. (1997), relies on their main structural features, with types depending on the number of THF rings on the aliphatic chain, and sub-types defined by the structure of the lactonic ring. They most commonly belong to the A-type (mono-THF AAGs) and to the B-type (adjacent bis-THF AAGs). The main sub-types are the sub-type 1a for an α,β-unsaturated γ-methyl-γ-lactone, and the sub-type 1b when this lactone is associated with a hydroxyl-group on the C-4 position. AAGs display a broad range of activities, relying on non-specific cytotoxicity, due to a strong inhibitory potency against mitochondrial complex I (NADH ubiquinone oxydo-reductase) in the respiratory chain. Structure-activity relationships of AAGs for this target have been thoroughly explored, concluding to a tendency of higher potency for B-type and 1b sub-type (Bermejo et al., 2005). Interestingly, additional protein targets have been proposed using fluorescent analogues of the AAG squamocin (B-type, sub-type 1a), whose specific addressing to the mitochondrial membrane could be evidenced (Derbré et al., 2005, 2008). Several AAGs, including squamocin, have been found to decrease ATP levels, to induce neuronal cell death and to cause tau protein redistribution in neuronal primary cultures (Höllerhage et al., 2009). Moreover, annonacin (A-type, sub-type 1b), which was identified as the main AAG in *Annona muricata* L. (soursop), proved to be neurotoxic in rodents and to trigger tau-pathology upon subchronic exposure (Champy et al., 2004; Yamada et al., 2014). Since evidences of possible neurotoxic long-term effects in Human were put to light, estimation of exposure to AAGs raised the attention of several research groups. Being already largely described in leaves and other parts of the *Annona* trees, AAGs were also reported in the edible fruit pulps of *A. muricata* and *Asimina triloba* (L.) Dunal, along with quantitative estimations (Champy et al., 2005; Levine et al., 2015; Potts et al., 2012). Composition in AAGs of some *Annona*-derived

77 food products have been described (Champy et al., 2009; Le Ven et al., 2012, 2014), evidencing mainly
78 C_{35} AAGs for the species *A. muricata* and *A. cherimolia*. Squamocin is one of the main AAGs in *Annona*
79 *squamosa* L. (Bermejo et al., 2005) and was reported in high amounts in the seeds of this species (Champy,
80 2011; Yang et al., 2009). If the presence of AAGs in *A. squamosa* fruit pulp yielded scarce and limited
81 reports (Bonneau et al., 2012; Champy et al., 2008; Höllerhage et al., 2015), precise identification,
82 unambiguous quantitative data and insight on possible variabilities are still acutely needed. We here studied
83 the fruit pulp of *A. squamosa* using four batches from different cultivation areas. The identification of
84 squamocin and its quantification using a robust method with the requisite validation are presented, as well
85 as a methodological development in HPLC-MS/MS with post-column infusion of Lithium (Le Ven et al.,
86 2012), allowing an overview on the variety of AAGs in the batches studied, as well as a description of the
87 main representatives of this molecular series.

88

89 2 Material and methods

90 *2.1 Chemical and reagents*

91 Standards (see Figure 2) were isolated in-house (purity > 97 %), under previously described conditions
92 (Bermejo et al., 2005), from the seeds of *Annona muricata* L. for annonacin (**1**) and annonacinone (**2**), of
93 *Annona bullata* A.Rich. for bullatacin (**3**), and of *Annona squamosa* L. for squamocin (**4**) . Methylene
94 chloride, methanol and acetonitrile (HPLC-grade) were supplied by CarloErba SDS (Val de Reuil, France).
95 Lithium iodide (LiI) was provided by Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Ultra-pure water was
96 prepared in-house with a Millipore Milli-Q purification system (Darmstad, Germany).

97 *2.2 Plant material*

98 Four distinct batches (A-D) of *Annona squamosa* L. fruits were directly obtained from food retailers. Places
99 of origin (country, region), of purchase and months of harvest respectively were: batch A: Thailand (4 fruits;
100 Asian foodstore, France; January); batch B: Mauritius island (Indian Ocean; 1 fruit; local fruit market;
101 March); batch C: Martinique (French West Indies; 1 fruit; local fruit market; March); batch D: Vietnam (4

102 fruits; Rungis market, France; February). Fruit pulps were carefully separated from the seeds and pericarp,
103 and then air-dried before powdering. Their water content was comprised between 79 and 81 %.

104 ***2.3 Crude extracts***

105 Crude extracts were obtained by 3 successive macerations (3 hours each) of dried pulp powders in distilled
106 CH_2Cl_2 (10 % m/v), under agitation at room temperature, followed by filtration and reduction to dryness
107 under reduced pressure. Yields were 0.19 (batch A), 0.25 (batch B), 0.22 (batch C) and 0.13 % (batch D)
108 in regard to fresh material.

109 ***2.4 Sample preparation and standards solutions***

110 Solutions of crude extracts were prepared at the concentration 10 mg/mL in MeOH for LC-UV quantification.
111 Five µL were injected for analysis (4 repeats). Solutions of squamocin in methanol were prepared from
112 $4.2.10^{-7}$ to 5.10^{-4} M for LOQ and LOD determination, and at 5.10^{-6}, 1.10^{-5}, 5.10^{-5}, 1.10^{-4} and 5.10^{-4}, 1.10^{-3}
113 and $1.5.10^{-3}$ M for LC-UV calibration curve. Injection volume was 5 µL. Four repeated injections intercalated
114 with blank injections were performed for each concentration, with increasing concentrations. For LC-MS/MS
115 annotation, stock solutions (1 mg/mL) of each standard were prepared in MeOH and stored at 4°C until
116 dilution for analysis. Solutions of crude extracts were prepared extemporaneously, at the concentration of
117 1 mg/mL in MeOH. Injection volume was 5 µL. Analysis were performed twice.

118 ***2.5 Chromatographic conditions***

119 *2.5.1 Quantification by HPLC-UV and co-injection with squamocin*

120 Quantification was performed by HPLC-UV recorded at λ = 210 nm. Analytical HPLC apparatus (Waters)
121 was composed of an Autosampler 717 plus, a 1525 binary pump, a 2996 Photodiode Array Detector. Data
122 treatment was performed with Empower Pro® software (2002 Waters Corporation). A C18 Sunfire® Waters
123 column (2.1 × 100 mm, 3.5 µm) was used, fitted with the corresponding C18 Sunfire® Waters pre-column.
124 Column temperature was set at 30°C. Mobile phase consisted of a water (A) / acetonitrile (B) gradient (A/B
125 60:40 → 0:100 in 25 min) followed by 15 min 100 % B washing. Flow-rate was 0.3 $mL.min^{-1}$. For squamocin
126 (**4**) co-injection with pulp extract (see Supplementary Fig. S1), a C18 Sunfire® Waters (4.6 × 150 mm, 5

127 µm) Waters column was used, fitted with the corresponding C18 Sunfire® Waters pre-column. Elution
128 conditions were similar except for a flow-rate at 1 $mL.min^{-1}$.

129 *2.5.2 Annotation by HPLC-MS and co-injection with squamocin*

130 An Agilent Technologies 1260 infinity HPLC chain with DAD detection, linked to a 6530 Accurate-Mass Q-
131 TOF LC/MS equipped with a dual-ESI source was used, in positive mode. Column and conditions were
132 identical with those used for LC-UV analysis (see Section 2.5.1). Fragmentor was set at 180 V. Source
133 parameters were optimized for detection: Gas temperature was set at 325°C, drying gas was 10 L/min,
134 nebulizer was set at 35 psi and Vcap was 4000 V. In targeted MS/MS acquisition mode, acquisition was
135 performed on the mass range *m/z* 100-1700, with a rate of 1 spectra/s. Collision energy was fixed at 70 eV.
136 Untargeted MS/MS was also performed. The parameters of auto-MS/MS mode were set as follows: Max
137 precursor per cycle: 3; Absolute precursor threshold: 10^4; Active exclusion after 3 spectra released after
138 0.2 min. LiI salt, known as a signal enhancer producing valuable fragmentation for AAGs (Le Ven et al.,
139 2012) was infused post-column, at a concentration of 2 mM in MeOH and a flow-rate of 5 µL/min.

140 ***2.6 Data interpretation***

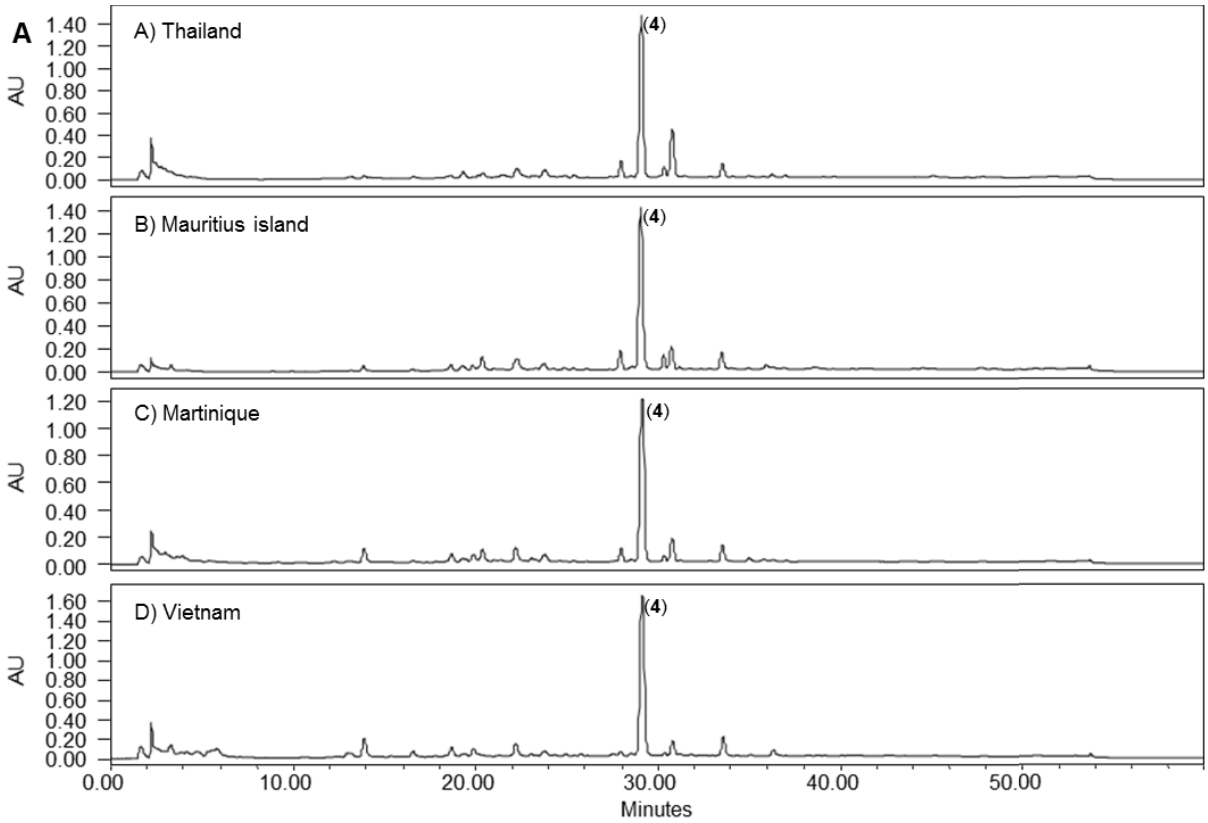
141 Lithium infusion at the used concentration ensured the presence of $[M+Li]^+$ ions for AAGs, as major ions.
142 Based on the homogeneous structures of AAGs, we delimited a range of typical raw formulas corresponding
143 to their most common structural features (Bermejo et al., 2005), i.e. a C_{32} or C_{34} alkyl backbone bearing an
144 α,β-unsaturated-γ-methyl-butyrolactone (sub-type 1), yielding the basal formulas $C_{35}H_{66}O_2$ and $C_{37}H_{70}O_2$.
145 Oxygenated alkyl-chains with a varying degree of insaturation (i.e. adding up to 8 oxygen atoms and
146 decrementing down to 3 H_2 from basic raw formulas) were considered, from $[C_{35}H_{60}O_3+Li]^+$ (535.4697 amu)
147 to $[C_{35}H_{66}O_{10}+Li]^+$ (653.4811 amu) and from $[C_{37}H_{64}O_3+Li]^+$ (563.5010 amu) to $[C_{37}H_{70}O_{10}+Li]^+$ (681.5124
148 amu). These ranges comprised all formulas of the most largely described and commonly found AAGs
149 (Bermejo et al., 2005; Le Ven et al., 2012). Extracted Ion Chromatograms (EIC) (*m/z* ± 2.5 ppm) were
150 obtained for each pulp. For the major hits retrieved, the presence of 1 to 2 acetyl groups (+CH_2CO, i.e.
151 +42.0106 amu each) was then considered, following the same principle. A blank injection performed after
152 injection of crude extract in order to estimate carry-over resulted in intensity of 10^3 for the most prominent
153 traces. Only traces yielding intensity >10^4 were then considered as being significant (See supplementary

154 information). Structural characterization of the major compounds was performed by targeted MS/MS:
155 Losses of CO, CO_2, and H_2O from the molecular ions, displaying a characteristic pattern, confirmed targeted
156 compounds as being AAGs (Allegrand et al., 2010). For assignment of the structural features of targeted
157 AAGs, the nomenclature established by Laprévote and Das (1994) for the fragmentation of AAGs was used:
158 Fragments containing the terminal lactonic ring form the series A, B, C and D; Those containing the terminal
159 CH_3 are named W, X, Y and Z (e.g. disruptions in α-positions of an hydroxyl group yield A and X fragments;
160 see Allegrand et al., 2010; Le Ven et al., 2012; Figure 2).
161

162 # 3 Results and discussion

163 ## *3.1 Detection and quantification of squamocin*

164 Four distinct batches of dried fruit pulp of *A. squamosa* were subjected to successive extractions with
165 CH_2Cl_2, a solvent suitable for the retrieval of AAGs (Bermejo et al., 2005). The four extracts were analyzed
166 by HPLC-UV. Profiles obtained at λ = 210 nm appeared similar, with one prominent peak showing a λ_{max} of
167 210 nm, at Rt = 29.1 min in the conditions used (Figure 1A). Retention time and HPLC-MS/MS analysis
168 (see Sections 3.2, 3.3) suggested this compound to be squamocin (**4**), which was described as the main
169 AAG in the seeds of the species (Champy, 2011). Its identity was confirmed by co-injection of pure
170 squamocin (**4**) with batch A in HPLC-UV (Supplementary Figure S1), then in HPLC-MS (Supplementary
171 Figure S2). In order to quantify this compound, HPLC-UV determination at λ = 210 nm appeared suitable,
172 as a clean baseline easily allowed integration of the corresponding peak. A method was established and
173 validated, using a purified standard. The limit of detection (LOD) was established as the concentration
174 displaying a chromatographic peak with a signal/noise ratio > 3. The limit of quantification (LOQ) was
175 defined as a signal/noise ratio > 10 with an RSD of 4 repeated injections < 15 %. The LOD for squamocin
176 (**4**) was $4.2.10^{-7}$ M and the LOQ was $8.4.10^{-7}$ M. Calibration curve, built by linear regression of the
177 absorbance at 210 nm (*y*) against squamocin (**4**) concentration in M (*x*), was established between 5.10^{-6} to
178 $1.5.10^{-3}$ M and showed a suitable range of linearity (R^2 = 0.999). The amount of squamocin (**4**) ranged from
179 13 to 37.6 mg per fruit, i.e. approximately 180 to 260 mg/kg of fresh pulp (Figure 1B).



B

batch	origin	squamocin content					
		crude extract		**100 g of fresh pulp**		**fruit pulp**	
		µmol /g	mg /g	µmol/100g	mg/100g	µmol/fruit	mg/fruit
A	Thailand	169.7	105.6	32.6	20.3	60.4	37.6
B	Mauritius island	174.3	108.4	42.9	26.7	52.8	32.8
C	Martinique	236.7	147.2	22.9	14.2	12.8	8.0
D	Vietnam	220.6	137.2	49.1	30.5	39.3	24.4

Figure 1. (**A**) HPLC-UV chromatograms recorded at λ = 210 nm, showing the crude extracts of *Annona squamosa* fruit pulp from the 4 batches (1 mg/mL in MeOH). The most intense peak was identified as being squamocin (**4**). (**B**) Squamocin (**4**) contents in the four *A. squamosa* fruit batches, determined by HPLC-UV at λ = 210 nm.

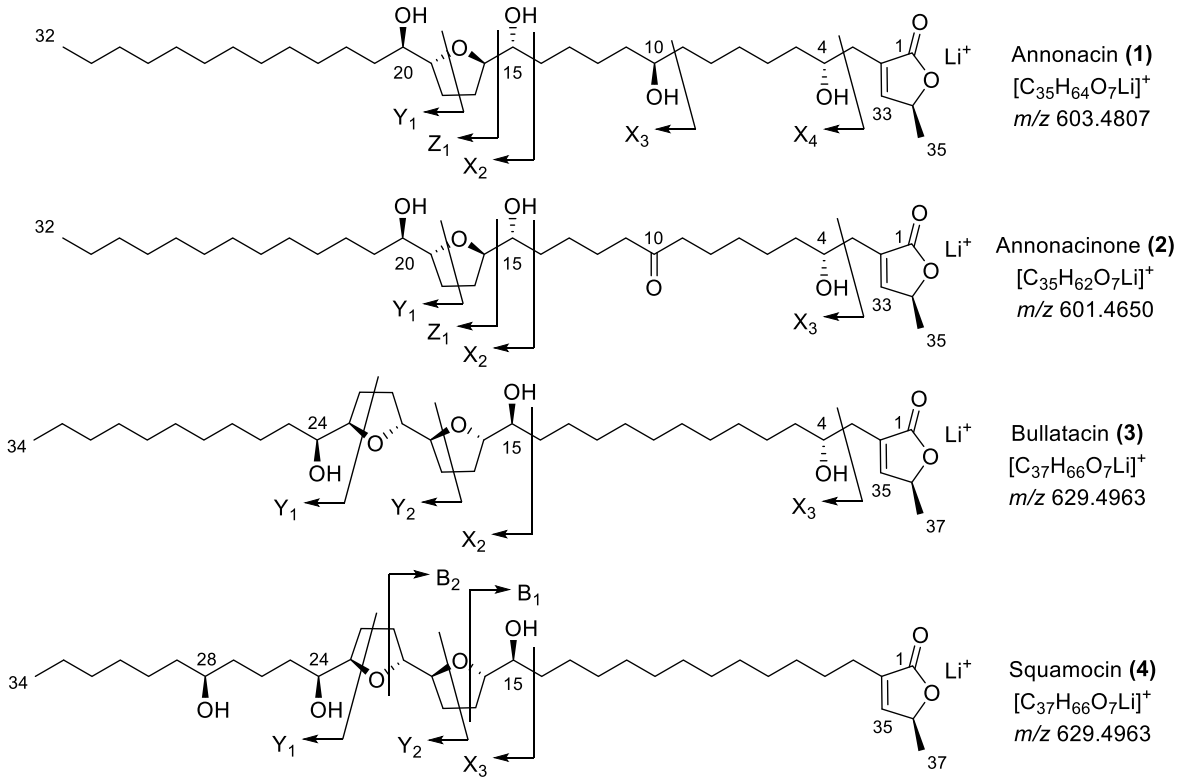
185 ***3.2 MS/MS method development***

186 AAGs are present as complex mixtures in Annonaceae (Bermejo et al., 2005; Gromek et al., 1996; Le Ven
187 et al. 2012). Nevertheless, minor peaks could be observed, beside **4**, on the UV chromatograms at 210 nm,
188 in all the *A. squamosa* batches studied. After quantification of the main AAG, a more thorough description
189 of the overall composition in other AAGs for each batch appeared necessary. A hyphenated technique was
190 then used, coupling HPLC with an ESI-Q-TOF mass spectrometer, which allows precise mass
191 measurements of both parent and product-ions and offers access to informative fragments. Fragmentation
192 optimization was performed first, in order to adapt our previous method with an LTQ-Orbitrap® (Le Ven et
193 al., 2012) to this different type of MS/MS apparatus, more routinely used in control and phytochemistry
194 laboratories. Indeed, differences in generation of fragments and in their relative intensities is reported,
195 depending on the type of spectrometer and fragmentation energy (Allegrand et al., 2010; Le Ven et al.,
196 2012). Towards this aim, representative AAGs standards were chosen, belonging to the most commonly
197 encountered types and sub-types (**1**-**4**; Figure 2). The aim is to differentiate the number and arrangement
198 of THF cycles on the alkyl chain (e.g. A-type, B-type), and the absence or presence of a hydroxyl group in
199 position 4 (sub-types 1a, 1b), which are known to produce characteristic fragments in the presence of
200 lithium. The number and positions of the hydroxyl groups and the size of the alkyl spacer between the
201 lactone and THF cycles are of importance as well, as they also have an influence on complex I inhibitory
202 and neurotoxic potential of AAGs (Bermejo et al., 2005; Höllerhage et al., 2009). Fragmentation
203 experiments were therefore conducted, in chromatographic conditions.

204 In the targeted MS/MS mode, 5 collision energies were tested with annonacin (**1**) (A-type, sub-type 1b) and
205 squamocin (**4**) (B-type, sub-type 1a). Both standards were submitted to Collision Induced Dissociation (CID)
206 at the concentration of 100 ng/mL, from 10 to 50 eV (Supplementary Figure S3). The energy 50 eV
207 displayed the highest absolute and relative abundance for product-ions of informational value, in regard to
208 the determination of types and sub-types. However, in these conditions, some of the expected fragments
209 were missing. Comparative CID was then performed at 50 and 70 eV, at the concentrations 10 and 100
210 µg/mL for both **1** and **4**, injected twice in order to assess the reproducibility of fragmentation. Fragments
211 abundances were about 3 to 7 times higher at 70 eV for each replicate of the 2 tested concentrations

212 (Supplementary Figure S4). The collision energy of 70 eV was therefore chosen for further analysis, with
213 good reproducibility at 10 µg/mL (Figure 3).

214



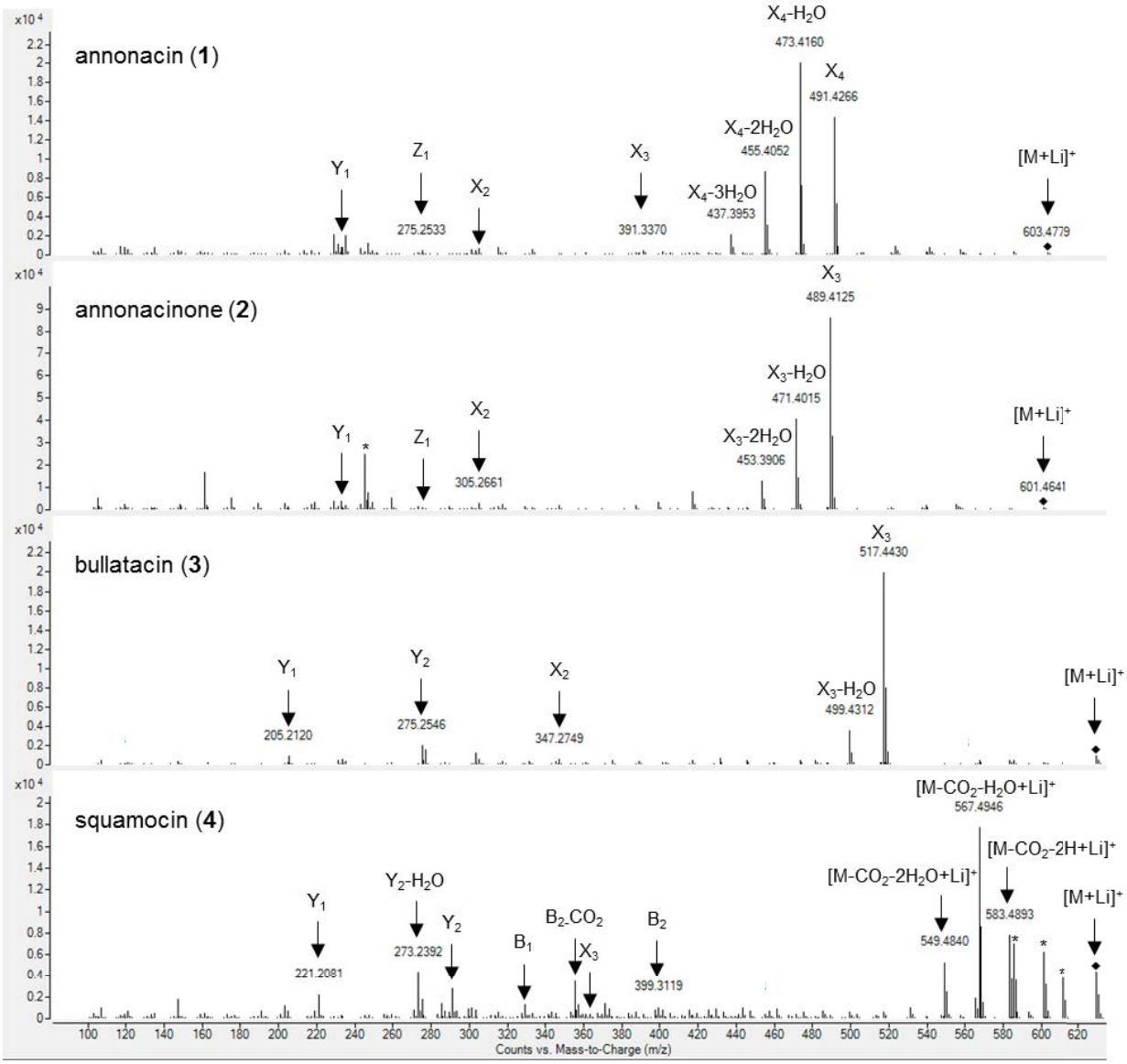
215

216 **Figure 2.** Structures and product-ions of standards (**1**-**4**), as $[M+Li]^+$ adducts.
217 Losses of H_2O, CO and CO_2 are not presented. Full description of the identified fragments, in the
218 conditions used, is presented in Supplementary Tables S1 to S4.

219

220 Using the same collision energy and concentration, the auto-MS/MS mode, tested with four standards (**1**,
221 **4**, annonacinone (**2**) bullatacin (**3**), offered fully informative spectra: AAGs of sub-type 1b (**1**-**3**) yielded the
222 corresponding X4 (or X3, depending on the number of hydroxyls) fragment. AAGs belonging to the A-type
223 (**1**, **2**) yielded Y1, Z1 and X2 ions, while those of the B-type (**3**, **4**) gave Y1, Y2 and X2 (or X3 depending on
224 the number of C terminal hydroxyls) fragments (Figure 2). Worth noticing is that B1 and B2 ions could be
225 observed for squamocin (**4**) (sub-type 1a) but not for bullatacin (**3**) (sub-type 1b) (Figure 3, Supplementary
226 Tables S1- S4). These patterns are quite different from those observed with LTQ-Orbitrap®. Finally,

227 hydroxyl groups located on the CH_3 terminal part of AAGs couldn't be located, as previously reported
228 (Allegrand et al., 2010).



229

230 **Figure 3.** Product-ion spectra obtained for the $[M+Li]^+$ adducts of annonacin (**1**), annonacinone (**2**),
231 bullatacin (**3**) and squamocin (**4**), injected at 10 µg/mL in chromatographic conditions (5 µL), in the
232 auto-MS/MS mode, with CID set at 70 eV. Fragments nomenclature is presented in Figure 2. The
233 full list of fragments (calculated *m/z*, raw formulas, errors on mass measurement, intensity), including
234 those marked by (*), is provided in Supplementary Tables S1 to S4.

235

236

237 In order to get insight on the LOD for informative fragments with an error inferior to 10 ppm, squamocin (**4**)
238 was injected from 0.01 to 10 µg/mL. At the concentration 0.1 µg/mL, only its sub-type could be determined
239 (see Supplementary Figure S3). At 1 µg/mL, each of the informative fragments described at higher
240 concentrations was detected (Supplementary Table S4). The LOD of fragments necessary for the
241 determination of AAGs bearing similar characteristics was therefore considered as being 1 µg/mL. This
242 appears to be a suitable limit for the analysis of crude extracts, at the concentration used (1 mg/mL), in the
243 auto-MS/MS mode, as exemplified in Section 3.3.

244

245 ***3.3 Qualitative analysis of AAGs and annotation***

246 Molecular formulas matching with AAGs were then searched in order to go deeper into the composition of
247 the pulp crude extracts of *A. squamosa* (see Section 2.6). Twenty-five molecular formulas corresponding
248 to AAGs were identified in at least one of the four batches, ten of which were present in every batch
249 (Supplementary Table S5). Among these, the 7 most intense series of parent ions were investigated by
250 targeted (*m/z* 629.4963) or auto-MS/MS, in order to highlight the common features of the fruit, no matter
251 what its origin is. As expected, these molecules all showed the characteristic fragments of AAGs belonging
252 to sub-type 1. The major AAGs for each of these 7 molecular formulas could be fully annotated, despite low
253 intensity of parent ions and problems arising from co-elutions in several cases. Extracted Ion
254 Chromatograms of *m/z* 629.4963, corresponding to the $[M+Li]^+$ adduct of $C_{37}H_{66}O_7$, were the highest in the
255 four batches, all showing 5 main peaks (Figure 4) which were identified as follows: at Rt 21.2 (**5**) min, an
256 isomer of squamocin; at Rt 21.7 min, squamocin (**4**) itself, as previously confirmed by co-injection of the
257 standard with batch A (See Section 3.1, Supplementary Figure S2); at Rt 23.7 min (**6**) and Rt 24.2 min (**7**),
258 bullatacin diastereoisomers; at Rt 24.8 min, bullatacin (**3**) itself (Figures 4 and 5). In this series, the relative
259 amounts of the less abundant AAGs (**5**-**7**) appear variable, depending on the geographical origin.

260

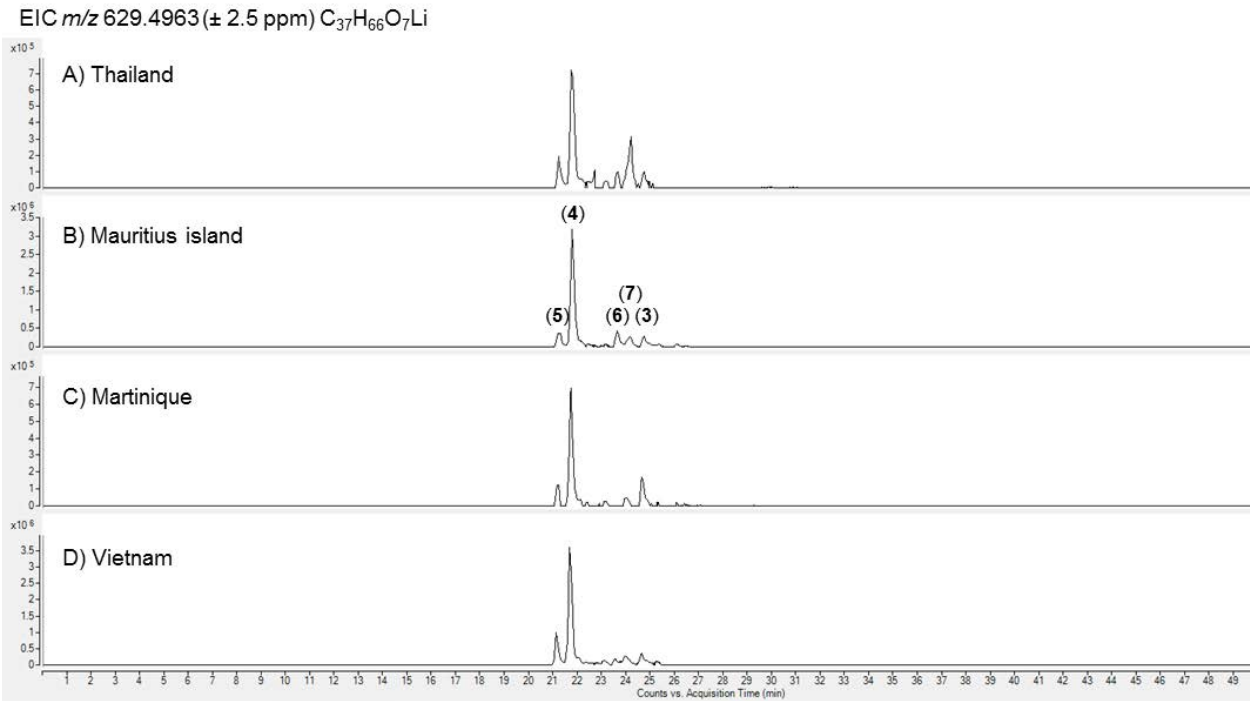


Figure 4. Extracted Ion Chromatograms of *m/z* 629.4963 (± 2.5 ppm; $C_{37}H_{66}O_7Li$) from the four pulp crude extracts of *A. squamosa*.

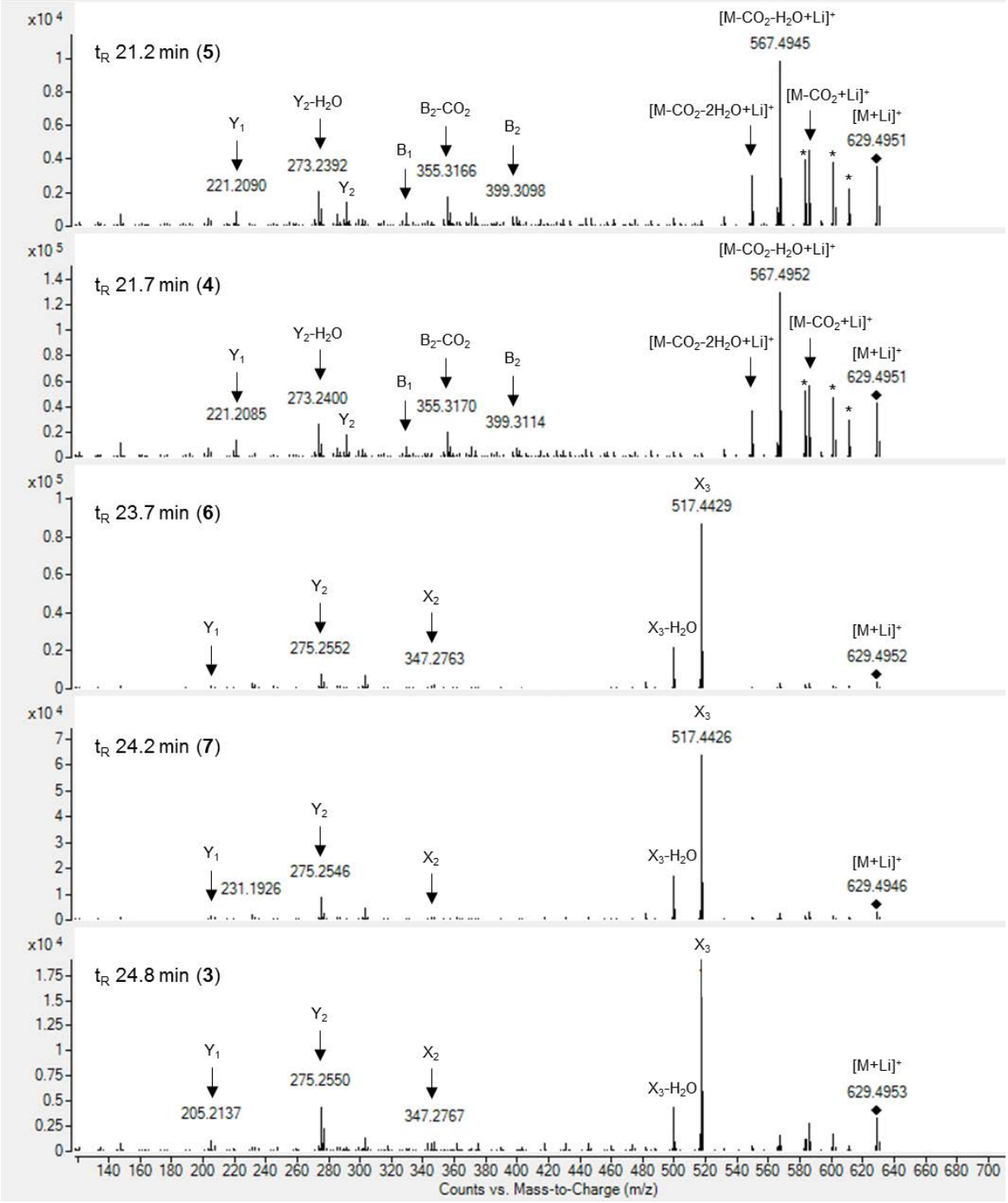


Figure 5. Product-Ion spectra from the major AAGs $C_{37}H_{66}O_7Li$ annotated (**3**-**7**). The full list of observed fragments (calculated *m/z*, raw formula, error on mass measurement, relative intensity) is provided in Supplementary Tables S6 to S10.

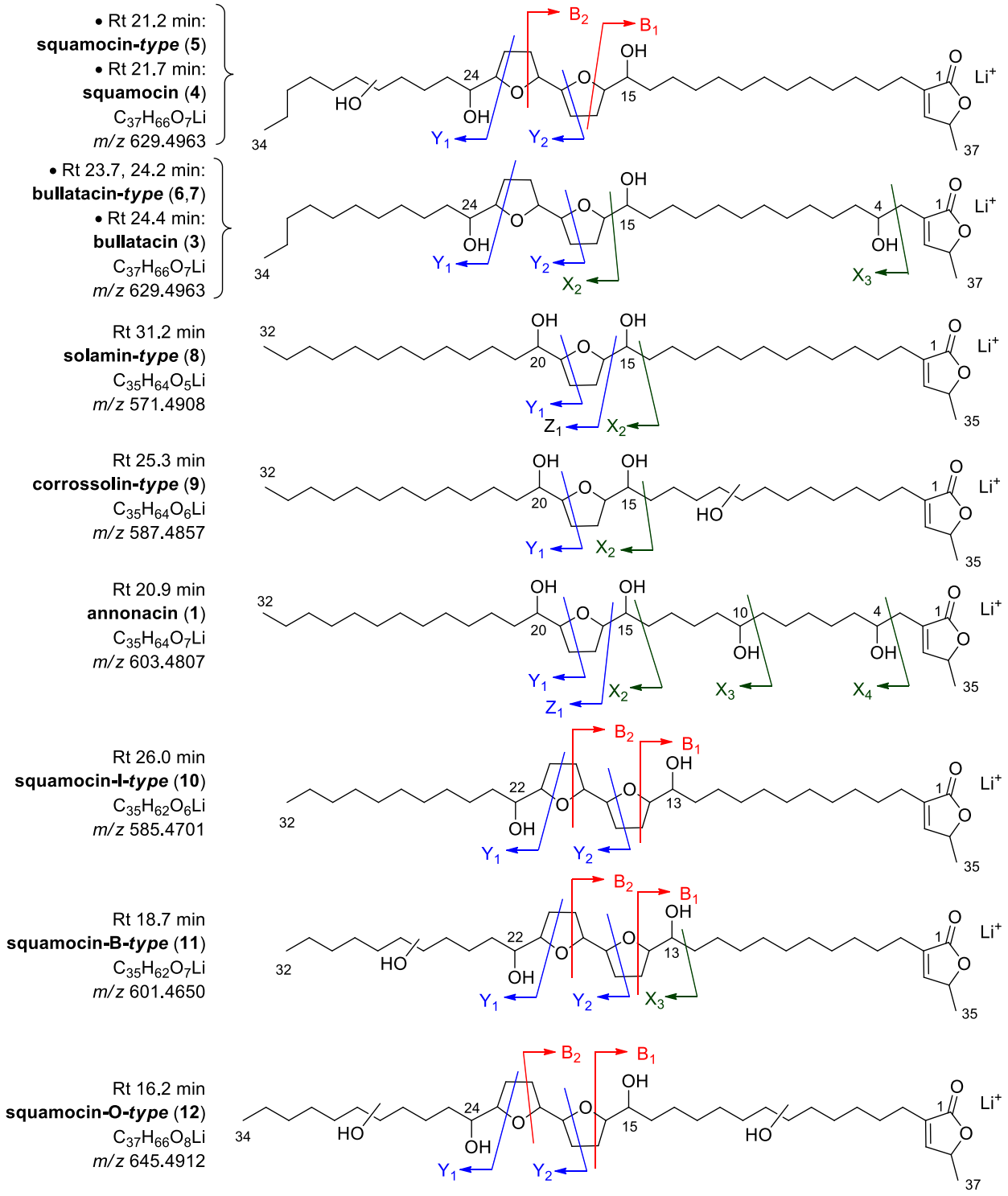


Figure 6. Structures of the C_{35} and C_{37} annotated AAGs (**1**, **3**-**12**). Full description of the identified fragments is presented in Supplementary Tables S6 to S16. The choice of examples relies on previous isolations from the species (Bermejo et al., 2005).

