HAL
open science

Recherche des molécules antiparasitaires à l'interface de l'ethnopharmacologie, des sciences analytiques et de la biologie

Pedro Vasquez Ocmin

To cite this version:

Pedro Vasquez Ocmin. Recherche des molécules antiparasitaires à l'interface de l'ethnopharmacologie, des sciences analytiques et de la biologie. Chimie thérapeutique. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS479 . tel-02153075

HAL Id: tel-02153075

https://theses.hal.science/tel-02153075

Submitted on 12 Jun 2019

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

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

université PARIS-SACLAY

NNT : 2018SACLS479

Thèse de doctorat

UNIVERSITÉ PARIS SUD

Comprendre le monde, construire l'avenir

Recherche des molécules antiparasitaires à l'interface de l'ethnopharmacologie, des sciences analytiques et de la biologie

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à Nom de l'Université Paris Sud

École doctorale n°569 : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: Chimie Pharmaceutique

Thèse présentée par

Pedro Gilberto VASQUEZ OCMIN

Composition du Jury :

Mme. Joëlle Quetin-Leclercq Professeurs, Université catholique de Louvain	Rapporteur
Mme. Elisabeth Davioud-Charvet Directeur de Recherche, Centre National de Recherche Scientifique	Rapporteur
M. Philippe Loiseau Professeur, Université Paris Sud	Président
Mme. Sabrina Boutefnouchet Maître de Conférences, Université Paris Descartes	Examinateur
M. Michel Sauvain Directeur de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement	Invité
M. Bruno Figadère Directeur de Recherche, Centre National de Recherche Scientifique	Directeur de thèse
M. Alexandre Maciuk Maître de Conférences, Université Paris Sud	Co-Directeur de thèse

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

Remerciements

-Je tiens à remercier le Professeur **Joëlle Quetin-Leclercq** et le Docteur **Elisabeth Davioud-Charvet** pour avoir accepté d'être les rapportrices de ce travail ainsi que le Professeur **Philippe Loiseau** et les Docteurs **Sabrina Boutefnouchet** et **Michel Sauvain** pour avoir accepté d'évaluer ce travail en temps qu'examinateurs.

- Je tiens à remercier les institutions : ***Consejo de Ciencia y Tecnología*** *(CONCYTEC)* et ***Fondo de Ciencia y Tecnología*** *(FONDECYT)*, pour le financement obtenu pendant ces trois années de thèse.

-Je tiens remercie également à la **Fédération National des producteurs de Chanvre** (FNPC) pour le support financier pour ces 6 derniers mois de thèse.

-Ce projet de thèse a été encadré pour le Dr. **Alexandre Maciuk** et le **Dr. Bruno Figadère** et s'est déroulé dans l'Equipe de chimie de substances naturelles et antiparasitaires, BioCIS-UMR 8076, Faculté de Pharmacie – Université Paris Sud.

-Je tiens à remercier le Dr. **Bruno Figadère**, Directeur de Recherche de l'UMR-CNRS 8076, pour m'accueillir au sein du laboratoire BIOCIS et ses conseils comme directeur de cette thèse.

-Je remercie chaleureusement le Dr. **Alexandre Maciuk**, directeur de ma thèse, pour ses conseils et sa confiance, pour les heures passées à discuter sur ce projet (l'hème, LCMS, l'ethnopharmacologie, la RMN, etc…) et autres (la vie, la religion, le futur…). Tu m'as toujours donné beaucoup de liberté et aussi des responsabilités pendant ma thèse. Tu as toujours été intéressé et disponible malgré tes responsabilités croissantes. Je suis profondément touché par ta passion à vivre la paternité et l'amour que tu donnes à tes enfants.

-Le chemin depuis la 4ème année de Pharmacie jusqu'ici a été super long, donc je vais essayer de le résumer en quelques lignes envers les chercheurs qui m'ont beaucoup appris et je suis plus que reconnaissant. Tout d'abord, merci au Dr. **José Betancourt** (décédé en 2007) pour me faire découvrir la recherche et au Q.F. **Ernesto Nina** pour me faire découvrir la chimie des Substances Naturelles (pendant mes années à l'IMET-Iquitos). Merci au Dr. **Carmen Rosa Garcia** (IIIAP) pour sa gentillesse et pour me montrer sa vision sur la recherche qui continue de me marquer encore aujourd'hui. Merci au Dr. **Mohamed Haddad** (IRD) pour croire en mes capacités dans la recherche et pour m'avoir aidé à un moment précis. Merci au Dr. **Michel Sauvain** (IRD) pour m'accueillir au laboratoire à Lima et pour son support financier pendant et

après le master. Encore merci au Dr. **Michel Sauvain** et aussi au Professeur **Pierre Champy** (Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud) pour être les initiateurs de mon arrivée dans l'Equipe de chimie de substances naturelles à Châtenay-Malabry.

-Je tiens remercier encore le Dr. **Mohamed Haddad** et le Dr. **Michel Sauvain** pour leur aide et leurs conseils dans mes débuts dans la recherche. Vous êtes deux personnes grâce à qui de nombreux étudiants, dont je fais partis, ont eu l'opportunité de découvrir la chimie des substances naturelles.

-A **Bono**, pour les discutions, la musique, les bières et la couleur.

-Aux étudiants de l'équipe BIOCIS qui son passés et qui sont encore là, du 3ème étage (**Natacha**, **Alexander**, **Long**, **Elvis**, **Charlotte**, **Hazrina**, **Dibi**, **Aminata**), du 4ème (**Sigura**, **Lin**, **Xinming**, **Victor**) et du 5ème (**Anne-Cécile**, **Katia**, **Oumayma**). Je garderai toujours de bons souvenirs des choses vécues avec vous, comme les déjeuners au resto universitaire, quelques sorties hors du labo et surtout les mélanges de cultures.

-Je tiens remercier les permanents de l'équipe de BIOCIS: **Karine**, **Pierre** (x2), **Laurent** (x2), **Blandine**, **Guillaume**, **Christophe**, **Mehdi**, **Camille**, **Jocelyne**, **François**, **Erwan**.

-A **Karine Le Blanc** pour son support LCMS, c'était un vrai plaisir et très enrichissent de discuter avec toi, j'ai beaucoup appris.

-A **Blandine Séon-Méniel** pour être toujours si aimable et souriante dans le laboratoire. Merci aussi pour toutes les commandes des kilos de carboglace pour faire avancer mon projet.

-A **Laurent Evanno** pour ses blagues, ses *graphical abstracts* « inspirants» et son aide avec la RMN.

-A **Guillaume Bernadant** pour les multiples formations en bioinformatique malgré mes déficiences dans ce domaine.

-Aux personnels administratif de BIOCIS : **Agnès Rasneur** et **Nathalie Lemière**. Merci pour avoir fait tout votre possible pour prendre en charge mes missions de dernières minutes.

-A **Soulaf Suyyagh-Albouz** et **Sandrine Cojean** de l'Equipe "Chimiothérapie antiparasitaire", BIOCIS. Merci beaucoup pour les tests antiplasmodiaux et anti-leishmanioses, avec vous deux j'ai beaucoup appris sur la parasitologie en particuliers sur *Plasmodium*.

-A **Sergio Ortiz** et **Sabrina Boutefnouchet** du Laboratoire de Pharmacognosie (UMR CNRS 8638 COMETE) de l'Université Paris Descartes. C'était très enrichissant nos projets et les discussions sur les méthoxyflavones et ses liaisons à cette molécule « rare » appelé l'hème.