274 Annotation of the AAGs **1** and **8**-**12** (Figure 6) giving the most intense $[M+Li]^+$ adducts for the 6 other
275 molecular formulas found in every batch was performed, based on the product-ion spectra obtained by
276 auto-MS/MS (EIC are depicted in Supplementary Figures S5 to S11; The lists of detected informative
277 fragments are presented in Supplementary Tables S11 to S16). Among them, five AAGs with 35 carbon
278 atoms could be annotated, 2 of them belonging to the A-type / sub-type 1a, another one to the A-type / sub-
279 type 1b, which was identified as being annonacin (**1**; Rt 23.3 min), and 2 to the B-type / sub-type 1a. Finally,
280 minor mono- and di-acetylated derivatives might also be present, but could not be characterized due to low
281 intensity (Supplementary Table S5).

282 Interestingly, although the highest ionic abundance relies on the $C_{37}H_{66}O_7$ AAGs, mainly due to squamocin
283 (**4**), only two other molecular formula corresponding to C_{37} AAGs are present in all of the batches studied,
284 and can be hypothesized as being characteristic of *A. squamosa* (e.g. **12**). The description presented here
285 is not exhaustive but still concludes to the following metabolic trends for the species, reminiscent with
286 observations in seeds (Bermejo et al., 2005; Champy, 2011): In the four batches of *A. squamosa* pulp, the
287 AAGs displaying the highest intensity belong to the B-type and to sub-type 1a, with 1 or 2 free-hydroxyls
288 along the alkyl chain, and with an alkyl spacer of 13 carbon atoms between the lactone and THF cycles.
289 These observations are worth comparing with known structure-activity relationships of AAGs (Höllerhage
290 et al., 2009), suggesting a neurotoxic potential superior to that of the totum of *A. muricata* L., which mostly
291 contains annonacin along with A1b and A1a AAGs (Champy et al., 2005, 2009; Le Ven et al., 2012).

292

293 4 Conclusion

294 AAGs were previously described in *Annona* fruits and derived-food products (Höllerhage et al., 2015; Le
295 Ven et al., 2012, 2014). However, this is the first quantitative determination of AAGs in the fruit pulp of
296 *Annona squamosa*. Indeed, a recently published estimation did not directly relate to fruit content
297 (Höllerhage et al., 2015). The main AAG, like in other parts of the plant, is squamocin (**4**) (Bermejo et al.,
298 2005), which was quantified in four batches from distinct origins using HPLC-UV, chosen as a robust
299 method (Champy, 2011; Gromek et al., 1994; Yang et al., 2009). An approximate 3 fold-variation was
300 observed, possibly due to the varieties, cultivation conditions or harvest time (Gu et al., 1999).

301 Nevertheless, HPLC-MS evidenced striking disparities in the AAGs profile of the batches. However identical
302 major AAGs, apparently constituting the core composition of the species, could be annotated.

303 If the exposure to AAGs here appears lower than for *A. muricata*, and despite the low bioavailability recently
304 evidenced for an AAG (Bonneau et al., 2015), the consumption of the fruit of *A. squamosa* shall be
305 considered as a risk factor for neurodegenerative disorders. More global estimation on the phytochemical,
306 biological and epidemiological levels is still warranted, according to the overall homogeneity we evidenced,
307 and to the variety of the identified structures.

308

309 Acknowledgments

310 The authors are grateful to Dr David Touboul, Isabelle-Schmitz-Afonso (ICSN-CNRS), Dr Marie Mejean
311 and Karine Leblanc for fruitful discussions and guidance, and to Estella Vallade for technical assistance.
312 Natacha Bonneau is the recipient of a doctoral grant from the *Ministère de l'enseignement supérieur et de*
313 *la recherche* (France).

314

315 Conflicts of interest:

316 The authors declare they have no conflicts of interest.

317

318 Appendix A. Supplementary data:

319 Supplementary data are associated with this article.

320

References

Allegrand, J., Touboul, D., Schmitz-Afonso, I., Guérineau, V., Giuliani, A., Le Ven, J., Champy, P., & Laprévote, O. (2010). Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high and low collision energy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *24*, 3602–3608. doi:10.1002/rcm.4805

Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M. C., Barrachina, I., Estornell, E., & Cortes, D. (2005). Acetogenins from Annonaceae: Recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Products Reports*, *22*, 269–303. doi: 10.1039/B500186M

Bonneau, N., Le Ven, J., Schmitz-Afonso, I., Guérineau, V., Bajin ba Ndob, I., Baloul, L., Lewin, G., Laprévote, O., Brunelle, A., Touboul, D., & Champy, P. (2012). Annonaceous acetogenins as environmental neurotoxins: Human exposure from edible *Annona* fruits. *Planta Medica*, *78*, PH25. doi: 10.1055/s-0032-1320684.

Bonneau, N., Schmitz-Afonso, I., Brunelle, A., Touboul, D., & Champy, P. (2015). Method development for quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC–MS/MS and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, *1004*, 46–52. doi:10.1016/j.jchromb.2015.09.039

Caparros-Lefèbvre, D., & Elbaz, A. (1999). Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: A case-control study. *The Lancet*, *354*, 281–286. doi:10.1016/S0140-6736(98)10166-6

Caparros-Lefèbvre, D., Sergeant, N., Lees, A., Camuzat, A., Daniel, S., Lannuzel, A., Brice, A., Tolosa, E., Delacourte, A., & Duyckaerts, C. (2002). Guadeloupean parkinsonism: A cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain*, *125*, 801–811. doi:10.1093/brain/awf086

Caparros-Lefèbvre, D., & Steele, J. (2005). Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism – dementia complex of Guam, and environmental toxic hypotheses. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *19*, 407–413. doi:10.1016/j.etap.2004.12.052

Cavé, A., Cortes, D., Figadère, B., Laurens, A., & Pettit, G. R. (1997). Acetogenins from Annonaceae. In L. Zeichmeister, W. Herz, R. E. Moore, W. Steglich, & Ch. Tamm (Eds), Progress in the chemistry of organic natural products (pp. 81–288). Vienna: Springer. doi:10.1007/978-3-7091-6551-5

Champy, P., Féger, J., Gleye, C., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévote, O., Medja, F., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, E.C., & Ruberg, M. (2004). Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: Possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*, *88(1)*, 63–69. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02138.x

Champy P., Melot A., Guérineau V., Gleye C., Höglinger G. U., Ruberg M., Lannuzel A., Laprévote O., Laurens A., & Hocquemiller R. (2005). Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disorders*, *20(12)*, 1629–1633.

Champy, P., Escobar-Khondiker, M., Bajin, I., Yamada, E., Lannuzel, A., Laprévote, O., Ruberg, M., & Höglinger, G. U. (2008). Atypical parkinsonism induced by Annonaceae: Where are we yet? *Planta Medica*, *74*, SL117. doi:10.1055/s-0028-1083997

Champy, P., Guérineau, V., & Laprévote, O. (2009). MALDI-TOF MS profiling of Annonaceous acetogenins in *Annona muricata* products for human consumption. *Molecules*, *14*, 5235–5246. doi:10.3390/molecules14125235

Champy, P. (2011). Acetogenins from the seeds of the custard apple (*Annona squamosa* L.) and their health outcomes. In: V. R. Preedy, R. R. Watson, V. B. Patel (Eds.), Nuts and seeds in health and disease prevention. (pp. 429–437). Amsterdam, London: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-375688-6.10051-9

367 Derbré, S., Roué, G., Poupon, E., Susin, S. A., Hocquemiller, R., (2005). Annonaceous acetogenins: The
368 hydroxyl groups and THF rings are crucial structural elements for targeting the mitochondria,
369 demonstration with the synthesis of fluorescent squamocin analogues. *ChemBioChem*, *6*, 1–4.
370 doi:10.1002/cbic.200400396

371 Derbré, S., Gil, S., Taverna, M., Boursier, C., Nicolas, V., Demey-Thomas, E., Vinh, J., Susin, S. A.,
372 Hocquemiller, R., & Poupon, E. (2008). Highly cytotoxic and neurotoxic acetogenins of the
373 Annonaceae : New putative biological targets of squamocin detected by activity-based protein
374 profiling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *18*, 5741–5744. doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.091

375 Gromek, D., Hocquemiller, R., & Cavé, A. (1994). Qualitative and quantitative evaluation of Annonaceous
376 acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, *5*, 133–140.
377 doi:10.1002/pca.2800050309

378 Gu, Z.-M., Zhou, D., Lewis, N. J., Wu, J., Johnson, H. A., McLaughlin, J. L., & Gordon, J. (1999).
379 Quantitative evaluation of Annonaceous acetogenins in monthly samples of paw paw (*Asimina triloba*)
380 twigs by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Phytochemical*
381 *Analysis*, *10*, 32–38.

382 Höllerhage, M., Matusch, A., Champy, P., Lombès, A., Ruberg, M., Oertel, W. H., & Höglinger, G. U. (2009).
383 Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic
384 neurodegenerative tau pathologies. *Experimental Neurology*, *220*, 133–142.
385 doi:10.1016/j.expneurol.2009.08.004

386 Hollerhage, M., Rosler, T. W., Berjas, M., Luo, R., Tran, K., Richards, K. M., Sabaa-Srur, U., Maia, J. G.
387 S., Moraes, M. R. D., Godoy, H. T., Hoglinger, G. U., & Smith, R. E. (2015). Neurotoxicity of dietary
388 supplements from Annonaceae species. *International Journal of Toxicology*, *in press*.
389 doi:10.1177/1091581815602252

390 Lannuzel, A., Höglinger, G. U., Verhaeghe, S., Gire, L., Belson, S., Escobar-Khondiker, M., Poullain, P.,
391 Oertel, W. H., Hirsch, E. C., Dubois, B., & Ruberg, M. (2007). Atypical Parkinsonism in Guadeloupe:

A common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain*, *130*, 816–827. doi:10.1093/brain/awl347

Laprévote, O., & Das, B. (1994). Structural elucidation of acetogenins from Annonaceae by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Tetrahedron*, *50*, 8479–8490. doi:10.1016/S0040-4020(01)85568-X

Le Ven, J., Schmitz-Afonso, I., Lewin, G., Laprévote, O., Brunelle, A., Touboul, D., & Champy, P. (2012). Comprehensive characterization of Annonaceous acetogenins within a complex extract by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap® using post-column lithium infusion. *Journal of Mass Spectrometry*, *47*, 1500–1509. doi:10.1002/jms.3092

Le Ven, J., Schmitz-Afonso, I., Lewin, G., Brunelle, A., Touboul, D., & Champy, P. (2014). Identification of the environmental neurotoxins Annonaceous acetogenins in an *Annona cherimolia* Mill. alcoholic beverage using HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap®. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 8696–8704. doi:10.1021/jf501174j

Levine, R. A., Richards, K. M., Tran, K., Luo, R., Thomas, A. L., & Smith, R. E. (2015). Determination of neurotoxic acetogenins in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit by LC-HRMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 1053–1056. doi:10.1021/jf504500g

Potts, L. F., Luzzio, F. A., Smith, S. C., Hetman, M., Champy, P., & Litvan, I. (2012). Annonacin in *Asimina triloba* fruit: Implication for neurotoxicity. *Neurotoxicology*, *33*, 53–58. doi:10.1016/j.neuro.2011.10.009

Yamada, E. S., Respondek, G., Müssner, S., de Andrade, A., Höllerhage, M., Depienne, C., Rastetter, A., Tarze, A., Friguet, B., Salama, M., Champy, P., Oertel, W. H., & Höglinger, G. U. (2014). Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. *Experimental Neurology*, *253*, 113–125. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.12.017.

416 Yang, H., Li, X., Tang, Y., Zhang, N., Chen, J., & Cai, B. (2009). Supercritical fluid CO_2 extraction and
417 simultaneous determination of eight Annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by
418 HPLC-DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *49*, 140–144.
419 doi:10.1016/j.jpba.2008.09.055

420

Manuscript for submission to *Food Chemistry*

The fruit of *Annona squamosa* L. as a source of environmental neurotoxins: From quantitation of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis.

Supplementary material

Natacha BONNEAU, Lamia BALOUL, Idensi BAJIN BA NDOB, François SÉNÉJOUX, Pierre CHAMPY

Supplementary material to Section 3.1.

- Detection and quantification of squamocin *pp 2-3*

Figures S1 (*p 2*), S2 (*p 3*)

Supplementary material to Section 3.2.

- MS/MS method development *pp 4-8*

Figures S3 (*p 4*), S4 (*p 5*),

Tables S1 (*p 6*), S2 & S3 (*p 7*), S4 (*p 8*)

Supplementary material to Section 3.3.

- Qualitative analysis of AAGs and annotation *pp 9-29*

Tables S5 (*p 9*), S6 (*p 15*), S7 (*p 16*), S8 & S9 (*p 17*), S10 (*p 18*),

Figures S5 (*p 19*), S6 (*p 20*), S7 (*p 21*), S8 (*p 22*), S9 (*p 23*), S10 (*p 24*), S11 & S12 (*p 25*),

Tables S13 (*p 26*), S14 (*p 27*), S15 (*p 28*), S16 (*p 29*).

Supplementary material to *Section 3.1.*

Detection and quantification of squamocin

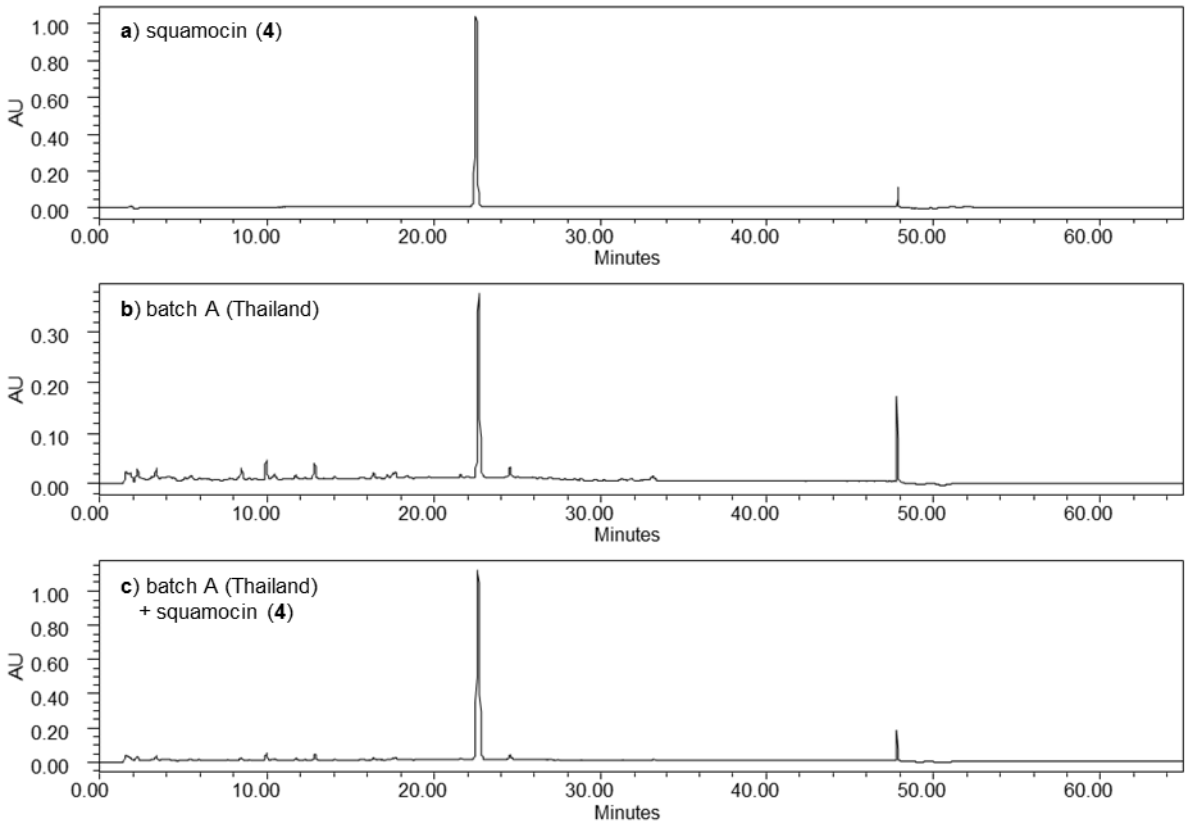


Figure S1. HPLC-UV chromatograms (λ = 210 nm), co-injection of squamocin (**4**) with a crude extract of the pulp of *A. squamosa* – batch A (origin: Thailand).

a) Squamocin (**4**) (1 mg/mL in MeOH); **b)** Crude extract (10 mg/mL in MeOH); **c)** Squamocin (**4**) spiked in crude extract from batch A (final concentrations: respectively 1 mg/mL and 10 mg/mL in MeOH).

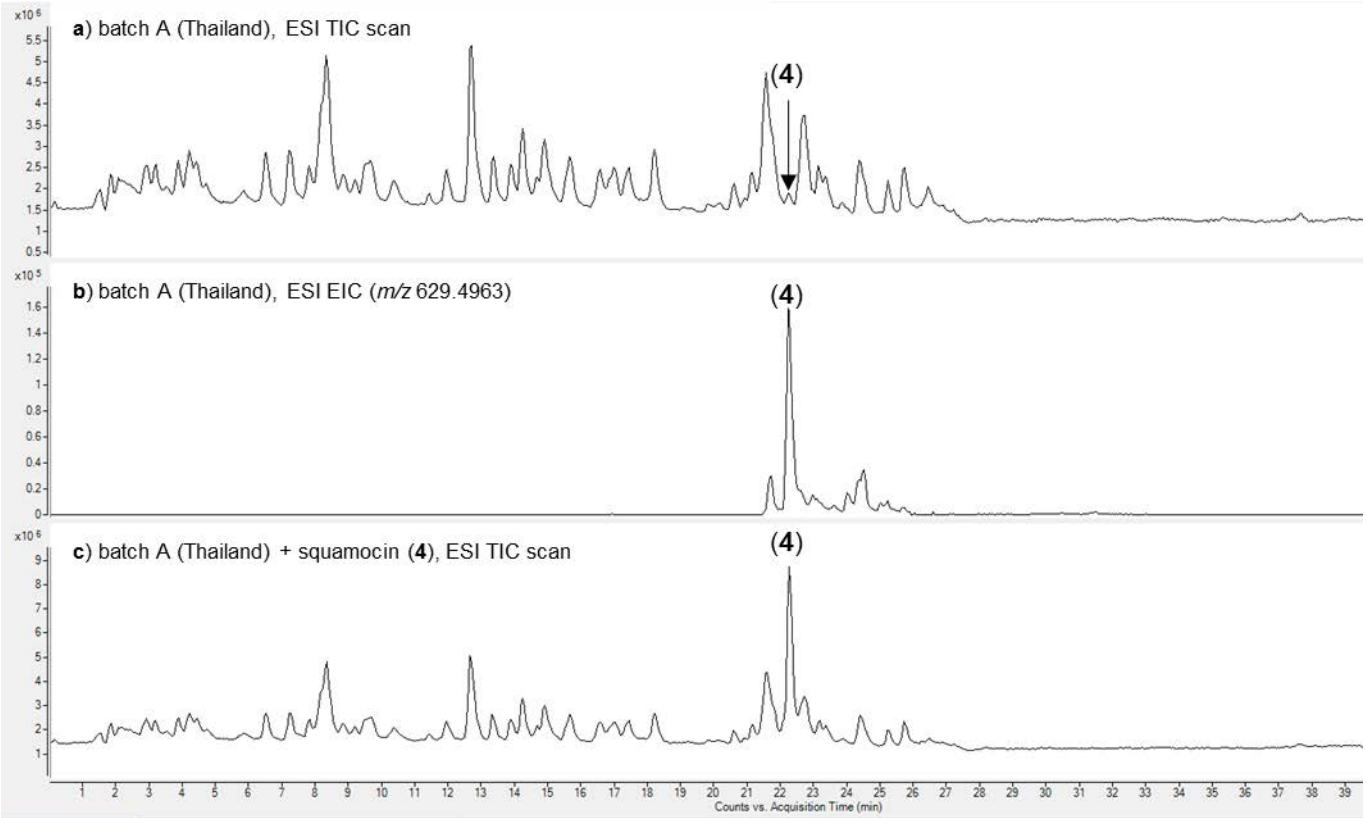


Figure S2. HPLC-MS (ESI-Q/TOF) co-injection of squamocin with a crude extract of the pulp of *A. squamosa* – batch A (origin: Thailand).

a) ESI TIC scan: Crude extract (1 mg/mL in MeOH); **b)** ESI EIC *m/z* 629.4963 ± 2.5 ppm: Crude extract (1 mg/mL in MeOH); **c)** ESI TIC scan: (final concentration: 1 mg/mL in MeOH) spiked with squamocin (**4**) (final concentration: 10 µg/mL in MeOH).

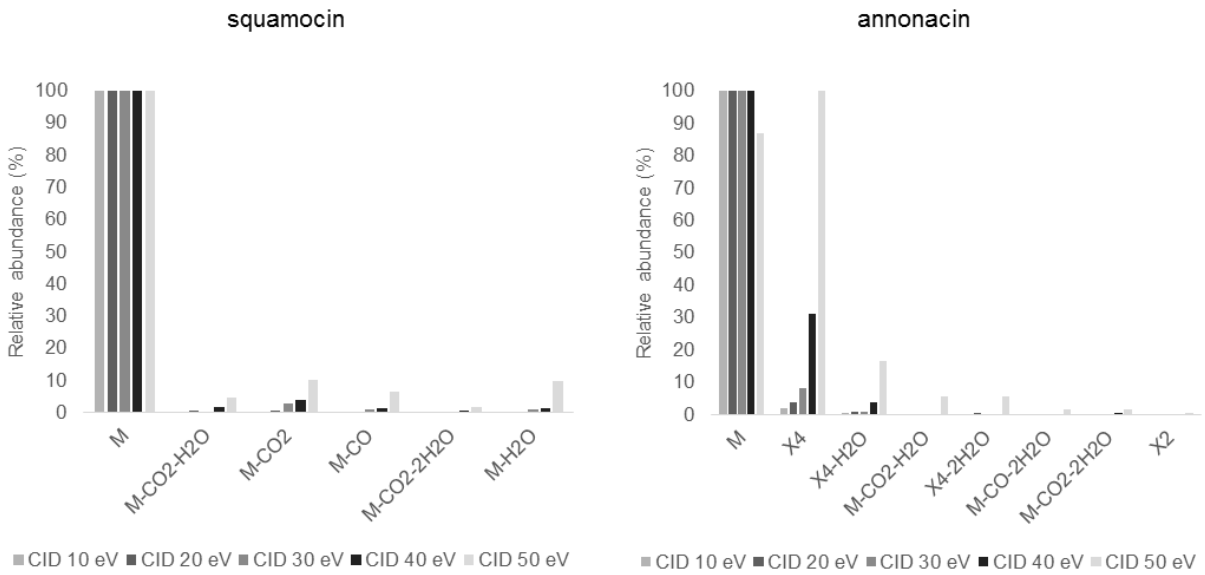
45 **Supplementary material to *Section 3.2.***

46 ***MS/MS method development***

47

48

49



50

51 **Figure S3.** Relative abundances of fragments obtained from the $[M+Li]^+$ adducts of squamocin (**4**) and
52 annonacin (**1**) (0.1 µg/mL in MeOH), obtained with collision energies ranging from 10 to 50 eV; Post-column
53 LiI infusion 2 mM in MeOH.

54 Fragments nomenclature: See Figures 2 and 3 in the main text.

55

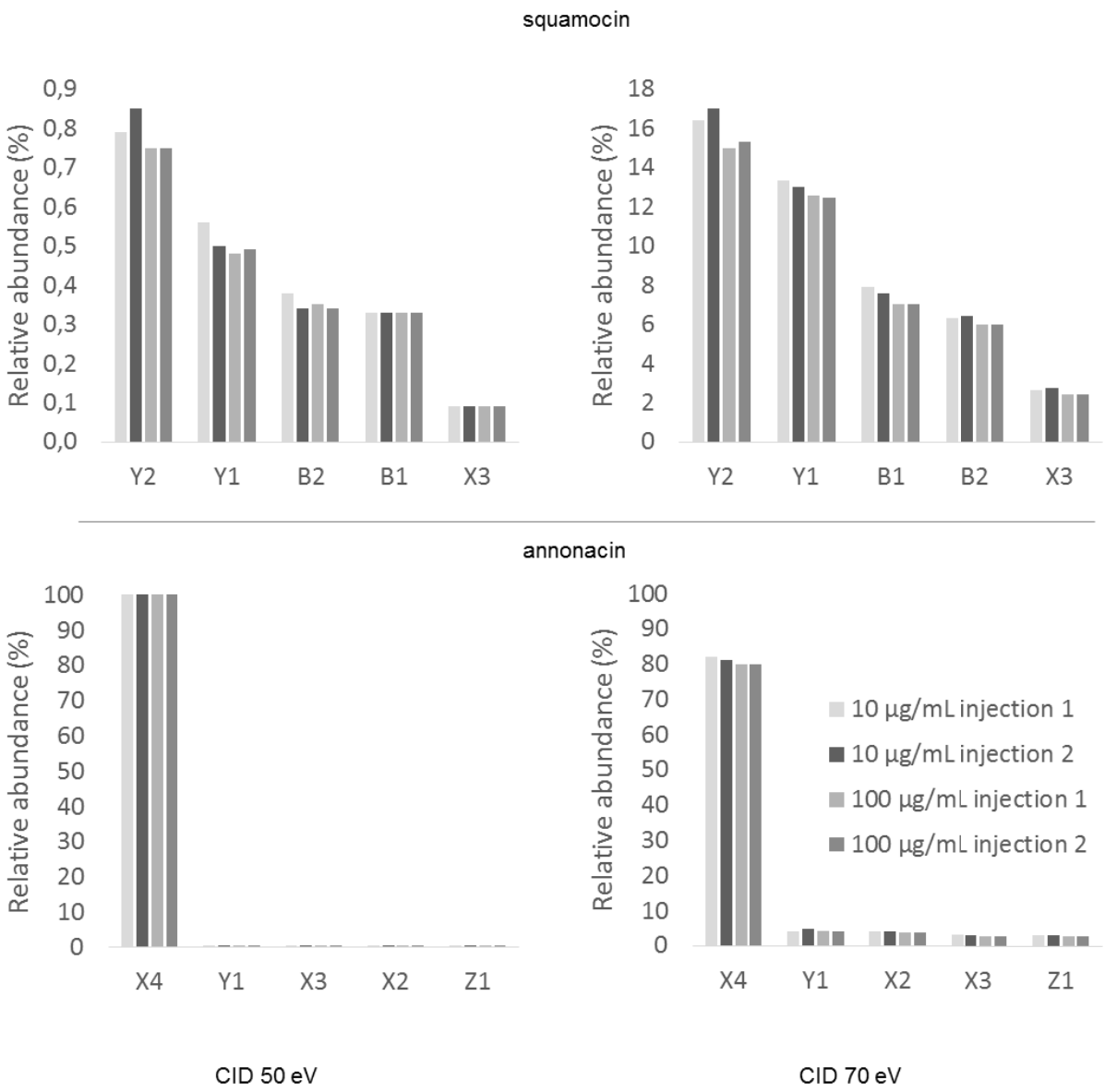


Figure S4. Fragments abundances and reproducibility at 50 and 70 eV for squamocin (**4**) and annonacin (**1**), compared at 10 and 100 µg/mL in MeOH; Post-column LiI infusion: 2 mM in MeOH.

Fragments nomenclature: See Figures 2 and 3 in the main text.

62 **Table S1.** Characterized fragments of annonacin (**1**) ([M+Li]$^+$, m/z_{calc} = 603.4807; $C_{35}H_{64}O_7Li$).

63 Conditions: 10 µg/mL, CID 70 eV, Auto-MS/MS; in chromatographic conditions (5 µL injected).

m/z_{calc}	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
473.4177	100	X4-H_2O	$C_{29}H_{54}O_4Li$	3.59
491.4282	71	X4	$C_{29}H_{56}O_5Li$	3.23
455.4071	43	X4-2H_2O	$C_{29}H_{52}O_3Li$	4.11
437.3965	11	X4-3H_2O	$C_{29}H_{50}O_2Li$	2.73
229.1774	11	X4-Y1-2H_2O	$C_{14}H_{22}O_2Li$	8.09
247.1880	6	X4-Y1-H_2O	$C_{14}H_{24}O_3Li$	2.81
523.4697	4	M-CO_2-2H_2O	$C_{34}H_{60}O_3Li$	8.03
541.4803	4	M-CO_2-H_2O	$C_{34}H_{62}O_4Li$	3.81
233.2451	4	Y1	$C_{15}H_{30}OLi$	10.00
119.0679	4	M-X4	$C_6H_8O_2Li$	7.69
305.2663	4	X2	$C_{18}H_{34}O_3Li$	4.41
301.2713	3	W1-2H	$C_{19}H_{34}O_2Li$	13.03
275.2557	2	Z1	$C_{17}H_{32}O_2Li$	8.53
391.3394	2	X3	$C_{23}H_{44}O_4Li$	6.19
303.2870	2	W1	$C_{19}H_{36}O_2Li$	1.10
249.2037	2	B1/X4	$C_{14}H_{26}O_3Li$	7.56
539.4646	2	M-CO-2H_2O	$C_{34}H_{60}O_4Li$	4.86
505.4591	1	M-CO_2-3H_2O	$C_{34}H_{58}O_2Li$	2.25

64

65

66 **Table S2.** Characterized fragments of annonacinone (**2**) ([M+Li]$^+$, m/z_{calc} = 601.4650, $C_{35}H_{62}O_7Li$).

67 Conditions: 10 µg/mL, CID 70 eV, Auto-MS/MS; in chromatographic conditions (5 µL injected).

m/z_{calc}	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
489.4126	100	X3	$C_{29}H_{54}O_5Li$	0.13
471.4020	47	X3-H_2O	$C_{29}H_{52}O_4Li$	1.12
453.3915	15	X3-2H_2O	$C_{29}H_{50}O_3Li$	1.82
305.2663	3	X2	$C_{18}H_{34}O_3Li$	0.43
233.2451	1	Y1	$C_{15}H_{30}OLi$	12.54
227.1618	1	X4-Y1-2H_2O	$C_{14}H_{20}O_2Li$	0.00
275.2557	1	Z1	$C_{17}H_{32}O_2Li$	2.74
215.1618	1	Y1-H_2O	$C_{13}H_{20}O_2Li$	4.85

68

69

70 **Table S3.** Characterized fragments of bullatacin (**3**) ([M+Li]$^+$, m/z_{calc} = 629.4963, $C_{37}H_{66}O_7Li$).

71 Conditions: 10 µg/mL, CID 70 eV, Auto-MS/MS; in chromatographic conditions (5 µL injected).

m/z_{calc}	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
517.4439	100	X3	$C_{31}H_{58}O_5Li$	1.68
499.4333	18	X3-H_2O	$C_{31}H_{56}O_4Li$	4.24
275.2557	10	Y2	$C_{17}H_{32}O_2Li$	4.06
205.2138	4	Y1	$C_{13}H_{26}OLi$	8.98
347.2768	3	X2	$C_{20}H_{36}O_4Li$	5.56

72

73

74 **Table S4.** Characterized fragments of squamocin (**4**) ($[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 629.4963, $C_{37}H_{66}O_7$).

75 Conditions: 1 µg/mL, CID 70 eV, Auto-MS/MS; in chromatographic conditions (5 µL injected).

m/z_{calc}	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
567.4959	100	$M-CO_2-H_2O$	$C_{36}H_{64}O_4Li$	2.27
585.5065	39	$M-CO_2$	$C_{36}H_{66}O_5Li$	3.22
601.5014	35	M-CO	$C_{36}H_{66}O_6Li$	1.33
549.4854	30	$M-CO_2-2H_2O$	$C_{36}H_{62}O_3Li$	2.45
273.2400	24	$Y2-H_2O$	$C_{17}H_{30}O_2Li$	2.98
611.4857	21	$M-H_2O$	$C_{37}H_{64}O_6Li$	3.68
355.3183	19	$B2-CO_2$	$C_{23}H_{40}O_2Li$	4.52
291.2506	16	Y2	$C_{17}H_{32}O_3Li$	3.01
221.2087	12	Y1	$C_{13}H_{26}O_2Li$	3.09
329.2663	7	B1	$C_{20}H_{34}O_3Li$	-0.93
203.1982	7	$Y1-H_2O$	$C_{13}H_{24}OLi$	4.64
399.3081	6	B2	$C_{24}H_{40}O_4Li$	-9.50
289.2350	3	Y2-2H	$C_{17}H_{30}O_3Li$	3.38
363.2717	2	X3	$C_{20}H_{36}O_5Li$	5.99

76

77 **Supplementary material to *Section 3.3. 3.3 Qualitative analysis of AAGs and annotation***

78

79 **Table S5.** List of the AAGs raw formulas searched ($[M+Li]^+$ ions), with a degree of insaturation of the alkyl chain varying from 0 to 3 (Bermejo et al.,

80 2005); **x**: intensity ≥ 10^4, **<**: no detection / intensity < 10^4; Molecular formulas retrieved in at least one batch or in all batches are highlighted.

81

Formula	$m/z_{calc.}$ (± 2.5 ppm)	Batches			
		A (Thailand)	B (Mauritius)	C (Martinique)	D (Vietnam)
$C_{35}H_{66}O_x$ / $C_{37}H_{70}O_x$ - degree of insaturation of the alkyl chain: 0					
$C_{35}H_{66}O_3Li$	541.5167	<	<	<	<
$C_{35}H_{66}O_4Li$	557.5116	<	<	<	<
$C_{35}H_{66}O_5Li$	573.5065	<	<	<	<
$C_{35}H_{66}O_6Li$	589.5014	<	<	<	<
$C_{35}H_{66}O_7Li$	605.4963	<	<	<	<
$C_{35}H_{66}O_8Li$	621.4912	<	<	<	<
$C_{35}H_{66}O_9Li$	637.4861	<	<	<	<
$C_{35}H_{66}O_{10}Li$	653.4811	<	<	<	<
$C_{37}H_{70}O_3Li$	569.5480	<	<	<	<

Formula	$m/z_{calc.}$ (± 2.5 ppm)	Batches			
		A (Thailand)	B (Mauritius)	C (Martinique)	D (Vietnam)
$C_{37}H_{70}O_4Li$	585.5429	<	<	<	<
$C_{37}H_{70}O_5Li$	**601.5378**	**x**	**x**	<	**x**
$C_{37}H_{70}O_6Li$	**617.5327**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{37}H_{70}O_7Li$	**633.5276**	<	**x**	<	<
$C_{37}H_{70}O_8Li$	**649.5225**	<	**x**	**x**	<
$C_{37}H_{70}O_9Li$	665.5174	<	<	<	<
$C_{37}H_{70}O_{10}Li$	681.5124	<	<	<	<
$C_{35}H_{64}O_x$ / $C_{37}H_{68}O_x$ - degree of insaturation of the alkyl chain: 1					
$C_{35}H_{64}O_3Li$	539.5010	<	<	<	<
$C_{35}H_{64}O_4Li$	555.4959	<	<	<	x
$C_{35}H_{64}O_5Li$ †	**571.4908**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{35}H_{64}O_6Li$ †	**587.4857**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{35}H_{64}O_7Li$ †	**603.4807**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{35}H_{64}O_8Li$	**619.4756**	**x**	<	<	**x**
$C_{35}H_{64}O_9Li$	635.4705	<	<	<	<

Formula	$m/z_{calc.}$ (± 2.5 ppm)	Batches			
		A (Thailand)	B (Mauritius)	C (Martinique)	D (Vietnam)
$C_{35}H_{64}O_{10}Li$	651.4654	<	<	<	<
$C_{37}H_{68}O_{3}Li$	567.5323	<	<	<	<
$C_{37}H_{68}O_{4}Li$	583.5272	<	<	<	<
$C_{37}H_{68}O_{5}Li$	**599.5221**	**x**	**x**	<	**x**
$C_{37}H_{68}O_{6}Li$	**615.5170**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{37}H_{68}O_{7}Li$	**631.5120**	<	**x**	<	<
$C_{37}H_{68}O_{8}Li$	647.5069	<	<	<	<
$C_{37}H_{68}O_{9}Li$	663.5018	<	<	<	<
$C_{37}H_{68}O_{10}Li$	679.4967	<	<	<	<
$C_{35}H_{62}O_{x}$ / $C_{37}H_{66}O_{x}$ - degree of insaturation of the alkyl chain: 2					
$C_{35}H_{62}O_{3}Li$	537.4854	<	<	<	<
$C_{35}H_{62}O_{4}Li$	**553.4803**	<	<	**x**	<
$C_{35}H_{62}O_{5}Li$	569.4752	<	**x**	<	**x**
$C_{35}H_{62}O_{6}Li$	**585.4701**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{35}H_{62}O_{7}Li$	**601.4650**	**x**	**x**	**x**	**x**

Formula	$m/z_{calc.}$ (± 2.5 ppm)	Batches			
		A (Thailand)	B (Mauritius)	C (Martinique)	D (Vietnam)
$C_{35}H_{62}O_8Li$	**617.4599**	<	**x**	<	**x**
$C_{35}H_{62}O_9Li$	633.4548	<	<	<	<
$C_{35}H_{62}O_{10}Li$	649.4498	<	<	<	<
$C_{37}H_{66}O_3Li$	565.5167	<	<	<	<
$C_{37}H_{66}O_4Li$	581.5116	<	<	<	<
$C_{37}H_{66}O_5Li$	**597.5065**	**x**	**x**	<	**x**
$C_{37}H_{66}O_6Li$	**613.5014**	**x**	**x**	<	**x**
$C_{37}H_{66}O_7Li$ ‡	**629.4963**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{37}H_{66}O_8Li$	**645.4912**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{37}H_{66}O_9Li$	**661.4861**	<	**x**	<	<
$C_{37}H_{66}O_{10}Li$	677.4811	<	<	<	<
$C_{35}H_{60}O_x$ / $C_{37}H_{64}O_x$ - degree of insaturation of the alkyl chain: 3					
$C_{35}H_{60}O_3Li$	535.4697	<	<	<	<
$C_{35}H_{60}O_4Li$	551.4646	<	<	<	<

Formula	$m/z_{calc.}$ (± 2.5 ppm)	Batches			
		A (Thailand)	B (Mauritius)	C (Martinique)	D (Vietnam)
$C_{35}H_{60}O_5Li$	567.4595	<	<	<	<
$C_{35}H_{60}O_6Li$	**583.4544**	**x**	**x**	**x**	**x**
$C_{35}H_{60}O_7Li$	**599.4494**	<	<	**x**	**x**
$C_{35}H_{60}O_8Li$	**615.4443**	**x**	<	<	<
$C_{35}H_{60}O_9Li$	631.4392	<	<	<	<
$C_{35}H_{60}O_{10}Li$	647.4341	<	<	<	<
$C_{37}H_{64}O_3Li$	563.5010	<	<	<	<
$C_{37}H_{64}O_4Li$	**579.4959**	<	**x**	<	<
$C_{37}H_{64}O_5Li$	595.4908	<	<	<	**x**
$C_{37}H_{64}O_6Li$	**611.4857**	<	**x**	<	**x**
$C_{37}H_{64}O_7Li$	**627.4807**	**x**	**x**	<	**x**
$C_{37}H_{64}O_8Li$	643.4756	<	<	<	<
$C_{37}H_{64}O_9Li$	659.4705	<	<	<	<

Formula	$m/z_{calc.}$ (± 2.5 ppm)	Batches			
		A (Thailand)	B (Mauritius)	C (Martinique)	D (Vietnam)
$C_{37}H_{64}O_{10}Li$	675.4654	<	<	<	<

82

83 † Presence of mono-acetylated counterparts can't be ruled out; However, corresponding fragments ($-CH_4CO_2$) could not be observed. In batch D,

84 the ion $[C_{39}H_{68}O_7+Li]^+$ (di-acetylated $C_{35}H_{64}O_5$) was observed (± 2.5 ppm) with $I > 10^4$.