-A **Abdoulaye Sissoko** et **Romain Duval** de l'Unité MERIT-UMR IRD 216 de l'Université Paris Descartes. C'était un vrai plaisir travailler avec vous dans ce projet très enrichissent des sondes d'artémisinine.

-A **Jean-François Gallard** de l'Institut de Chimie de Substances Naturelles, Gif-Sur-Yvette. Merci pour toute sa disponibilité et sa gentillesse lors des analyses RMN de mes composés.

-A **Carlos Amasifuen** pour sa grande aide et sa connaissance sur la botanique des plantes péruviennes. Toujours disponible pour notre travail sur le terrain à Loreto.

-A **Elisabeth Mouray** et **Philippe Grellier** de l'Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes, UMR 7245, Muséum National d'Histoire Naturelle. Merci pour avoir accepté de tester mes produits sur des souches parasitaires ainsi que pour les tests cytotoxiques.

-A **Sébastian Pomel** et **Philipe Loiseau** de l'Equipe "Chimiothérapie antiparasitaire" BIOCIS. Merci pour les tests antileishmaniose et anti-trypanosoma.

-A **Audrey Solgadi** de la plateforme SAMM - Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites. Merci pour les très enrichissent discussions sur la spectrometrie de masse.

-Aux chercheurs de l'Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (Iquitos): **Elsa Rengifo**, **Billy Cabanillas**, **Kember Mejia**, **Gabriel Arana**, **Denis del Castillo**.

-Aux communautés de Métis ***El Dorado*** et ***13 de Febrero*** (route Iquitos-Nauta), et les communautés de ***Lupuna Zona II*** et ***Jenaro Herrera*** en l'**Amazonie Péruvienne**. Malgré le peu de considération de l'état envers ces communautés, la richesse de leurs connaissances traditionnelles reste intacte.

-A **Nixen Saavera** de la communauté *Jenaro Herrera* pour son aide dans la collecte des plantes médicinales.

-A **Agathe Martinez** et **Jean-Marc Nuzillard** de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims de l'Université de Reims Champagne-Ardenne. Merci pour leur aide lors de notre projet LCMS-RMN.

-Agradezco a mis amigos peruanos en Francia y España por los momentos de distracción y la amistad constante durante estos casi 4 años de tesis: ***Juan Pablo, André, Rubi, Lourdes, Jason Marcela*** *y* ***Giovanna****.*

*-Agradezco de todo corazón a mi familia (tíos, tías, primos, primas, etc.), en especial a mis padres (****Jorge*** *y* ***Martha****) y hermanos (****Carlos****,* ***Jorge****,* ***Chaín*** *et* ***Mery Consuelo****).*

*-A mi hermano **Chaín** porque a pesar que eres el menor has sabido crecer rápido y ponerte en la plaza de los mayores. Te tendré siempre una inmensa admiración y respeto por todo lo que haces por la familia.*

*-A mis padres y hermanos, ustedes fueron de una u otra manera un soporte moral desde mis años de estudios en la facultad hasta el término de este proyecto personal, los amo. Después de las innumerables veces que mi **padre** me preguntó lo mismo, cuando sustentas tu tesis hijo?, hoy puedo responderle: es hoy la sustentación de tesis papá!!!*

-Je tiens remercier affectueusement à mon autre famille, pour leur aide en France: **Jean-Claude**, **Michèle**, **Théo**, vous êtes des personnes formidables, je vous apprécie beaucoup.

-Je remercie vivement à la femme qui a changé ma vie, **Alice**. C'était avec ton support quand j'étais démoralisé, ta tendresse quand j'en avais besoin et tes paroles que tu m'as encouragé pendant cette thèse. J'admire ton esprit aventurier et ta passion pour la recherche. Je t'aime et j'espère pouvoir te rétribuer tout ton amour et ta patiente. *Como Julio Cortázar lo diría: "Andábamos sin buscarnos pero sabiendo que andábamos para encontrarnos"*.

A ma femme Alice

Table des matières

Remerciements 1

Introduction générale 13

Chapitre 1 : De l'ethnopharmacologie à l'isolement de produits naturels actifs 17

1. Des maladies négligées à l'ethnopharmacologie 18

1.1. La médicine traditionnelle et l'ethnopharmacologie 18

1.2. Apport de la médicine traditionnelle péruvienne 20

1.3. L'ethnopharmacologie des Métis 21

1.4. Les maladies tropicales négligées (MTN) 25

1.4.1. La leishmaniose 26

1.4.2. La trypanosomiase 27

1.5. Le paludisme 29

2. Article 1 : Activité antiprotozoaire de plantes médicinales utilisées par les communautés de la route Iquitos-Nauta dans la région Loreto (Pérou) 31

2.1. Résumé 31

2.2. Article 33

2.3. Commentaires et discussion 47

2.3.1. Contexte du travail 47

2.3.2. Enquêtes ethnopharmacologiques 47

2.3.3. Collecte des plantes 48

2.3.4. Résultats-Discussion 48

Chapitre 2 : Le paludisme et les interactions intermoléculaires par spectrométrie de masse 51

1 Le paludisme 53

1.1 Cycle du Plasmodium et vecteur du paludisme 53

1.2 La découverte de nouvelles molécules antiplasmodiales et antipaludiques 57

1.3 Molécules antipaludiques et mécanismes d'action 59

1.3.1 Dérivées de quinoléines : cibler l'hème 61

1.3.2 Antifolates : bloquer la voie des folates 61

1.3.3 Naphtoquinones et tétracyclines : cibler les fonctions mitochondriales 62

1.3.4 Artémisinine et dérivés : encore cibler l'hème 63

1.3.5 Candidats antipaludiques et cibles potentielles 64

1.4 La ferriprotoporphyrine IX (FPIX) comme cible 65

2 Interactions ou forces intermoléculaires 68

2.1 Interactions de Van der Waals 68

2.1.1 L'effet d'orientation (Interaction de Keesom) 70

2.1.2 L'effet d'induction (Interaction de Debye) 70

2.1.3 L'effet de dispersion (Interaction de London) 70

2.2 « Liaison » d'hydrogène 71

2.3 Interactions π-π (π-*stacking*) 72

3 La spectrométrie de masse comme moyen de détection des interactions intermoléculaires 73

4 Applications de l'analyse des interactions intermoléculaires par spectrométrie de masse 78

4.1 Application d'interactions hème-extrait : l'exemple de *Pentzia monodiana* (Asteraceae) 78

4.1.1 Taxonomie de *Pentzia monodiana* 78

Pentzia monodiana 78

4.1.2 Généralités sur le genre *Pentzia* : 78

4.1.3 Article 2 : liaison à l'hème des méthoxyflavones de *Pentzia monodiana* (Asteraceae) 81

4.1.3.1 Résumé 81

4.1.3.2 Article 82

4.1.3.3 Commentaires et discussions 87
4.2 Bio-activité de méthoxyflavones hémisynthétiques 88
4.2.1 Généralités et pertinence biologique des méthoxyflavones 88
4.2.2 Relation structure-activité de méthoxyflavones évaluées pour leru activité antiplasmodiale et leur liaison à l'hème. 92
4.2.2.1 Résumé 92
4.2.2.2 Proposition d'article (décrit ci-dessous « article 3 ») 93
4.2.2.3 Commentaires et discussions 128
4.3 Profilage de protéine selon l'activité (ABPP) 129
4.3.1 Sondes d'artémisinine 132
4.3.2 Développement d'une sonde fluorescente chimiquement stable mimant l'artéméther et l'artéether, pertinente du point vue mécanistique en conservant l'activité biologique et la spécificité. 135
4.3.2.1 Résumé 135
4.3.2.2 Proposition d'article (décrit ci-dessous « article 4 ») 136
4.3.2.3 Commentaires et discussions 176
Chapitre 3 : Développement et application d'une méthode de biodéréplication antiplasmodiale 181
1 Déréplication 183
1.1 Définition 183
1.2 Méthodes 184
1.2.1 La spectroscopie ultra-violette 184
1.2.2 Les couplages avec la spectrométrie de masse (SM) 185
1.2.2.1 CPG-SM 185
1.2.2.2 CLHP-SM^n 186
1.2.3 La résonance magnétique nucléaire 187
2 La biodéréplication 190