85 ‡ In batch C, the ion $[C_{39}H_{68}O_8+Li]^+$ (mono-acetylated counterpart of $[C_{37}H_{66}O_7+Li]^+$ was observed (± 2.5 ppm) with $I > 10^4$).

86 Minor mono-acetylated derivatives of C_{35} AAGs could not be characterized due to low intensity; in a number of cases, they might overlap with the

87 *m/z* values of some C_{37} non-acetylated AAGs.

88

Table S6. Characterized fragments of the squamocin isomer (**5**) at Rt 21.2 min ($[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 629.4963, $C_{37}H_{66}O_7$) in crude extracts from pulps of *A. squamosa*.

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
567.4959	100	$M-CO_2-H_2O$	$C_{36}H_{64}O_4Li$	2.47
585.5065	46	$M-CO_2$	$C_{36}H_{66}O_5Li$	3.65
583.4888	41	$M-CO_2-2H$	$C_{36}H_{64}O_5Li$	3.49
601.5014	39	M-CO	$C_{36}H_{66}O_6Li$	0.91
549.4854	31	$M-CO_2-2H_2O$	$C_{36}H_{62}O_3Li$	1.75
611.4857	23	$M-H_2O$	$C_{37}H_{64}O_6Li$	1.33
273.2400	21	$Y2-H_2O$	$C_{17}H_{30}O_2Li$	3.13
355.3183	18	$B2-CO_2$	$C_{23}H_{40}O_2Li$	4.66
291.2506	14	Y2	$C_{17}H_{32}O_3Li$	4.70
221.2087	9	Y1	$C_{13}H_{26}O_2Li$	-1.56
329.2663	8	B1	$C_{20}H_{34}O_3Li$	5.64
399.3081	6	B2	$C_{24}H_{40}O_4Li$	-3.98
203.1982	5	$Y1-H_2O$	$C_{13}H_{24}OLi$	-1.79
363.2717	3	X3	$C_{20}H_{36}O_5Li$	-8.20

93 **Table S7.** Characterized fragments of squamocin (**4**) (Rt 21.7 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 629.4963,
94 ($C_{37}H_{66}O_7Li$) in crude extracts from pulps of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
567.4959	100	$M-CO_2-H_2O$	$C_{36}H_{64}O_4Li$	1.19
585.5065	43	$M-CO_2$	$C_{36}H_{66}O_5Li$	1.69
583.4895	41	$M-CO_2-2H$	$C_{36}H_{64}O_5Li$	2.28
601.5014	36	M-CO	$C_{36}H_{66}O_6Li$	1.58
549.4854	28	$M-CO_2-2H_2O$	$C_{36}H_{62}O_3Li$	1.74
611.4857	23	$M-H_2O$	$C_{37}H_{64}O_6Li$	2.03
273.2400	20	$Y2-H_2O$	$C_{17}H_{30}O_2Li$	0.24
355.3183	15	$B2-CO_2$	$C_{23}H_{40}O_2Li$	3.69
291.2506	13	Y2	$C_{17}H_{32}O_3Li$	1.97
221.2087	10	Y1	$C_{13}H_{26}O_2Li$	1.26
329.2663	6	B1	$C_{20}H_{34}O_3Li$	-1.29
399.3081	6	B2	$C_{24}H_{40}O_4Li$	-8.25
203.1982	5	$Y1-H_2O$	$C_{13}H_{24}OLi$	2.23
363.2717	2	X3	$C_{20}H_{36}O_5Li$	0.60

95

96

97 **Table S8.** Characterized fragments of the bullatacin analogue (**6**) at Rt 23.7 min ($[M+Li]^+$, m/z_{calc} =
98 629.4963, $C_{37}H_{66}O_7Li$) in crude extracts from pulps of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
517.4439	100	X3	$C_{31}H_{58}O_5Li$	1.78
499.4333	25	X3-H_2O	$C_{31}H_{56}O_4Li$	1.78
275.2557	9	Y2	$C_{17}H_{32}O_2Li$	1.76
347.2768	3	X2	$C_{20}H_{36}O_4Li$	2.29
205.2138	2	Y1	$C_{13}H_{26}OLi$	6.06

99

100 **Table S9.** Characterized fragments of the bullatacin analogue (**7**) at Rt 24.2 min ($[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 629.4963,
101 $C_{37}H_{66}O_7Li$) in crude extracts from pulps of *A. squamosa*.

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
517.4439	100	X3	$C_{31}H_{58}O_5Li$	1.91
499.4333	25	X3-H_2O	$C_{31}H_{56}O_4Li$	1.81
275.2557	9	Y2	$C_{17}H_{32}O_2Li$	1.60
347.2768	3	X2	$C_{20}H_{36}O_4Li$	1.60
205.2138	2	Y1	$C_{13}H_{26}OLi$	5.85

102

103 **Table S10.** Characterized fragments of bullatacin (**3**) (Rt 24.8 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 629.4963, $C_{37}H_{66}O_7Li$)
104 in crude extracts from pulps of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
517.4439	100	X3	$C_{31}H_{58}O_5Li$	2.26
275.2557	17	Y2	$C_{17}H_{32}O_2Li$	2.28
499.4333	17	X3-H_2O	$C_{31}H_{56}O_4Li$	2.64
205.2138	4	Y1	$C_{13}H_{26}OLi$	0.78
347.2768	3	X2	$C_{20}H_{36}O_4Li$	0.30

105

106

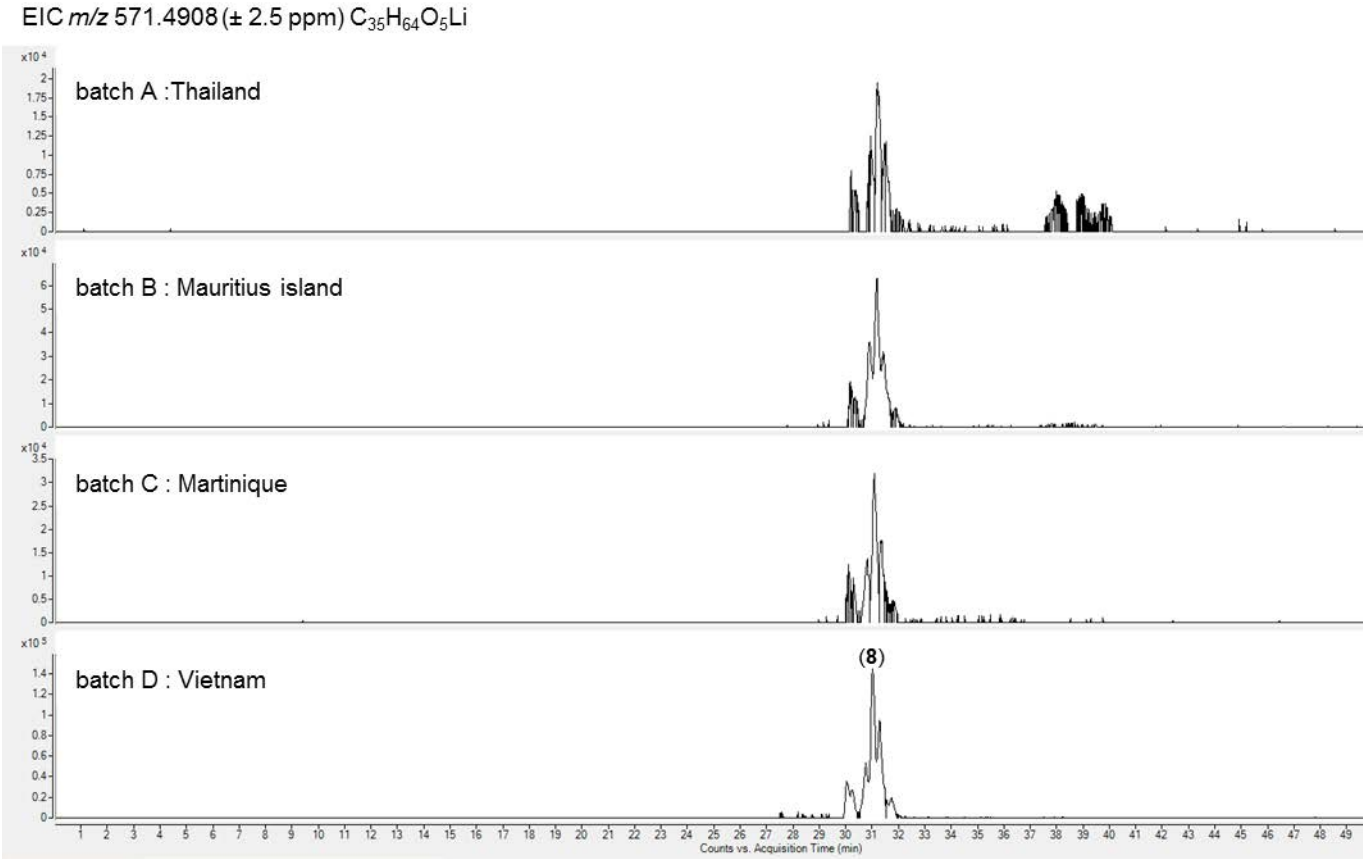
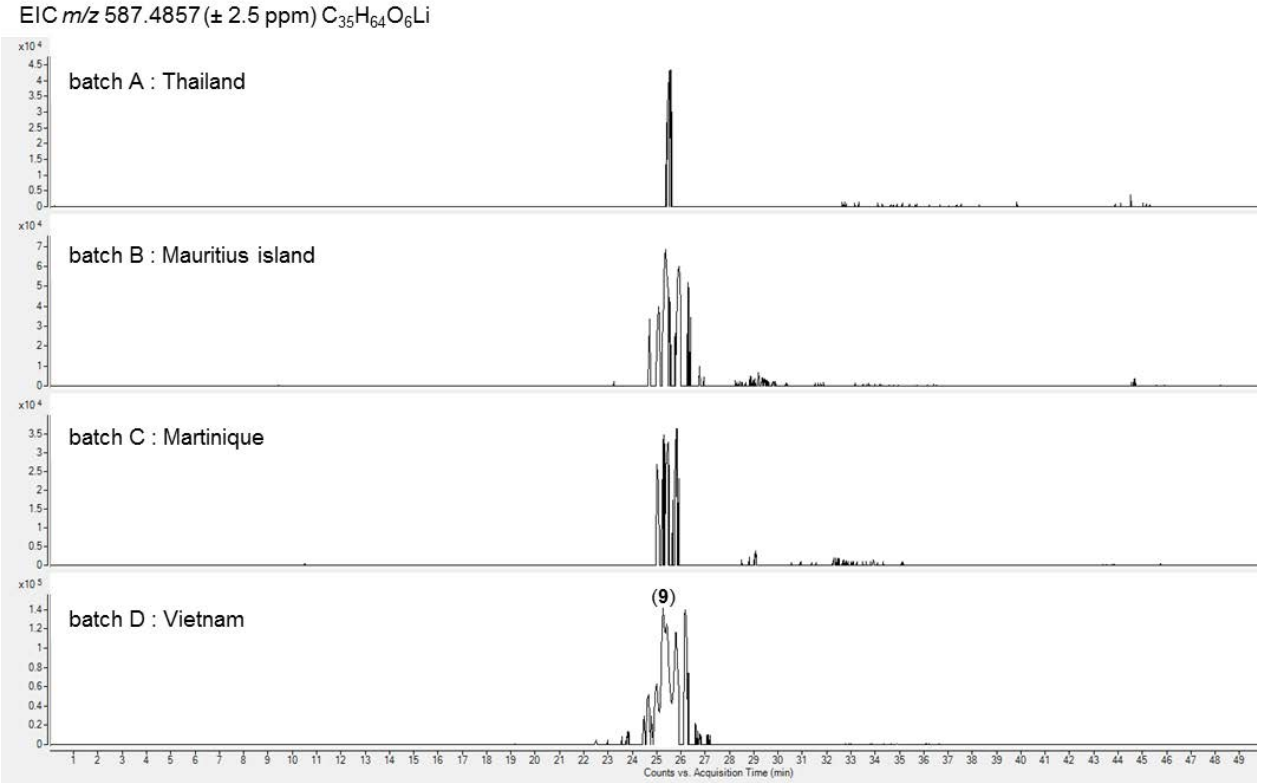


Figure S5. Extracted Ion Chromatograms of $[M+Li]^+$ at m/z_{calc} 571.4908 (± 2.5 ppm; $C_{35}H_{64}O_5Li$) from the four pulps crude extracts of *A. squamosa*.

112

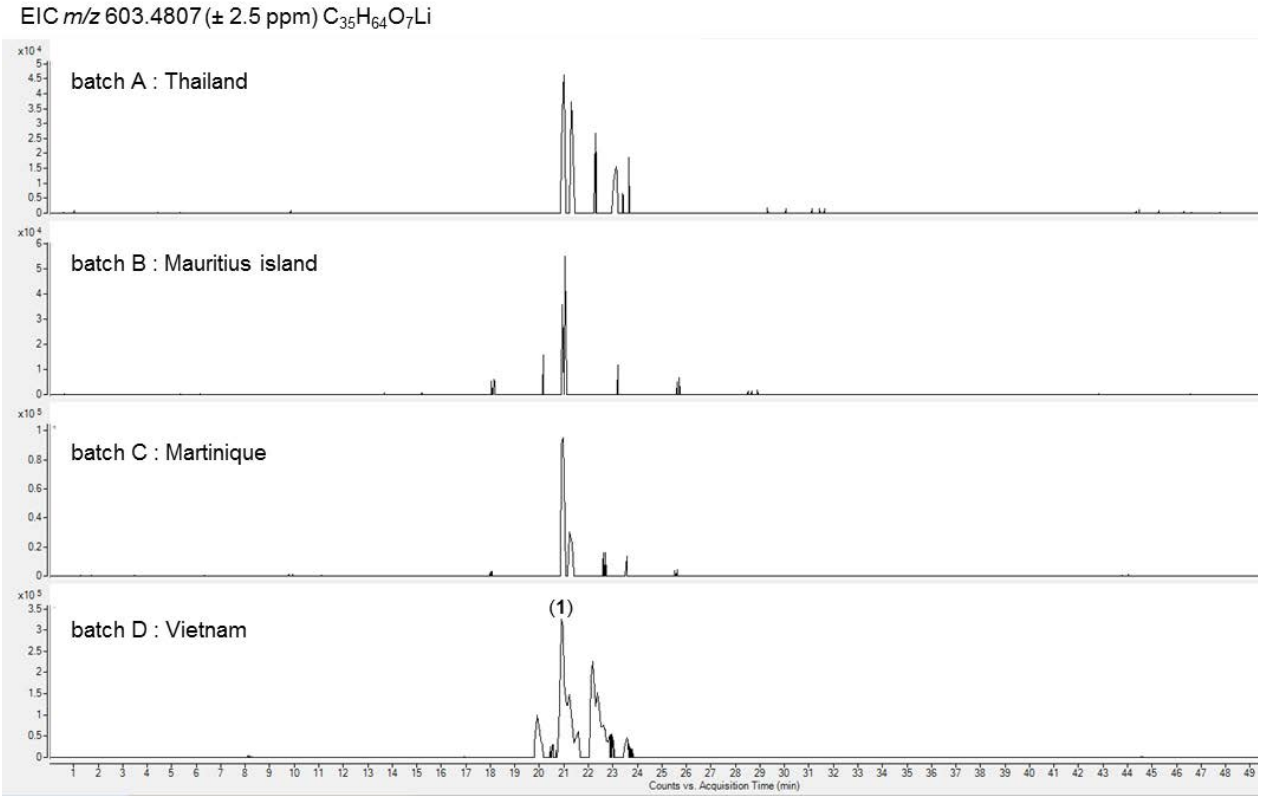


113

114 **Figure S6.** Extracted Ion Chromatograms of $[M+Li]^+$ at m/z_{calc} 587.4857 (± 2.5 ppm; $C_{35}H_{64}O_6Li$) from the

115 four pulps crude extracts of *A. squamosa*.

116



117

118 **Figure S7.** Extracted Ion Chromatograms of $[M+Li]^+$ at m/z_{calc} 603.4807 (± 2.5 ppm; $C_{35}H_{64}O_7Li$) from the

119 four pulps crude extracts of *A. squamosa*.

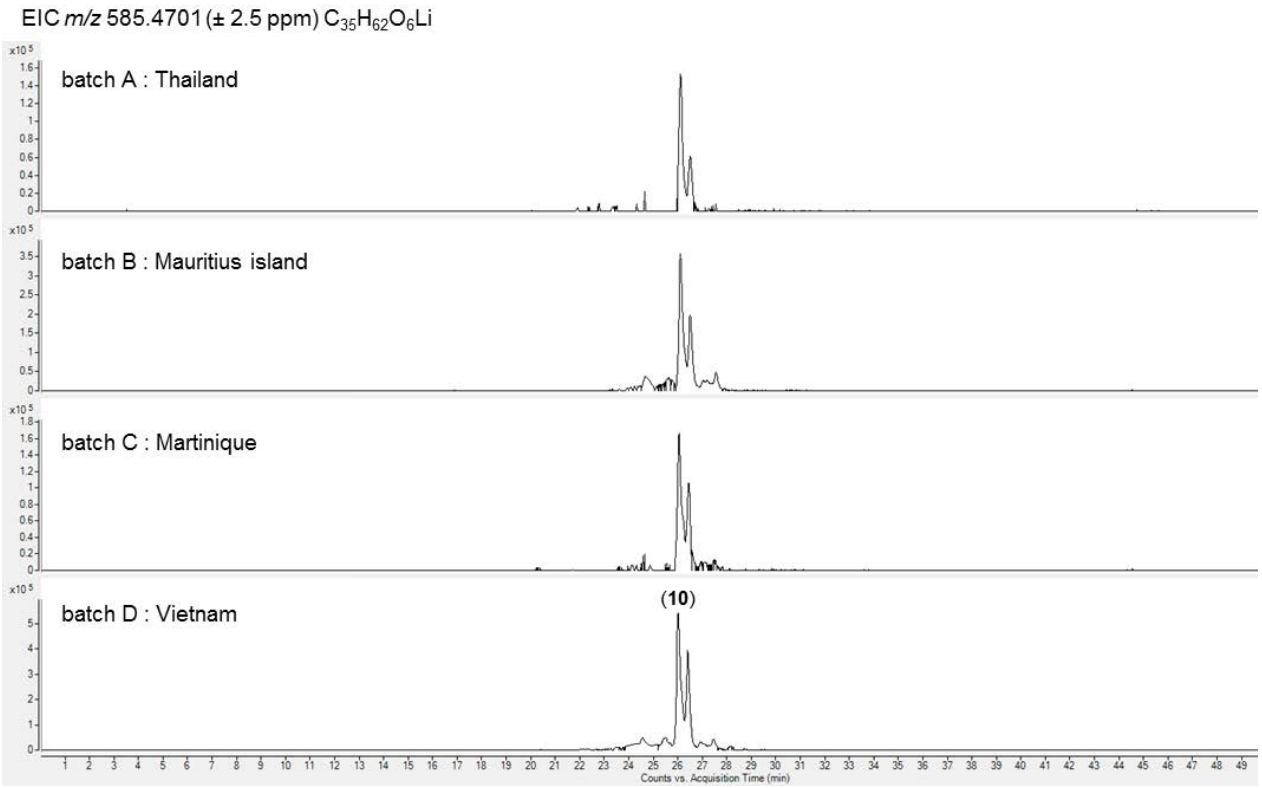


Figure S8. Extracted Ion Chromatograms of $[M+Li]^+$ at m/z_{calc} 585.4701 (± 2.5 ppm; $C_{35}H_{62}O_6Li$) from the four pulps crude extracts of *A. squamosa*.

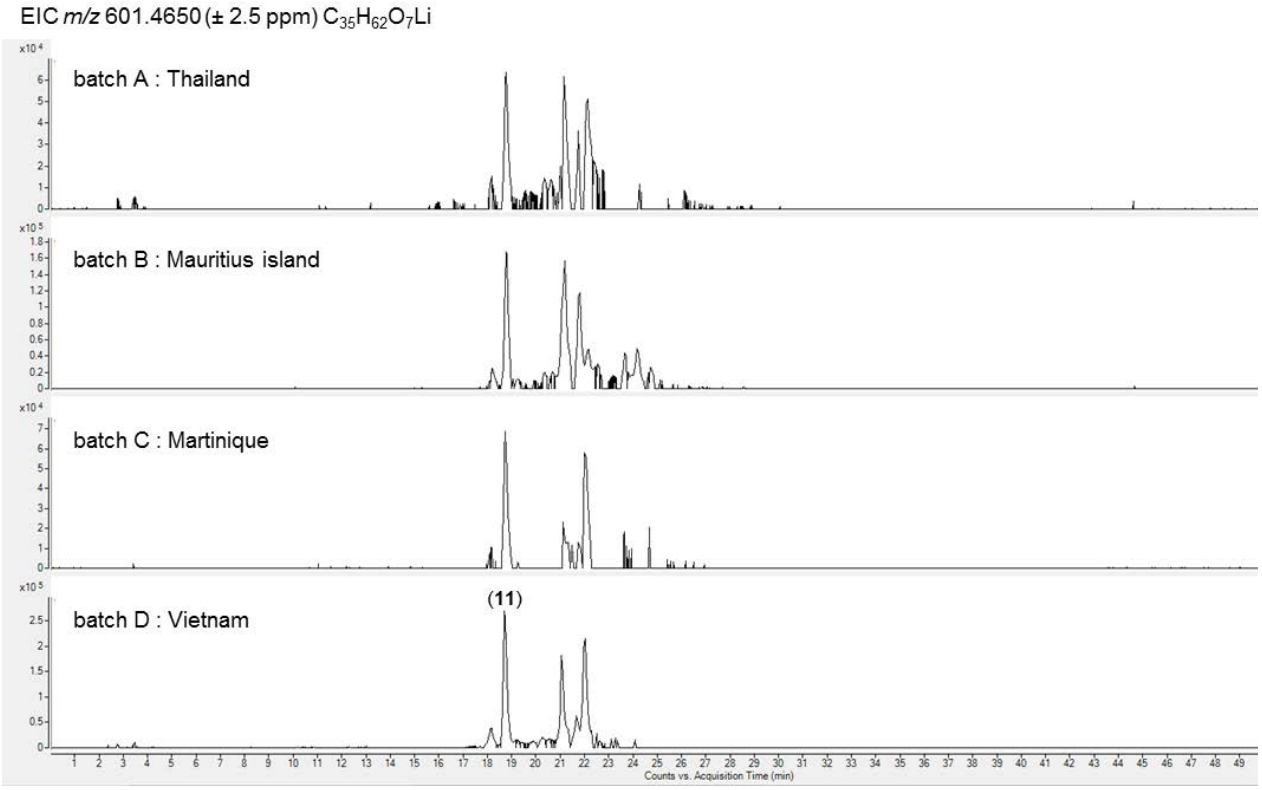


Figure S9. Extracted Ion Chromatograms of $[M+Li]^+$ at m/z_{calc} 601.4650 (± 2.5 ppm; $C_{35}H_{62}O_7Li$) from the four pulps crude extracts of *A. squamosa*.

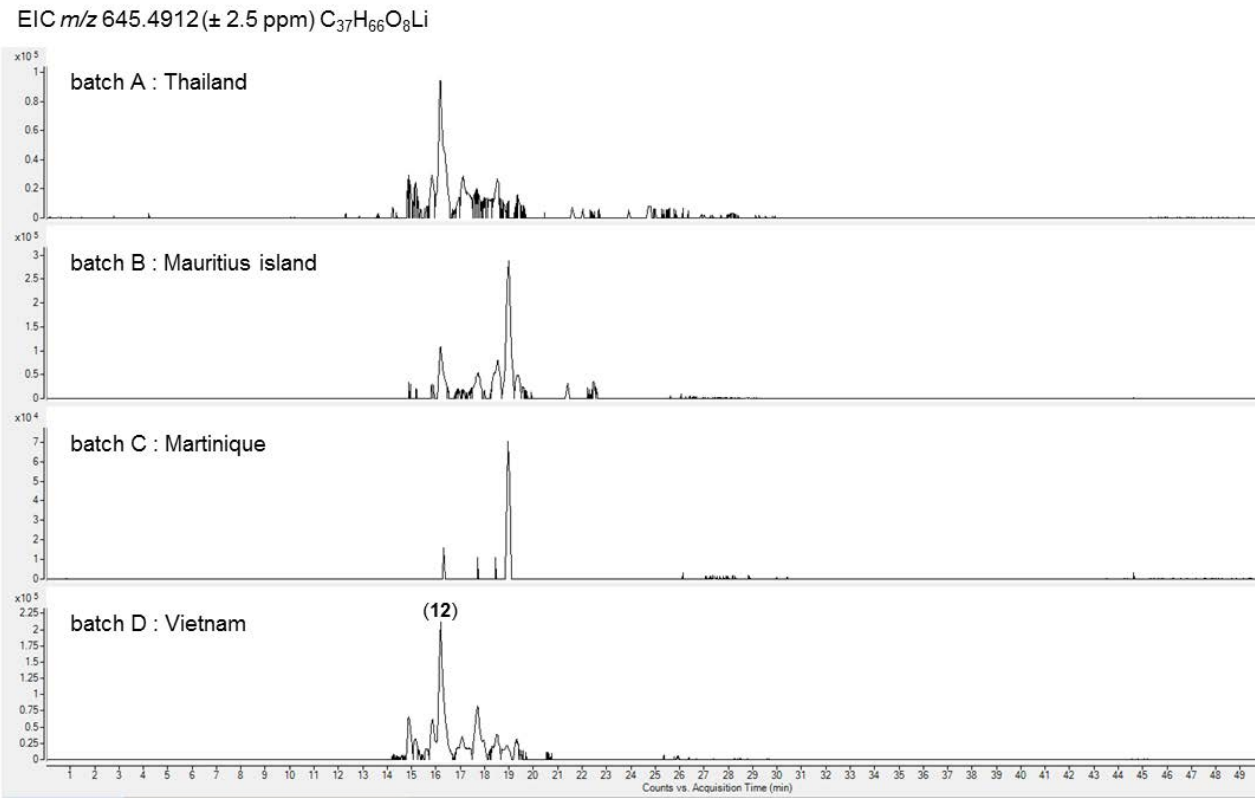


Figure S10. Extracted Ion Chromatograms of $[M+Li]^+$ at m/z_{calc} 645.4912 (± 2.5 ppm; $C_{37}H_{66}O_8Li$) from the four pulps crude extracts of *A. squamosa*.

Table S11. Characterized fragments of compound (**8**) (Rt 31.2 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 571.4908, $C_{35}H_{64}O_5Li$) in crude extracts from pulp of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
543.4959	100	M-CO	$C_{34}H_{64}O_4Li$	3.90
527.5010	59	M-CO_2	$C_{34}H_{64}O_3Li$	-0.41
525.4854	26	M-CO-H_2O	$C_{34}H_{62}O_3Li$	-11.17
275.2557	14	Z1	$C_{17}H_{32}O_2Li$	-3.99
233.2451	14	Y1	$C_{15}H_{30}OLi$	-14.10
305.2663	13	X2	$C_{18}H_{34}O_3Li$	14.72

134 **Table S12.** Characterized fragments of compound (**9**) (Rt 25.3 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 587.4857, $C_{35}H_{64}O_6Li$)

135 in crude extracts from pulp of *A. squamosa*.

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
525.4854	100	$M-CO_2-H_2O$	$C_{34}H_{62}O_3Li$	11.80
305.2663	69	X2	$C_{18}H_{34}O_3Li$	6.22
507.4748	97	$M-CO_2-2H_2O$	$C_{34}H_{60}O_2Li$	-1.26
559.4908	78	$M-H_2O$	$C_{35}H_{62}O_5Li$	6.92
523.4697	88	$M-CO_2-H_2O-2H$	$C_{34}H_{60}O_3Li$	4.65
541.4803	94	$M-2H_2O$	$C_{34}H_{62}O_4Li$	-0.05
233.2451	29	Y1	$C_{15}H_{30}OLi$	13.37

136

137

138 **Table S13.** Characterized fragments of annonacin (**1**) (Rt 20.9 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 603.4807,

139 $C_{35}H_{64}O_7Li$) in crude extracts from pulp of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
473.4177	100	X4-H_2O	$C_{29}H_{54}O_4Li$	3.04
491.4282	92	X4	$C_{29}H_{54}O_5Li$	5.25
455.4071	47	X4-2H_2O	$C_{29}H_{52}O_3Li$	3.06
229.1774	12	X4-Y1-2H_2O	$C_{14}H_{22}O_2Li$	2.88
437.3965	9	X4-3H_2O	$C_{29}H_{50}O_2Li$	9.89
305.2663	9	X2	$C_{18}H_{34}O_3Li$	-2.95
523.4697	9	M-CO_2-2H_2O	$C_{34}H_{60}O_3Li$	1.34
541.4803	7	M-CO_2-H_2O	$C_{34}H_{62}O_4Li$	-0.16
247.1880	6	X4-Y1-H_2O	$C_{14}H_{24}O_3Li$	-2.36
301.2713	6	W1-2H	$C_{19}H_{34}O_2Li$	13.31
233.2451	6	Y1	$C_{15}H_{30}OLi$	10.04
303.2870	5	W1	$C_{19}H_{36}O_2Li$	11.96
119.0679	4	M-X4	$C_6H_8O_2Li$	-5.21
275.2557	4	Z1	$C_{17}H_{32}O_2Li$	11.33
505.4591	4	M-CO_2-3H_2O	$C_{34}H_{58}O_2Li$	9.02
391.3394	3	X3	$C_{23}H_{44}O_4Li$	8.75
539.4646	3	M-CO-2H_2O	$C_{34}H_{60}O_4Li$	4.86
249.2037	1	B1/X4	$C_{14}H_{26}O_3Li$	-13.80

140

141

142 **Table S14.** Characterized fragments of compound (**10**) (Rt 26.0 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 585.4701,

143 $C_{35}H_{62}O_6Li$) in crude extracts from pulp of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
541.4803	100	$M-CO_2$	$C_{34}H_{62}O_4Li$	3.27
275.2557	86	Y2	$C_{17}H_{32}O_2Li$	3.57
557.4752	77	M-CO	$C_{34}H_{62}O_5Li$	3.45
523.4697	67	$M-CO_2-H_2O$	$C_{34}H_{60}O_3Li$	5.93
205.2138	26	Y1	$C_{13}H_{26}OLi$	6.39
347.2768	25	X2	$C_{20}H_{36}O_4Li$	-0.32
301.2350	17	B1	$C_{18}H_{30}O_3Li$	0.66
371.2768	8	B2	$C_{22}H_{36}O_4Li$	8.95

144

145 **Table S15.** Characterized fragments of compound (**11**) (Rt 18.7 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 601.4650,

146 $C_{35}H_{62}O_7Li$) in crude extracts from pulp of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
539.4646	100	$M-CO_2-H_2O$	$C_{34}H_{60}O_4Li$	3.00
555.4595	46	$M-CO-H_2O$	$C_{34}H_{60}O_5Li$	2.40
573.4701	39	M-CO	$C_{34}H_{62}O_6Li$	3.83
557.4752	38	$M-CO_2$	$C_{34}H_{62}O_5Li$	1.94
521.4541	35	$M-CO_2-2H_2O$	$C_{34}H_{58}O_3Li$	0.67
273.2400	27	$Y2-H_2O$	$C_{17}H_{30}O_2Li$	0.60
583.4544	19	$M-H_2O$	$C_{35}H_{60}O_6Li$	4.20
291.2506	16	Y2	$C_{17}H_{32}O_3Li$	6.20
221.2087	14	Y1	$C_{13}H_{26}O_2Li$	6.07
271.2244	11	$Y2-2H-H_2O$	$C_{17}H_{28}O_2Li$	0.32
301.2350	10	B1	$C_{18}H_{30}O_3Li$	6.49
203.1982	7	$Y1-H_2O$	$C_{13}H_{24}OLi$	4.31
371.2768	6	B2	$C_{22}H_{36}O_4Li$	2.93
289.2350	4	Y2-2H	$C_{17}H_{30}O_3Li$	9.20
363.2717	3	X3	$C_{20}H_{36}O_5Li$	1.30

147

148 **Table S16.** Characterized fragments of compound (**12**) (Rt 16.3 min; $[M+Li]^+$, m/z_{calc} = 645.4912

149 ($C_{37}H_{66}O_8Li$) in crude extracts from pulps of *A. squamosa.*

m/z	relative abundance %	fragment	formula	error (ppm)
583.4908	100	$M-CO_2-H_2O$	$C_{36}H_{64}O_5Li$	3.67
565.4803	50	$M-CO_2-2H_2O$	$C_{36}H_{62}O_4Li$	3.84
627.4807	45	$M-H_2O$	$C_{37}H_{64}O_7Li$	3.75
273.2400	44	$Y2-H_2O$	$C_{17}H_{30}O_2Li$	0.23
609.4701	39	$M-2H_2O$	$C_{37}H_{62}O_6Li$	10.9
601.5014	31	$M-CO_2$	$C_{36}H_{66}O_6Li$	5.65
599.4857	30	$M-CO-H_2O$	$C_{36}H_{64}O_6Li$	-0.43
291.2506	23	Y2	$C_{17}H_{32}O_3Li$	1.32
581.4752	22	$M-CO-2H_2O$	$C_{36}H_{62}O_5Li$	3.76
371.3132	16	$B2-CO_2$	$C_{23}H_{40}O_3Li$	13.13
271.2244	15	$Y2-H_2O-2H$	$C_{17}H_{28}O_2Li$	-0.12
415.3030	13	B2	$C_{24}H_{40}O_5Li$	-4.03
547.4697	12	$M-CO_2-2H_2O$	$C_{36}H_{60}O_3Li$	-1.00
345.2612	11	B1	$C_{20}H_{34}O_4Li$	5.13
221.2087	10	Y1	$C_{13}H_{26}O_2Li$	-3.56
289.2350	8	Y2-2H	$C_{17}H_{30}O_3Li$	7.11

150

The fruit of *Annona squamosa* L. as a source of environmental neurotoxins: From quantitation of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis.

Figure complémentaire hors texte

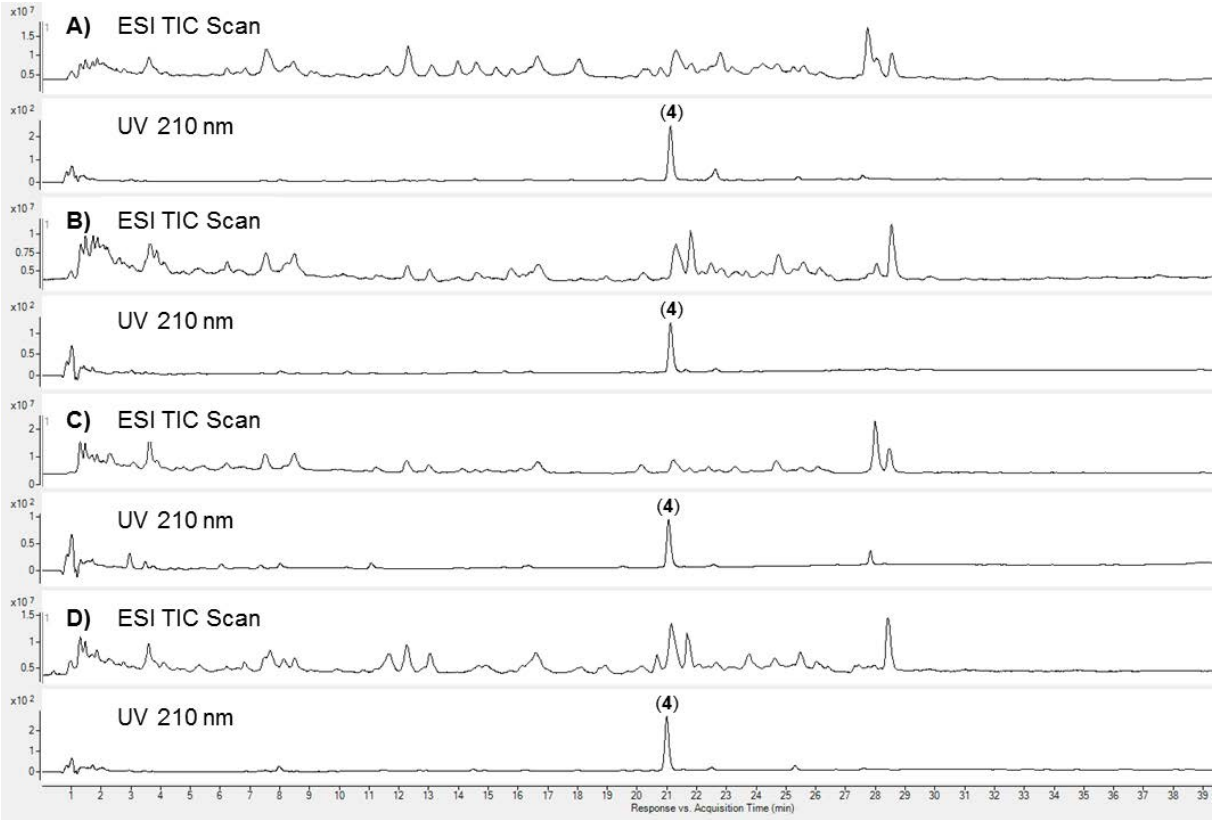


Figure hors texte : Chromatogrammes TIC et UV (λ = 210 nm) des extraits totaux des 4 lots de fruits d'*Annona squamosa* (1 mg/mL, injection 5 µL)

- **A)** Lot A : Thaïlande
- **B)** Lot B : Ile Maurice (Mauritius)
- **C)** Lot C : Martinique
- **D)** Lot D : Vietnam

2.3. Commentaires

- La squamocine a été identifiée comme acétogénine majoritaire dans la pulpe d'*Annona squamosa*, par co-injections en CLHP-UV et CLHP-MS.

- Son dosage a été effectué dans quatre lots de de fruits d'origines différentes, avec des teneurs en squamocine variant de 13 à 38 mg par fruit.