2.1 Définition 190

2.2 Méthodes 190

2.2.1 Bioautographie 190

2.2.2 Tests biologiques en ligne et récepteurs immobilisés 192

2.2.3 Tests en ligne découplés 193

3 Application de la biodéréplication avec le test de liaison à l'hème 195

3.1 *Piper coruscans* Kunt (Piperaceae) 195

3.1.1 Taxonomie et distribution 195

3.1.2 Utilisation traditionnelle contre le paludisme 197

3.2 Biodéréplication antiplasmodiale basée sur la liaison à l'hème, les réseaux moléculaires et la chromatographie de partage centrifuge. 198

3.2.1 Résumé 198

3.2.2 Proposition d'article (décrit ci-dessous « article 5 ») 199

3.2.3 Commentaires et discussions 264

3.2.4 Automatisation par réseaux moléculaires 264

3.2.5 Isolement ciblé par CPC 265

Conclusions finales et Perspectives 269

Bibliographie 271

ANNEXES 295

Tables des figures

Figure 1. Exemples de plantes médicinales originaires du Pérou utilisées dans le monde à travers le temps..... 21

Figure 2. Toile appartenant au vice-roi Amat du Pérou représentant une famille de père espagnol (Espanol sur la légende du tableau), mère amérindienne (Yndia serrana o cafeada) et leur enfant métis (mestizo) (1751-1800 ap. n. è.). 22

Figure 3. Cycle de vie du *Plasmodium sp*. 54

Figure 4. Image de microscopie électronique d'un érythrocyte infecté par *P. falciparum* à la phase schizonte contenant une vacuole digestive avec des cristaux d'hémozoïne. 55

Figure 5. Géographie, statut vectoriel, phylogénie moléculaire, orthologie et aliénabilité génomique chez les *Anopheles*. 57

Figure 6. Histoire de l'introduction des principaux médicaments antipaludiques et des premières apparitions de résistance. 58

Figure 7. Cibles et mécanismes d'action principaux des médicaments antipaludiques. 59

Figure 8. Représentation du mécanisme de cristallisation de l'hème en hémozoïne..... 67

Figure 9. Représentation des interactions de van der Walls, des plus fortes (polaire/polaire) aux plus faibles (apolaire/apolaire)..... 70

Figure 10. Représentation de la formation de la « liaison » hydrogène par un ligand avec un site de récepteur. 72

Figure 11. *Docking* de la molécule THPDTPI {(2'S,5'S)-tetrahydropyrazino[1',2':1,6]- di{2,3,4,9-tetra-hydro-1H-pyrido[3,4-b]indole}-1',4'-dione)} entre le double brin d'ADN..... 73

Figure 12. *Pentzia monodiana*. 80

Figure 13. Structure générale des méthoxyflavones. 88

Figure 14. Origine biosynthétique et types de flavonoïdes 89

Figure 15. Occurrence de (poly) méthoxyflavones dans les plantes terrestres 91

Figure 16. Représentation schématique des stratégies ABPP en une ou deux étapes.. 130

Figure 17. *Workflow* typique d'une expérience de profilage de protéine à base d'activité (ABPP).. 131

Figure 18. Mécanisme d'alkylation de l'hème après l'activation réductrice d'artémisinine. 133

Figure 19. Design logique de l'ART-ABPPs 134

Figure 20. Structure de base des alcaloïdes synthétiques dérivés du 3-(2'-aryl-*N*-methyl acetamido)indolin-2-ones. 179
Figure 21. *Workflow* général de déréplication par RMN. 189
Figure 22. Principe du test de bioautographie sur CCM. 191
Figure 23. Principe des réactions biologiques en ligne. 192
Figure 24. Configuration schématique de la détection en ligne découplée d'inhibiteurs d'enzyme 194
Figure 25. Arbuste de l'espèce *Piper coruscans* 196
Figure 26. Distribution et collectes de l'espèce *P. coruscans*. 196
Figure 27. Structures de la coruscanone A et B isolé de *P. coruscans*. 197

Table des tableaux

Tableau 1. Techniques par SM utilisées dans le processus de découverte de médicaments . 76
Tableau 2. Classification taxonomique de l'espèce *Pentzia monodiana* 78
Tableau 3. Classification taxonomique de l'espèce *Piper coruscans.* 195

Introduction générale

L'usage des plantes par l'Homme remonte à des temps immémoriaux. Il est fascinant d'imaginer comment les plantes ont eu de multiples utilisations dans l'histoire de l'Humanité, dans des endroits et époques différents. Les exemples sont nombreux : les traces de pollen de fleurs de plantes médicinales trouvés dans la grotte Néandertahl de Shanidar à Zagros en Irak (50 000 ans av. n. è.), les gravures et peintures rupestres dans la grotte Chauvet en Ardèche (37 000 ans av. n. è.), les restes de haricots, piments, pommes de terre natives cultivés par l'homme de *Guitarrero* à Anchash au Pérou (10 000 ans av. n. è.). Mais c'est encore plus fascinant de constater que ces plantes restent utilisées de nos jours.

Les plantes sont la base d'une médecine très ancienne, peu développée à ces époques reculées, mais très efficace. Les connaissances sur ces plantes ont été transmises par les anciens des peuples, de générations en générations puis inscrites dans des livres appelés « pharmacopées ». L'exemple le plus représentatif peut être l'ancienne «pharmacopée» chinoise (500 av. n. è.), utilisée encore de nos jours. La consécration de cette utilisation millénaire des plantes médicinales a été la validation de leurs usages avec l'isolement massif des principes actifs à l'origine de nombreux médicaments, en particulier au cours du siècle passé.

De nos jours, la médecine moderne est toujours soutenue par la découverte de nouveaux médicaments d'origine naturelle (plantes, microorganismes, animaux, organismes marins). Les produits d'origine naturelle, d'hémisynthèse ou inspirés par la nature représentent aujourd'hui environ 60 % du marché mondial des médicaments. Par conséquent, les travaux fondamentaux sur la chimie des substances naturelles sont un point fort pour la découverte de nouveaux produits actifs. Cependant, ces recherches sont de plus en plus compliquées car les autorités de chaque pays appliquent des normes de plus en plus strictes pour préserver leur connaissance et leur patrimoine biologique.

Concernant le but de ce travail, le choix de l'utilisation de plantes médicinales a été privilégié pour l'isolement des produits antiprotozoaires. La chimie des substances naturelles est un outil puissant mais doit naturellement être guidé par rapport à une cible biologique

spécifique. Choisir une cible biologique en rapport avec une maladie et l'adapter au travail chimique n'est pas simple, car il faut prendre en compte les relations complexes entre les systèmes, du gène jusqu'à la fonction. Par conséquent, les activités testées en chimie des substances naturelles ne sont la plupart du temps pas spécifiques mais généralistes. Devant la complexité des interactions entre la chimie et le vivant, les chimistes peuvent être tentés de se cantonner à leur objet d'étude et chercher alors davantage la « nouvelle molécule » sans prendre en compte l'activité biologique.

Les maladies parasitaires causées aux protozoaires ont toujours représenté des problèmes sanitaires majeurs, en particulier dans les pays tropicaux. Le paludisme, les leishmanioses et les trypanosomiases sont les principales maladies, responsables de nombreux cas d'infections et de morts chaque année en Afrique, en Asie et en Amérique. Par exemple en Amérique du Sud, notamment au Pérou, ces trois maladies sont un vrai défi pour les Ministères de la Santé. La forte prévalence des infections à protozoaires s'explique par la géographie et le climat de ces pays. Par exemple parmi tous les cas reportés de paludisme au Pérou au cours des 10 dernières années, 79% ont été reportés dans le département de Loreto, situé au cœur de l'Amazonie péruvienne.

Les travaux collaboratifs entre deux groupes de Pharmacognosie de l'Université Paris-Sud et Paris-Descartes, avec des groupes de biologistes de l'IIAP (*Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana*, Pérou) ainsi que l'unité MERIT de l'IRD, ont permis de développer ce travail de thèse.

Ce travail est divisé en trois chapitres :

- Un premier chapitre où nous contribuons à la valorisation du savoir traditionnel amazonien avec une liste de plantes médicinales péruviennes utilisées contre les maladies à protozoaires. Cette liste a été obtenue à base d'enquêtes ethnopharmacologiques réalisées dans deux communautés de Métis.

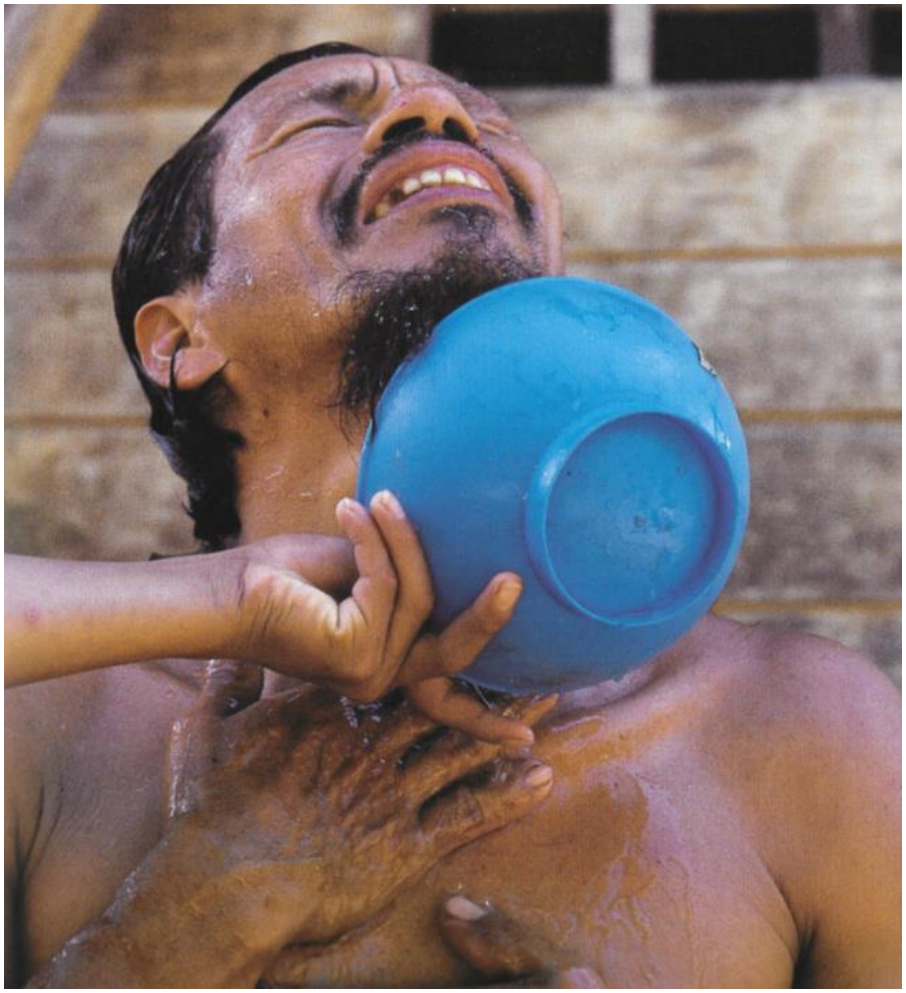
- Un deuxième chapitre où nous mettons en évidence des interactions intermoléculaires non-covalentes par spectrométrie de masse dans le but de comprendre l'activité biologique antiplasmodiale des produits testés.

- Un troisième chapitre où nous développons une méthodologie de biodéréplication biomimétique antiplasmodiale par spectrométrie de masse, en imitant l'environnement de la vacuole digestive parasitaire de *Plasmodium falciparum*.

La présentation des travaux est donnée sous la forme de l'article publié le cas échéant, ou dans un format correspondant à la revue à laquelle l'article sera soumis.

L'ensemble de ces trois chapitres nous a menés à l'interface de l'ethnopharmacologie, de la chimie analytique et de la biologie. Les résultats ont été mis en évidence avec l'obtention d'un *workflow* de biodéréplication qui peut être utilisé pour l'obtention de produits naturels antiplasmodiaux.

Chapitre 1 : De l'ethnopharmacologie à l'isolement de produits naturels actifs



Utilisation d'une espèce de la famille Piperaceae comme bain de curation pour traiter les fièvres au village de Milagro au Pérou. Photo prise par Swerdlow et Johnson, 2000.

1. Des maladies négligées à l'ethnopharmacologie

1.1. La médicine traditionnelle et l'ethnopharmacologie

Historiquement, les plantes ont été utilisées par l'homme pour se soigner. Ce savoir, malgré ses limites, a parfois été transcrit dans des manuels appelées « pharmacopées » pour le garder et le préserver, c'est ainsi que l'ethnopharmacologie est née. La Société Française d'Ethnopharmacologie la définit de la manière suivante: « c'est l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale, et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, mises en œuvre par les cultures traditionnelles pour modifier l'état des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques ». (SFE, 2018). Au-delà de la consignation par écrit de ces savoirs traditionnels, l'ethnopharmacologie peut contribuer à la préservation de la biodiversité. En dévoilant le potentiel thérapeutique de certaines espèces qui seraient menacées, leur protection prend alors un aspect plus impératif. Par ailleurs l'étude pharmaceutique (composition chimique et activité pharmacologique) peut être la source de nouvelles molécules thérapeutiques (Heinrich et al., 2006; Laird, 2002). Cependant cette approche qui semble à première vue purement scientifique peut avoir des conséquences négatives. En effet, si un savoir traditionnel, par définition immatériel, devient un bien marchand (brevet, médicament…), la question d'une juste rétribution de chacun des partenaires impliqués se pose : comment rétribuer le détenteur du savoir initial, le chercheur qui identifie la molécule d'intérêt et son mécanisme d'action, l'industrie qui fabrique le médicament ? Plusieurs contentieux retentissants ont émergé dans les 30 dernières années. La prise de conscience de ce risque d'injustice a conduit à des efforts de partenariats localisés (ex. les groupes ICBG dans les années 90) ou des conventions internationales (Convention de Rio en 1992, de Nagoya en 2014…). Mais un encadrement strict de la recherche sur la biodiversité peut avoir comme effet de dissuader les chercheurs ou l'industrie de baser leurs travaux sur les savoirs traditionnels, et donc de limiter les effets bénéfiques de l'ethnopharmacologie.