- Une étude complémentaire de la composition de ces extraits bruts a été menée par CLHP-ESI-Q-TOF, suite à une optimisation des conditions de fragmentation à partir d'AAGs isolées utilisées comme modèles. Des essais menés dans un premier temps sur l'annonacine (type A-1b) et la squamocine (type B-1a), ont par la suite été étendus à l'annonacinone (type A-1b) et la bullatacine (type B-1b), dans le but de mettre en avant les ions fragments pour chacun de ces types et sous-types d'AAGs qui sont les plus fréquemment rencontrés.

- Bien que des disparités aient été observées, 11 AAGs dont la squamocine la bullatacine et l'annonacine, ont pu être décrites comme étant systématiquement présentes dans ces extraits, donnant ainsi la première composition en AAGs majoritairement retrouvées dans les fruits d'*Annona squamosa*.

2.3.1. Développement de la méthode MS/MS

Bien qu'une méthode de dereplication efficace ait été développée antérieurement et appliquée avec succès à de nombreux produits alimentaires (Le Ven *et al.*, 2014, 2012), il est apparu intéressant de l'adapter à un spectromètre avec analyseur de masse tandem à temps de vol, plus récent, doté d'une meilleure sensibilité, et disponible au laboratoire.

2.3.1.1. Mise au point de la détection

La source utilisée est la Dual ESI en mode positif, 1700 *m/z,* 2 GHz extended dynamic range. La mise au point de la détection a été effectuée par injections répétées de 5 µL d'une solution de squamocine dans le méthanol à 10 µg/mL. La colonne Sunfire® C_{18} mentionnée dans l'article a été utilisée, avec une phase mobile isocratique eau / acétonitrile 10:90 à un débit de 0,3 mL/min. La valeur du fragmenteur et les paramètres de source ont été optimisés à partir des valeurs de base spécifiées dans le manuel d'utilisation de l'appareil (Figure 32). Les valeurs ont été retenues sur la base des aires de pic de la squamocine (t_R=3,9 min).

Paramètres	Valeurs de base
Gas Temp. (°C)	300
Drying Gas (L /min)	10
Nebulizer (psig)	35
Vcap (V)	3000

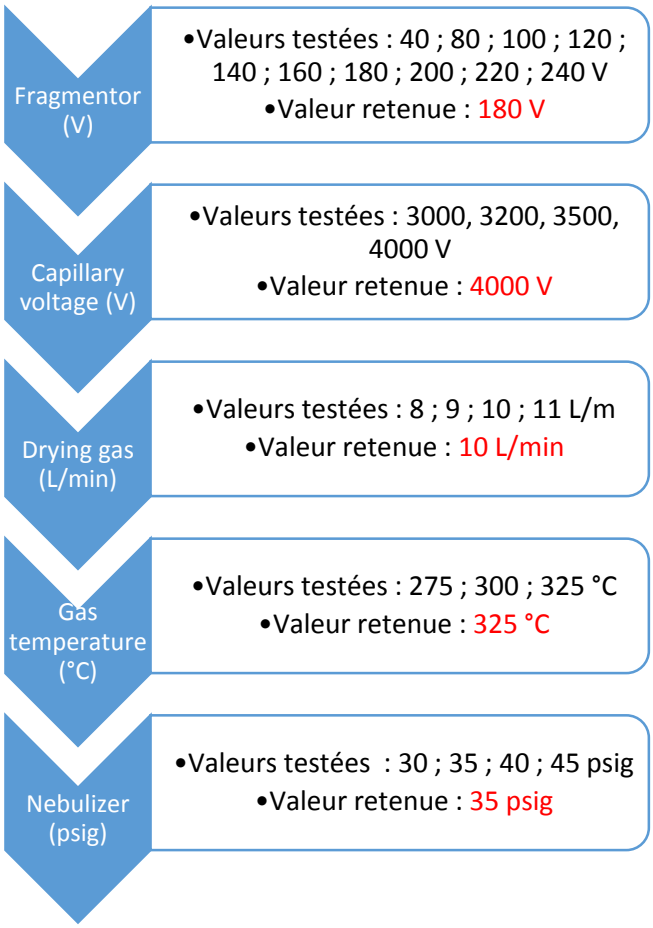


Figure 32 : Optimisation des conditions d'ionisation des AAGs, à partir de la squamocine.

2.3.1.2. Mise au point des conditions de fragmentation

Tests sans infusion d'iodure de lithium post-colonne

Une solution de squamocine à 10 µg/mL dans le MeOH a été injectée pour comparer les fragments obtenus par dissociation induite par collision (CID) à 10, 20 et 30 eV. Les ions $[M+H]^+$ (*m/z* 623,4881) et $[M+Na]^+$ (*m/z* 645,4701) ont été ciblés. L'ion $[M+Na]^+$ était majoritaire (**Figure 33**).

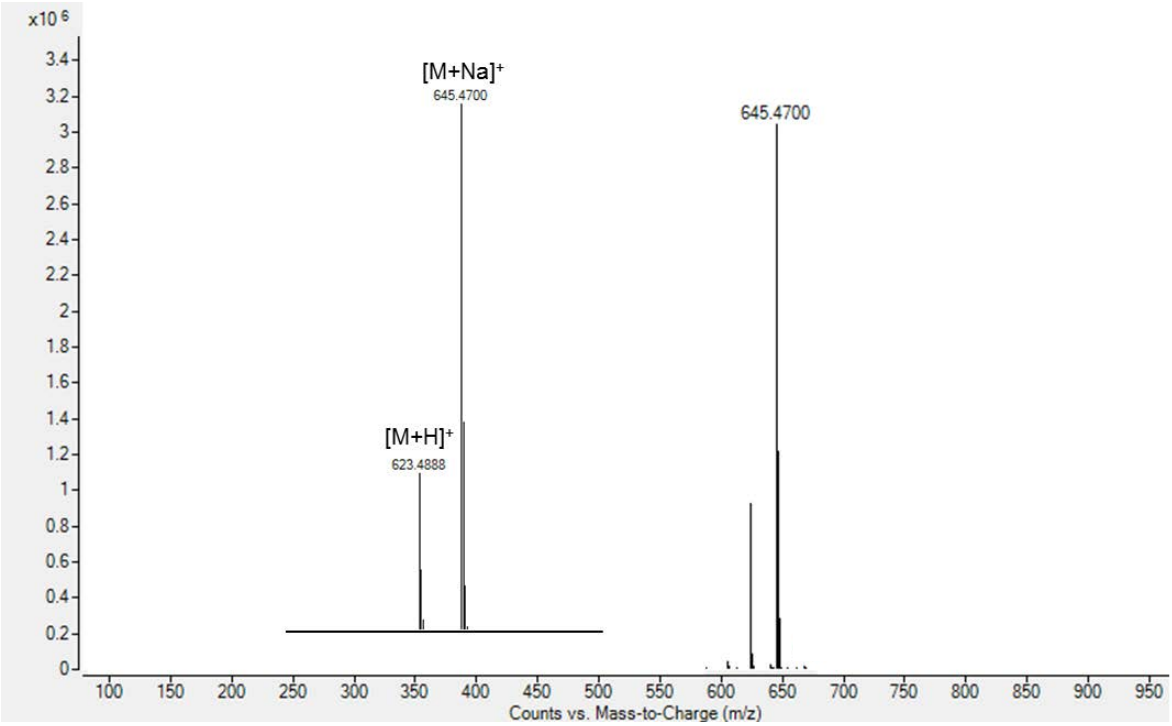


Figure 33 : Spectre MS de la squamocine

A partir de $[M+H]^+$, cinq pertes d'eau ont été observées aux trois énergies de collision testées (**figure 34**). Les *m/z* correspondant aux fragments informatifs B, Y et X ont été recherchés mais aucun n'a été détecté. Dès 20 eV, l'intensité de l'ion parent diminue considérablement sans pour autant noter l'apparition de ces fragments. Les tests n'ont donc pas été poursuivis à des énergies de collision plus élevées. En revanche aucune perte n'a été observée à partir de de l'ion $[M+Na]^+$. Les essais auraient en ce sens pu être poursuivis à des énergies de collision supérieures, mais dans la mesure où l'ionisation sous forme d'une espèce majoritaire $[M+Li]^+$ facilitait à la fois la détection de l'ion parent et des fragments (Le Ven, 2012), il n'est pas apparu nécessaire de développer ce point.

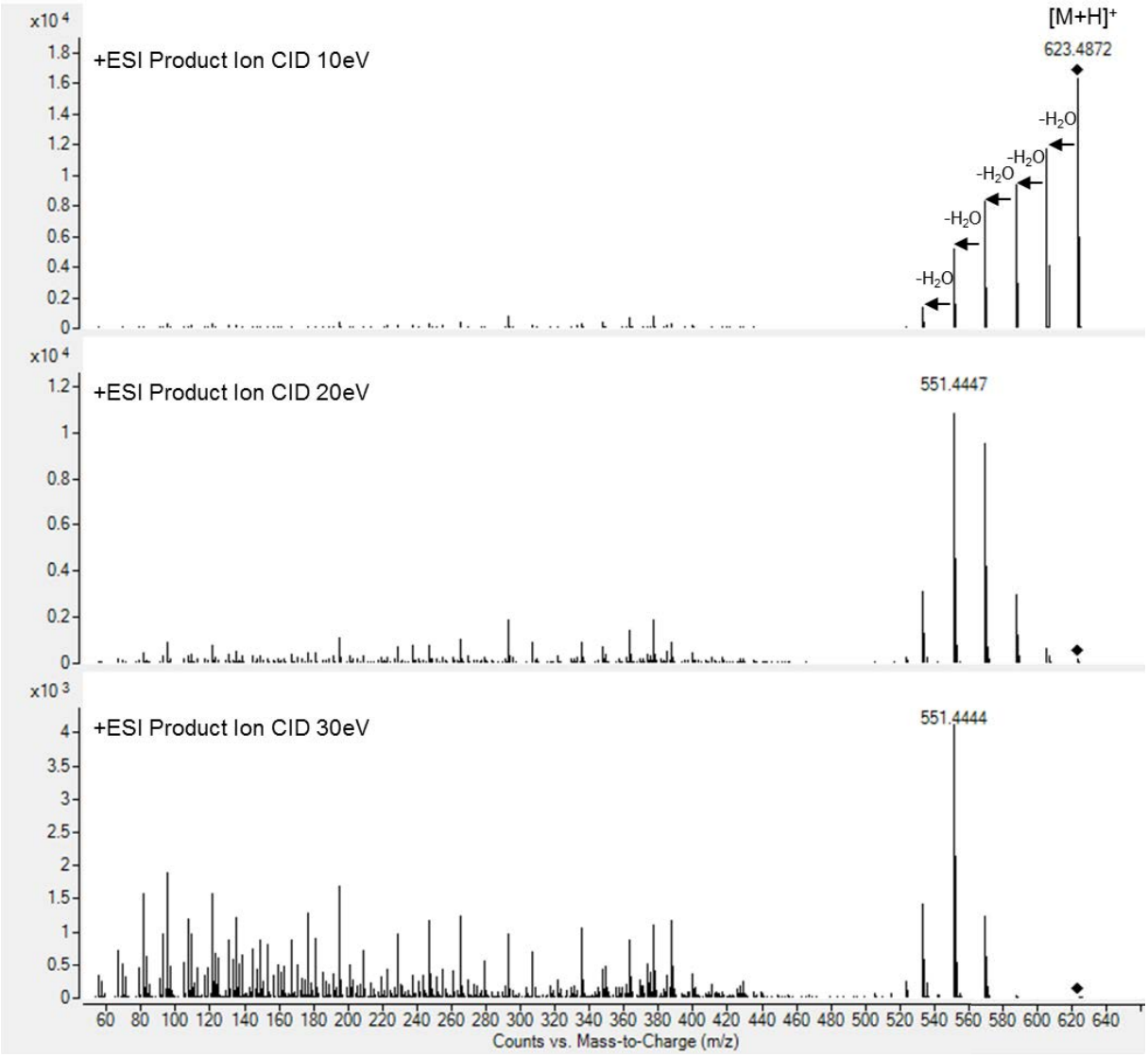


Figure 34 : Spectres d'ions produits de la squamocine à partir de l'adduit $[M+H]^+$, à 10, 20 et 30 eV.

2.3.1.3. Tests avec infusion de d'iodure lithium post-colonne

Les tests suivants ont été effectués en conditions chromatographiques, avec le mode d'élution décrit dans l'**article 3**.

L'utilisation de l'iodure de lithium à 2 mM à 5 µL/min dans le méthanol a été conditionnée par de précédents résultats obtenus en couplage LC-MS (Allegrand et al., 2010 ; Le Ven et al., 2012). Les différences d'intensités de signaux sur les TIC d'un extrait brut de pulpe d'Annona squamosa sont visibles **Figure 35**. Les pics étaient mieux définis et plus intenses lors de l'utilisation d'infusion de LiI post-colonne. En outre les ions $[M+Li]^+$ étaient les plus abondants pour chacune des quatre AAGs de référence (annonacine, annonacinone, bullatacine, squamocine) utilisées comme modèles de fragmentation dans l'**article 3**. Les spectres sont obtenus dans les conditions décrites dans cet article (**Figures 36 à 39**).

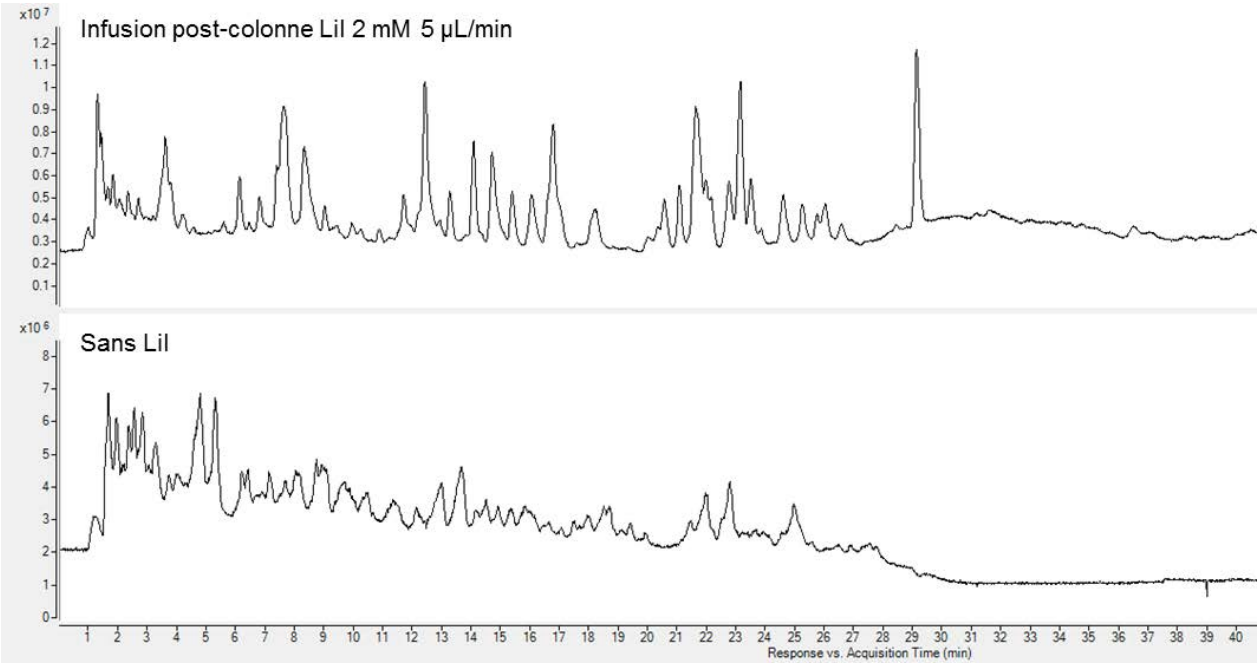


Figure 35 : TICs comparés d'un extrait de pulpe d'*Annona squamosa* (lot A, article 3), obtenus par acquisition en Full Scan, avec et sans infusion de lithium post-colonne.

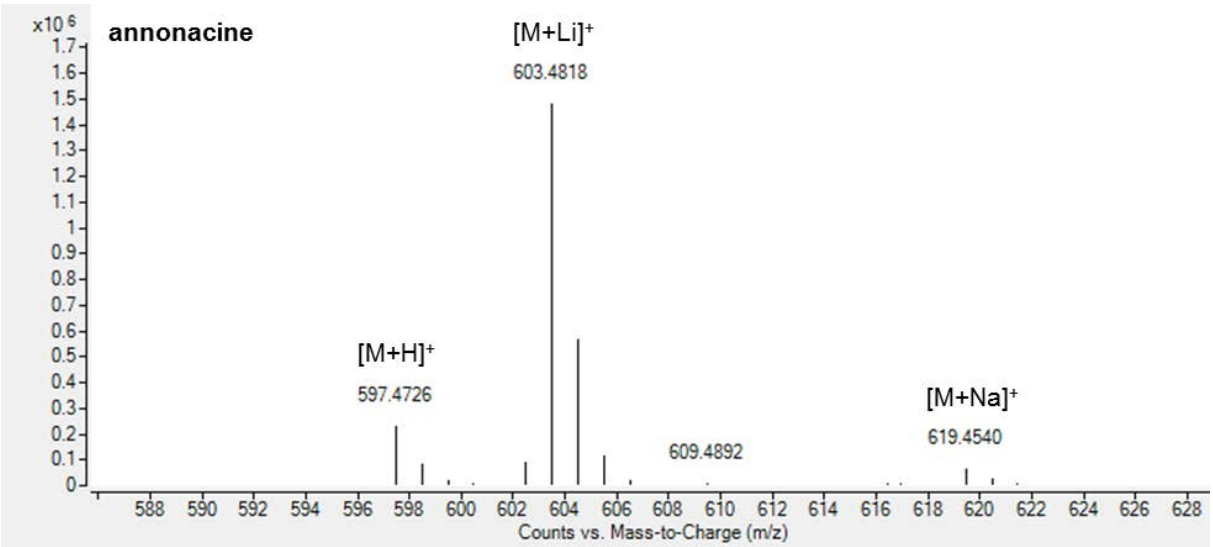


Figure 36 : Spectre de l'annonacine à 10 µg/mL dans le MeOH (injection 5 µL), avec infusion post-colonne de LiI à 2 mM (débit 5 µL/min). Conditions chromatographiques décrites dans l'article 3.

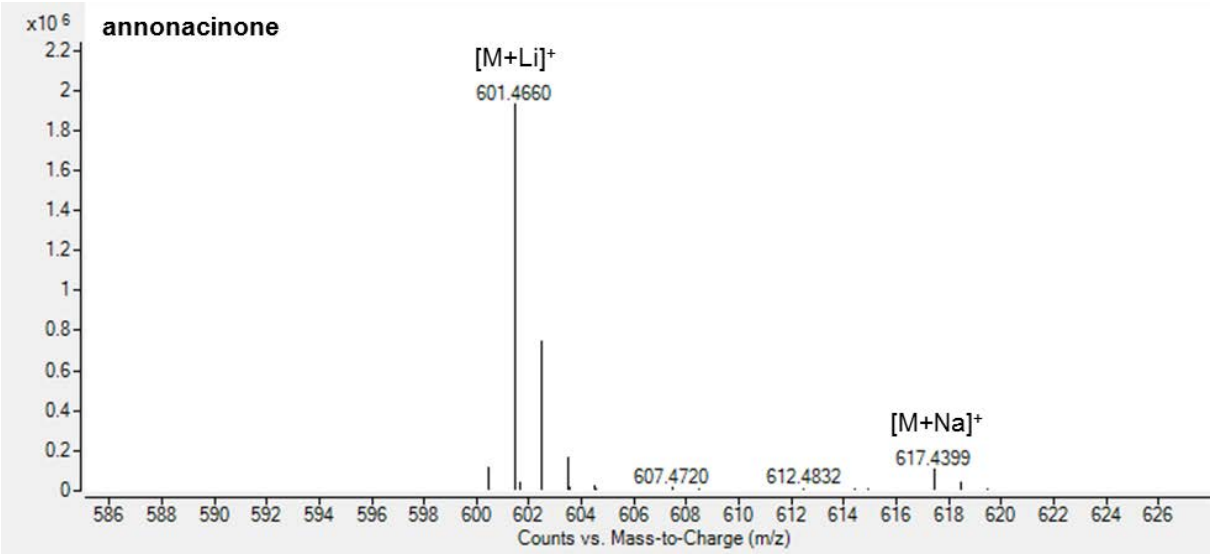


Figure 37 : Spectre de l'annonacinone à 10 µg/mL dans le MeOH (injection 5 µL), avec infusion post-colonne de LiI à 2 mM (débit 5 µL/min). Conditions chromatographiques décrites dans l'article 3.

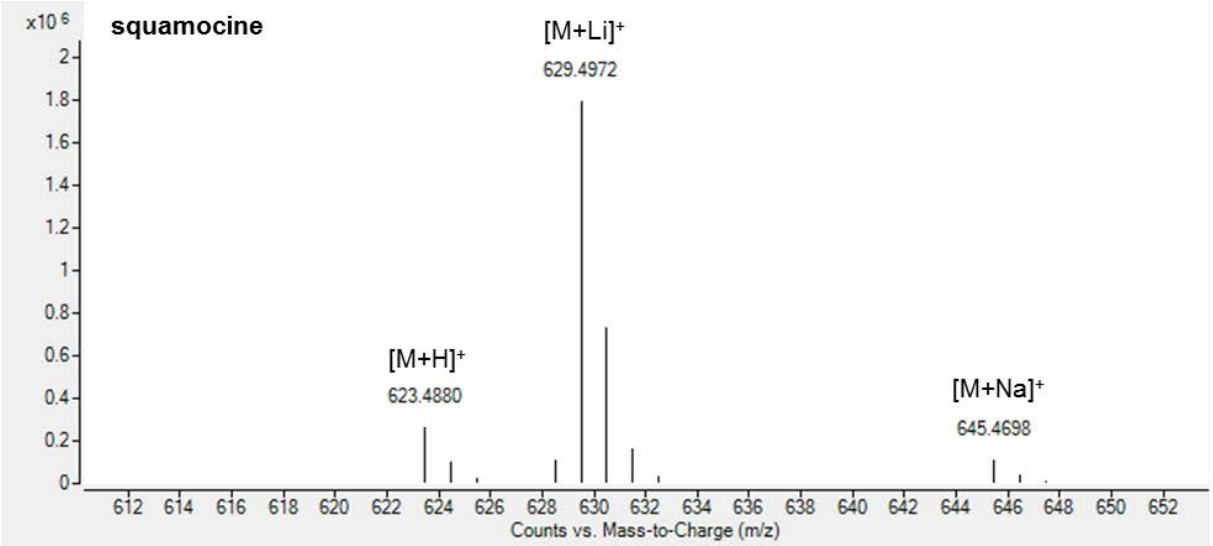


Figure 38 : Spectre de la squamocine à 10 µg/mL dans le MeOH (injection 5 µL), avec infusion post-colonne de LiI à 2 mM (débit 5 µL/min). Conditions chromatographiques décrites dans l'article 3.

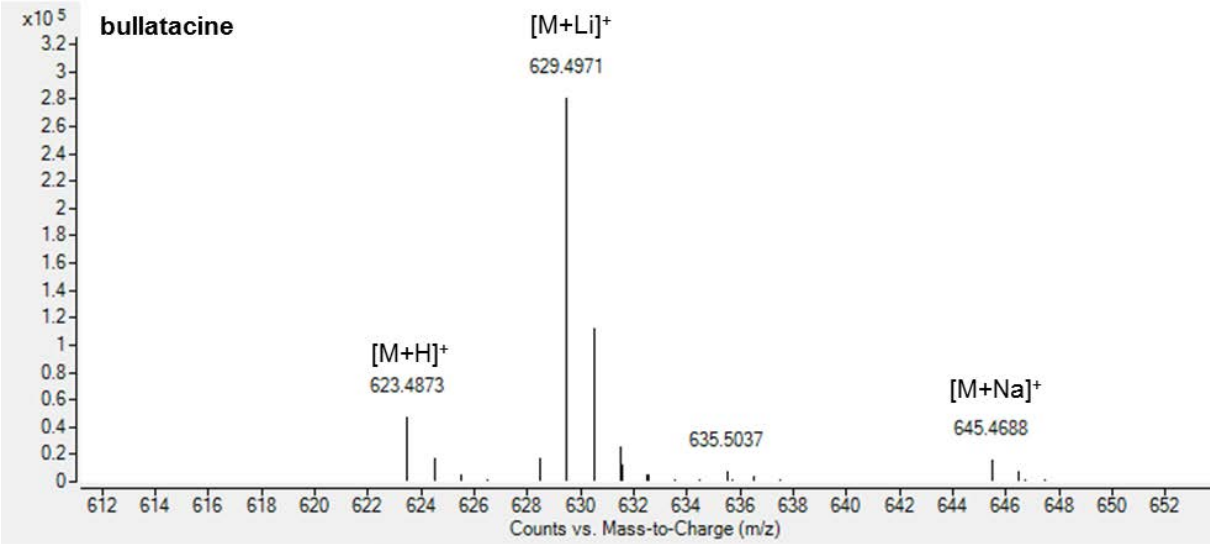


Figure 39 : Spectre de la bullatacine à 10 µg/mL dans le MeOH (injection 5 µL), avec infusion post-colonne de LiI à 2 mM (débit 5 µL/min). Conditions chromatographiques décrites dans l'article 3.

2.3.2. Traitement des données

2.3.2.1. Recherche de formules brutes

La recherche de formules brutes pouvant correspondre à des AAGs a consisté en l'établissement de la liste présentée dans les informations complémentaires de l'article. Les *m/z* correspondants aux ions mono-isotopiques $[M+Li]^+$ ont ensuite été calculés à partir des formules brutes dans le logiciel MassHunter Qualitative Analysis version B.06.00 (logiciel constructeur Agilent®), et une liste d'ions a été générée permettant d'extraire sous forme d'EIC les masses d'intérêt dans chaque lot de pulpe.

2.3.2.2. Recherche d'ions caractéristiques

Lors des essais de fragmentation sur l'annonacine et la squamocine, les ions produits habituellement décrits (Le Ven *et al.*, 2012) n'étaient pas forcément retrouvés sur les spectres. C'est le cas des ions B, absents pour l'annonacine. Cette particularité a par la suite pu être vérifiée pour l'annonacinone et la bullatacine, en faisant une caractéristique du sous-type 1b. Nous avons donc dressé une liste de fragments hypothétiques pour l'annonacine et la squamocine. S'appuyant sur cette liste, des fragments non décrits auparavant ont pu être identifiés. B1/X4 en est un exemple (**Figure 40 :** Ion fragment B1/X4 de l'annonacine. Les fragments plus classiques, décrits dans l'article, ont ensuite été recherchés sur les spectres d'extraits de pulpes.

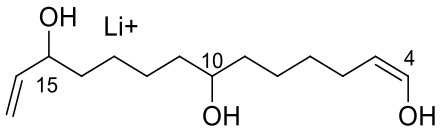


Figure 40 : Ion fragment B1/X4 de l'annonacine en présence de lithium.

3. Article 4 : Quantification globale d'AAGs par RMN quantitative : application à des extraits de pulpes d'*Annona muricata*

^{1}H qNMR method development for global quantification of Annonaceous acetogenins in crude fruit pulp extracts : Annona muricata *L, as a major source of exposure*

En preparation pour Phytochemical Analysis

3.1. Résumé

Introduction

Les acétogénines d'Annonaceae (AAGs) constituent un groupe de neurotoxines environnementales, potentiellement impliquées dans la survenue de complexes parkinsonismes atypiques/démence sporadiques. La récente mise en évidence d'un grand nombre d'acétogénines dans des fruits comestibles et des produits alimentaires dérivés requiert la mise en œuvre d'outils analytiques adaptés et facilement utilisables pour une estimation globale de l'exposition humaine.

Objectif

Développer une méthode simple pour quantifier les AAGs totales dans des extraits bruts, en utilisant la ^{1}H RMN, applicable à un appareil de routine, pour le contrôle de produits et compléments alimentaires.

Méthode

La quantification a été menée en utilisant les signaux à δ 7,18 ou δ 6,98 ppm correspondant à un proton éthylénique, caractéristiques de la plupart des AAGs, Un développement méthodologique préliminaire a été effectué sur un spectromètre à 400 MHz, avant une transposition sur un appareil à 300 MHz pour l'analyse de routine d'extraits bruts d'*Annona muricata* L. La méthode a été validée avec l'annonacine et la squamocine comme molécules témoins. L'acide fumarique et le diméthylfumarate ont été utilisés comme étalons internes, respectivement dans le CD_3OD et $CDCl_3$. Ce dernier solvant a été choisi pour la suite du développement et l'application en routine. La limite de détection était de 0,5 mM. La limite de quantification (LOQ) était de 2,5 mM, avec une bonne justesse.

Résultats

La teneur totale en AAGs a été quantifiée dans sept lots distincts d'*Annona muricata*, et s'étend de 0,14 mmol à 1,3 mmol par fruit.

Conclusion

Une méthode simple, spécifique et présentant une justesse satisfaisante pour déterminer la quantité totale d'AAGs dans des extraits bruts issus de pulpe de fruits d'*A. muricata* a été développée ; elle est applicable en routine.

3.2. Article

Manuscript for submission to *Phytochemical Analysis*

^{1}H qNMR method development for global quantification of Annonaceous acetogenins in crude fruit pulp extracts: *Annona muricata* L. as a major source of exposure.

Short title: **^{1}H qNMR of Annonaceous acetogenins and *Annona muricata* fruit.**

Natacha BONNEAU, Timothé CYNOBER, Jean-Christophe JULLIAN, Pierre CHAMPY *

Affiliation: Laboratoire de Pharmacognosie, BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, UFR Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

* Correspondance to: Laboratoire de Pharmacognosie, BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, UFR Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92290, Châtenay-Malabry, France.
E-mail address: pierre.champy@u-psud.fr

ABSTRACT

Introduction

Annonaceous acetogenins (AAGs) constitute a group of environmental neurotoxins, possibly implicated in sporadic atypical Parkinsonism / dementia complexes. The recent evidencing of complex mixtures of AAGs in edible fruits and derived food products requires efficient and practical analytical tools for a global estimation of Human exposure.

Objective

To develop a simple routine method for the direct quantitation of total AAGs within crude extracts, using commonly available ^{1}H RMN spectrometer, for food and dietary supplements control.

Methodology

Quantitation was carried out using signals corresponding to the deshielded ethylenic protons characterizing most AAGs, at δ 7.18 or δ 6.97 ppm. Preliminary method development was carried out on a 400 MHz spectrometer, and then transposed on a 300 MHz apparatus for routine application on fruits crude extracts of *Annona muricata* L. The method was validated with annonacin and squamocin as reference compounds. Fumaric acid and dimethyl fumarate were used as IS in MeOD and $CDCl_3$, respectively, the latter being proposed for routine method development and experiments. The LOQ was 2.5 mM, with good accuracy, and the LOD was 0.5 mM. Two internal standards (IS) were successively tested.

Results

The total AAGs content was quantified in 7 distinct batches of *Annona muricata*, and ranged from 0.14 mmol to 1.3 mmol per fruit.

Conclusion

A simple, accurate and specific method for global estimation of AAGs content was developed and validated for routine quantitation in fruit pulp crude extracts.

Abbreviations: AAG: Annonaceous acetogenin; COSY: Homonuclear correlation spectroscopy; CV: Coefficient of variation; HMBC: Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy; HSQC: Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy; IS: Internal Standard; LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification; qNMR: Quantitative Nuclear Magnetic Resonance; SD: standard deviation; T1: longitudinal relaxation time; THF: Tetrahydrofuran; TMS: Tetramethylsilane; T_R: Sequence repetition time.

Keywords: *Annona muricata* L.; Annonaceous acetogenins; Annonacin; Neurotoxins; Squamocin, Quantitative NMR.

INTRODUCTION

Annonaceous acetogenins (AAGs) are a homogenous class of polyketides specific to the Annonaceae family. They are constituted of a long aliphatic chain bearing oxygenated groups, terminated by a γ-methyl-γ-lactone, which is most generally α,β-unsaturated (Bermejo et al., 2005). The number of central oxygenated groups – mostly THF moieties – determines the type of AAG (mostly A-type for mono-THF, and B-type for adjacent bis-THF) while the structure of the lactonic ring determines the sub-type (α,β-unsaturated being sub-type 1) (Cavé et al., 1997). AAGs are strongly cytotoxic due to a potent inhibiting potential of complex I in the mitochondrial respiratory chain (NADH ubiquinone oxido-reductase), whose activity is diminished in parkinsonian patients (Camilleri and Vassallo, 2014). Various inhibitors of this enzyme, such as MPP^+ or rotenone, a pesticide banned in the EU, were identified as environmental neurotoxins (Schapira, 2010). Annonacin, a prototypical AAG, was found to induce neurodegeneration *in vitro* and *in vivo*, with specific hallmarks of tauopathies (Höllerhage et al., 2009; Potts et al., 2012; Yamada et al., 2014).

AAGs were identified in fruits of several cultivated Annonaceae, which are largely consumed worldwide (e.g. custard apple – *Annona squamosa* L.; pawpaw – *Asimina triloba* (L.) Dunal; soursop – *Annona muricata*, L.) (Champy et al., 2005; Höllerhage et al., 2015; Levine et al., 2015; Potts et al., 2012). These species were proposed to be responsible for sporadic Parkinsonism / dementia syndromes in tropical communities, as evidenced in New Caledonia (Angibaud et al., 2009) and in the French West Indies, where Guadeloupean parkinsonism, an endemic tauopathy, was linked to *A. muricata* (Lannuzel et al., 2007). This issue sheds light on the need for an estimation of exposure in Human. Nevertheless, the "BELFRIT list", aiming at the European harmonization for botanicals used in dietary supplements, recognizes the use of *Asimina triloba*, for which the presence of AAGs "*inducing atypical Parkinsonism*" is acknowledged, as well as that of 3 *Annona* spp., for which "*the amount of acetogenins must be determined*".

However, only few attempts were made to quantify these compounds in Annonaceae. Besides total extraction and purification for gravimetric estimation (Potts et al., 2012), quantification mostly involved methods coupling liquid-chromatography with a UV detector (Champy et al., 2005; Gromek et al., 1994) or with mass spectrometry (Gu et al., 1999 ; Levine et al., 2015). These methods theoretically imply construction of individual calibration curves for each specific AAG, resulting in the quantitation of a limited number of those molecules only. For both methods, chromatographic resolution might constitute as serious drawback when studying crude extracts. Besides, complex purification steps are required in order to get AAGs standard analytes for each calibration curve, since they are not commercially available. Hence until now, quantification processes focused on major AAGs, leading to probable underestimation regarding exposure and potential toxicity. Indeed, the impressive number of distinct AAGs contained in a single extract was enlightened by qualitative studies of *Annona*-derived food products (Le Ven et al., 2012, 2014). Quantification of a group of several AAGs of identical molecular mass by MALDI-TOF MS was explored (Champy et al., 2005), but no method was designed for the total

87 amount of AAGs in plant material, until recently, when the use of mono-dimensional ^{1}H NMR was
88 proposed (Bonneau et al., 2012; Teixeira Machado et al., 2015). Indeed, the ethylenic signals from α,β-
89 unsaturated-γ-lactones seem promising for global quantitation, two distinct chemical shifts only
90 characterizing the vast majority of AAGs, and NMR intrinsically being a quantitative method. This
91 essential quantitative characteristic of NMR relies on the fact that integrated intensity is proportional to
92 the number of nuclei contributing to the signal (Shoolery, 2007). Quantitative ^{1}H NMR (qNMR) has then
93 risen an enthusiastic interest with a broad range of applications such as quality control of
94 pharmaceuticals (Holzgrabe, 2010; Webster and Kumar, 2014), or determination of natural product
95 purity in the context of drug discovery (Pauli et al., 2014). The field of complex mixtures analysis by
96 NMR, which came along with system biology development and rapid expansion of metabolomics, also
97 involves quality control of phytochemicals (Simmler et al., 2014). NMR, being known for displaying
98 robust analysis, indeed seems a dedicated method for quantitation. However its accuracy largely
99 depends on acquisition and processing (Bharti and Roy, 2012; Holzgrabe, 2010; Pauli et al., 2012).
100 Among other acquisition parameters, a uniform pulse excitation for the spectral width of interest should
101 be considered. Selection of a suitable repetition time (or recycling time, T_R), relying on the longest
102 relaxation time of the sample ($T_R \geq 5 \times T1$) is also required. Specific experiments for determination of
103 the longitudinal relaxation time (T1) of the signals of interest should therefore be performed. Another
104 important fact is the simplicity and "purity" of the quantitated signal, with no overlap on the spectrum.
105 When using an internal standard, these characteristics also apply to its signal.

106 The potential of qNMR for AAGs specific signals was lately successfully exemplified with Annonaceae
107 leaves, unfortunately without discussion on parameters optimization and method validation (Teixeira
108 Machado et al., 2015). First successful attempts by our team (Bonneau et al., 2012) were hampered by
109 solubility issues in CD_3OD which prevented us from extending the method to a larger variety of samples.
110 A simple method for the determination of total AAGs is here proposed using ^{1}H qRMN, based on the
111 high structural homogeneity of these molecules. Quantitation relies on the lactonic ethylenic proton of
112 AAGs, in comparison with an internal standard. For method validation, different experimental conditions
113 were compared, including deuterated solvents. LOD and LOQ were determined. The method was
114 applied to crude extracts of *Annona muricata* fruits, with minimal preparation step, providing fresh insight
115 on Human exposure through diet.

116

117 # EXPERIMENTAL

118 ## Plant material

119 Seven ripe fruits of *Annona muricata* L., ready for consumption, were bought from local market stalls or
120 directly harvested. They are designated as batches **A** to **G** (1 fruit each): **A** and **B** were bought on the
121 market at Saint Paul, Reunion Island, respectively in October 2011 and October 2012; **C** was bought in
122 Mauritius Island in April 2012; **D** was bought in French Guiana, in July 2012; Fruits **E** and **F** were

123 individually collected in Adzopé, Ivory Coast, in February 2012. The last fruit (**G**), from New Caledonia,
124 was harvested in January 2013 at the *Institut de Recherche Agronomique de Nouvelle Calédonie*.

125 Chemicals and reagents

126 Annonacin (**1**) (purity > 97%) and squamocin (**2**) (purity > 97%) were isolated respectively from the
127 seeds of *Annona muricata* L. and *Annona squamosa* L., as previously described (Bermejo et al., 2005).
128 Fumaric acid (> 97%), dimethyl fumarate (**3**) (traceCERT quality), methylene chloride, chloroform-d and
129 methanol-d were provided by Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

130 Preparation of standard solutions

131 ***Internal standards solutions.*** Stock solutions of fumaric acid (200 mM in CD_3OD) and dimethyl
132 fumarate (20 mM in $CDCl_3$) were stored at -20°C or 4°C and diluted to reach the concentration of 5 or
133 10 mM for calibration curve. Fumaric acid and dimethyl fumarate were respectively diluted to reach 5
134 mM and 10 mM in final solutions of crude extracts.

135 ***Analytes solutions for calibration curve, LOD, LOQ.*** In order to build a calibration curve, solutions of
136 annonacin ranging from 5 to 100 mM were prepared by a series of dilution, then mixed 50:50 with
137 solution of dimethyl fumarate (20 mM in $CDCl_3$) in order to obtain solutions at the concentrations of 2.5;
138 5; 7.5;10;25; 50 mM for annonacin and 10 mM for IS. Another series of dilution was prepared to reach
139 concentrations from 0.1 to 2.5 mM in order to determine the limit of detection for annonacin. LOQ was
140 defined as the lowest concentration with an accuracy error of less than 20 %. LOD was defined as the
141 lowest concentration displaying a regular peak shape, with a S/N ratio > 10.

142 Equimolar (5 mM) mixed solution of annonacin and fumaric acid was prepared for inversion recovery
143 experiment on the 400 MHz spectrometer. Mixed solution of annonacin (5 mM), squamocin (5 mM), and
144 dimethyl fumarate (10 mM) was prepared for parameter optimization on the 300 MHz spectrometer.

145 Extraction and sample preparation

146 The fresh pulp of each fruit was separated from the seeds and pericarp. Pulp was air dried at room
147 temperature for 2 days, then ground. Powder was extracted three times with CH_2Cl_2 (1 mL per gram of
148 fresh pulp). Extraction yields were comprised between 0.1 to 0.3 % of fresh pulp. For experiments in
149 CD_3OD, the crude extracts of batches **C** and **E** were dissolved in 500 µL of solvent containing I.S.
150 (fumaric acid, 5 mM), to achieve a concentration of 80 mg/mL for quantitation. The solution was vortex-
151 mixed until full dissolution of the extract. For experiments in $CDCl_3$, the seven crude extracts were
152 dissolved in 600 µL of solvent containing IS (dimethyl fumarate, 10 mM) to achieve a concentration of
153 100 mg/mL. Solutions of batches **E** and **G** were also prepared at the concentrations of 50 mg/mL and
154 85 mg/mL, respectively (10 mM IS, $CDCl_3$) for repeated quantitation, and inversion recovery
155 experiments. Solutions were vortex-mixed until full dissolution of the extract and no filtration step was
156 applied.

157 **NMR experiments**

158 400 MHZ experiment. NMR measurements were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer with
159 a 5 mm BBI probe. The ^1H chemical shifts (δ) are expressed in ppm with reference to the residual solvent
160 signal of CD_3OD (CHD_2OD, 3.31 ppm relative to the TMS scale). For quantitation experiments in
161 CD_3OD, fumaric acid is used as IS. The following parameters were used: Number of scans = 16; T= 300
162 K; Relaxation delay = 30 seconds; Pulse width = 6.8250; Pulse sequence: zg30; Acquisition time =
163 3.9716 s; Spectral width = 8250. Irradiation with a 90° pulse sequence was also performed but did not
164 show better results (not shown). Inversion recovery T1 experiment was performed on an equimolar
165 mixed solution of annonacin (**1**) and fumaric acid at the concentration 5 mM in CD_3OD, and on crude
166 extract **E**, at the concentration of 85 mg/mL spiked with dimethyl fumarate (10 mM in $CDCl_3$). Focus was
167 made on the signals of interest: δ 7.36 ppm, δ 6.75 ppm in CD_3OD; δ 7.18 ppm, δ 6.97 ppm and δ 6.85
168 ppm in $CDCl_3$. 2D homonuclear (COSY) and heteronuclear (HSQC, HMBC) experiments were recorded
169 in $CDCl_3$.

170 ***300 MHz experiments***. NMR measurements were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer with
171 a DUL S1 5 mm probe. The ^1H chemical shifts (δ) are expressed in ppm with reference to the residual
172 solvent signal of $CDCl_3$ ($CHCl_3$, 7.26 ppm relative to the TMS scale). For quantitation in $CDCl_3$, the
173 following parameters were used: T = 297 K; Number of scans = 64; Relaxation delay = 5 seconds; Pulse
174 width = 6.7500; Pulse sequence: zg30; Acquisition time = 5.3085 s; Spectral width = 6172.8. For all
175 experiments, singlet of the Internal Standard was normalized at 100 for integration. Phase correction,
176 baseline correction and integration were performed manually for all experiments.

177

178 **RESULTS AND DISCUSSION**

179 For the global quantification of AAGs, ^1H NMR was chosen for it displays signal intensity with a
180 proportional response to the number of contributive nuclei, some being identical for this whole series of
181 molecules. Soursop fruit pulp (*Annona muricata*) appeared as a relevant model for development of this
182 method. Seven batches were extracted with suitable solvent (Bermejo et al., 2005; Le Ven et al., 2012).
183 Development of a reproducible quantitative ^1H NMR method requires the investigation of several key
184 parameters, starting with selection of an appropriate signal from molecules to be quantified and from an
185 internal standard, when used. Two deuterated solvents compatible with the solubility of AAGs and two
186 suitable internal standards were successively tested, namely CD_3OD with fumaric acid as the internal
187 standard (IS), and $CDCl_3$ with dimethyl fumarate as alternative IS.

188

Selection of signals for quantitation

Nearly 500 AAGs have been reported since their discovery in the 1980's, all of them displaying a terminal γ-methyl-butyrolactone, the majority of which is α-β unsaturated (sub-type 1, divided as sub-types 1a and 1b). To our knowledge, only 12 minor representatives have no ethylenic proton in 33 (35) position, besides about 45 "isoacetogenins" which are considered as extraction artifacts when using protic solvents, especially in the presence of bases, as documented (Bermejo et al., 2005). AAGs are constituted of a long alkyl chain (C_{32} / C_{34}) resulting in overlaps of signals in the down-field region of ^{1}H NMR spectra, in $CDCl_3$ and CD_3OD. In these solvents two characteristic signals potentially eligible for quantitation can be distinguished: H-34 (or H-36) (*qd*, δ 5.02-5.05 ppm in $CDCl_3$; sp^3 tertiary carbon) and H-33 (or H-35) (*d*, δ 6.98-7.18 in $CDCl_3$; deshielded ethylenic proton) are indeed clearly isolated on the spectra obtained with pure AAGs. However, in CH_2Cl_2 crude extracts of fruits, only the deshielded ethylenic proton could be identified as clear of hampering signals (Supplementary Fig. S1, S3). This is also the case with *A. muricata* leaves extracts after a purification step, as exemplified by Machado Teixeira *et al.* (2015), as well as in crude seeds extracts (CH_2Cl_2 and AcOEt, not shown). This ethylenic signal (H-33 / H-35) was then chosen for quantitation. For the optimization of parameters and for validation of the method, two purified standards were chosen: Annonacin (**1**), identified as the major AAG in *A. muricata*, was used as a model for sub-type 1b (i.e. bearing a hydroxyl on C-4), while squamocin (**2**), another prototypical AAG, was used as a model for sub-type 1a (i.e. unsubstituted C-4). Their respective ethylenic protons show distinct signals, suitable for quantitation of the most abundant and frequent AAGs, usefully allowing clear distinction between the two main sub-types.

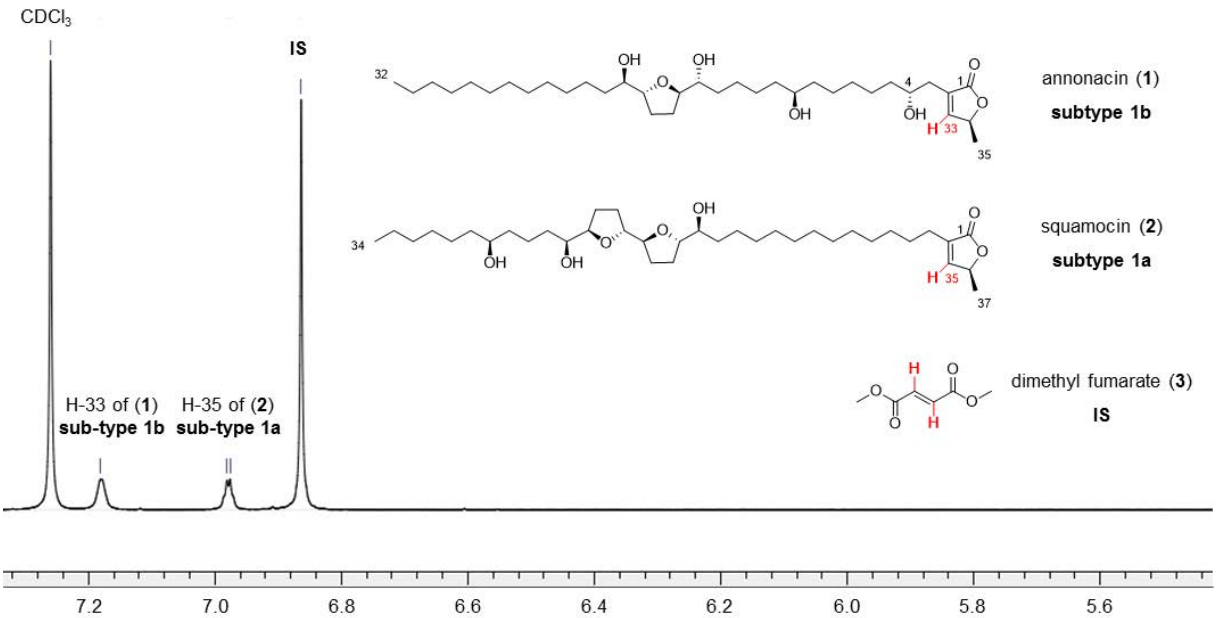


Figure 1. Mixed solution of dimethyl fumarate (10 mM), annonacine (**1**) (5 mM) and squamocine (**2**) (5 mM) in $CDCl_3$ recorded at 300 MHz. Focus is made on ethylenic signals selected for quantitation belonging to AAGs of sub-types 1a (*δ* 6.98 ppm) and 1b (*δ* 7.18 ppm), and to IS (*δ* 6.86 ppm). Full spectrum is presented in Supplementary Fig. S2.

Selection of an Internal Standard and T1 inversion recovery experiments for quantitation at 400 MHz

The use of a coaxial insert was first considered, in order to avoid contamination of the sample with internal standard (IS). However, application of this procedure was uneasy for a large number of samples. We then focused on selection of an IS which could be directly dissolved in deuterated solvent for simple sample preparation. Like quantified signals belonging to the molecules of interest, the IS is required to display a signal of simple shape, preferably singlet, in an area cleared from hindering signals (Pauli et al., 2012). It is also useful to choose an IS whose proton displays a longitudinal relaxation time T1 shorter than the one of the quantitated molecule, in order to avoid unnecessary lengthening of the experiment. Full relaxation between two pulses is indeed needed for accurate quantitation.

In order to measure 99 % of the equilibrium magnetization, repetition time (T_R), which is defined as the total time spent to acquire a single scan spectrum, should be five times the longest T1 of the sample (Bharti and Roy, 2012). This can be verified by measuring T1 of the signals of interest in each sample before quantitation. Since we planned to develop a routine method, this experiment could not be performed on each and every sample. T1 relying on the concentration of the samples, the experiment was then performed at the same concentration range that when acquiring for quantitation on one unique sample. Since T_R mainly comprises relaxation delay (d1) and acquisition time, two arbitrary d1 were then compared when quantitation process was transferred on the routine spectrometer.

At first, experiments were led in CD_3OD, and fumaric acid was chosen as an IS, because it had the advantage of yielding a singlet from two contributing ethylenic protons close to the signals of interest, in a clear area of spectra obtained with crude *A. muricata* fruit extracts. Indeed, spectra of the tested batches mostly displayed signals similar to that of isolated AAGs standards, with distinct ethylenic signals (Supplementary Fig. S1). T1 inversion recovery experiment was performed in CD_3OD on an annonacin (**1**) / IS equimolar solution at low concentration (5 mM), resulting in T1= 4.657 s for δ 7.36 ppm (**1**) and T1= 4.004 s for δ 6.75 ppm (IS). Quantitation experiments were then performed on two crude extracts (80 mg/mL) spiked with IS (5 mM). Signal/Noise ratio were higher than usually accepted for quantitation (S/N > 250) (Holzgrabe, 2010). In order to get full relaxation even at low concentration, d1 was set at 30 seconds (d1 > 5xT1). Scan number was 16 and pulse angle was 30°. Satisfying accuracy (relative error < 8%) was obtained on annonacin (**1**) spiked with IS (5 mM) at the concentrations 2.5, 5 and 10 mM. Experiments were also performed on squamocin (**2**) with a higher scan number (64 scans against 16 scans) and a 90° angle (instead of 30°). These conditions did not provide better accuracy, from 2.5 to 50 mM of **2** (not shown).

Due to solubility issues of the crude extracts in CD_3OD after storage at -20 °C, $CDCl_3$ was preferred. The readily soluble dimethyl fumarate was chosen as the IS instead of fumaric acid. Another T1 inversion recovery experiment was then performed on a crude extract at the concentration of 85 mg/mL spiked with IS at the concentration of 10 mM. Targeted signals, namely δ 7.18 ppm (H-33/35, sub-type 1b; T1 = 1.161 s), δ 6.98 ppm (H-33/35, sub-type 1a; T1 = 1.195 s) and δ 6.86 ppm (IS; T1 = 1.125 s),

evidenced a shorter relaxation for IS protons, demonstrating that dimethyl fumarate was suitable for quantification of those signals. According to those results, at this concentration, a recycling time of 6 seconds is sufficient for complete relaxation, a relaxation time of about 5 seconds being appropriate.

300 MHz experiments: Establishment of a routine method

Optimization of acquisition parameters

If NMR is a quantitative method by itself, some parameters however, need to be controlled before routine use of an IS in order to provide a correct estimation of the quantitated signals. To improve the conditions of acquisition as well as post-acquisition treatment, an equimolar mixture of annonacin (**1**) and squamocin (**2**), each at the concentration of 5 mM, was studied in the presence of IS (10 mM). Scan numbers of 16, 32 and 64 and relaxation delays (d1) of 5 and 20 seconds were compared, d1 being chosen based on the previously recorded T1. The concentration for AAGs of each sub-type was calculated as follows: $CAAG = \frac{IAAG}{IIS} \times \frac{NIS}{NAAG} \times CIS$

I_{IS} being the integration value of IS singlet,
I_{AAG} being the integration value of ethylenic signals of each sub-type,
N_{IS} being the number of nuclei contributing to the singlet of the IS (N_{IS} = 2, for dimethyl fumarate, as well as for fumaric acid when using CD_3OD),
N_{AAG} = 1 for each sub-type (1a and 1b) of AAGs,
C_{IS} concentration was set at 10 mM.
Accuracy is expressed as a percentage was calculated by: $\frac{Ccalc}{Cnominal} \times 100$

Parameters giving the best accuracy and S/N ratio were retained. A scan number of 64 was chosen since it increased S/N ratio. Although measured S/N ratio were less than 250, which is the recommended limit for quantification (Bharti and Roy, 2012; Holzgrabe, 2010), our measurements were repeatable, and accuracy was comprised between the usually acceptable limits, i.e. 85 % and 115 % of the theoretical concentrations for both **1** and **2** (Supplementary Table S1). No need for an increasing relaxation delay was evidenced, a d1 of 5 seconds thus being chosen in order to reduce the time of analysis.

From the homogeneous response of the two ethylenic signals of standards **1** and **2**, the determination of the limits of quantitation (LOQ) and of detection (LOD) was performed on **1** exclusively; with series of dilution of the molecule in $CDCl_3$ containing IS (10 mM). LOD defined as the lowest concentration displaying a regular peak shape with a S/N ratio > 10, was 0.5 mM. LOQ defined as the lowest concentration displaying a relative error on accuracy of less than 20 %, was 2.5 mM (Table 1).

Table 1. Accuracy for annonacin (**1**) at 300 MHz in $CDCl_3$ with dimethyl fumarate as IS.

$C_{nom.}$ (mM)	S/N ratio	I	C_{calc} (mM)	accuracy %
50	680	247	49.4	98.9
25	283	117	23.4	93.6
10	175	46	9.1	91.4
7.5	123	34	6.9	91.7
5.0	82	23	4.6	91.6
2.5	50	12	2.4	94.8

Nominal concentration, S/N ratio, integration value, and calculated concentration are reported for the signal at δ_H 7.18 ppm, corresponding to H-33.

Validation in crude extracts

The experiments on crude extracts were also performed with IS at the concentration of 10 mM. Repetability of the analysis, implying both acquisition and post-acquisition treatment, was assessed by repeated analysis on 2 consecutive days on batch **G**, resulting in a precision of 4 % and 1 % for sub-types 1a and 1b, respectively. Reproducibility of the results was assessed by preparation and analysis of the sample 1 month later. Precision was found to be 5 % and 1 % for sub-types 1a and 1b respectively (Supplementary Table 2).

Comparison of quantitation at 300 MHz and 400 MHz was performed, on batches **C** and **E**. AAGs quantitation in these crude extracts showed variations < 15 % and < 10 % for sub-types 1a and 1b, respectively (Supplementary Table S4), evidencing the reliability of the estimation performed by the routine method at 300 MHz in crude extracts.

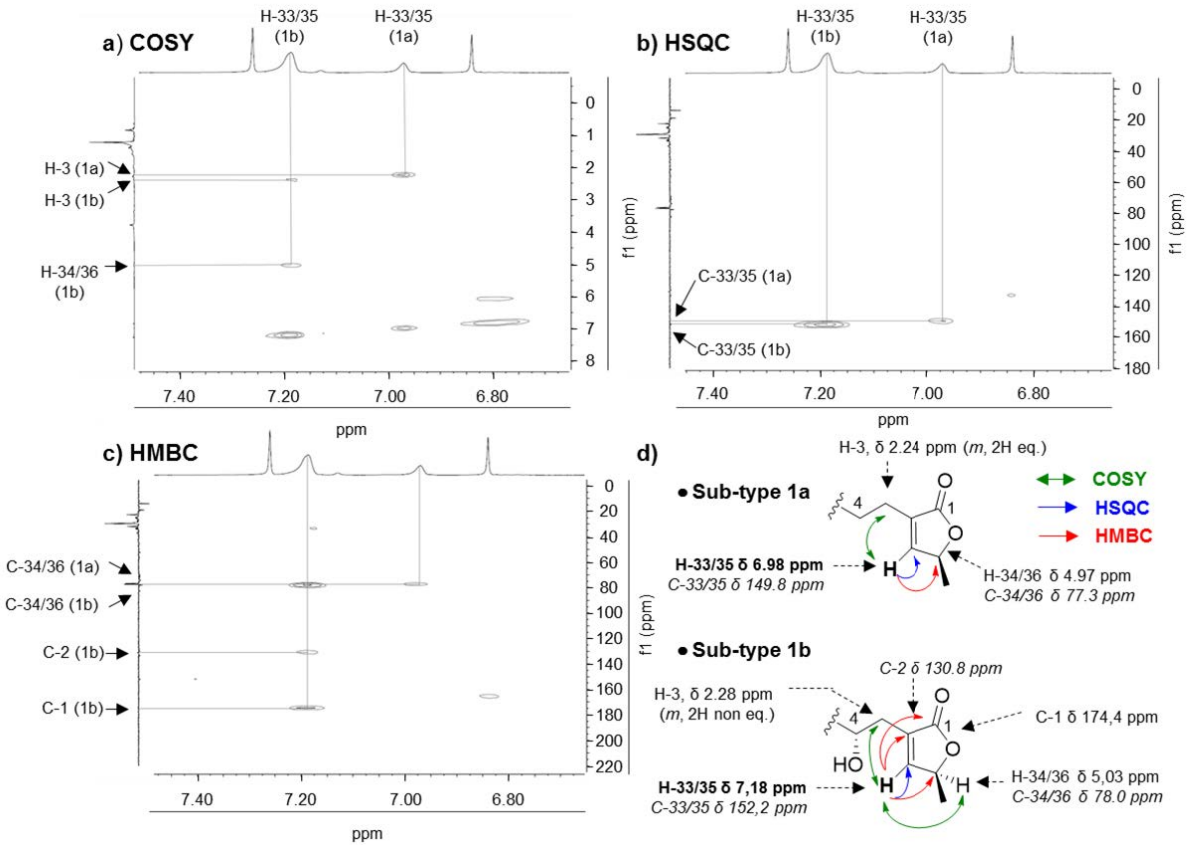


Figure 2. Homo and heteronuclear correlations in *Annona muricata* fruit pulp crude extract (batch **E**) with dimethyl fumarate as IS, in $CDCl_3$, recorded at 400 MHz. **a)** COSY correlation of H-33/H-35 (sub-types 1a: δ 6.98 ppm / 1b: δ 7.18 ppm), with H-3 (1a: δ 2.24 ppm / δ 2.38 ppm) and H-34/H-36 (1a: δ 4.97 ppm / δ 5.03 ppm); **b)** HSQC correlation of H-33/H-35 with C-33/C-35 (1a: δ 149.8 ppm / 1b: δ 152.2 ppm); **c)** HMBC correlation of H-33/H-35 with C-1 (1a: not observed / 1b: δ 174.4 ppm), C-2 (1a: not observed / 1b: δ 130.8 ppm), C-34/C-36 (1a: δ 77.3 ppm / 1b: δ 78.0 ppm). **d)** Relevant chemical shifts, HSQC and HMBC correlations for AAGs of sub-types 1a and 1b.

304 **Specificity**

305 The ^{1}H NMR spectra of all crude extracts (batches **A**-**F**) displayed large signals at both δ 6.98 ppm and
306 δ 7.18 ppm in $CDCl_3$. Homonuclear and heteronuclear 2D correlations experiments were performed in
307 order to confirm they actually contained AAGs ethylenic proton with known correlations, as well as to
308 check the purity of contributing signals. COSY, HSQC and HMBC correlations were similar to those
309 recorded on annonacin (**1**) and squamocin (**2**) (Supplementary Fig. S3) and no overlapping signals were
310 detected in the extracts, as exemplified with batch **E** (Fig. 2).

311

312 **Application of the method to total AAGs content in soursop**

313 The method was applied to seven *A. muricata* fruits (batches **A**-**G**) collected in five tropical locations.
314 The NMR profiles of the extracts evidenced a steady ratio between AAGs of sub-types 1b (~72 %) and
315 1a (~28 %), except for batch **C** (~90 % / 10 %). It is known that annonacin (**1**) is the main AAG in *A.*
316 *muricata* fruits (Champy et al., 2005; Höllerhage et al., 2015), but investigation of a soursop nectar by
317 HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap® had evidenced the vast presence of sub-type 1a AAGs, without semi-
318 quantitative estimation due to the variable ionization of AAGs with different structural characteristics (Le
319 Ven et al., 2012). Quantitative NMR here confirms that non-negligible amounts of sub-type 1a AAGs
320 are indeed present.

321 The total AAGs contents of the fruits were estimated to be 0.14 to 1.3 mmol (batches **C** – Mauritius
322 Island and **G** – New Caledonia, respectively; Table 2). If these results are in accordance with the order
323 of magnitude proposed in previous estimations for annonacin (Champy et al., 2005; Hölleraghe et al.,
324 2015), such differences were unexpected. Interestingly, fruits obtained from the same location at a 1
325 year interval had similar total AAGs content (batches **A**, **B**), while others from close areas and dates of
326 harvest showed a 1.7 fold difference (batches **C**, **D**). Further studies are thus needed, using a set of
327 samples allowing statistical analysis. However, the present application of qNMR evidences unpredicted
328 Human exposure for several batches.

329 In conclusion, these results confirm that solely performing a quantitation of the most intense AAG
330 detected by UV or MS obviously leads to underestimated results. This emphasizes the interest of this
331 qNMR method, which constitutes a rapid, straightforward and reliable approach for the determination of
332 total AAGs within fruits and derived food-products, with minimal preparation steps, acceptable sensitivity
333 and satisfying confidence.

334

Table 2. AAGs content in crude extract from *Annona muricata* fruit pulps of 7 batches from diverse locations.

	Sub-type 1a						Sub-type 1b						Total AAGs [a]						Sub-types ratio	
	crude extract		fresh pulp		fresh fruit [b]		crude extract		fresh pulp		fresh fruit [b]		crude extract		fresh pulp		fresh fruit [b]		1a	1b
batch	µmol/g	mg/g[c]	µmol/100 g	mg/100 g[c]	µmol/fruit	mg/fruit[c]	µmol/g	mg/g[c]	µmol/100 g	mg/100 g[c]	µmol/fruit	mg/fruit[c]	µmol/g	mg/g[c]	µmol/100 g	mg/100 g[c]	µmol/fruit	mg/fruit[c]	%	%
A	212	132	27	17	161	100	484	288	62	37	368	219	696	420	89	54	530	320	30	70
B	82	51	10	6	146	91	187	111	23	14	333	199	269	162	33	20	479	290	30	70
C	101	63	28	17	160	100	723	431	198	118	1145	682	824	494	226	135	1305	782	12	88
D	113	70	11	7	156	97	225	134	21	13	311	185	337	204	32	19	467	282	33	67
E	246	153	39	24	228	142	718	428	113	68	666	397	963	581	152	92	894	539	26	74
F	145	90	36	22	181	112	259	154	63	38	323	193	404	244	99	60	504	305	36	64
G	35	21	4	2	39	24	88	52	10	6	99	59	122	74	14	8	139	84	28	72
mean	**133**	**83**	**22**	**14**	**153**	**95**	**383**	**228**	**70**	**42**	**464**	**276**	**516**	**311**	**92**	**56**	**617**	**372**	**28 [d]**	**72 [d]**
±SD	**74**	**46**	**14**	**9**	**57**	**36**	**259**	**155**	**67**	**40**	**343**	**205**	**313**	**188**	**76**	**46**	**375**	**224**	**8**	**8**
RSD	***56 %***		***62 %***		***37 %***		***68 %***		***95 %***		***74 %***		***61 %***		***83 %***		***61 %***		***28 %***	***11 %***

335 **A** and **B**: Reunion Island (October 2011 / 2012); **C**: Mauritius; **D**: French Guiana; **E** and **F**: Ivory Coast (both February 2012); **G**: New Caledonia.

336 [a] Total AAGs content is expressed as the addition of the values obtained for sub-types 1a and 1b.

337 [b] AAGs in the whole pulp of one fruit.

338 [c] Concentrations are expressed as mg of annonacin (**1**) (MW 596.46) for sub-type 1b and as mg of squamocin (**2**) (MW 622.48) for sub-type 1a.

339 [d] Excluding batch **C**, the mean ratio between sub-types 1a and 1b is 31±4 % / 69±4 %.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Alexandre Dubesset, Leïla Haddad, Karine Leblanc and Blandine Séon-Méniel for technical assistance, as well as to Isabelle Cazin, Dr Valérie Kagy and Dr Paul Coulerie from the *Institut Agronomique de Nouvelle Calédonie* (IAC), Dr Faustin Kablan and Pr. Guy Lewin for kindly providing plant material.

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Angibaud G, Gaultier C, Rascol O. 2004. Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia. *Mov. Disord.* **19:** 603–604.

Bermejo A, Figadère B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E, Cortes D. 2005. Acetogenins from Annonaceae : recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep* **22:** 269–303.

Bharti SK, Roy R. 2012. Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy. *TrAC Trend Anal Chem* **35:** 5–26.

Bonneau N, Le Ven J, Schmitz-Afonso I, Guérineau V, Bajin ba Ndob I, Baloul L, Lewin G, Laprévote O, Brunelle A, Touboul D, Champy P. 2012. Annonaceous acetogenins as environmental neurotoxins: Human exposure from edible *Annona* fruits. *Planta Med* **78:** PH25.

Camilleri A, Vassallo N. 2014. The centrality of mitochondria in the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* **20:** 591–602.

Cavé A, Cortes D, Figadère B, Laurens A, Pettit GR. 1997. Acetogenins from Annonaceae. In *Progress in the chemistry of organic natural products* L. Zeichmeister, W. Herz, R. E. Moore, W. Steglich, & Ch. Tamm (Ed.). Springer: Vienna; 81-288.

Champy P, Melot A, Guérineau V, Gleye C, Fall D, Höglinger GU, Ruberg M, Lannuzel A, Laprévote O, Laurens A, Hocquemiller R. 2005. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disord* **20:** 1629–1633.

Gromek D, Hocquemiller R, Cavé A. 1994. Qualitative and quantitative evaluation of Annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* **5:** 133–140.

367 Gu Z, Zhou D, Lewis NJ, Wu J, Johnson HA, McLaughlin JL, Gordon J. 1999. Quantitative evaluation
368 of annonaceous acetogenins in monthly Samples of pawpaw (*Asimina triloba*) twigs by liquid
369 chromatography /electrospray ionization / tandem mass spectrometry *Phytochem Anal* **10:** 32–38.

370 Höllerhage M, Matusch A, Champy P, Lombès A, Ruberg M, Oertel WH, Höglinger GU. 2009. Natural
371 lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative
372 tau pathologies. *Exp Neurol* **220:** 133–142.

373 Hollerhage M, Rosler TW, Berjas M, Luo R, Tran K, Richards KM, Sabaa-Srur U, Maia JGS, Moraes
374 MRD, Godoy HT, Hoglinger GU, Smith RE. 2015. Neurotoxicity of dietary supplements from
375 Annonaceae species. *Int J Toxicol* ***in press***. DOI: 10.117/1091581815602252

376 Holzgrabe U. 2010. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Prog Nucl Magn*
377 *Res Sp* **57:** 229–240.

378 Lannuzel A, Höglinger GU, Verhaeghe S, Gire L, Belson S, Escobar-Khondiker M, Poullain P, Oertel
379 WH, Hirsch EC, Dubois B, Ruberg M. 2007. Atypical Parkinsonism in Guadeloupe: A common risk
380 factor for two closely related phenotypes? *Brain* **130:** 816–827.

381 Le Ven J, Schmitz-afonso I, Lewin G, Brunelle A, Touboul D, Champy P. 2014. Identification of the
382 environmental neurotoxins Annonaceous acetogenins in an *Annona cherimolia* Mill. alcoholic
383 beverage using HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap®. *J Agric Food Chem* **62:** 8696–8704.

384 Le Ven J, Schmitz-Afonso I, Lewin G, Laprévote O, Brunelle A, Touboul D, Champy P. 2012.
385 Comprehensive characterization of Annonaceous acetogenins within a complex extract by HPLC-
386 ESI-LTQ-Orbitrap® using post-column lithium infusion. *J Mass Spectrom* **47:** 1500–1509.

387 Levine RA, Richards KM, Tran K, Luo R, Thomas AL, Smith RE. 2015. Determination of neurotoxic
388 acetogenins in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit by LC-HRMS. *J Agric Food Chem* **63:** 1053–1056.

389 Pauli GF, Chen SN, Simmler C, Lankin DC, Gödecke T, Jaki BU, Friesen JB, McAlpine JB, Napolitano,
390 JG. 2014. Importance of purity evaluation and the potential of quantitative ^{1}H NMR as a purity
391 assay. *J Med Chem* **57:** 9220-9231.

392 Pauli GF, Gödecke T, Jaki BU, Lankin DC. 2012. Quantitative ^{1}H NMR. Development and potential of
393 an analytical method: an update. *J Nat Prod* **75:** 834–851.

394 Potts LF, Luzzio FA, Smith SC, Hetman M, Champy P, Litvan I. 2012. Annonacin in *Asimina triloba* fruit:
395 implication for neurotoxicity. *Neurotoxicology* **33:** 53–58.

Schapira AHV. 2010. Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Exp Neurol* **224:** 331–335.

Shoolery JN. 2007. *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons Ltd: Chichester.

Simmler C, Napolitano JG, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF. 2014. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr Opin Biotech* **25:** 51–59.

Teixeira Machado ART, Lage GA, Da Silva Medeiros F, De Souza Filho JD, Pimenta LPS. 2015. Total α,β-unsaturated-γ-lactone acetogenins in *Annona muricata* by proton NMR spectroscopy. *Appl Magn Reson* **46:** 153–160.

Webster G, Kumar S. 2014. Expanding the analytical toolbox: Pharmaceutical application of quantitative NMR (q-NMR). *Anal Chem* **86:** 11474-11480.

Yamada ES, Respondek G, Müssner S, De Andrade A, Höllerhage M, Depienne C, Rastetter A, Tarze A, Friguet B, Salama M, Champy P, Oertel WH, Höglinger GU. 2014. Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. *Exp Neurol* **253:** 113–125.

Manuscript for submission to *Phytochemical Analysis*

^{1}H qNMR method development for global quantification of Annonaceous acetogenins in crude fruit pulp extracts: *Annona muricata* L. as a major source of exposure.

Natacha BONNEAU, Timothé CYNOBER, Jean-Christophe JULLIAN, Pierre CHAMPY*

Supplementary material

- Signals selection for quantitation *pp 2-4*

Figure S1 (*p 2*), Figure S2 (*p 3*), Figure S3 (*p 4*)

- 300 MHz experiment: establishment of a routine method *pp 4-5*

Tables S1 and S2 (*p 5*), Tables S3 and S4 *(p 6)*

- Specificity *p 6*

Figure S4

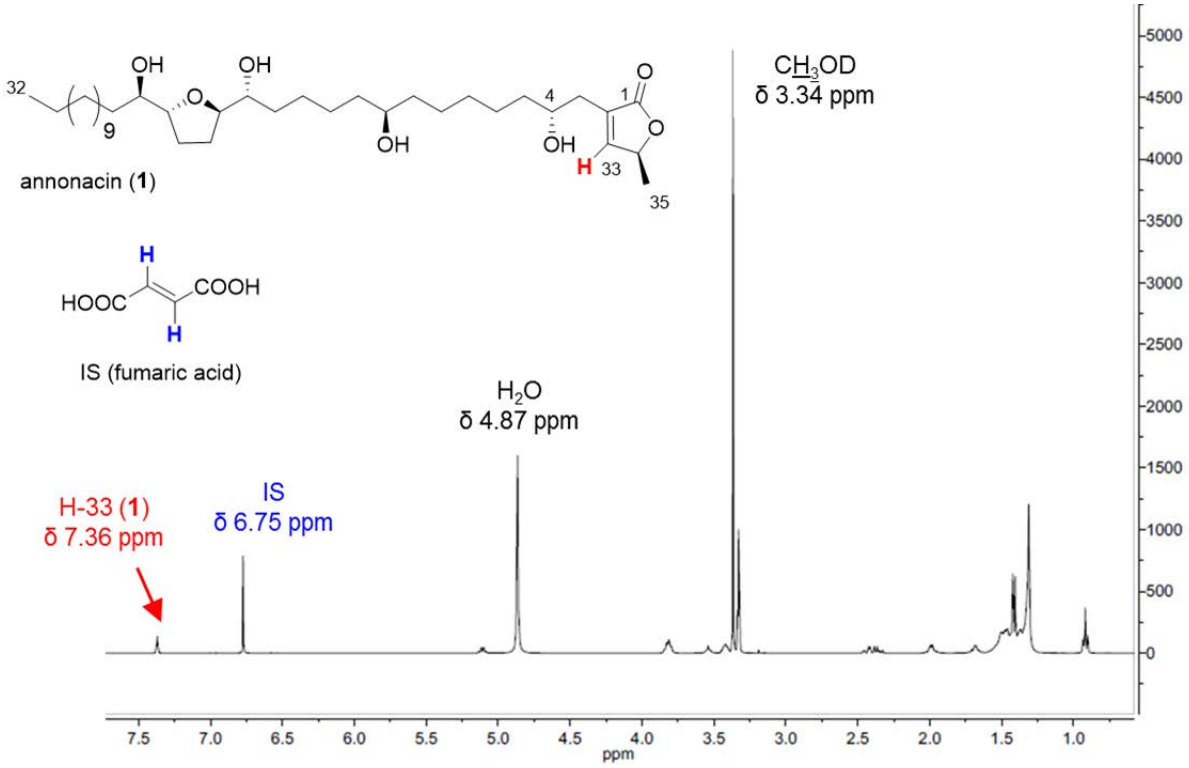


Figure S1. ^{1}H RMN spectrum of a mixed solution of annonacin (**1**) and fumaric acid as IS, recorded at 400 MHz in CD_3OD.

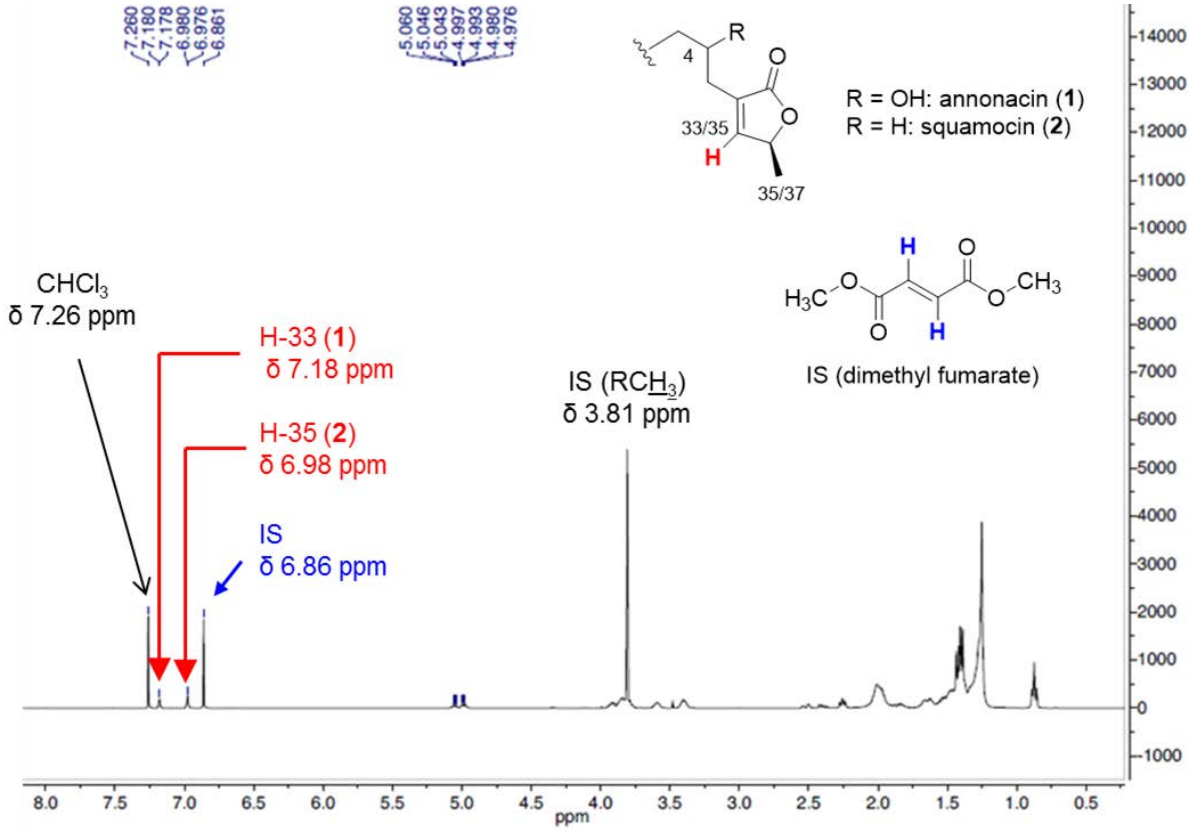


Figure S2. ^{1}H RMN spectrum of a mixed solution of annonacin (**1**), squamocin (**2**) and dimethyl fumarate as IS, recorded at 400 MHz in $CDCl_3$.