L'utilisation des plantes médicinales n'est cependant pas que le fait de populations indigènes rurales de culture traditionnelle. L'attrait des médecines alternatives, et notamment la phyto-aromathérapie, est une tendance forte dans la société moderne occidentale. Cependant, cet usage se limite à quelques plantes d'usage certes traditionnel, mais très bien connues et pour des indications en général mineures. Les études ethnopharmacologiques les

plus intéressantes sont celles qui portent sur des usages originaux de plantes peu étudiées, et ce pour des maladies graves. Le choix des populations-cibles doit prendre en compte cet aspect. Un critère important est l'interaction avec la biodiversité, impliquant notamment un lieu de vie proche de la nature. Un deuxième critère peut être le recours à la biodiversité imposé par des ressources économiques faibles. Dans des pays en voie de développement, la médecine traditionnelle est souvent le seul traitement accessible et abordable disponible, particulièrement pour les populations rurales. Parmi ce type de population, le degré de connaissance médicale peut être très varié, selon qu'elles ont une connexion avec les systèmes de santé modernes ou non. Quel que soit le système de représentation des maladies, qu'il soit traditionnel (basé sur les religions, les mythologies, les éléments…) ou empreint de notions de médecine moderne, l'exploration des usages des plantes peut révéler des pratiques spécifiques très pertinentes.

Le Pérou est un pays riche en biodiversité. Deux « points chauds » (*Hotspot*) traversent son territoire : celui des Andes Tropicales; et celui de la zone de mangrove côtière avec sa forte endémicité (soit plus de 1500 espèces propre à cette zone qui s'étale sur le Panama, la Colombie, l'Équateur et le Pérou) (Mittermeier et al., 2002). La forêt amazonienne est considérée comme une aire biogéographique particulièrement riche en espèces. Dix pour cent de la flore mondiale se trouve sur le territoire péruvien, principalement en Amazonie (De-la-Cruz et al., 2007). La richesse botanique du Pérou se reflète dans la diversité d'utilisations des plantes: environ 5000 espèces de plantes sont utilisées par la population péruvienne pour l'alimentation, la médecine, comme des ornements, pour la construction, le fourrage, les teintures, comme toxines ou bois de chauffage, entre autres. Une grande proportion des communautés rurales dépend majoritairement des plantes pour leur subsistance (Monigatti et al., 2013). Parmi toutes ces espèces, 1 400 espèces sont décrites comme médicinales (Bussmann and Douglas, 2014). Cependant le rapport entre le nombre d'espèces présentes et les usages médicinaux décrits est vraisemblablement très faible. Par conséquent, les enquêtes ethnopharmacologiques constituent un moyen important de recensement et de préservation. Bien que la plupart des recherches sur l'ethnopharmacologie et la médicine traditionnelle au Pérou sont menées en Amazonie (Estevez et al., 2007; Kvist et al., 2006; Odonne et al., 2013, 2011; Rengifo, 2007), la proportion de travaux de recherche existant par rapport à la biodiversité amazonienne est faible. Des institutions péruviennes sont conscientes de cet état de fait et s'emploient à recenser les usages ethnomédicinaux.

1.2. Apport de la médicine traditionnelle péruvienne

Le continent américain a existé pendant des millions d'années à l'écart de l'évolution humaine. Selon la théorie de l'anthropologue Alex Hrdlicka (publié en 1937), cela ne fait qu'environ 40 000 ans que les hommes sont arrivés en provenance de l'Asie en passant par le détroit de Behring. Les peintures rupestres de *Toquepala* (9 600 av. n. è., située actuellement près de la ville de Tacna) et *Lauricocha* (9600 av. n. è., actuellement Huánuco), sont les premiers indices d'une ancienne civilisation de chasseurs-cueilleurs sur le territoire péruvien. D'autre part, l'interaction avec les plantes est mise en évidence grâce à l'homme de *Guitarrero* (zone d'Ancash, 10 000 av. n. è.), connu comme le premier agriculteur de haricots, piments, pommes de terre natives du Pérou (*ollucos*) et maïs de l'époque pré-Inca (Tamayo Herrera, 2013).

La culture des anciennes civilisations précolombiennes d'Amérique du Sud est guidée par la Terre (*pachamama*) et le Soleil (*inti*). L'interprétation des maladies à cette époque (à partir de 3000 av. n. è.) est liée à ces deux entités. Des traces de trépanations réalisées par les guérisseurs et chirurgiens pré-Inca, membres de la culture *Paracas* (800 av. n. è. - 200 ap. n. è.) (Marino and Gonzales-Portillo, 2000) témoignent de l'avancement de la médecine à cette époque (Kushner et al., 2018). Des céramiques *Moche* (100 - 700 ap. n. è.) montrent la relation de ces peuples avec des maladies parasitaire endémiques de l'Amérique du sud, notamment la leishmaniose cutanée (Altamirano-Enciso et al., 2003; Tuon et al., 2008; Weiss, 1943). Malheureusement il n'existe pas de transcription de l'utilisation des plantes pour le traitement.

Certaines des plantes utilisées par ces civilisations ont traversé les siècles et font encore partie des plantes médicinales actuelles. Des composés ont pu en être isolés et sont utilisé comme principes actifs des certaines spécialités pharmaceutiques (**Figure 1**). Nous présentons ici trois exemples. Tout d'abord, peut-être le plus connu, les différentes espèces de *Cinchona* (Rubiaceae), utilisées par les indigènes du Pérou pour soigner les maladies liées au froid et à l'humidité. En observant ces usages au XVIIème siècle, les jésuites ont eu l'idée d'utiliser la poudre d'écorce macérée dans l'eau pour traiter les fièvres (poudre des jésuites). En 1820, Pelletier et Caventou isolent la quinine, ouvrant ainsi la voie à l'isolement d'autres alcaloïdes (Bruneton, 2016). L'usage de la *coca*, *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae), est bien antérieur à l'empire inca (du XVe au XVIe siècle). Les feuilles étaient traditionnellement

mâchées pour abolir la faim et la fatigue. Les Incas lui attribuèrent une origine divine et en réservèrent l'usage aux cérémonies religieuses. La coca n'avait aucune application thérapeutique avant l'isolement, en 1859, de la cocaïne et son utilisation postérieure comme anesthésique local (Bruneton, 2016). Enfin, le baumier du Pérou, *Myroxylon balsamun* (Fabaceae), utilisé traditionnellement comme cicatrisant, est capable de créer un environnement cellulaire favorable au processus de réparation des tissus (Bruneton, 2016; Lock et al., 2016).