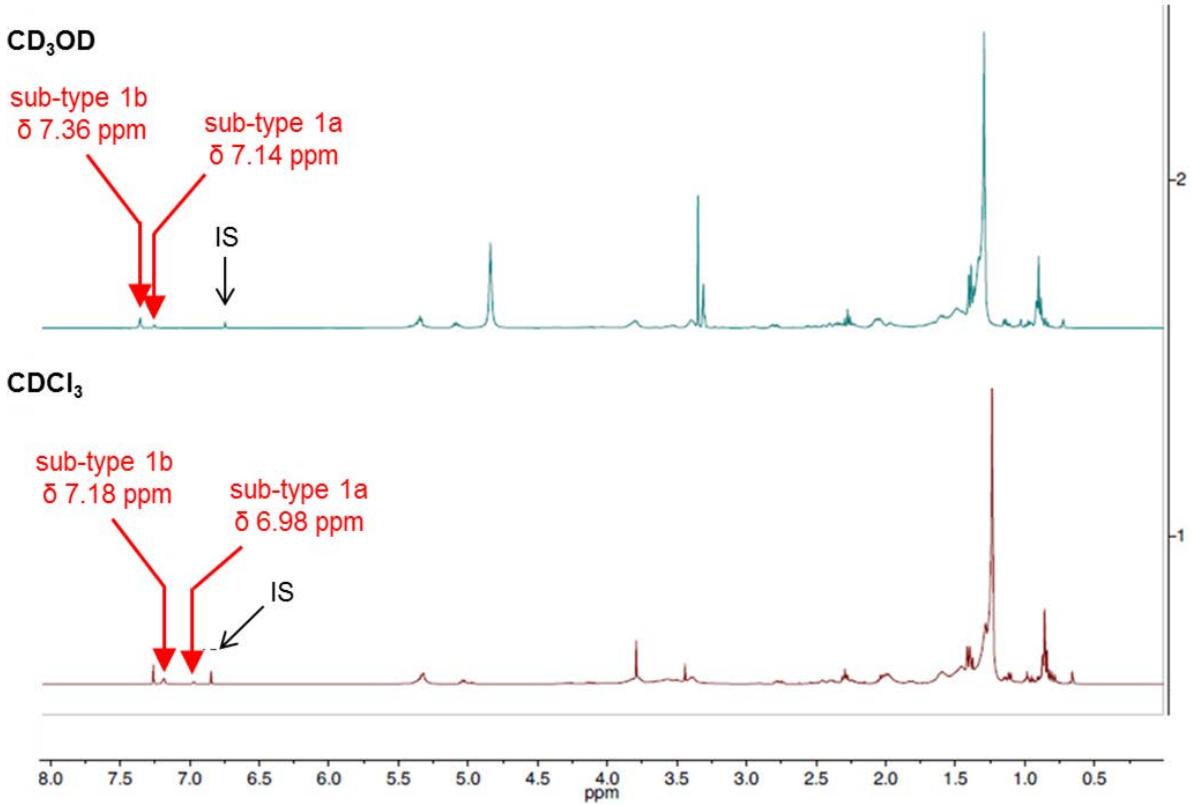


Figure S3. ^{1}H RMN spectra (400 MHz) of *A. muricata* fruit pulp crude extract (batch **E**) with fumaric acid as IS in CD_3OD and dimethyl fumarate as IS in $CDCl_3$. The ethylenic signals of sub-types 1a and 1b are indicated.

34

35

36 **Table S1.** Compared integrations, concentration measurements and accuracies for annonacin (**1**) and
37 squamocin (**2**) with dimethyl fumarate as IS, at 400 MHz in $CDCl_3$. The explored parameters are
38 relaxation delay (d1) and scan number. Signal/Noise ratio are also reported.

parameters		annonacin (1) – sub-type 1b				squamocin (2) – sub-type 1a			
d1	**scan nb**	I_{AAG}	C_{calc} (mM)	**accuracy %**	**S/N**	I_{AAG}	C_{calc} (mM)	**accuracy %**	**S/N**
	16	27	5.4	107	24	21	4.2	83	35
5 s	**32**	26	5.1	102	67	21	4.2	84	53
	64	24	4.8	96	76	21	4.2	85	72
	16	23	4.7	93	32	21	4.2	84	39
20 s	**32**	23	4.5	90	52	21	4.2	85	51
	64	24	4.7	94	73	21	4.2	83	74

39

40

41

42 **Table S2.** Integration and calculated concentrations for AAGs of sub-types 1a and 1b in repeated
43 analysis of *A. muricata* fruit pulp crude extract (batch **G**) at 300 MHz, in $CDCl_3$.

			sub-type 1a (*δ* 6.98 ppm)				sub-type 1b (*δ* 7.18 ppm)			
C (mg/mL)	**day of analysis**	**IS S/N ratio**	**S/N ratio**	**I**	**C_{calc}**	**$C_{extract}$ mmol/g**	**S/N ratio**	**I**	**C_{calc}**	**$C_{extract}$ mmol/g**
100	day 1	2105	57	17	3.5	0.035	109	44	8.8	0.088
100	day 2	2157	57	16	3.3	0.033	110	43	8.6	0.086
50	day 30	996	20	9	1.8	0.036	39	22	4.4	0.088

44

45

Table S3. Repeatability of quantification of AAGs of sub-types 1a and 1b in *A. muricata* fruit pulp crude extract (batch **G**) at 300 MHz in $CDCl_3$.

300 MHz, $CDCl_3$	**sub-type 1a (*δ* 6.98 ppm)**			**sub-type 1b (*δ* 7.18 ppm)**		
	mean	**SD**	**RSD (%)**	**mean**	**SD**	**RSD (%)**
repetability (mmol/g)	0.034	0.001	3.6	0.087	0.001	1.4
reproducibility (mmol/g)	0.035	0.002	4.8	0.087	0.001	0.9

Table S4. Comparison of quantification of AAGs in *A. muricata* fruit pulp crude extracts, at 300 MHz and 400 MHz in $CDCl_3$.

sub-type 1a (*δ* 6.98 ppm)					
batch	**400 MHz $C_{extract}$ (µmol / g)**	**300 MHz $C_{extract}$ (µmol / g)**	**mean (µmol/g)**	**SD**	**RSD (%)**
C	87	101	94	10	11
E	202	246	224	31	14
subtype 1b (*δ* 7.18 ppm)					
batch	**400 MHz $C_{extract}$ (µmol / g)**	**300 MHz $C_{extract}$ (µmol / g)**	**mean (µmol/g)**	**SD**	**RSD (%)**
C	821	723	772	70	9
E	671	718	694	33	5

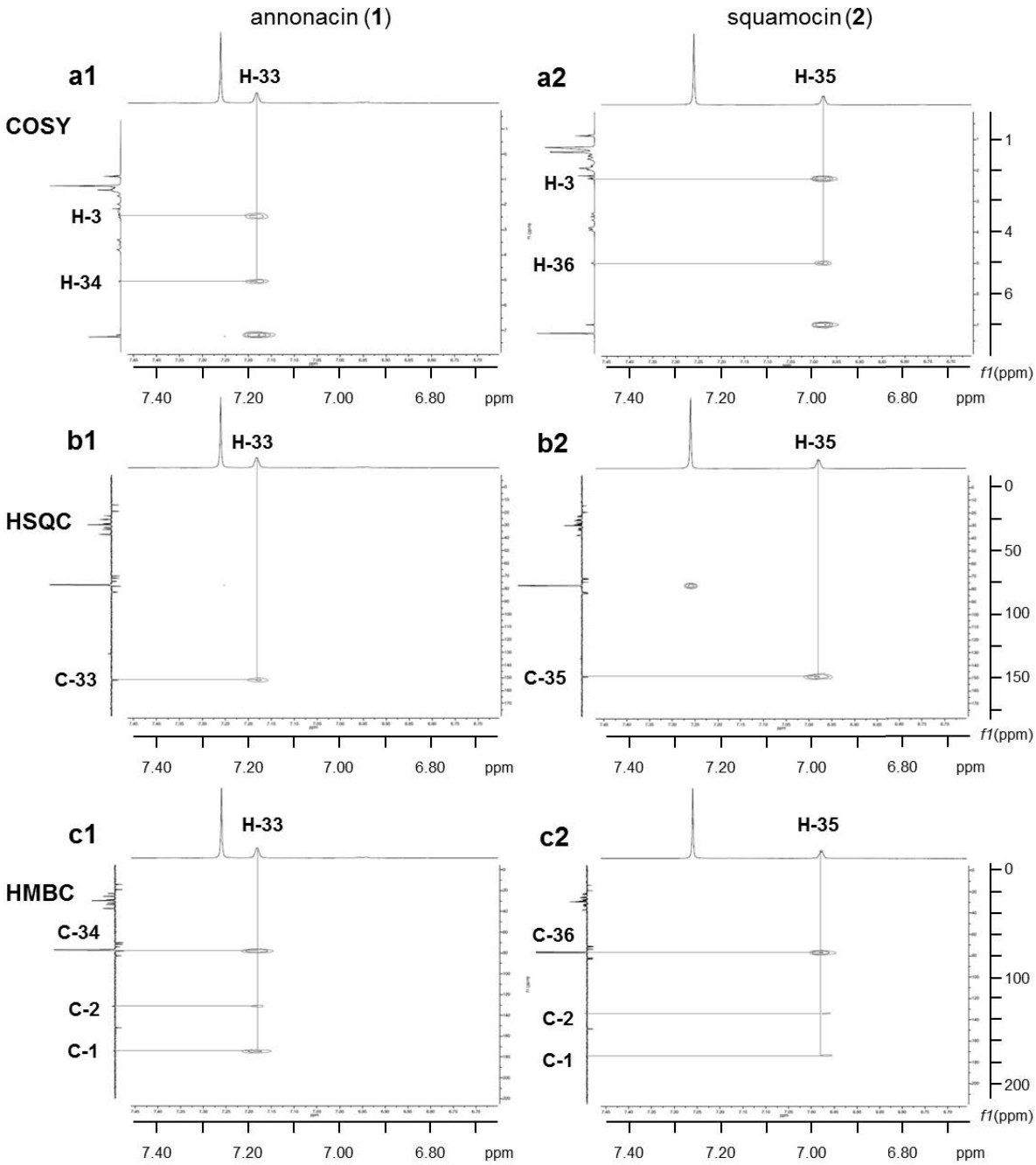


Figure S4. 2D NMR homo and heteronuclear correlations of the standards annonacin (**1**) and squamocin (**2**), recorded in $CDCl_3$ at 400 MHz.

a1-a2) COSY correlations of H-33 (**2**) /H-35 (**1**) (δ 7.18 ppm (**1**) / δ 6.98 ppm (**2**)), with H-3 (δ 2.47 ppm (**1**) / δ 2.26 ppm (**2**)) and H-34/H-36 (δ 5.05 ppm (**1**) / δ 4.99 ppm (**2**));

b1-b2) HSQC correlation of H-33/H-35 with C-33/C-35 (δ 151.9 ppm (**1**) / δ 148.9 ppm (**2**));

c1-c2) HMBC correlations of H-33/H-35 with C-1 (δ 174.6 ppm (**1**) / δ 173.8 ppm (**2**)), C-2 (δ 131.2 ppm (**1**) / δ 134.4 ppm (**2**)) and C-34/C-36 (δ 78.0 ppm (**1**) / δ 77.3 ppm (**2**)).

3.3. Commentaires

La démarche du travail présentée dans l'**article 4**, les éléments principaux de la validation analytique et les principaux résultats quantitatifs sont les suivants :

- La quantification des AAGs totales est nécessaire pour l'estimation de l'exposition. En l'absence de méthode générale satisfaisante, un protocole a été développé par ^{1}H RMN. Cette approche, développée à partir de la 2e année de thèse (Bonneau *et al.*, 2012), a fait l'objet d'une publication en 2015 par une équipe brésilienne (extraits organiques de feuilles d'*A. muricata*, purifiés par extraction liquide / liquide) (Teixeira Machado *et al.*, 2015). Comme dans notre cas, les auteurs se sont fondés sur les signaux du proton éthylénique déblindé caractéristique des AAGs de sous-types 1a et 1b (δ 6,98 ppm et δ 7,18 ppm dans le $CDCl_3$).

  L'**Annexe 4** récapitule les déplacements chimiques de protons éthyléniques d'AAGs de sous-type 1 à substitution remarquable et ceux d'AAGs d'autres sous-types.

- L'emploi d'un étalon interne et son ajout préalable au solvant deutéré, avant la dissolution des échantillons, s'est avéré être le moyen le plus simple pour procéder à la quantification.

- Des essais préliminaires ont été réalisés sur des extraits de graines d'*Annona reticulata* dans le CD_3OD pour définir des régions du spectre dépourvues de signaux parasites (protons d'intérêt, étalon interne). Les signaux de l'étalon interne ne doivent pas interférer avec ceux du reste de l'échantillon. L'acide fumarique a été choisi sur cette base après recherche dans une liste de molécules communément utilisées comme étalons internes pour la quantification en RMN, solubles dans le solvant employé (Pauli *et al.*, 2012).

- Une optimisation des paramètres d'acquisition a par la suite été menée sur un spectromètre à 400 MHz, en utilisant des solutions de concentrations connues d'annonacine isolée comme analyte de référence, en présence d'acide fumarique. Après vérification de la justesse de ces mesures, la quantification a été effectuée dans des pulpes de fruits d'*Annona muricata.* L'isolement de l'annonacine, indispensable à ce travail, a été réalisé au cours de la thèse, et est décrit dans l'**Annexe 3**.

- Des problèmes de solubilisation ont été rencontrés dans le CD_3OD lors de l'application à d'autres extraits, qui empêchaient une conservation à -20°C avant analyse. Un changement de solvant deutérié a été décidé : le $CDCl_3$ a été employé pour la suite du travail, sans nuire à la qualité de la méthode. L'acide fumarique n'étant pas soluble ce solvant, il a été remplacé par le dimethyl fumarate en tant qu'étalon interne.

- Le but étant de mettre en place une méthode utilisable en routine sur un grand nombre d'échantillons, le développement s'est poursuivi sur l'appareil à 300 MHz, en utilisant l'annonacine et la squamocine comme modèles des deux sous-types d'acétogénines ciblés. Les limites de détection et de quantification ont été déterminées à 0,5 mM et 2,5 mM.; Ces

étalons sont représentatifs des 2 sous-types d'intérêt, largement majoritaires parmi les AAGs. L'isolement de la squamocine, réalisé au cours de ce travail, est présenté dans l'**Annexe 3**

- .

- Les résultats du dosage de sept pulpes d'*Annona muricata* de provenance diverses, avec un appareil à 300 MHz, sont cohérents avec ceux obtenus à 400 MHz sur deux extraits bruts. La répétabilité des résultats et la spécificité des signaux quantifiés ont été vérifiés.

- Les données quantitatives obtenues sont exprimées en µmol / 100 g de pulpe fraiche et en µmol / fruit frais entier. Des données massiques sont proposées, exprimées en mg de squamocine pour le sous-type 1a, et en mg d'annonacine pour le sous-type 1b.

- La détermination d'une teneur en AAGs totales, rapportée pour la première fois dans des fruits, permet une estimation plus juste de la quantité potentiellement consommée, au contraire des méthodes employées jusqu'alors qui se focalisaient uniquement sur le dosage des AAGs majoritaires. Le dosage de l'annonacine dans quatre des lots de pulpe d'*A. muricata*, réalisé par LC-UV selon une méthode semblable à celle décrite précédemment (**article 3**) (Bonneau *et al.*, 2012), a résulté en une teneur en annonacine de 43 à 122 µmol/fruit, soit environ 10 fois moins que les teneurs totales en AAGs pour ces extraits. En effet, la moyenne était de 383±259 µmol/ fruit pour le sous-type 1a, et de 464±288 µmol/ fruit pour le sous-type 1b. Ceci confirme l'importance de la méthode développée pour une meilleure estimation de l'exposition aux acétogénines.

- Les données illustrent une exposition très variable aux AAGs suivant le lot, avec des teneurs parfois plus importantes que ne le laissaient soupçonner les données quantitatives disponibles jusqu'alors.

- Les graines et les péricarpes des fruits étudiés ont également fait l'objet de dosages. Ce travail, ainsi qu'une partie de la validation analytique, a été réalisé avec le concours de Timothé Cynober, étudiant en M1 que j'ai encadré. Les résultats annexes sont énoncés dans le rapport du stage correspondant et dans la thèse de doctorat d'Etat en pharmacie de M. Cynober (en cours de rédaction).

4. Recherche d'acétogénines dans la pulpe d'*Annona reticulata*

Deux lots de fruits (7 et 6 fruits) d'*Annona reticulata* en provenance de La Réunion, achetés aux mois d'Août et d'octobre 2011 sur le marché de Saint Paul, ont été investigués. Les extractions de pulpes ont été réalisées comme précédemment décrit. Le premier lot ne présentait pas de signaux éthyléniques caractéristiques d'AAGs en RMN dans les conditions d'analyses décrites précédemment (**article 4**), au contraire du 2e lot. Des concentrations de 0,75 et 1,02 mM ont été retrouvées pour chacun des 2 signaux (δ 6,98 ppm et δ 7,18 ppm). La teneur estimée s'élève à 14 mg/fruit d'AAG de sous-type 1b exprimés en annonacine, et 10 mg/fruit d'AAG de sous-type 1a exprimés en squamocine. La présence d'AAG a donc été recherchée par CLHP-MS/MS selon la procédure précédemment décrite (**article 3**). Dans le premier lot, aucune AAG n'a été détectée. En revanche dans le 2e lot, 6 traces d'ions à *m/z* d'intérêt ont été détectées avec une intensité suffisante pour générer des fragments identifiés comme caractéristiques d'AAG en MS/MS. La présence d'AAGs dans de la pulpe d'*Annona reticulata* a été rapportée pour la première fois. La quantité est faible par rapport aux données concernant les fruits d'*A. muricata* et *squamosa*. Les différences entre les 2 lots mettent en évidence l'importance de renseigner la période de récolte, et annoncent de potentielles variations qui restent à étudier.

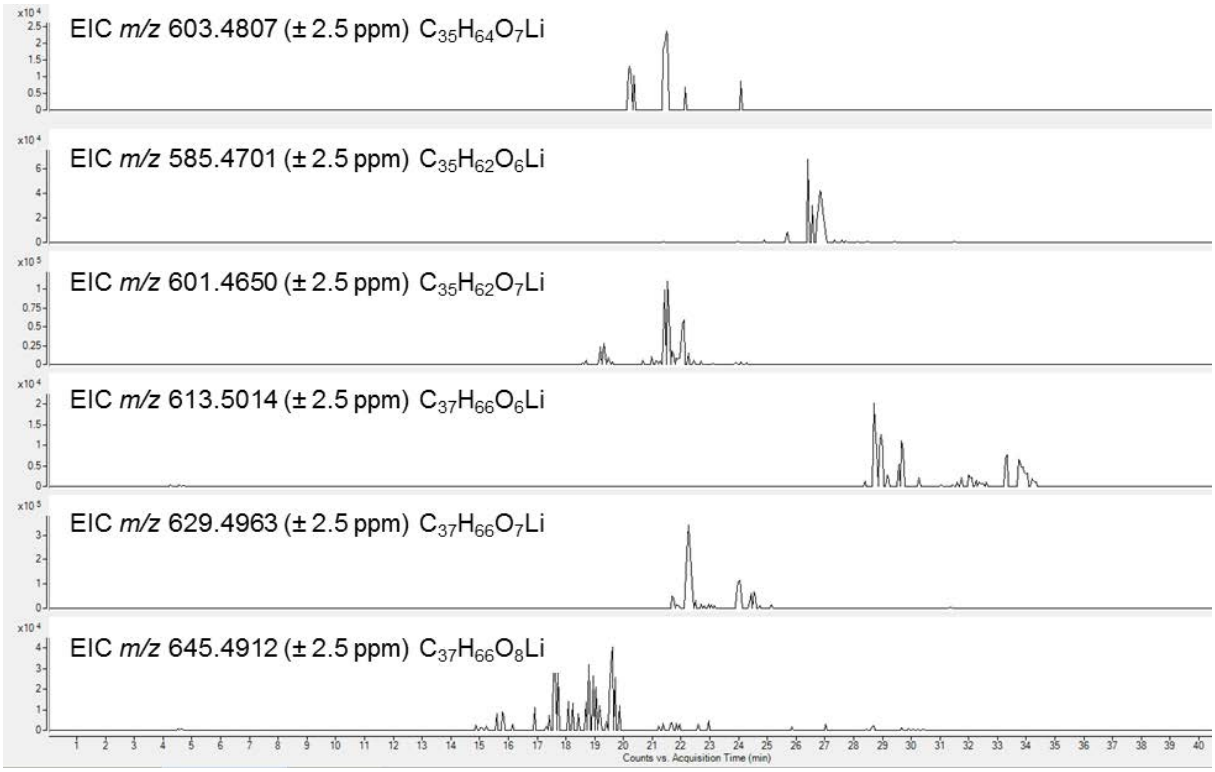


Figure 41 : Chromatogrammes CLHP-ESI-Q-TOF des masses correspondant à des adduits $[M+Li]^+$ d'AAGs dans l'extrait brut de pulpe d'*A. reticulata*.

5. Perspectives : descriptif comparé d'AAGs présentes dans les pulpes de fruits de plusieurs espèces du genre *Annona*.

- **Optimisations complémentaires**

Dans l'optique d'effectuer une comparaison de la composition de pulpes de plusieurs espèces du genre *Annona*, une optimisation des conditions chromatographiques a été réalisée de manière annexe, avec la comparaison de plusieurs colonnes en phase inverse. L'emploi des conditions élutives décrites dans l'**article 3** apparait comme adéquat. D'autre part, on notera que le Dr David Touboul développe actuellement, avec Laurent Laboureur, étudiant en doctorat, une approche chromatographique en phase supercritique à visée déréplicative.

D'autre part, l'optimisation de l'infusion post-colonne d'iodure de lithium (LiI) a également été poursuivie, a posteriori, à l'aide d'une solution d'annonacine à 10 µg/mL dans le méthanol injectée en CLHP-ESI(+)-Q-TOF. Afin d'obtenir une seule espèce d'adduits, les conditions retenues ont été 7,5 mM dans le méthanol au débit de 5 µL/min pour la suite du travail effectué au cours de cette thèse. Ces essais sont résumés dans la table et la figure ci-dessous.

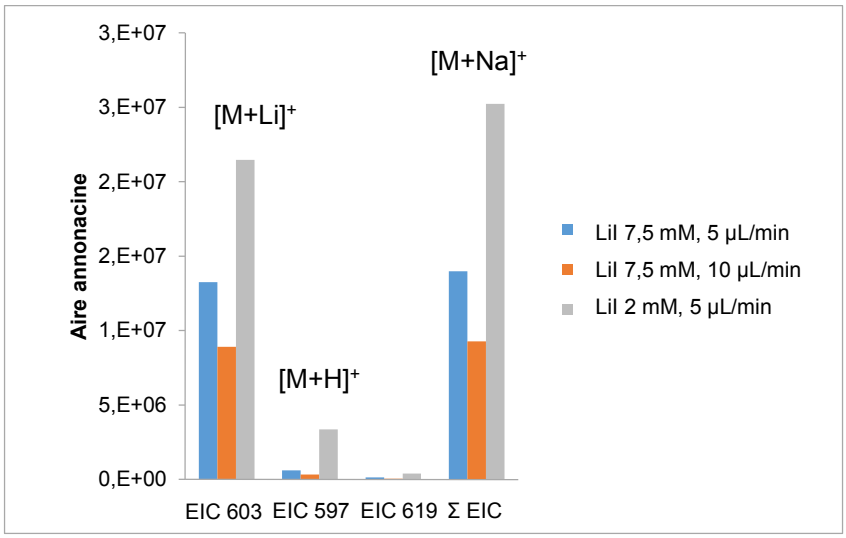


Figure 42 : Abondances des adduits $[M+Li]^+$, $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ de l'annonacine en fonction de la concentration et du débit post-colonne en LiI, en conditions chromatographiques.

La comparaison de couples formules brutes/temps de rétention correspondant potentiellement à des AAGs est à envisager afin de comparer la composition chimique des pulpes des différentes espèces. Les conditions séparatives décrites dans l'**article 3** semblent bien adaptées aux différentes annones testées. Les conditions d'emploi du LiI décrites ci-dessus seront préférées.

Tableau 13 : Abondances des adduits $[M+Li]^+$, $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ de l'annonacine en fonction de la concentration et du débit post-colonne en LiI, en conditions chromatographiques.

conditions	injection	aire EIC 603, $[M+Li]^+$	aire EIC 597, $[M+H]^+$	aire EIC 619, $[M+Na]^+$	Σ A
5 µL/min, 7,5 mM	1	12563438	553803	113341	13230582
	2	13562973	646126	130234	14339333
	3	13616443	637459	134488	14388390
	moyenne	*13247618*	*612463*	*126021*	*13986102*
	SD	*593120*	*50985*	*11186*	*654759*
	CV	*4.5*	*8.3*	*8.9*	*4.7*
	% aire totale	***95***	***4***	***1***	
10 µL/min, 7,5 mM	1	9337518	373252	58045	9768815
	2	8739134	298206	46109	9083449
	3	8616907	289749	49108	8955764
	moyenne	*8897853*	*320402*	*51087*	*9269343*
	SD	*385634*	*45964*	*6209*	*437242*
	CV	*4.3*	*14.3*	*12.2*	*4.7*
	% aire totale	***96***	***3***	***1***	
5 µL / min, 2 mM	1	21428541	3529942	395036	25353519
	2	21836080	3517509	415490	25769079
	3	21147810	3037945	347346	24533101
	moyenne	*21470810*	*3361799*	*385957*	*25218566*
	SD	*346076*	*280534*	*34967*	*628943*
	CV	*1.6*	*8.3*	*9.1*	*2.5*
	% aire totale	***85***	***13***	***2***	

- **Poursuite des travaux : élargissement du champ d'investigation**

L'homogénéité relative et les variations de composition mises en évidence au cours de ce travail suggèrent le besoin d'étudier des échantillons nombreux et comparables.

Ces travaux seront complétés par l'analyse d'échantillons complémentaires récoltés de manière régulière à l'IANC (Institut Agronomique de Nouvelle-Calédonie ; Dr. V. Kiagy, Dr. P. Coulerie). Une partie des échantillons a fait l'objet de dosages en ^{1}H RMN et d'injections en CLHP-MS pendant cette thèse.

Ayant fait l'objet de récoltes contrôlées, ces échantillons s'inscriront dans le cadre de l'étude de variation de la composition selon les périodes de récolte et le stade de maturation. Une étude statistique multivariée est envisagée.

- **Remarque : acétogénines d'*Annona glabra***

L'espèce *Annona glabra* présentée dans le chapitre introductif est en cours d'analyse. Cinq échantillons néo-calédoniens (IANC) ont été analysés par ^{1}H RMN. Aucun ne montrait la présence d'AAGs, mettant en évidence une concentration inférieure à la LOD. Les formules brutes d'AAGs ont été recherchées sur l'un des échantillons après analyse CLHP-ESI-Q-TOF par la méthode décrite précédemment. Aucune formule brute n'a été détectée. Il semblerait donc que les fruits d'*Annona glabra* soient dépourvus d'AAGs.

6. Conclusion

L'étude phytochimique des pulpes de fruits de plusieurs espèces d'*Annona* a été entamée, se focalisant sur la recherche d'acétogénines. Des aspects quantitatifs ont été développés, partant de l'utilisation de méthodes connues pour doser les AAGs majoritaires dans des extraits bruts par CLHP-UV (Gromek *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2009a), et se poursuivant par la mise au point d'une méthode de quantification globale par ^{1}H RMN applicable en routine. Les résultats obtenus sur sept échantillons d'*Annona muricata* ont été présentés, avec des teneurs s'étendant de 0,14 à 1,3 mmol/fruit, ce qui est supérieur aux estimations qui avaient été rapportées auparavant (Champy *et al.*, 2005). Des aspects qualitatifs ont également été développés dans le but de décrire la composition des pulpes, s'inspirant de l'utilisation historique du lithium pour l'obtention de fragments informatifs en spectrométrie de masse (Allegrand *et al.*, 2010; Laprévote et Das, 1994). Un développement de méthode a donc été effectué en ce sens, s'inscrivant dans la continuité de travaux de couplage CLHP-MS/MS avec infusion post-colonne de lithium (Le Ven *et al.*, 2012), accompagné d'un descriptif des AAGs retrouvées dans les pulpes d'*Annona squamosa*. L'extension de ces analyses à d'autres espèces a été entamée et sera poursuivie au sein de l'équipe. La synthèse des résultats obtenus à ce jour est présentée **Figure 43**.

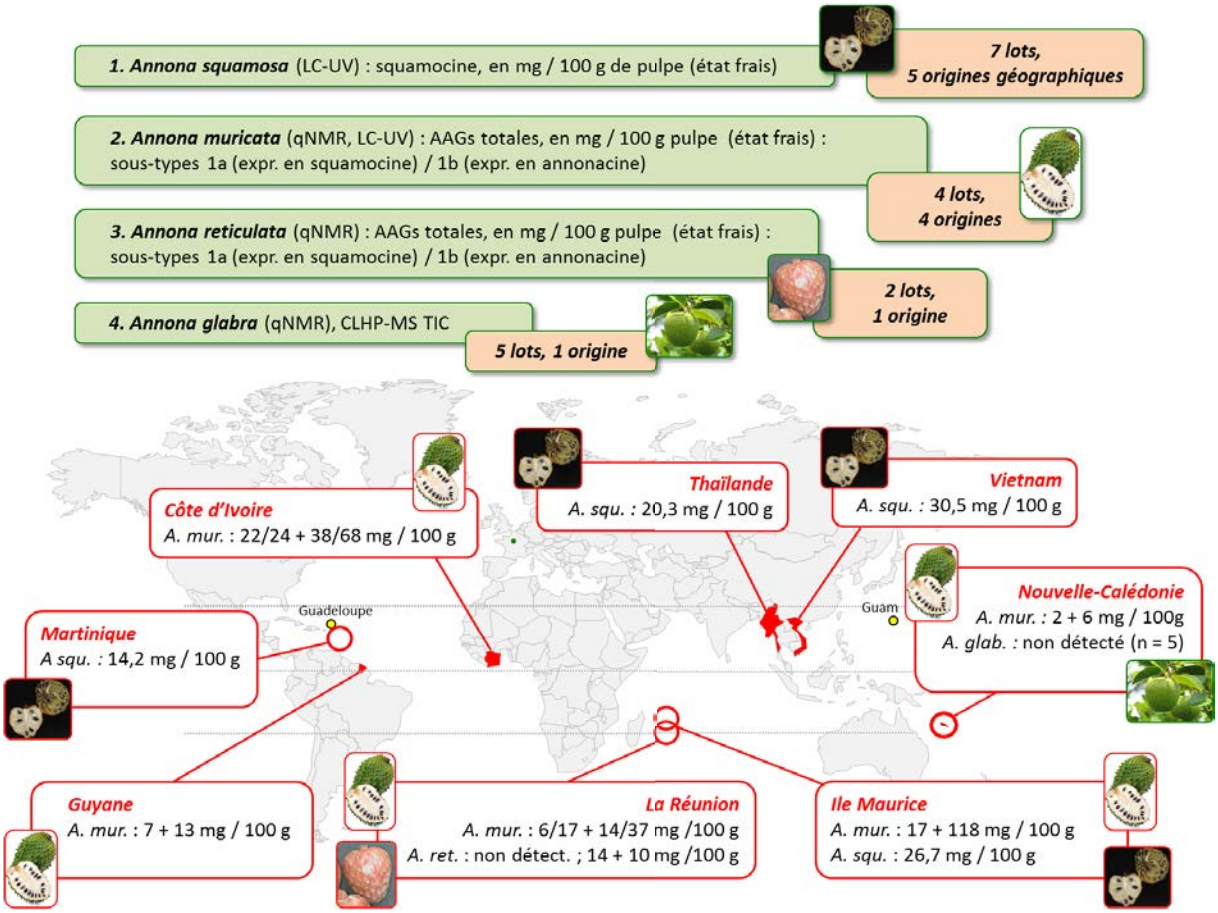


Figure 43 : Récapitulatif des fruits étudiés, des techniques employées, et des principaux résultats.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les objectifs de ces travaux s'inscrivaient dans une thématique développée au laboratoire et en collaboration avec l'équipe de Spectrométrie de Masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles depuis plusieurs années. Dans le cadre d'investigations concernant un lien probable entre la consommation de produits alimentaires ou médicinaux issus d'Annonaceae, et d'une proportion anormalement élevée de formes atypiques de parkinsonismes dans plusieurs zones géographiques où ils sont abondamment consommés, notre apport à cette problématique centrée sur les acétogénines d'Annonaceae s'est articulé en deux axes principaux.

Le premier concernait une approche de la pharmacocinétique d'une AAG modèle, l'annonacine, chez le Rat, dans le but d'avoir une première idée de la potentielle fraction des AAGs consommées, retrouvées dans la circulation générale. Une quantification dans le cerveau permettait également une première estimation de la fraction des AAGs consommées qui pouvait y être retrouvée. Ces deux objectifs ont nécessité un développement de méthodes de quantification en spectrométrie de masse sur matrices biologiques.

Les résultats découlant de l'application de ces méthodes à des échantillons issus d'animaux traités par voie orale ou intraveineuse, ont permis d'estimer la biodisponibilité de l'annonacine à 3 % environ et la fraction de dose d'annonacine retrouvée dans le cerveau 24 et 48 h après consommation à $^{1}/_{10^{6}}$. Ces résultats viennent compléter des données de métabolisation de phase I obtenues sur microsomes de Rats et humains au cours d'une précédente thèse au laboratoire (Le Ven, 2012). Il avait alors été montré que moins de 1 % de l'annonacine était métabolisée par ce biais.

La métabolisation de phase II n'a à ce jour pas encore été étudiée, bien que des essais non concluants de recherche de métabolites hypothétiques par spectrométrie de masse dans l'urine et les fécès de Rat aient été entrepris par CLHP-ESI-LTQ-Orbitrap® durant cette thèse.

Le second axe a concerné l'estimation de l'apport en AAGs par la consommation de fruits du genre *Annona,* ainsi que la description de leur composition en acétogénines. Ceci a nécessité à nouveau du développement de méthode en spectrométrie de masse pour la partie qualitative de ce travail, qui a principalement consisté en la transposition d'une méthode en ligne CLHP-MS/MS avec infusion de lithium post-colonne développée auparavant (Le Ven *et al.*, 2012) à un appareil différent. L'application à des fruits d'*Annona squamosa* a permis la description des principales AAGs retrouvées dans la pulpe et donc consommées. Le type et le sous-type d'AAGs ayant une influence sur leur cytoxicité, déterminer leur nature a permis de compléter l'approche d'exposition, entamée par la quantification de l'AAG majoritaire, à savoir la squamocine. Cette démarche s'inscrit dans le cadre des premières estimations d'AAGs dans les fruits réalisées au laboratoire (Champy *et al.*, 2005 ; Le Ven, 2012). Les teneurs en annonacine alors déterminées étaient d'environ 100 mg/fruit d'*Annona muricata*. La description d'une importante diversité structurale au sein d'un même échantillon laissait cependant supposer que le dosage seul de l'AAG majoritaire conduisait à une sous-estimation des quantités d'AAGs consommées.

Une partie de mon travail a donc consisté en la mise au point d'une méthode de quantification des AAGs totales dans des extraits de pulpes, par ^{1}H RMN. Cette méthode a pu être appliquée aux extraits d'*Annona muricata*, Les données obtenues sur sept lots de fruits ont montré une disparité assez importante mais également une forte quantité d'AAGs, avec une teneur moyenne exprimée en annonacine d'environ 360 mg/fruit. Cela correspond à une dose d'environ 5 mg/kg chez l'Homme (70 kg), soit d'un ordre de grandeur proche de la dose testée chez le Rat. L'extrapolation à l'Homme de données obtenues chez l'animal est difficile, mais il est cependant tentant d'effectuer une comparaison : dans ces conditions, une quantité d'environ 10 mg d'AAGs serait attendue dans la circulation générale après consommation d'un fruit. Par ailleurs, les espèces *A. reticulata* et *A. glabra* ne semblent pas présenter de risque d'exposition aux AAGs. Ceci reste à confirmer par l'étude d'un plus qrand nombre d'échantillons.

Les méthodes développées feront l'objet d'applications futures, phytochimiques plus particulièrement, avec une extension des dosages et descriptions effectués à ce jour à un panel plus important de fruits issus de récoltes contrôlées, qui permettront de statuer quant aux risques associés à certaines localisations et périodes de consommation.

Ce travail, par deux approches combinées résulte donc en une estimation de l'exposition alimentaire aux AAGs à la fois consommées et attendues dans l'organisme après consommation. L'absence de toxicité aigüe manifeste, lorsque pourtant d'importantes quantités de molécules fortement cytotoxiques sont ingérées, pourrait s'expliquer par la très faible biodisponibilité constatée. Les résultats ainsi obtenus permettent à leur tour une avancée dans le cadre de cette problématique de santé publique.

Bibliographie

Bibliographie

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)

Allegrand, J., Touboul, D., Schmitz-Afonso, I., Guérineau, V., Giuliani, A., Le Ven, J., Champy, P., Laprévote, O., **2010**. Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high and low collision energy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 3602–3608.

Alvarez Colom, O., Neske, A., Chahboune, N., Zafra-Polo, M.C., Bardón, A., **2009**. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. *Chem. Biodivers*. 6, 335–340.

Angibaud, G., Gaultier, C., Rascol, O., **2004**. Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia. *Mov. Disord*. 19, 603–604.

Apartis, E., Gaymard, B., Verhaeghe, S., Roze, E., Vidailhet, M., Lannuzel, A., **2008**. Predominant cortical dysfunction in Guadeloupean parkinsonism. *Brain* 131, 2701–2709.

Arzoumanian, M., **2013**. Prospection botanique : immersion en Grenade et à la Dominique à la recherche de plantes dont l'usage est jugé significatif par TRAMIL. Doctorat d'Etat en Pharmacie. Université Paris-Sud.

Bajin ba Ndob, I., Champy, P., Gleye, C., Lewin, G., Akendengué, B., **2009**. Annonaceous acetogenins: Precursors from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochem. Lett.* 2, 72–76.

Banack, S.A., Murch, S.J., Cox, P.A., **2006**. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J. Ethnopharmacol*. 106, 97–104.

Banning, J.W., Uretsky, N.J., Patil, P.N., Beal, J.L., **1980**. Reticuline: a dopamine receptor blocker. *Life Sci*. 26, 2083–2091.

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., **2007**. New antitumoral acetogenin "Guanacone type" derivatives: isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation of diacetyl-guanacone. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 4369–4381.

Beal, M.F., **2000**. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 23, 298–304.

Beal, M.F., **2001**. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 325–334.

Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E., Cortes, D., **2005**. Acetogenins from Annonaceae : recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep*. 22, 269–303.

Bonneau, N., Schmitz-Afonso,I., Brunelle, A., Touboul, D., **2015**. Method development for quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study. *J. Chrom. B.* 1004, 46-52.

Borroni, B., Agosti, C., Magnani, E., Di Luca, M., Padovani, A., 2011. Genetic bases of Progressive Supranuclear Palsy: the MAPT tau disease. Curr. Med. Chem. 18, 2655–60.

Boulogne, I., Germosén-Robineau, L., Ozier-Lafontaine, H., Fleury, M., Loranger-Merciris, G., **2011**. TRAMIL ethnopharmalogical survey in Les Saintes (Guadeloupe, French West Indies): a

comparative study. J. Ethnopharmacol. 133, 1039–1050.

Brandão, M.G.L., Pignal, M., Romaniuc, S., Grael, C.F.F., Fagg, C.W., **2012**. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853). J. Ethnopharmacol. 143, 488–500.

Bruch, J., Xu, H., De Andrade, A., Höglinger, G., **2014**. Mitochondrial complex 1 inhibition increases 4-repeat isoform Tau by SRSF2 upregulation. *PLoS One* 9, e113070.

Buraud, M., **2010**. Ethnopharmacologie appliquée à la Guadeloupe dans le cadre du programme TRAMIL. Doctorat d'Etat en Pharmacie. Université Paris-Sud.

Burn, D.J., Lees, A.J., **2002**. Progressive supranuclear palsy: where are we now? *Lancet Neurol*. 1, 359–369.

Camilleri, A., Vassallo, N., **2014**. The centrality of mitochondria in the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 591–602.

Camuzat, A., Romana, M., Dürr, A., Feingold, J., Brice, A., Ruberg, M., Lannuzel, A., **2008**. The PSP-associated MAPT H1 subhaplotype in Guadeloupean atypical Parkinsonism. *Mov. Disord.* 23, 2384-2391.

Caparros-Lefèbvre, D., Elbaz, A., **1999**. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Lancet* 354, 281–286.

Caparros-Lefèbvre, D., Sergeant, N., Lees, A., Camuzat, A., Daniel, S., Lannuzel, A., Brice, A., Tolosa, E., Delacourte, A., Duyckaerts, C., **2002**. Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain* 125, 801–811.

Caparros-Lefèbvre, D., Steele, J., **2005**. Atypical parkinsonism on Guadeloupe , comparison with the parkinsonism – dementia complex of Guam , and environmental toxic hypotheses. Environ. *Toxicol. Pharmacol*. 19, 407–413.

Cavé, A., Cortes, D., Figadère, B., Laurens, A., Pettit, G.R., **1997**. Acetogenins from Annonaceae in "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products," Springer. ed, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer Vienna.

Chahboune, N., Barrachina, I., Royo, I., Romero, V., Sáez, J., Tormo, J.R., De Pedro, N., Estornell, E., Zafra-Polo, M.C., Peláez, F., Cortes, D., **2006**. Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 1089–94.

Champy, P., **2004**. Etude chimique et biologiquedes neurotoxines d'*Annona muricata* L. (Annonaceae) pouvant être impliquées dans la survenue de parkinsonismes atypiques en Guadeloupe. Doctorat de l'Université Paris-Sud.

Champy, P., Jean, F., Gleye, C., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévote, O., Medja, F., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, E.C., Ruberg, M., **2004**. Annonacin , a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats : possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J. Neurochem.* 88, 63–69.

Champy, P., Melot, A., Guérineau, V., Gleye, C., Fall, D., Höglinger, G.U., Ruberg, M., Lannuzel, A., Laprévote, O., Laurens, A., Hocquemiller, R., **2005**. Quantification of acetogenins in Annona muricata linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord*. 20, 1629–1633.

Champy, P., Guérineau, V., Laprévote, O., **2009**. MALDI-TOF MS profiling of Annonaceous acetogenins in *Annona muricata* products for human consumption. *Molecules* 14, 5235–5246.

Chander, M.P., Kartick, C., Gangadhar, J., Vijayachari, P., **2014**. Ethnomedicine and healthcare practices among Nicobarese of Car Nicobar - an indigenous tribe of Andaman and Nicobar Islands. *J. Ethnopharmacol.* 158, 18–24.

Chatrou, L.W., Erkens, R.H.J., Richardson, J.E., Saunders, R.M.K., Fay, M.F., **2012a**. The natural history of Annonaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 169, 1–4.

Chatrou, L.W., Pirie, M.D., Erkens, R.H.J., Couvreur, T.L.P., Neubig, K.M., Abbott, J.R., Mols, J.B., Maas, J.W., Saunders, R.M.K., Chase, M.W., **2012b**. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Bot. J. Linn. Soc*. 169, 5–40.

Chaudhuri, K.R., Edin, F., Lond, F., Hu, M.T.M., Uk, M., Brooks, D.J., **2000**. Atypical Parkinsonism in Afro-Caribbean and Indian origin immigrants to the UK. *Mov. Disord.* 15, 18–23.

Chen, Y., Chen, J., Li, X., **2012a**. Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochem. Lett.* 5, 33–36.

Chen, Y., Chen, J., Xu, S., Wang, Y., Li, X., Cai, B., Fan, N., **2012b**. Antitumor activity of Annonaceous acetogenins in HepS and S180 xenografts bearing mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 22, 2717–2719.

Chen, Y., Xu, S., Chen, J., Wang, Y., Xu, H., Fan, N., Li, X., **2012c**. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. *J. Ethnopharmacol.* 142, 462–466.

Chen, Y., Chen, J., Zhai, J., Wang, Y., Wang, S., Li, X., **2013**. Antitumor activity and toxicity relationship of Annonaceous acetogenins. *Food Chem. Toxicol.* 58, 394–400.

Cheong, K.W., Tan, C.P., Mirhosseini, H., Chin, S.T., Che Man, Y.B., Hamid, N.S.A., Osman, A., Basri, M., **2011**. Optimization of equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds of malaysian soursop (*Annona muricata*): Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS). *Food Chem.* 125, 1481–1489.

Chinou, I., **2014**. Monographs, list entries, public statements. *J. Ethnopharmacol.* 158, 458–462.

Coelho-Ferreira, M., **2009**. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J. Ethnopharmacol.* 126, 159–75.

Cohen De Cock V., Lannuzel A., Verhaeghe S., Roze E., Ruberg M., Derenne J.-P., Willer J.-C., Vidailhet M., Arnulf I., **2007**. REM sleep behavior disorder in patients with Guadeloupean Parkinsonism, a Tauopathy. *Sleep* 30, 1026-1032.

Collins, M.A., **1999**. Atypical Parkinsonism in the French West Indies. Letter to the editor. *Lancet* 354, 1473–1474.

Cortes, D., Figadère, B., Cavé, A., **1993**. Bis-tetrahydrofuran acetogenins from Annonaceae. Phytochemistry 32, 1467–1473.

Costa-Lotufo, L.V., Cunha, G.M.A., Farias, P.A.M., Viana, G.S.B., Cunha, K.M.A., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Gramosa, N.V., Rao, V.S.N., **2002**. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* 40, 1231–1234.

Couvreur, T.L.P., Maas, P.J.M., Meinke, S., Johnson, D.M., Keßler, P.J.A., **2012**. Keys to the genera of Annonaceae. *Bot. J. Linn. Soc*. 169, 74–83.

Couvreur, T.L.P., Niangadouma, R., Sonké, B., Sauquet, H., **2015**. *Sirdavidia*, an extraordinary new genus of Annonaceae from Gabon. *PhytoKeys* 46, 1–19.

Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., **2003**. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *PNAS* 100, 13380–13383.

Cuendet, M., Oteham, C.P., Moon, R.C., Keller, W.J., Peaden, P. a., Pezzuto, J.M., **2008**. Dietary administration of *Asimina triloba* (pawpaw) extract increases tumor latency in *N*-Methyl-*N*-nitrosourea–treated Rats. *Pharm. Biol.* 46, 3–7.

da C. Alves, T., Gonçalves, M.R.S., Correia, F.C.S., da Silva, V.C., de Sousa, P.T., de Carvalho, M.G., Braz-Filho, R., Dall'Oglio, E.L., **2014**. New acetogenins from the seeds of *Annona coriacea*. *Helv. Chim. Acta* 97, 1469–1474.

Dai, Y., Harinantenaina, L., Brodie, P.J., Callmander, M.W., Randrianaivo, R., Rakotonandrasana, S., Rakotobe, E., Rasamison, V.E., Shen, Y., Tendyke, K., Suh, E.M., Kingston, D.G.I., **2012**. Antiproliferative Acetogenins from a *Uvaria* sp. from the Madagascar dry forest. *J. Nat. Prod*. 75, 479–483.

Dang, Y.J., Feng, H.Z., Zhang, L., Hu, C.H., Zhu, C.Y., **2012**. *In situ* absorption in rat intestinal tract of solid dispersion of Annonaceous acetogenins. *Gastroenterol. Res. Pract*. 2012, 879676.

Degli Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D., Estornell, E., **1994**. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem. J.* 301, 161–167.

Degli Esposti, M., **1998**. Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg*. 1364, 222–235.

Derbré, S., Gil, S., Taverna, M., Boursier, C., Nicolas, V., Demey-Thomas, E., Vinh, J., Susin, S.A., Hocquemiller, R., Poupon, E., **2008**. Highly cytotoxic and neurotoxic acetogenins of the Annonaceae : New putative biological targets of squamocin detected by activity-based protein profiling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5741–5744.

Derbré, S., Roué, G., Poupon, E., Susin, S.A., Hocquemiller, R., **2005**. 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* 6, 1–4.

Duret, P., **1997**. Etudes chimiques et biologiques des acetogenines des racines d'*Annona cherimolia* et des graines d'*Annona atemoya* (Annonnaceae). Doctorat de l'Université Paris-Sud.

Duret, P., Figadère, B., Hocquemiller, R., Cavé, A., **1997**. Epimerization of Annonaceous acetogenins under basic conditions. *Tetrahedron Lett*. 38, 8849–8852.

Duret, P., Hocquemiller, R., Gantier, J.-C., Figadère, B., **1999**. Semisynthesis and cytotoxicity of amino-acetogenins and derivatives. *Bioorg. Med. Chem*. 7, 1821–1826.

Duval, R., **2003**. Hémisynthèse et évaluation biologique d'analogues de la squamocine, une acétogénine d'Annonaceae : contribution à l'étude du mécanisme d'action. Doctorat de l'Université Paris-Sud.

Duval, R.A., Lewin, G., Peris, E., Chahboune, N., Garofano, A., Dröse, S., Cortes, D., Brandt, U., Hocquemiller, R., **2006**. Heterocyclic analogues of squamocin as inhibitors of mitochondrial complex I. On the role of the terminal lactone of Annonaceous acetogenins. *Biochemistry* 45, 2721–2728.

Enneking, D., **2011**. The nutritive value of grasspea (*Lathyrus sativus*) and allied species, their toxicity to animals and the role of malnutrition in neurolathyrism. *Food Chem. Toxicol*. 49, 694–709.

Eparvier, V., Nguyen, V.H., Thoison, O., Martin, M.-T., Sévenet, T., Guéritte, F., **2006**. Cytotoxic monotetrahydrofuran acetogenins from *Disepalum plagioneurum*. *J. Nat. Prod.* 69, 1289–94.

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., **2007**. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J. Neurosci*. 27, 7827–7837.

European Food Safety Authority, **2012**. Compendium of botanicals reported to contain naturally occuring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. *EFSA J*. 10.

Fall, D., Pimentel, L., Champy, P., Gleye, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., **2006**. A new adjacent bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenin from the seeds of *Uvaria chamae*. *Planta Med*. 72, 938–940.

Fujimoto, Y., Eguchi, T., Kakinuma, K., Ikekawa, N., Sahai, M., Gupta, Y.K., **1988**. Squamocin, a new cytotoxic Bis-tetrahydrofuran containing acetogenin from *Annona squamosa*. *Chem. Pharm. Bull*. 36, 4802–4806.

George, V.C., Kumar, D.R.N., Rajkumar, V., Suresh, P.K., Kumar, R.A., **2012**. Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 13, 699–704.

Gromek, D., Hocquemiller, R., Cavé, A., **1994**. Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 5, 133–140.

Grover, P., Singh, S.P., Prabhakar, P. V, Reddy, U.A., Balasubramanyam, A., Mahboob, M., Rahman, M.F., Misra, S., **2009**. *In vivo* assessment of genotoxic effects of Annona squamosa seed extract in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1964–1971.

Gu, Z., Zhou, D., Lewis, N.J., Wu, J., Johnson, H.A., Mclaughlin, J.L., Gordon, J., **1999**. Quantitative evaluation of Annonaceous acetogenins in monthly samples of pawpaw (*Asimina triloba*) twigs by liquid chromatography / electrospray ionization / tandem mass spectrometry. *Phytochem. Anal*. 10, 32–38.

Gu, Z., Zhou, D., Lewis, N.J., Wu, J., Shi, G., McLaughlin, J.L., **1997a**. Isolation of new bioactive Annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.* 5, 1911–1916.

Gu, Z., Zhou, D., Wu, J., **1997b**. Screening for Annonaceous acetogenins in bioactive plant extracts by liquid chromatography / mass spectrometry. *J. Nat. Prod.* 60, 242–248.

Guengerich, F.P., **2006**. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*. 8, E101–E111.

Guillopé, R., Escobar-Khondiker, M., Guérineau, V., Laprévote, O., Höglinger, G.U., Champy, P., **2011**. Kaurenoic acid from pulp of *Annona cherimolia* in regard to Annonaceae-induced Parkinsonism. *Phytother. Res.* 25, 1861–4.

Hansra, D.M., Silva, O., Mehta, A., Ahn, E., **2014**. Patient with metastatic breast cancer achieves stable disease for 5 years on graviola and Xeloda after progressing on multiple lines of therapy. *Adv. Breast Cancer Res*. 3, 84–87.

Hasrat, J.A., Pieters, L., De Backer, J.P., Vauquelin, G., Vlietinck, A.J., **1997**. Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT(1A) ligands: Bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. *Phytomedicine* 4, 133–140.

Heinrich, M., Rimpler, H., Barrera, N.A., **1992**. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. *J. Ethnopharmacol*. 36, 63–80.

Höglinger, G.U., Oertel, W.H., Hirsch, E.C., **2006**. The rotenone model of parkinsonism--the five years inspection. *J. Neural Transm. Suppl.* 70, 269–272.

Höllerhage, M., Matusch, A., Champy, P., Lombès, A., Ruberg, M., Oertel, W.H., Höglinger, G.U., **2009**. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. *Exp. Neurol*. 220, 133–142.

Höllerhage, M., Rosler, T.W., Berjas, M., Luo, R., Tran, K., Richards, K.M., Sabaa-Srur, A. U., Maia, J.G.S., de Moraes, M.R., Godoy, H.T., Höglinger, G.U., Smith, R.E., **2015**. Neurotoxicity of dietary supplements from Annonaceae species. *Int. J. Toxicol. in press*

Hué-Faucheur, N., **2002**. Dissociation en phase gazeuse d'ions organiques complexes par collision de haute énergie et spectrométrie de masse tandem. Doctorat de l'Université Paris-Sud.

Hui, Y., Rupprecht, J.K., E. Anderson, J., Liu, Y., Smith, D.L., Chang, C., McLaughlin, J.L., Bullatalicin, a novel bioactive acetogenin from *Annona bullata* (Annonaceae). *Tetrahedron* 45, 6941–6948.

Im, S.Y., Kim, Y.E., Kim, Y.J., **2015**. Genetics of Progressive Supranuclear Palsy. *J. Mov. Disord*. 8, 122–129.

Jecmenica-Lukic, M., Petrovic, I.N., Pekmezovic, T., Kostic, V.S., **2014**. Clinical outcomes of two main variants of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a prospective natural history study. *J. Neurol.* 261, 1575–1583.

Jiménez, V.M., Gruschwitz, M., Schweiggert, R.M., Carle, R., Esquivel, P., **2014**. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Res. Int.* 65, 42-46.

Johnson, M.E., Bobrovskaya, L., **2015**. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene–environment interactions. *Neurotoxicology* 46, 101–116.

Jolad, S.D., Hoffmann, J.J., Schram, K.H., Cole, J.R., Tempesta, M.S., Kriek, G.R., Bates, R.B., **1982**. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *J. Org. Chem*. 47, 3151–3153.

Joseph, H., **1983**. Ethnopharmacognosie des Annonaceae de la Guadeloupe. Doctorat d'Etat en pharmacie. Université Montpellier I.

Karamyan V.T., Speth, R.C., **2008**. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.* 82, 233–246.

Kojima, N., Tanaka, T., **2009**. Medicinal Chemistry of Annonaceous acetogenins: design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues. *Molecules* 14, 3621–3661.

Kotake, Y., Yoshida, M., Ogawa, M., Tasaki, Y., Hirobe, M., Ohta, S., **1996**. Chronic administration of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces parkinsonism in a primate. *Neurosci. Lett.* 217, 69–71.

Kuwabara, K., Takada, M., Iwata, J., Tatsumoto, K., Sakamoto, K., Iwamura, H., Miyoshi, H., **2000**. Design syntheses and mitochondrial complex I inhibitory activity of novel acetogenin mimics. *Eur. J. Biochem.* 267, 2538–46.

Landolt, J.L., Ahammadsahib, K.I., Hollingworth, R.M., Barr, R., Crane, F.L., Buerckv, N.L., McCabe, G.P., McLaughlin, J.L., **1995**. Determination of structure-activity relationships of Annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. *Chem. Biol. Interact*. 98, 1–13.

Lannuzel, A., Michel, P.P., Caparros-Lefèbvre, D., Abaul, J., Hocquemiller, R., Ruberg, M., **2002**. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord*. 17, 84–90.

Lannuzel, A., Michel, P.., Höglinger, G.., Champy, P., Jousset, A., Medja, F., Lombès, A., Darios, F., Gleye, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., Hirsch, E.., Ruberg, M., **2003**. The mitochondrial complex i inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience* 121, 287–296.

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., **2007**. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: A common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain* 130, 816–827.

Lannuzel, A., Ruberg, M., Michel, P.P., **2008**. Atypical parkinsonism in the Caribbean island of Guadeloupe : Etiological role of the mitochondrial complex I inhibitor annonacin. *Mov. Disord*. 23, 2122–2128.

Lannuzel, A., Mecharles, S., Tressières, B., Demoly, A., Alhendi, R., Hédreville-Tablon, M.-A., Alecu, C., **2015**. Clinical varieties and epidemiological aspects of amyotrophic lateral sclerosis in the Caribbean island of Guadeloupe: A new focus of ALS associated with Parkinsonism. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener*. 16, 216–223.

Lans, C.A., **2006**. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *J. Ethnobiol. Ethnomed*. 2, 45

Laprévote, O., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., Charles, B., Tabet, J.-C., **1991**. Structural elucidation of five stereoisomeric acetogenins, uleicins A–E, by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 30, 2721–2727.

Laprévote, O., Girard, C., Das, B.C., Cortes, D., Cave, A., **1992a**. Formation of gas-phase lithium complexes from acetogenins and their analysis by fast atom bombardment mass spectrometry. *Tetrahedron Lett.* 33, 5237–5240.

Laprévote, O., Girard, C., Das, B.C., Laugel, T., Roblot, F., Leboeuf, M., Cavé, A., **1992b**. 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.* 6, 352–355.

Laprévote, O., Das, B.C., **1994**. Structural elucidation of acetogenins from Annonaceae by fast atom bombardment mass spectrometry. *Tetrahedron* 50, 8479–8490.

Larranaga, N., Hormaza, J.I., **2015**. DNA barcoding of perennial fruit tree species of agronomic interest in the genus *Annona* (Annonaceae). Front. Plant. Sci. 6, 589.

Lehéricy S., Hartmann A., Lannuzel A., Galanaud D., Delmaire C., Bienaimée M.-J., Jodoin N., Roze R., Gaymard B., Vidailhet M., **2010**. Magnetic resonance imaging lesion pattern in Guadeloupean parkinsonism is distinct from progressive supranuclear palsy. *Brain* 133, 2410-2425.

Le Thomas, A ; Doyle, J.A., **1993**. Implications d'une analyse cladistique dans l'histoire géographique

des Annonaceae : famille d'Angiospermes primitives. Actes du Colloque International. de Phytogéographie Tropicale. Paris, juin 1993, 173–180.

Le Ven, J., Schmitz-Afonso, I., Touboul, D., Buisson, D., Akagah, B., Cresteil, T., Lewin, G., Champy, P., **2011**. Annonaceae fruits and parkinsonism risk: Metabolisation study of annonacin, a model neurotoxin; evaluation of human exposure. *Toxicol. Lett*. 205, 50–51.

Le Ven, J., **2012**. Contribution à l'étude du lien entre Annonaceae et parkinsonismes : identification et quantification d'acétogénines par déreplication ; métabolisation de phase I et approche de distribution de l'annonacine. Doctorat de l'Université Paris-Sud.

Le Ven, J., Schmitz-Afonso, I., Lewin, G., Laprévote, O., Brunelle, A., Touboul, D., Champy, P., **2012**. Comprehensive characterization of Annonaceous acetogenins within a complex extract by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap® using post-column lithium infusion. *J. Mass Spectrom*. 47, 1500–1509.

Le Ven, J., Schmitz-afonso, I., Lewin, G., Brunelle, A., Touboul, D., Champy, P., Ven, J. Le, **2014**. Identification of the environmental neurotoxins Annonaceous acetogenins in an *Annona cherimolia* Mill. alcoholic beverage using HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap®. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8696–8704.

Lebœuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R., **1980**. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21, 2783–2813.

Levine, R.A., Richards, K.M., Tran, K., Luo, R., Thomas, A.L., Smith, R.E., **2015**. Determination of neurotoxic acetogenins in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit by LC-HRMS. J. *Agric. Food Chem*. 63, 1053–1056.

Li, C.-M., Tan, N.-H., Mu, Q., Zheng, H.-L., Hao, X.-J., Yu, W., Zhou, J., **1997**. Cyclopeptide from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry* 45, 521–523.

Li, C.-M., Tan, N.-H., Zheng, H.-L., Mu, Q., Hao, X.-J., He, Y.-N., Zhou, J., **1999**. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry* 50, 1047–1052.

Li, X., **2011**. Oral bioavailability: Basic principles, advanced concepts, and applications. John Wiley & Sons, Inc.

Liaw, C.-C., Chang, F.-R., Chen, S.-L., Wu, C.-C., Lee, K.-H., Wu, Y.-C., **2005**. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Bioorg. Med. Chem*. 13, 4767–4776.

Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Chen, M., Chang, F.-R., Chen, S.-L., Wu, S.-H., Wu, Y.-C., **2008**. Mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators. *J. Nat. Prod*. 71, 764–71.

Liaw, C., Liao, W., Chen, C., Jao, S., Wu, Y., **2011**. The Calcium-chelating capability of Tetrahydrofuranic Moieties Modulates the Cytotoxicity of Annonaceous Acetogenins. *Angew. Chem., Int. Ed.* 50, 7885–7891.

Lipinski, C.A., **2004**. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today. Technol.* 1, 337–341.

Londershausen, M., Leicht, W., Lieb, F., Moeschler, H., Weiss, H., **1991**. Molecular mode of action of annonins. *Pestic. Sci.* 33, 427–438.

Longuefosse, J.L., Nossin, E., **1996**. Medical ethnobotany survey in Martinique. *J. Ethnopharmacol.* 53, 117–42.

Mader, L.S., **2013**. Update: FDA Approves Crofelemer as First Oral Botanical Drug. *HerbalGram* 97, 68–69.

Mafimisebi, T.E., Oguntade, A.E., Fajemisin, A.N., Aiyelari, O.P., **2012**. Local knowledge and socio-economic determinants of traditional medicines' utilization in livestock health management in Southwest Nigeria. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 8, 2.

Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Araujo Escalona, A.G., Ledesma Velázquez, I., Martínez-Mota, L., Moreno, J., Heinze, G., **2012**. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 139, 164–70.

Mc Cloud, T.G., Smith, D.L., Chang, C.-J., Cassady, J.M., **1987**. Annonacin, a novel, biologically active polyketide from *Annona densicoma*. Experientia 43, 947–949.

Mc Laughlin, J.L., **2008**. pawpaw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J. Nat. Prod*. 71, 1311–1321.

Melot, A., Fall, D., Gleye, C., Champy, P., **2009**. Apolar annonaceous acetogenins from the fruit pulp of *Annona muricata. Molecules* 14, 4387–4395.

Mootoosamy, A., Fawzi Mahomoodally, M., **2014**. Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *J. Ethnopharmacol*. 151, 413–44.

Morais, L.C.S.L., Barbosa-Filho, J.M., Almeida, R.N., **1998**. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* 62, 57–61.

Nagatsu, T., **2002**. Amine-related neurotoxins in Parkinson's disease: past, present, and future. *Neurotoxicol. Teratol*. 24, 565–569.

Ningthoujam, S.S., Talukdar, A. Das, Potsangbam, K.S., Choudhury, M.D., **2012.** Challenges in developing medicinal plant databases for sharing ethnopharmacological knowledge. *J. Ethnopharmacol*. 141, 9–32.

OMS, **2006**. Neurological disorders, public health challenges, Organisation Mondiale de la Santé. (WHO) Genève.

Ong, H.G., Kim, Y.-D., **2014**. Quantitative ethnobotanical study of the medicinal plants used by the Ati Negrito indigenous group in Guimaras island, Philippines. *J. Ethnopharmacol.* 157, 228–242.

Oravcová, J., Böhs, B., Lindner, W., **1996**. Drug-protein binding studies : new trends in analytical and experimental methodology. *J. Chrom. B* 677, 1-28.

Padmaja, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y., Hisham, A., **1995**. Biological activities of *Annona glabra. J. Ethnopharmacol.* 48, 21–24.

Papapetropoulos, S., **2007**. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-*N*-methylamino-*L*-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem. Int.* 50, 998–1003.

Pauli, G.F., Gödecke, T., Jaki, B.U., Lankin, D.C., **2012**. Quantitative ^{1}H NMR. Development and potential of an analytical method: an update. *J. Nat. Prod*. 75, 834–851.

Picking, D., Delgoda, R., Younger, N., Germosén-Robineau, L., Boulogne, I., Mitchell, S., **2015**. TRAMIL ethnomedicinal survey in Jamaica. *J. Ethnopharmacol.* 169, 314–27.

Pimenta, L.P.S., Nascimento, F.C., Boaventura, M.A.D., **2005**. Acetogenins from the Leaves of *Rollinia laurifolia*. *Helv. Chim. Acta* 88, 3225–3231.

Pinto, A.C. de Q., Cordeiro, M.C.R., Andrade, S.R.M. De, Ferreira, F.R., Alves, R.E., Kinpara, D.I., Hughes, A., Clement, C.R., Haq, N., Smith, R.W., 2005. Fruits for the Future 5 *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton.

Pirie, M.D., Doyle, J.A., **2012**. Dating clades with fossils and molecules: the case of Annonaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 169, 84–116.

Pomper, K.W., Lowe, J.D., Crabtree, S.B., Keller, W., **2009**. Identification of Annonaceous Acetogenins in the Ripe Fruit of the North American pawpaw (*Asimina triloba*). *J. Agric. Food Chem*. 57, 8339–8343.

Potts, L.F., Luzzio, F.A., Smith, S.C., Hetman, M., Champy, P., Litvan, I., **2012**. Annonacin in *Asimina triloba* fruit: implication for neurotoxicity. *Neurotoxicology* 33, 53–8.

Prabhu, S., Vijayakumar, S., Yabesh, J.E.M., Ravichandran, K., Sakthivel, B., **2014**. Documentation and quantitative analysis of the local knowledge on medicinal plants in Kalrayan hills of Villupuram district, Tamil Nadu, India. *J. Ethnopharmacol*. 157, 7–20.

Qiu, F., Imai, A., McAlpine, J.B., Lankin, D.C., Burton, I., Karakach, T., Farnsworth, N.R., Chen, S.-N., Pauli, G.F., **2012**. Dereplication, residual complexity, and rational naming: the case of the Actaea triterpenes. *J. Nat. Prod.* 75, 432–43.

Rageau, J., **1973**. Les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie. O.R.S.T.O.M.

Rainer, H., **2007**. Monographic studies in the genus *Annona* L . (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A . *St -Hil Ann. Nat. Hist. Mus. Wien. Ser. B. Bot. Zool.* 191–205.

Razafindraibe, M., Kuhlman, A.R., Rabarison, H., Rakotoarimanana, V., Rajeriarison, C., Rakotoarivelo, N., Randrianarivony, T., Rakotoarivony, F., Ludovic, R., Randrianasolo, A., Bussmann, R.W., **2013**. Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar). *J. Ethnobiol. Ethnomed*. 9, 73.

Rodrigues dos Santos Lima, L.A., Santos Pimenta, L.P., Diamantino Boaventura, M.A., **2009**. Two new adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from seeds of *Annona cornifolia*. *Planta Med*. 75, 80–3.

Rottscholl, R., Lunow, M., Jainsch, B., Respondek, G., Höllerhage, M., Rösler, T.W., Bony, E., Ven, J. Le, Guérineau, V., Schmitz-Afonso, I., Champy, P., Oertel, W.H., Yamada, E.S., Höglinger, G.U., **2015**. soumis à *Neurobiol. Aging*

Santos, L.A.R. Dos, Boaventura, M.A.D., Pimenta, L.P.S., **2006**. Cornifolin, a new bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenin from *Annona cornifolia*. Biochem. Syst. Ecol. 34, 78–82.

Schapira, A.H. V, **2010**. Complex I : inhibitors , inhibition and neurodegeneration. *Exp. Neurol*. 224, 331–335.

Schapira, A.H. V, Schrag, A., **2011**. Parkinson disease: Parkinson disease clinical subtypes and their implications. *Nat. Rev. Neurol*. 7, 247–248.

Sinha, S.C., Chen, Z., Huang, Z.-Z., Nakamaru-Ogiso, E., Pietraszkiewicz, H., Edelstein, M., Valeriote, F., **2008**. Alteration of the bis-tetrahydrofuran core stereochemistries in asimicin can affect the cytotoxicity. *J. Med. Chem*. 51, 7045–7048.

Spatola, M., Wider, C., **2014**. Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 Suppl 1, S35–38.

Spencer, P.S., Roy, D.N., Ludolph, A., Hugon, J., Dwivedi, M.P., Schaumburg, H.H., **1986**. Lathyrism: evidence for role of the neuroexcitatory aminoacid BOAA. *Lancet* 2, 1066–1067.

Sreekeesoon, D.P., Mahomoodally, M.F., **2014**. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants and animals used in the treatment and management of pain in Mauritius. *J. Ethnopharmacol.* 157, 181–200.

Steele, J.C., **1999**. Atypical parkinsonism in the French West Indies. *Lancet* 354, 1469–1478.

Sun, S., Liu, J., Kadouh, H., Sun, X., Zhou, K., **2014**. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 24, 2773–2776.

Tag, H., Kalita, P., Dwivedi, P., Das, A.K., Namsa, N.D., **2012**. Herbal medicines used in the treatment of diabetes mellitus in Arunachal Himalaya, northeast, India. *J. Ethnopharmacol.* 141, 786–795.

Takada, M., Kuwabara, K., Nakato, H., Tanaka, A., Iwamura, H., Miyoshi, H., **2000**. Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. Biochim. *Biophys. Acta - Bioenerg*. 1460, 302–310.

Teixeira Machado, A.R.T., Lage, G.A., da Silva Medeiros, F., de Souza Filho, J.D., Pimenta, L.P.S., 2014. Total α,β-unsaturated-γ-lactone acetogenins in *Annona muricata* by proton NMR Spectroscopy. *Appl. Magn. Reson*. 46, 153–160.

Tene, V., Malagón, O., Finzi, P.V., Vidari, G., Armijos, C., Zaragoza, T., **2007**. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *J. Ethnopharmacol*. 111, 63–81.

Tolosa, E., Wenning, G., Poewe, W., **2006**. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* 5, 75–86.

Tomer, K.B., Jensen, N.J., Gross, M.L., **1986.** Fast atom bombardment and tandem mass spectrometry for determining structural modification of fatty acids. *Anal. Chem*. 58, 2429–2433.

Torres, M.P., Rachagani, S., Purohit, V., Pandey, P., Joshi, S., Moore, E.D., Johansson, S.L., Singh, P.K., Ganti, A.K., Batra, S.K., **2012**. Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. *Cancer Lett.* 323, 29–40.

TRAMIL, 2007. Pharmacopée Végétale Caribéenne. Deuxième édition.

Wagner, J., Krauss, S., Shi, S., Ryazanov, S., Steffen, J., Miklitz, C., Leonov, A., Kleinknecht, A., Göricke, B., Weishaupt, J.H., Weckbecker, D., Reiner, A.M., Zinth, W., Levin, J., Ehninger, D., Remy, S., Kretzschmar, H.A., Griesinger, C., Giese, A., Fuhrmann, M., **2015**. Reducing tau aggregates with anle138b delays disease progression in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol.* 130, 619-631.

Watanabe, H., Ikeda, M., Watanabe, K., Kikuchi, T., **1981**. Effects on central dopaminergic systems of D-coclaurine and D-reticuline, extracted from *Magnolia salicifolia*. *Planta Med*. 42, 213–222.

Wélé, A., Mayer, C., Quentin, D., Zhang, Y., Blond, A., Bodo, B., **2009**. 3D-structure of cycloreticulin C and glabrin A, cyclopeptides from the seeds of *Annona reticulata*. *Tetrahedron* 65, 275–281.

Wongsa, N., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., **2011**. Cananginones A-I, linear acetogenins from the stem bark of Cananga latifolia. *Phytochemistry* 72, 1859–1864.

Wu, P., Wu, M., Xu, L., Xie, H., Wei, X., **2014**. Anti-inflammatory cyclopeptides from exocarps of sugar-apples. *Food Chem*. 152, 23–28.

Yabesh, J.E.M., Prabhu, S., Vijayakumar, S., **2014.** An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. *J. Ethnopharmacol.* 154, 774–89.

Yamada, E.S., Respondek, G., Müssner, S., de Andrade, A., Höllerhage, M., Depienne, C., Rastetter, A., Tarze, A., Friguet, B., Salama, M., Champy, P., Oertel, W.H., Höglinger, G.U., **2014**. Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. *Exp. Neurol*. 253, 113–125.

Yang, H., Li, X., Tang, Y., Zhang, N., Chen, J., Cai, B., **2009a**. Supercritical fluid CO_2 extraction and simultaneous determination of eight Annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 49, 140–144.

Yang, H., Zhang, N., Li, X., Chen, J., Cai, B., **2009b**. Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 2199–202.

Yang, H., Zhang, N., Li, X., He, L., Chen, J., **2009c**. New nonadjacent bis-THF ring acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapia* 80, 177–181.

Zafra-Polo, M.C., González, M.C., Estornell, E., Sahpaz, S., Cortes, D., **1996**. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry* 42, 253–271.

Listes

Liste des Abréviations

AAG : acétogénine d'Annonaceae

ACN : acétonitrile

AcOEt : acétate d'éthyle

ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ATP : adénosine triphosphate

AUC : surface sous courbe (*Area Under Curve*)

BMAA : β-*N*-méthyl-amino-*L*-alanine

BnTHiQ : benzyl-tetrahydorisoquinoléine

BOAA : β-oxalyl-amino-alanine

CID : dissociation induite par collision

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

COSY : RMN à deux dimensions homonucléaire ^{1}H-^{1}H (*homonuclear COrrelation SpectroscopY*)

CTX : cyclophosphamide

CV : coefficient de variation

EIC : chromatogramme d'ion extrait

EMA : agence européenne du médicament

ESI : électrospray

FAB : *Fast Atom Bombardment*

Gd-PDC : complexe démence parkinsonisme guadeloupéen

Gd-PSP : paralysie supranucléaire progressive guadeloupéenne

hCMEC : lignée immortalisée de cellule humaine endothéliale microvasculaire cérébrale

HSQC : RMN à deux dimensions hétéronucléaire ^{13}C-^{1}H (*Heteronuclear Single Quantum Coherence)*

HMBC : RMN à deux dimensions hétéronucléaire ^{13}C-^{1}H (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence)*

IS : étalon interne

LOD : Limite de Détection

LOQ : Limite de Quantification

MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

MAPT : *Microtubule Associated Protein*

MeOH : méthanol

MND : maladie des motoneurones

MPP^{+} : 1-méthyl-4-phényl-pyridinium

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-pyridine

MS : spectrométrie de masse

MS/MS : spectrométrie de masse tandem

NADH : (=NADH,H^{+}) Nicotinamide Adénosine Triphosphate, forme réduite

OMS :Organisation mondiale de la Santé

PDC : complexe démence-parkinsonisme de Guam (*Parkinson Dementia Complex*)

PSP : Paralysie Supranucléaire Progressive

Q-TOF : analyseur tandem quadripôle - temps de vol.