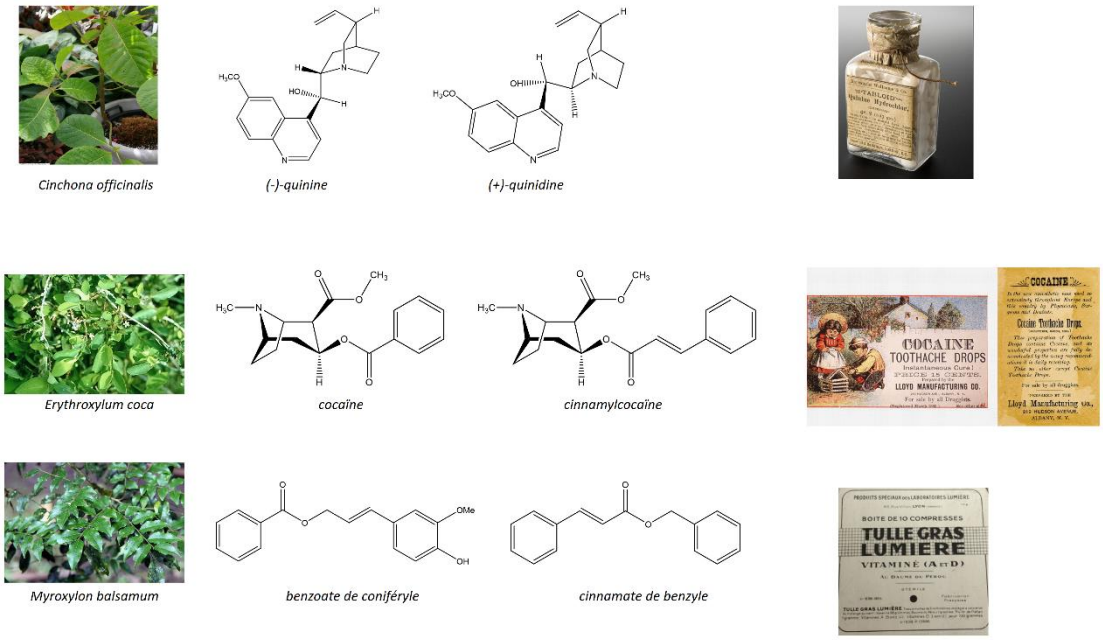


Figure 1. Exemples de plantes médicinales originaires du Pérou utilisées dans le monde à travers le temps.

1.3. L'ethnopharmacologie des Métis

Les termes métis, sang-mêlé, mulâtre, homme de couleur et libre de couleur sont chargés d'une histoire très spécifique. Ils portent le poids de la colonisation, de l'esclavage et de la discrimination depuis 5 siècles, en Afrique et aux Amériques essentiellement. Cependant il existe aussi des représentations d'individus décrits comme métis dans l'art romain, témoignant du besoin de distinguer ces personnes du reste de la population (Schmidt, 2003). Dans un contexte géographique amérindien et au XVIe s., le Métis désigne une personne née de l'union d'un européen et d'une amérindienne. Ce sens témoigne de la colonisation

essentiellement masculine des Amériques et du rapport de domination patriarcal caractéristique de la plupart des cultures humaines historiques (Tamayo Herrera, 2013), comme cela est rapporté par plusieurs toiles espagnoles datant de la colonisation (**Figure 2**).

Figure 2. Toile appartenant au vice-roi Amat du Pérou représentant une famille de père espagnol (Espanol sur la légende du tableau), mère amérindienne (Yndia serrana o cafeada) et leur enfant métis (mestizo) (1751-1800 ap. n. è.). (Source : Museo Nacional de Antropología.de Madrid).

Le concept même de métissage est complexe, comme en témoigne la nomenclature péruvienne pour les unions mixtes à l'époque de la colonisation. De nos jours, les péruviens adoptent toujours certains de ces termes pour désigner des groupes de personnes, même si le sens contemporain s'écarte du sens historique. Ces termes portent souvent une connotation péjorative : *mulato* (mulâtre, un parent blanc, l'autre noir), *cholo* (un parent métis, l'autre indien), *chino* (un parent métis, l'autre asiatique) et *zambo* (un parent indien, l'autre noir) (Mömer, 1971). Le sens du terme *mestizo* (métis) a changé au cours du temps, et désigne aujourd'hui un concept anthropologique moins strict que son sens historique. L'enquête ethnopharmacologique décrite dans le présent travail portant sur les usages de communautés décrites comme « Mestizos ». Il nous a donc semblé important d'approfondir ce que ce terme désigne dans l'inconscient collectif péruvien contemporain. Les *mestizos* sont définis comme un groupe de personnes aux origines mixtes, nées de l'union d'un parent urbanisé et d'un parent indigène. Les ethnies indigènes proches de la ville d'Iquitos sont les

Bora ou *Yagua*. Les populations *mestizos* sont en général marquées par une mobilité géographique importante. Une des causes principales de migration est le départ de la jungle vers la ville pour trouver du travail. En parallèle avec une remise en cause de leur identité culturelle, les migrations peuvent néanmoins enrichir la connaissance traditionnelle dans ces communautés. Les *mestizos* amazoniens ont un grand dépôt de connaissances traditionnelles qui peut provenir de cultures indigènes éteintes ou en danger (Phillips and Gentry, 1993). Il existe notamment une forte tradition de *curanderismo* parmi les *mestizos*. Le *curanderismo* désigne un ensemble de croyances essentiellement d'ordre surnaturel ou magique (Jovel et al., 1996). Il inclut des pratiques de guérison impliquant les esprits de la forêt ou *supay* (diable ou dieu de la mort en langue quechua) (Luna and Amaringo, 1991). Les mêmes forces peuvent être invoquées à des fins malveillantes et s'apparente à la sorcellerie. Dans ce contexte, certaines plantes « magiques » permettent aux *curanderos,* ou guérisseurs (aussi appelé *chaman*), d'entrer en communication directement avec des êtres puissants pour traiter des troubles considérés comme surnaturels. En Amazonie péruvienne, la connaissance des plantes médicinales est fortement liée à l'utilisation de l'*ayahuasca* (liane des morts, liane amère) (Desmarchelier et al., 1996). Ce breuvage se prépare à partir de tronçons de *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb) Morton (Malpighiaceae), une liane à petites fleurs qui grandit dans la forêt, associée à d'autres plantes dans un breuvage bu lors de cérémonies rituelles. À cause de la présence dans l'écorce d'alcaloïdes dérivés de la β-carboline tels que l'harmine, la tétrahydroharmine, l'harmaline, l'harmol, etc (Bruneton, 2016), le *chaman* entre en transe et revendique d'apprendre l'art de guérir le malade en utilisant les plantes de la forêt. L'existence de *curanderos* dans les villages *mestizos* est un signe de leur attachement aux traditions indigènes.

Néanmoins un ensemble de plantes médicinales usuelles sont utilisées par la population en dehors de ce cadre pour traiter des maladies perçues par la population comme relevant de la médecine. Quelques enquêtes existent sur la médecine traditionnelle et les pratiques de santé des *mestizos* (Kamppinen, 1988; Luna, 1984). La plupart des groupes ethniques qui ont vécu en Amazonie péruvienne depuis des siècles (*Shipibo-Konibo, Ashaninka*, *Cashibo-Cacataibo*, *Amuesha*, *Matsiguenka…)* ont développé une connaissance profonde des écosystèmes qu'ils habitent (Salick, 1989; Wezel and Ohl, 2005) (Lenaerts, 2006). Ils ont utilisé des plantes médicinales ou alimentaires pendant des millénaires, et ont transmis cette expérience d'une génération à l'autre (Lewis, 2000). Néanmoins, les peuples indigènes

ne sont pas les seuls à avoir une connaissance détaillée des écosystèmes amazoniens dans lesquels ils vivent. Les résidents à long-terme de l'Amazonie, comme par exemple, les *mestizos* l’ont également (Dufour, 1990). La plupart des communautés *mestizos* sont dépendantes de la médecine traditionnelle comme seule source de soins de santé, par tradition mais aussi en raison de l’accessibilité (prix et accès physique) plus grande de ces remèdes par rapport aux thérapies occidentales.