RMN : résonance magnétique nucléaire

SD : déviation standard

SFC : chromatographie en fluide supercritique

SLA : sclérose latérale amyotrophique

SRM : *Selected Reaction Monitoring*

THF : tétrahydrofurane

THP : tétrahydropyrane

TIC : *Total Ion Current*

TQ : Triple Quadripôle

UHPLC : chromatographie liquide ultra haute performance

Liste des Figures

Figure 1 : Répartition du genre *Annona* 11
Figure 2 : *Annona glabra* 12
Figure 3 : Illustrations d'*Annona muricata* (a), *Annona squamosa* (b), *Annona reticulata* (c)……13
Figure 4 : Carte de la répartition des pays cultivant les espèces *A. muricata* et *squamosa* et du recensement des mentions d'usage en médecine traditionnel 14
Figure 5 : Classes de métabolites secondaires isolés du genre *Annona* illustrées par des exemples. 18
Figure 6 : Schéma général de structure d'une AAG. 19
Figure 7 : Classification des acétogénines selon Cavé *et al.* (1997). 20
Figure 8 : Nomenclature de Cortès et *al*, augmentée par Bermejo *et al.* (2005). 21
Figure 9 : Classification de la famille des Annonaceae et nombre d'AAGs isolées 24
Figure 10 : Exemples de fragmentations obtenues par ionisation chimique ($[M+H]^+$) ou électronique ($[M]^{+\cdot}$). 26
Figure 11 : Schéma général de fragmentation des acétogénines en présence de Li^+. 28
Figure 12 : Mécanismes de fragmentation proposés par Laprévote *et al.* (1994) en présence de Lithium. 30
Figure 13 : Détermination du type d'acétogénine par l'étude des fragments caractéristiques obtenus par FAB-MS en présence de LiCl .....**Erreur ! Signet non défini.**
Figure 14 : Fragments obtenus par ESI-LTQ-Orbitrap® en mode MS/MS avec infusion de LiI 32
Figure 15 : Comparaison des spectres MS/MS d'acétogénines de type A B et C 33
Figure 16 : Liste des masses d'acétogénines attendues.. 35
Figure 17 : Chromatogrammes de l'extrait de nectar d'*A. muricata* : 37
Figure 18 : Chromatogramme UV d'extrait de graines d'*A. muricata*. 38
Figure 19 : Chromatogrammes *d'A. squamosa.* 39
Figure 20 : Chromatogrammes d'extraits de produits et compléments alimentaires 41
Figure 21 : Schéma simplifié de la chaîne respiratoire mitochondriale. 43
Figure 22 : Schéma général des relations structure-activité des acétogénines. 45
Figure 23 : Neurotoxines environnementales impliquées dans des parkinsonismes : 50
Figure 24 : Plantes alimentaires neurotoxiques et toxines incriminées 58
Figure 25 : Analogie structurale de la réticuline, avec la dopamine et l'apomorphine. 59
Figure 26 : Rôle du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale dans la neurodégénérescence. 61
Figure 27 : Schéma de perfusion intestinale en 4 sites. 66
Figure 28 : Comparaison du SIM 635,45 du brut d'échantillon de métabolisation obtenu sur microsomes humains, de rats, et par hémisynthèse. 67
Figure 29 : Résumé des métabolites de phase I de l'annonacine.. 68
Figure 30 : Profils des concentrations plasmatiques en annonacine 87
Figure 31 : Dosage de l'annonacine dans le cerveau de Rat 112

Figure 32 : Optimisation des conditions d'ionisation des AAGs, à partir de la squamocine. 174
Figure 33 : Spectre MS de la squamocine 175
Figure 34 : Spectres d'ions produits de la squamocine à partir de l'adduit $[M+H]^+$..... 176
Figure 35 : TICs comparés d'un extrait de pulpe d'*Annona squamosa* 177
Figure 36 : Spectre de l'annonacine à 10 µg/mL dans le MeOH. 177
Figure 37 : Spectre de l'annonacinone à 10 µg/mL dans le MeOH 178
Figure 38 : Spectre de la squamocine à 10 µg/mL dans le MeOH 178
Figure 39 : Spectre de la bullatacine à 10 µg/mL dans le MeOH. 179
Figure 40 : Ion fragment B1/X4 de l'annonacine en présence de lithium. 179
Figure 41 : Chromatogrammes CLHP-ESI-Q-TOF des masses correspondant à des adduits $[M+Li]^+$ d'AAGs dans l'extrait brut de pulpe d'*A. reticulata*. 209
Figure 42 : Abondances des adduits $[M+Li]^+$, $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ de l'annonacine en fonction de la concentration et du débit post-colonne en LiI, en conditions chromatographiques. 210
Figure 43 : Récapitulatif des fruits étudiés, des techniques employées, et des principaux résultats...212

Liste des Tableaux

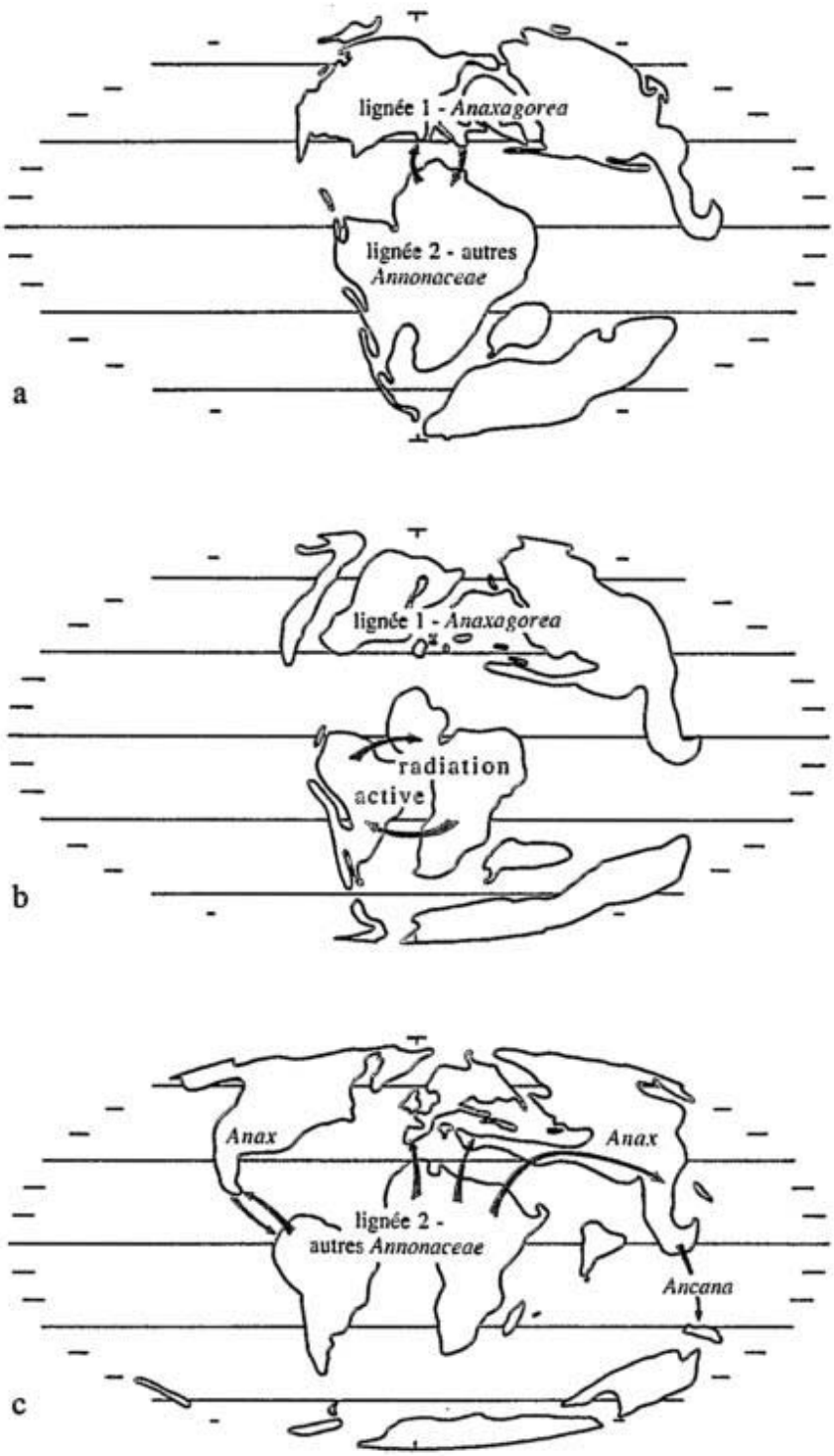
Tableau 1 : Utilisations des espèces rapportées au cours d'études ethnobotaniques menées dans les Caraïbes (Boulogne *et al.*, 2011; Buraud, 2010; Lans, 2006; Longuefosse and Nossin, 1996; Picking *et al.*, 2015) 15
Tableau 2 : Étude de la teneur en annonacine de divers produits alimentaires à base de corossol. (Le Ven, 2012). 40
Tableau 3 : Estimation de la teneur en acétogénines totales de produits à base de corossol. (Le Ven, 2012). 40
Tableau 4 : Étude comparée de la consommation de corossol ou de tisane de feuilles de corossolier, entre les sujets atteints de la maladie de parkinson, de parkinsonisme atypique, ou non malades (Caparros-Lefèbvre et Elbaz, 1999). 52
Tableau 5 : Comparaison des phénotypes PSP et UP, cohorte 1996-2001 (Caparros-Lefèbvre *et al.*, 2002) 53
Tableau 6 : Signes cliniques comparés des patients MP, Gd-PSP et Gd-PDC, cohorte 2003-2005 (Lannuzel *et al.*, 2007). 54
Tableau 7 : Consommation d'*A. muricata* par les patients parkinsoniens en Guadeloupe (Lannuzel *et al.*, 2007). 55
Tableau 8 : Toxicité des alcaloïdes d'A. muricata sur cultures primaires mésencéphaliques d'embryons de rats (Lannuzel *et al.*, 2002) ; potentiel inhibiteur du complexe I (Champy, 2004). 60
Tableau 9 : Neurotoxicité des acétogénines : principales données expérimentales *in vitro*. 62
Tableau 10 : Neurotoxicité des acétogénines : principales données expérimentales *in vivo*. 64
Tableau 11 : Tableau prédictif du passage des barrières physiologiques pour l'annonacine. Reproduction de (Le Ven, 2012). 65
Tableau 12 : Résultats de l'étude de la distribution de l'annonacine dans le compartiment sanguin. .. 88
Tableau 13 : Abondances des adduits $[M+Li]^+$, $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ de l'annonacine en fonction de la concentration et du débit post-colonne en LiI, en conditions chromatographiques. 211

Annexes

Annexe 1.....241
Annexe 2.....243
Annexe 3.....245
Annexe 4.....251

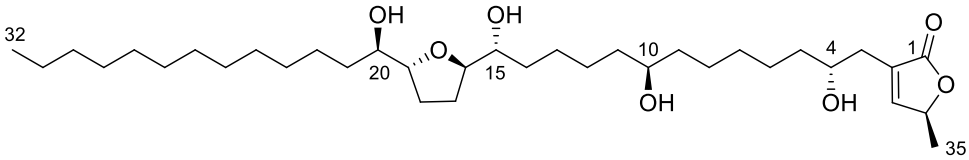
Annexe 1 : Actes du colloque international de Phytogéographie tropicale. Paris, juin 1993 (Le Thomas, A ; Doyle, 1993)

Trois étapes proposées dans l'histoire géographique des Annonaceae : (a) Crétacé inférieur, (b) Crétacé supérieur, (c) Tertiaire inférieur. Paléogéographie d'après PARRISH (1987) (cartes des niveaux Barrhien, Cénornanien et Eocène).

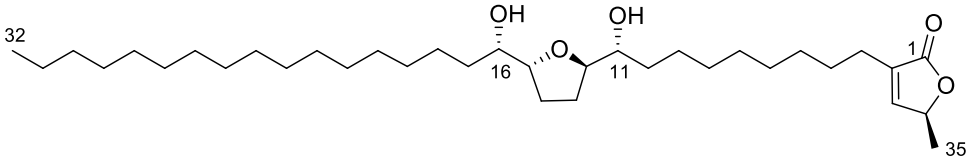


Annexe 2 : Récapitulatif des principales acétogénines citées dans le manuscrit

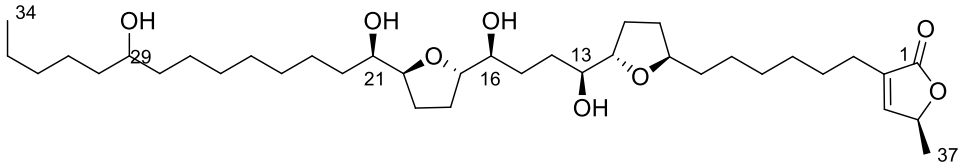
annonacine
$C_{35}H_{64}O_7$
M = 596,47 g.mol^{-1}



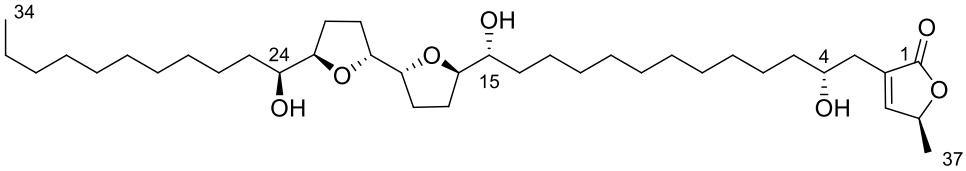
annosquamine-B
$C_{35}H_{64}O_5$
M = 564,88 g.mol^{-1}



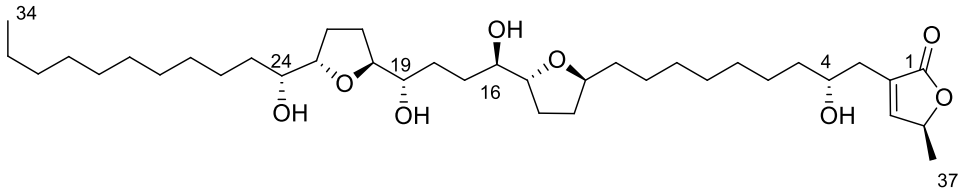
annosquatine-B
$C_{37}H_{66}O_8$
M = 638,92 g.mol^{-1}



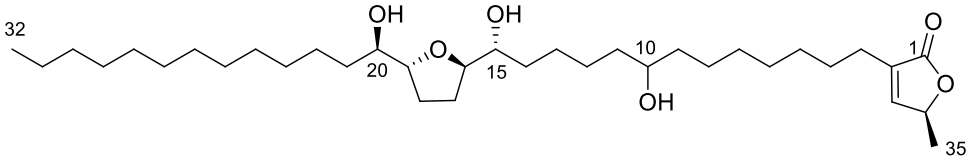
bullatacine
$C_{37}H_{66}O_7$
M = 622,92 g.mol^{-1}



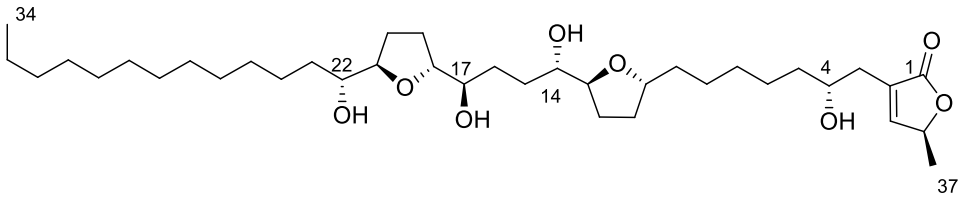
bullatalicine
$C_{37}H_{66}O_8$
M = 638,92 g.mol^{-1}



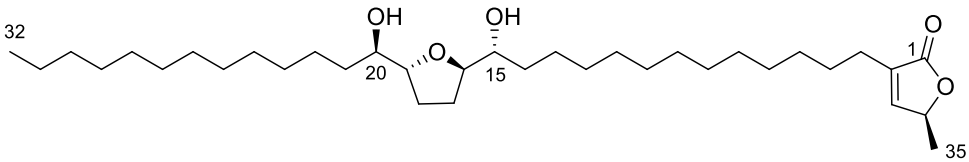
corrossoline
$C_{35}H_{64}O_6$
M = 580,88 g.mol^{-1}



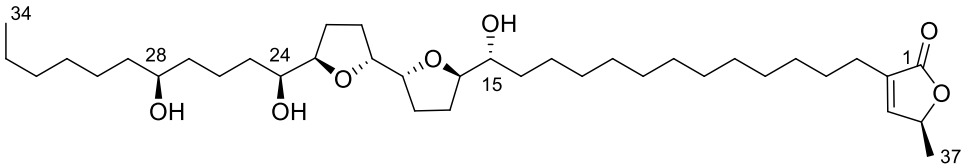
gigantecine
$C_{37}H_{66}O_8$
M = 638,92 g.mol^{-1}



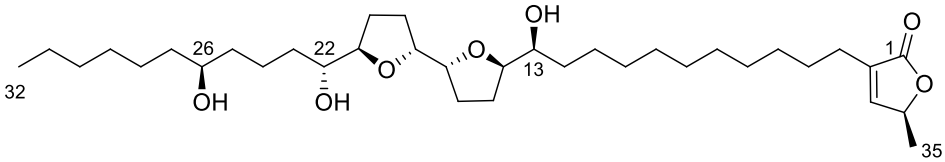
solamine
$C_{35}H_{64}O_5$
M = 564,88 g.mol^{-1}



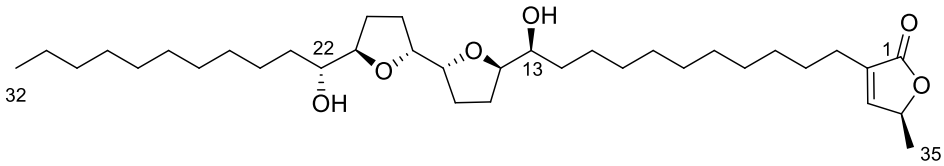
squamocine
$C_{37}H_{66}O_7$
M = 622,92 g.mol^{-1}



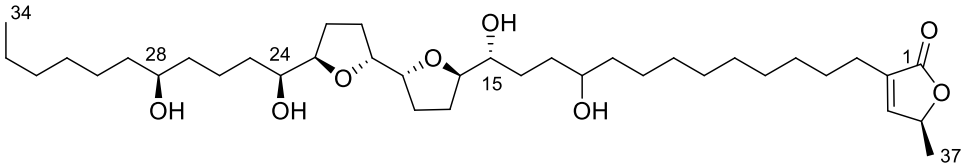
squamocine-B
$C_{35}H_{62}O_7$
M = 594,86 g.mol^{-1}



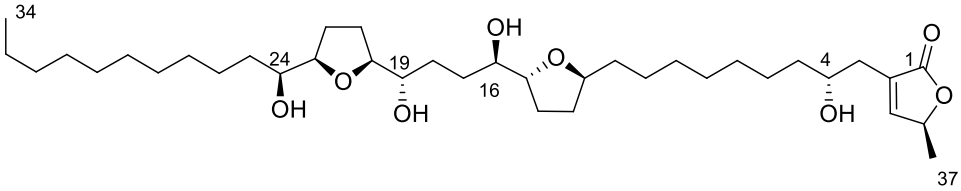
squamocine-I
$C_{35}H_{62}O_6$
M = 578,86 g.mol^{-1}



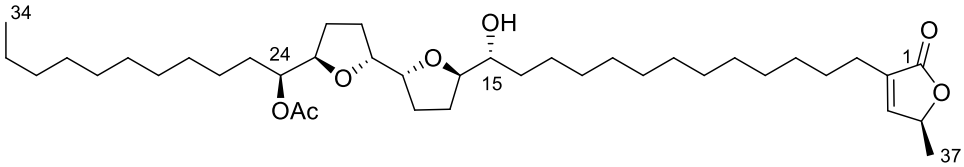
squamocine-O
$C_{37}H_{66}O_7$
M = 622,92 g.mol^{-1}



sylvaticine
$C_{37}H_{66}O_8$
M = 638,92 g.mol^{-1}



uvaricine
$C_{39}H_{68}O_7$
M = 648,95 g.mol^{-1}



Annexe 2 : Isolement des molécules de référence

a) Isolement de l'annonacine

Schéma d'extraction et purification de l'annonacine à partir de graines d'*Annona muricata.*

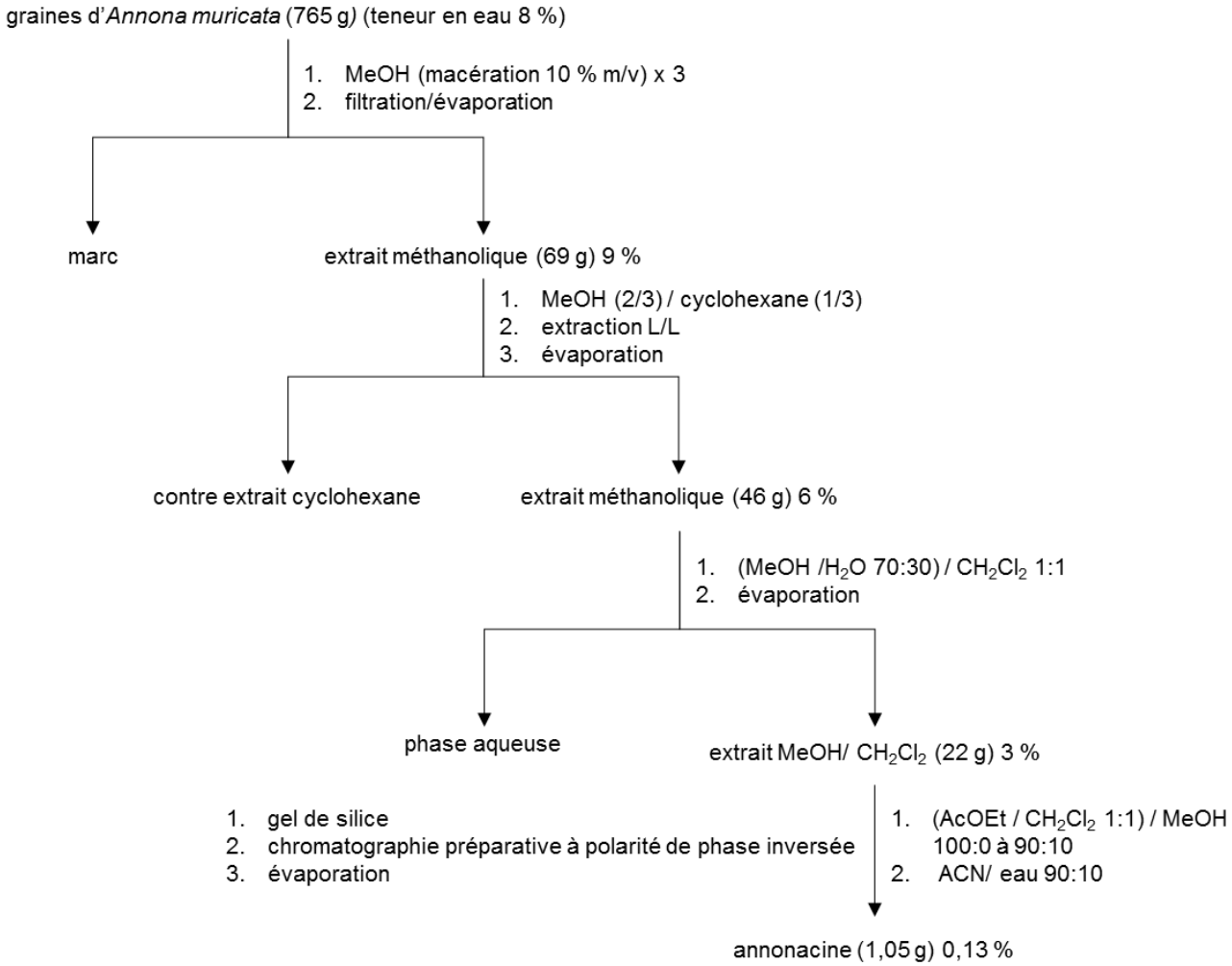


Table 1 : Déplacements chimiques de l'annonacine en RMN ^{1}H et ^{13}C. (*J* en Hertz)

Position	RMN ^{1}H δ en ppm, *J* en Hz	RMN ^{13}C δ en ppm
1	-	174,6
2	-	131,2
3a	dd 2,39 (15,4 ; 8,0)	31,9
3b	*dd* 2,52 (*15,4* ; *1,6*)	31,9
4	*m* 3,81	69,8
5	*m* 1,50	37,3
6-8	*m* 1,19-1,47	25,4-29,6
9	*m* 1,37	37,2
10	*m* 3,60	71,7
11	*m* 1,37	37,2
12-13	*m* 1,19- 1,47	25,4-29,6
14	*m* 1,37	33,4
15	*m* 3,40	74,1
16	*m* 3,81	82,7
17a-18a	*m* 1,64	28,8
17b-18b	*m* 1,95	
19	*m* 3,79	82,7
20	*m* 3,40	74,1
21	*m* 1,37	33,3
22-30	*m* 1,19-1,47	25,2-29,6
31	*m* 1,26	22,7
32	*t* 0,87 (*6,7*)	14,5
33	*d* 7,18 (*1,4*)	151,9
34	*qd* 5,05 (*6,8* ; *1,4*)	78
35	*d* 1,40 (*6,8*)	19,1

L'annonacine a été purifiée au laboratoire à partir de graines *d'Annona muricata*. Sa pureté (>97%) a été établie par CLHP-UV et MS.

b) Isolement de la squamocine

<u>Schéma d'extraction et purification de la squamocine à partir de graines d'*Annona squamosa*.</u>

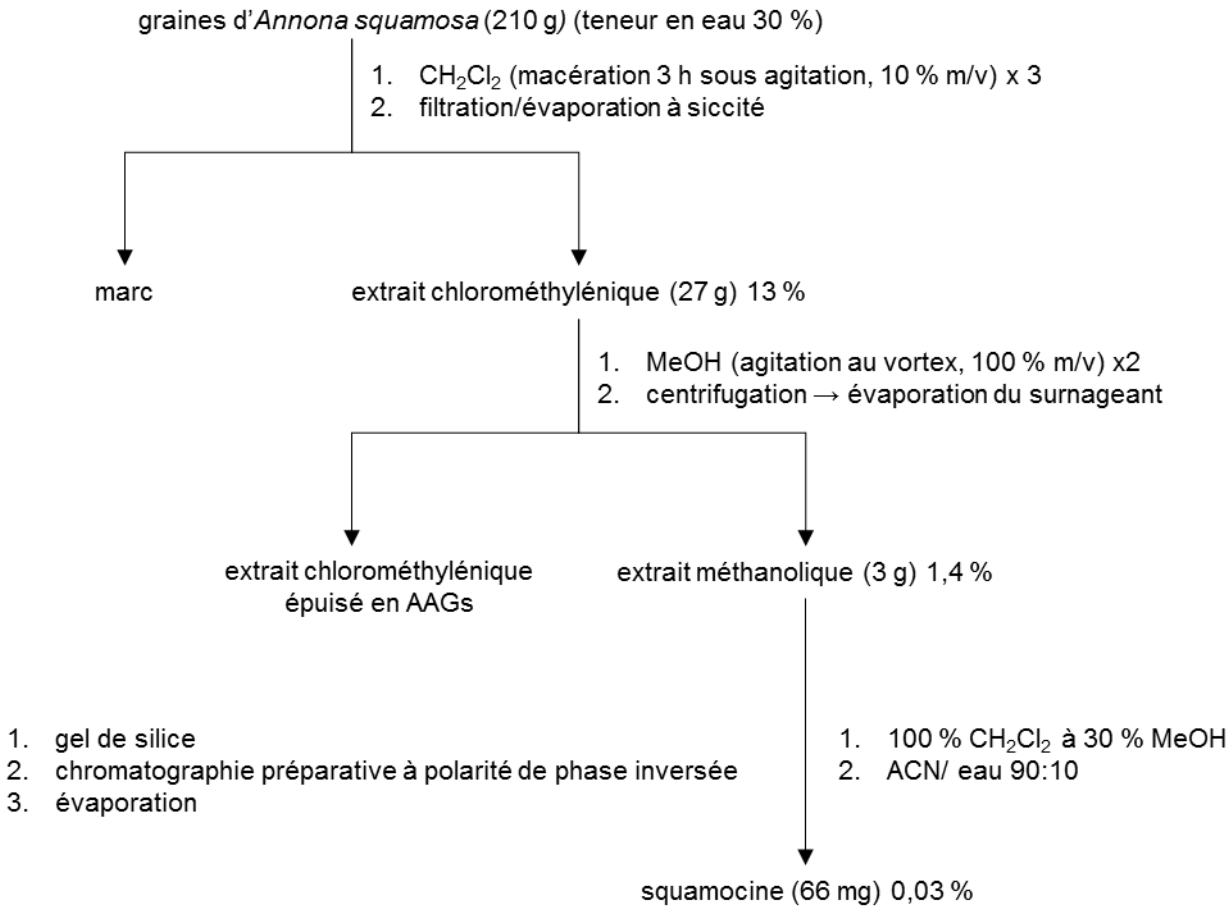


Table 2 : Déplacements chimiques de la squamocine en RMN ^{1}H et ^{13}C. (*J* en Hertz)

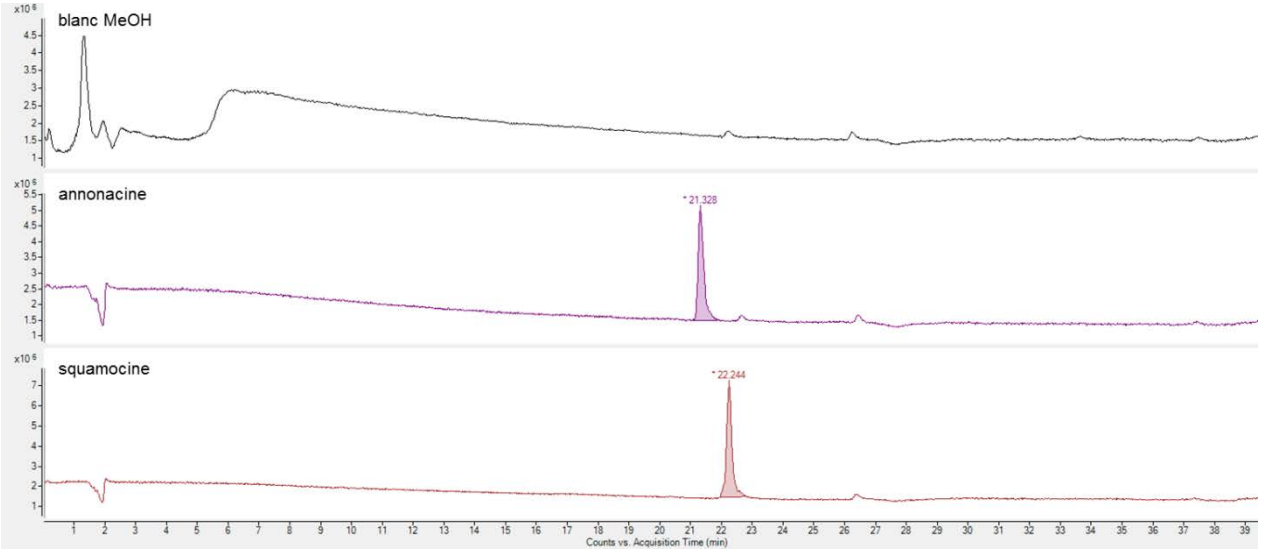
Position	RMN ^{1}H δ en ppm, *J* en Hz	RMN ^{13}C δ en ppm
1	-	173 ,8
2	-	134,4
3	2,26 *tt* (7,8 ; 1,6)	24,83
4	1,51 *m*	27,8
5-13	1,23-1,27 *m*	27,4-33,4
14	1,40 m	32,5
15	3,40 *m*	74,1
16	3,84 *m*	83,3
17a, 17b	1,61†-2,01‡ *m*	28,4-28,9
18a, 18b	1,61†-2,01‡ *m*	28,4-28,9
19	3,93 *m*	82,8*
20	3,93 *m*	82,5*
21a, 21b	1,64†-1,95‡ *m*	28,4-28,9
22a, 22b	1,64†-1,95‡ *m*	28,4-28,9
23	3,84 *m*	82,3
24	3,87 *m*	71,4
25	1,23-1,27 *m*	22,0
26	1,23-1,27 *m*	22,0
27	1,42 *m*	37,5
28	3,60 *m*	71,8
29	1,40 *m*	37,3
30-32	1,23-1,27	24,8-37,5
33	1,23-1,27	22,6
34	0,88 *t* (6,4)	14,1
35	6,98 *dt* (1,4 ; 1,6)	148,9
36	4,99 *qd* (6,8 ; 1,6)	77,3
37	1,40 *d* (6,8)	19,4

*, †, ‡ : interchangeables

La squamocine et l'annonacine ont été identifiées sur la base de données spectrales, en comparaison avec la littérature. Des co-injections en LC-MS avec des témoins présents au laboratoire ont permis de confirmer leur identité. La pureté des témoins isolés est montrée par CLHP-UV et CLHP-MS.

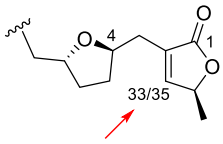
c) Pureté des témoins isolés : annonacine et squamocine.

Chromatogrammes CLHP-ESI-Q-TOF de l'annonacine et de la squamocine dans les conditions décrites dans l'**article 3**.



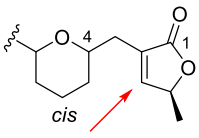
Annexe 4 : AAGs à lactones éthyléniques de sous-type 1 remarquables ou de sous-types atypiques. Données ^{1}H RMN obtenues dans le $CDCl_3$.

AAGs à lactones de sous-type 1 (classification de Bermejo *et al.*, 2005), **substitutions atypiques en 4, 5**



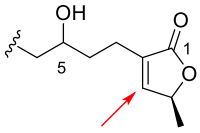
type L-A (sous-type 1a)
ex : aromine, aromine-A, aromicine

br.s 7,15 ppm [aromine, aromacine ; aromine-A]



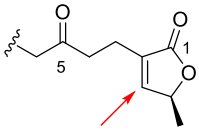
type L-A (sous-type 1a)
montanacines D-E

d, 7,14 ppm (*J* = 1,6 Hz) [id. montanacines-D, -E]



type L-A (sous-type 1a)
ex : sootepensine A

d
7,03 ppm (*J = 1,5 Hz*)

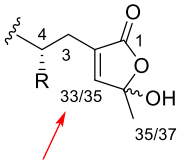


type L-A (sous-type 1a)
ex : tonkinine C

d
7,02 ppm (*J = 1,5 Hz*)

Lactone de type L-D

- cf liste complète [a] *; en mélange d'épimères en C-34/36*



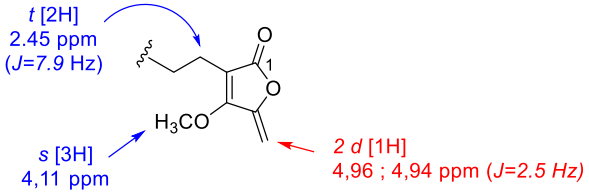
toutes R=OH
sauf annomolone-A + 34-*epi :* R =H
donnaienines-C et -D et *epi*-34 : R = OAc

s 6.95 ppm (annomolones ; R = H ; goniodonines ; R = OH)
s 6.84 ppm (donnaienine ; R = OAc)
s 6.89 ppm (*epi*-donnaienine ; R = OAc)

[a] **Lactone L-D :** donhepocine+34-*epi* (type E), donnaienine-A + 34-*epi* ; donnaienine-B + 34-*epi* ; goniodonine + 34-*epi* ; *cis*-goniodonine + 34-*epi ;* gardnerinine + 34-*epi* : donnaienine-C + 34-*epi* ; annomontanine-C* , montanacine-H + 34-*epi** ; montanacine-I + 34-*epi** ; montanacine-J + 34-*epi** ; parisine** annomolone-A + 34-*epi* † ; annomolone-B + 34-*epi* † ; (toutes de type A, i.e. mono-THF α,α'-diOH) ; gardnerinine (type A - T-B : α'-mono-OH-THF) ;
* *A. montana* ; † *A. cherimolia* ; ** *A. salzmani*. (Voir Bermejo *et al.*, **2005**)

Lactone de type L-F

artapelatines-A, -B, -C (type E)



Lactone L-F : β-méthoxy-γ-méthylène-γ-butyrolactone-α,β-insaturée -
(ref : Wong H.F., Brown G.D. β-Methoxy-γ-methylene-α,β–unsaturated–γ–butyrolactones. *Phytochemistry*, **2002**, *59*, 99-104 ; cit. *In* Bermejo *et al.*, **2005**).

Communications

Communications associées à cette thèse

Article publié dans une revue internationale avec comité de lecture (1)

Bonneau N., Schmitz-Afonso I., Brunelle A., Touboul D., Champy P.* Method development for quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B.*, **2015**, *1004*, 46–52. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.09.039. (*facteur d'impact 2014 : 2,487).*

Articles en préparation – revues internationales avec comité de lecture (3)

Bonneau N., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Brunelle A., Champy P.* Quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat brain by UPLC-MS/MS. Soumis à *Toxicon*, **2015** (*short communication*) *(facteur d'impact 2014 : 2,492)*.

Bonneau N., Sénéjoux F., Bajin ba Ndob O., Baloul L., Champy P.* The fruit of *Annona squamosa* L. as a source of environmental neurotoxins: From quantification of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis. En préparation pour *Food Chemistry*. *(facteur d'impact 2014 : 3,391).*

Bonneau N., Cynober T., Jullian J.-C., Champy P.* Global quantification of Annonaceous acetogenins in fruits: ^{1}H qNMR routine technique and its application to soursop (*Annona muricata* L.). En préparation pour *Phytochemical Analysis (facteur d'impact 2014 : 2,341).*

Article publié dans une revue nationale sans comité de lecture (1)

Bonneau N., Le Ven J., Champy P.*****, *illustrations de* Gueguen J.-C. Toxines alimentaires et maladies neurodégénératives : le cas des Annonaceae. *La Phytothérapie Européenne*, **2012**, *67*, 24-28. (*référencement INIST, pas de facteur d'impact*).

Actes publiés dans une revue internationale avec comité de lecture

Bonneau N., Schmitz Afonso I., Touboul D., Brunelle A., Champy P.* Quantification of annonacin in Rat plasma: Application to pharmacokinetic study. *Planta Medica*, **2014**, *80*, 1518-1519 [P2Y19 : DOI: 10.1055/s-0034-1394993]. *Proceedings of 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Guimarães, Portugal, 31 août-4 septembre 2014.* [résumé de poster].

Bonneau N., Le Ven J., Schmitz-Afonso I., Guérineau V., Bajin ba Ndob I., Baloul L., Lewin G., Laprévote O., Brunelle A., Touboul D., Champy P.* Annonaceous acetogenins as environmental neurotoxins: Human exposure from edible *Annona* fruits. *Planta Medica*, **2012**, *78* [PH25 ; DOI: 10.1055/s-0032-1320684]. *Proceedings of ICNPR 2012 – 8th joint meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, New York, juillet-août 2012.* [résumé de poster].

Le Ven J., Schmitz-Afonso I., **Bonneau N.**, Cresteil T., Akagah B., Lewin G., Brunelle A., Touboul D., Champy P.* *In vitro* phase I metabolism and approach to the distribution of annonacin, a neurotoxic annonaceous acetogenin. *Planta Medica*, **2012**, *78* [PH26 ; DOI: 10.1055/s-0032-1320685]. *idem* [résumé de posters].

(facteur d'impact 2014 : 2,152)

Communications sous forme d'affiches

Congrès internationaux (5 dont 4 comme premier auteur), congrès national (1)

Bonneau N., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Brunelle A., Champy P. Quantitation of annonacin in Rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *2014 Phytochemical Society of Europe (PSE) Meeting "Phytochemicals in medicine and pharmacognosy" (Pietra-Neamt, Roumanie, avril 2014).*

Bonneau N., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Brunelle A., Champy P. Quantitation of annonacin in Rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *2013 Phytochemical Society of Europe (PSE) Xth Young scientists Meeting (Autriche, juillet 2013).*

Bonneau N., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Brunelle A., Champy P. Mise au point d'une méthode de dosage de l'annonacine dans le plasma de Rat. *Journées de l'École Doctorale « Innovation Thérapeutique, du Fondamental à l'Appliqué » (Châtenay-Malabry, mai 2013).*

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Titre : Acétogénines d'Annonaceae et parkinsonismes atypiques : de la biodisponibilité de l'annonacine à l'exposition alimentaire.

Mots clefs : acétogénines d'Annonaceae, annonacine, biodisponibilité, LC-MS/MS, parkinsonisme atypique, RMN quantitative.

Résumé : Une importante proportion de formes atypiques de parkinsonismes a été rapportée en Guadeloupe en 1999. Il ressort des études épidémiologiques menées sur place, que tous les patients atteints étaient de grands consommateurs de produits alimentaires et médicinaux de la famille des Annonaceae, et plus particulièrement du genre *Annona*. De nombreux genres appartenant à cette famille renferment des molécules fortement cytotoxiques : les acétogénines d'Annonaceae. Leur présence dans les fruits d'*Annona muricata* a déjà été mise en évidence. Cependant, peu de données existent sur leur teneur en acétogénines dans ces fruits ou dans ceux d'espèces proches. Par ailleurs, bien que l'annonacine, acétogénine principale d'*A. muricata* soit neurotoxique *in vivo*, aucune donnée quantitative de son accès au cerveau n'est disponible. Nous nous sommes donc attachés au cours de ce travail, à développer des méthodes de dosage de l'annonacine par LC-MS/MS dans le plasma et le cerveau de Rat pour déterminer sa biodisponibilité et la fraction à tropisme cérébral, dans le but de comprendre pourquoi des molécules si fortement cytotoxiques n'entraînaient pas d'intoxication aigue lors de l'exposition alimentaire. Nous avons par ailleurs développé une méthode de quantification des acétogénines totales par ^{1}H RMN dans des extraits bruts de fruits, appliquée à des lots d'*A. muricata* d'origines variées. Une méthode par LC-MS/MS a également été développée pour une description plus approfondie des acétogénines présentes dans des extraits bruts de fruits, appliquée à différents lots d'*A. squamosa*. Les fruits d'*A. reticulata* et d'*A. glabra* ont également fait l'objet d'investigations. Ces deux approches combinées ont contribué à améliorer l'estimation de l'exposition aux acétogénines dans le cadre de l'alimentation.

Title : Annonaceous acetogenins and atypical parkinsonism: from annonacin bioavailability to alimentary exposure.

Keywords : Annonaceous acetogenins, annonacin, bioavailability, LC-MS/MS, atypical parkinsonism, quantitative NMR.

Abstract : A high proportion of atypical parkinsonisms was reported in French West Indies in 1999. Epidemiological studies pointed out an association with the consumption of fruits and medicinal herbs from Annonaceae of the *Annona* genera. Numerous Annonaceae members contain Annonaceous acetogenins (AAGs), which are highly cytotoxic molecules. They were found in the pulp fruit of *Annona muricata*. However, scarce only quantitative exist for this fruit and those of related species. Moreover, although annonacin, the major AAG of *A. muricata* proved neurotoxic *in vivo*, no quantitative data is available towards its distribution to the brain. We therefore developed a method for annonacin quantitation in Rat plasma and brain homogenate, in order to determine its bioavailability and the fraction reaching the brain, to understand why those highly cytotoxic molecules are not responsible for acute toxicity when fruits are ingested. We then developed a quantitation method for global estimation of AAGs in crude fruit extracts by ^{1}H NMR, which we applied to the fruit pulp of *A. muricata* batches from diverse locations. An LC-MS/MS method was also developed for the qualitative study of AAGs. It was applied to different batches from *A. squamosa* fruits. The species *A. reticulata* and *A. glabra* were also examined. Those two approaches contributed in a better estimation of AAGs exposure by fruit consumption.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France