Il reste que la connaissance des plantes médicinales est en rapport avec la proximité de ces plantes des habitations humaines : les individus favorisent les plantes qui poussent dans leur voisinage immédiat (Kujawska and Pardo-de-Santayana, 2015). En conséquence, la médecine traditionnelle des *mestizos* varie selon leur zone géographique : les plantes utilisées par les *mestizos* de Cuzco (Andes péruvienne) sont différentes de celles des *mestizos* d’Iquitos (forêt Amazonienne) ou la côte (Cabieses, 1993).

1.4. Les maladies tropicales négligées (MTN)

Les maladies tropicales négligées (MTN) sont définies comme un groupe de maladies prévalant dans des conditions tropicales et subtropicales concernant 149 pays (WHO, 2017a). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou *World Health Organization*) recense 17 MTN : l'ulcère de Buruli, la maladie de Chagas, la dengue, le chikungunya, la dracunculose (maladie du ver de Guinée), l'échinococcose, les trématodoses d'origine alimentaire, la trypanosomiose humaine africaine, les leishmanioses, la maladie de Hansen (la lèpre), la filariose lymphatique, l'onchocercose (cécité des rivières), la rage, la schistosomiose (bilharziose), les géohelminthioses, le téniasis (cysticercose), le trachome et les tréponématoses endémiques (le Pian). Lors de la 10ème réunion du Groupe Consultatif Stratégique et Technique pour les Maladies Tropicales Négligées en 2017, des propositions ont été faites pour compléter la liste des MTN, comme les maladies par chromoblastomycose et d'autres mycoses profondes, la gale et autres ectoparasites ainsi que les empoisonnements liés à des morsure de serpent (WHO, 2017a). Les MTN affectent plus d'un milliard de personnes et leur coût, évalué à plusieurs milliards de dollars chaque année, impacte principalement les pays en voie de développement (Hotez et al., 2014). Il est fréquent que les individus touchés par les MTN soient infectés par plusieurs pathogènes, ce qui détériore leur développement physique et cognitif et provoque environ 534 000 morts par an (Aerts et al., 2017). Les personnes vivant dans la pauvreté, dans des conditions sanitaires précaires et en contact proche avec les vecteurs infectieux, les animaux domestiques et le bétail sont les plus touchés. Les moyens de lutte sont guidés par l'épidémiologie locale et la possibilité de recourir à des mesures appropriées pour détecter, empêcher et contrôler ces maladies. Le contrôle de ces maladies est efficace quand les approches de santé publique sont combinées et mises en œuvre localement. Les parasites, responsables de plus de 70 % de toutes les MTN (le reste étant causé par les infections bactériennes et virales), incluent aussi bien des protozoaires que des helminthes.

Dans ce premier chapitre nous sommes intéressés en particulier à la leishmaniose et la trypanosomiase. *Leishmania spp.*, responsables de la leishmaniose, *Trypanosoma cruzi* et *T. brucei*, responsables des trypanosomiases, sont des parasites protozoaires de la famille des Kinetoplastidae, transmis aux hôtes mammifères via leurs insectes vecteurs : la mouche des

sables « *sandflies* » (genres *Phlebotomus* et *Lutzomyia*), le triatome (comme le *Triatoma infestans*), et la mouche tsé-tsé (*Glossina spp.*), respectivement (McCall and McKerrow, 2014).

1.4.1. La leishmaniose

Il existe plusieurs formes de leishmanioses chez l'homme : cutanée (LC), cutanéo-muqueuse (LCM) et viscérale (LV), présentant un large éventail de symptômes cliniques (Pearson and Sousa, 1996). Les manifestations cliniques de la leishmaniose sont la fièvre, l'anémie, l'hépatosplénomégalie et une immunodépression (Savoia, 2015). La forme la plus commune est la leishmaniose cutanée (causée par *L. major* et *L. tropica* en Asie centrale et au Moyen-Orient et par le complexe *L. braziliensis* et *L. mexicana* dans les Amériques), qui cause des plaies de la peau qui se développent typiquement en quelques semaines ou mois à l'endroit d'une piqûre de mouche de sable. Les plaies peuvent changer de taille et d'apparence au fil du temps. Elles peuvent débuter sous forme de papules ou des nodules et se transformer en ulcères (comme un volcan, avec un bord levé et un cratère central). Les ulcères de peau peuvent être recouverts par une croûte (CDC, 2013). La LV, aussi connue sous le nom de *kala-azar* est plus grave, car mortelle est causée par *L. infantum*, *L. chagasi* et *L. donovani* (Savoia, 2015).

La leishmaniose, considérée comme maladie orpheline par l'OMS, est endémique dans plus de 98 pays des zones tropicale ou subtropicale et dans le sud de l'Europe. Cette maladie menace actuellement 350 millions d'individus, adultes et enfants, dans le monde entier (de Vries et al., 2015) et le nombre de nouveaux cas par an n'est pas connu avec certitude. Pour la leishmaniose cutanée, l'incidence est estimée à 0,7-1,2 millions de nouveaux cas par an. Pour la leishmaniose viscérale, l'incidence est d'environ 0,2 à 0,4 millions/an (CDC, 2013). La majorité des cas de leishmaniose cutanée est recensée en Algérie, Syrie, Iran, Arabie Saoudite, Afghanistan, Pakistan, Colombie, Brésil, Pérou. Près de 90 % des cas de leishmaniose cutanéo-muqueuse sont observés en Bolivie, au Brésil et au Pérou (WHO, 2018a). Au Pérou, 91 000 cas ont été dénombrés en 10 ans (2005-2016), principalement des leishmanioses cutanées (Ministerio de Salud del Perú, 2017a, 2015).

La chimiothérapie est la stratégie clé pour contrôler la leishmaniose. Les quelques médicaments actuellement sur le marché sont les antimoniés pentavalents (Sn^{5+}), l'amphotéricine B, la miltefosine, la paromomycine et l'amphotéricine B sous forme de

liposome. Ces médicaments ont tous des avantages et des inconvénients. La toxicité, le coût, la voie d'injection, la durée du traitement ainsi que l'apparition de parasites résistants au traitement sont à l'origine d'un nombre important d'échecs thérapeutiques (Chakravarty and Sundar, 2010; Didwania et al., 2017; Ghorbani and Farhoudi, 2018). Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin contre la leishmaniose mais des recherches sont en cours.

1.4.2. La trypanosomiase

La trypanosomiase humaine africaine (THA) ou la maladie du sommeil est une maladie mortelle de l'Afrique subsaharienne, causée par deux sous-espèces de *Trypanosoma brucei* (*T.b*) (Büscher et al., 2017) : *T.b. gambiense* (*T.b.g*) est endémique dans 24 pays d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale. Cette forme représente actuellement plus de 97% des cas de maladie du sommeil et provoque une infection chronique (WHO, 2017b). La deuxième sous-espèce, *T.b. rhodesiense* (*T.b.r*), se trouve dans 13 pays d'Afrique orientale et australe (Büscher et al., 2017; WHO, 2017b). Aujourd'hui, cette forme représente moins de 3% des cas et provoque une infection aiguë. Les deux sous-espèces de parasite sont transmises par la piqûre d'une mouche tsé-tsé infectée (Diptère genre *Glossina*). *T.b. gambiense* peut aussi être transmis à la naissance (Lindner and Priotto, 2010). D'autres modes de transmission sont possibles (sexuels, accidents de laboratoire, transfusion sanguine et transplantation d'organe), mais ils sont peu documentés et supposés très rares (Hira and Husein, 1979; Rocha et al., 2004).

Les manifestations cliniques varient selon la sous-espèce et le stade de la maladie. Les symptômes du stade hémolymphatique sont non spécifiques et incluent fièvre, maux de tête et gonflement des ganglions lymphatiques. Dans la seconde phase, dite méningo-encéphalique, le trypomastigote passe du sang et du système lymphatique au système nerveux central (Büscher et al., 2017). Par le passé, les épidémies de maladie du sommeil ont été un problème de santé publique majeur, mais la maladie est relativement sous contrôle à présent, avec 7000 à 10000 cas rapportés annuellement ces dernières années (CDC, 2012).

La maladie de Chagas (trypanosomiase américaine) est endémique dans 18 pays latino-américains. C'est une pathologie progressive chronique qui affecte plus de 6 à 8 millions de personnes dans le monde entier, avec environ 12 000 morts annuellement (DNDi, 2017). Cette maladie est causée par le protozoaire *Trypanosoma cruzi* et sa transmission est due

principalement à l’infestation du site de piqûre d’un triatome par les déjections de l’insecte. Le parasite peut être également transmis lors d’accidents de laboratoire, par l'ingestion de nourriture et de boissons contaminées avec les excréments ou le triatome entier infecté par le parasite, lors de transfusions sanguines, ou de manière congénitale (ces deux dernières voies de transmissions sont cependant en déclin grâce à des mesures de santé publique adoptées par les pays endémiques) (Chatelain, 2014). Jusqu’à 30% des personnes infectées de façon chronique présentent des troubles cardiaques, et jusqu’à 10% des troubles digestifs, neurologiques ou les deux à la fois, ce qui impose un traitement particulier. La lutte antivectorielle est la méthode la plus efficace pour prévenir la maladie de Chagas en Amérique latine. Pour éliminer le parasite après infection, le patient peut être traité par benznidazole ou nifurtimox. Ces deux médicaments sont efficaces à près de 100% et permettent de guérir la maladie s’ils sont administrés suffisamment tôt après l’infection, dès le début de la phase aiguë. Leur efficacité diminue toutefois avec l’ancienneté de l’infection. Le coût du traitement reste élevé. Rien que pour la Colombie, au cours de l’année 2008, on a estimé à environ 267 millions de dollars le coût des soins médicaux dispensés aux personnes atteintes. Les pulvérisations d’insecticide pour la lutte antivectorielle reviendrait à près de 5 millions par an, soit moins de 2% des dépenses médicales (WHO, 2017c). Au Pérou, la maladie de Chagas est moins prévalente avec seulement 45 cas entre les années 2016 et 2017, cependant ces cas sont constamment sous surveillance épidémiologique (Ministerio de Salud del Perú, 2017b). Néanmoins ce chiffre est peut-être sous-estimé du fait d’une absence de diagnostic ou d’une absence de consultation par le patient.

1.5. Le paludisme

Le paludisme n'est pas classé par l'OMS comme une MTN, cependant rien qu'en 2016, environ 216 millions de cas de paludisme ont été recensés dans le monde et 445 000 personnes sont mortes, surtout des enfants en Afrique (CDC, 2018). Le paludisme est transmis par des moustiques femelles appartenant au genre *Anopheles*. Quatre espèces différentes du parasite *Plasmodium* sont responsable du paludisme chez l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Parmi elles, *P. falciparum* et *P. vivax* ont la plus forte prévalence tandis que *P. falciparum* est la plus dangereuse. *P. knowlesi* est une espèce zoonotique qui peut également infester l'homme (WHO, 2015). Le cycle biologique du paludisme sera abordé plus en détail dans le chapitre suivant.

Les manifestations cliniques de *P. falciparum* résultent notamment de l'hémolyse de globules rouges lors de la sortie du parasite, suivi par une réponse inflammatoire aiguë liée à l'élimination des parasites par l'organisme (Ademolue and Awandare, 2018). L'objectif premier du traitement est d'obtenir une guérison complète, c'est-à-dire l'élimination rapide et totale de *Plasmodium* dans le sang du patient, pour éviter l'évolution vers une forme grave potentiellement mortelle ou vers une infection chronique provoquant une anémie. Le paludisme est une maladie évitable et traitable. Du point de vue de la santé publique, le traitement est destiné à réduire la transmission de l'infection en diminuant le réservoir infectieux, et à éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques (WHO, 2018b). Les polythérapies à base d'artémisinine ont un rôle important dans le succès de la lutte contre le paludisme au niveau mondial, et protéger leur efficacité de traitement est une priorité en matière de santé (WHO, 2017d). Un vaccin (Mosquirix, GSK) vient d'être mis sur le marché, basé sur des protéines recombinantes de *P. falciparum*.

La plupart des cas de paludisme en 2016 étaient localisés en Afrique (90 %), suivi par l'Asie du Sud-Est (7 %) et la région méditerranéenne orientale (2 %). *P. falciparum* est l'espèce la plus répandue en Afrique subsaharienne, représentant 99 % de cas évalués en 2016. *P. vivax* est le parasite prédominant dans la région des Amériques, représentant 64 % des cas (WHO, 2017d). Concernant le paludisme au Pérou, on constate depuis 2012 une tendance à l'augmentation du nombre des cas. Pour l'année 2016, 51 090 cas de paludisme (*P. falciparum* et *P. vivax*) ont été reportés. Parmi tous les départements du Pérou, Loreto représentait 96 % des cas reportés (49 463 : 35509 par *P. vivax* et 13954 par *P. falciparum*) (Ministerio de Salud

del Perú, 2016a). Entre 2004 et 2016 le Ministère de la Santé a reporté 620 000 cas de paludisme dans le pays, dont 79.5 % pour Loreto (Ministerio de Salud del Perú, 2016b).

2. Article 1 : Activité antiprotozoaire de plantes médicinales utilisées par les communautés de la route Iquitos-Nauta dans la région Loreto (Pérou)

Article publié dans *Journal of Ethnopharmacology*

2.1. Résumé

Pertinence ethnopharmacologique : En Amazonie péruvienne, l'utilisation de plantes médicinales est une pratique courante. Cependant, il y a peu d'informations documentées sur l'aspect pratique de leurs utilisations et sur leur validation scientifique. Le point de départ pour ce travail est un ensemble d'enquêtes concernant l'utilisation des plantes et réalisées sur des personnes habitant dans des communautés rurales de l'Amazonie péruvienne. Les parasitoses à protozoaires sont un problème de santé publique dans les communautés amazoniennes, qui y font en partie face en utilisant des remèdes traditionnels. La validation de ces pratiques traditionnelles contribue à l'efficacité des soins de santé publique et peut aider à identifier des nouveaux composés antiparasitaires.

Buts de l'étude : Inventorier et valider l'utilisation de plantes médicinales par les populations rurales de la région Loreto (Pérou).

Méthode : Des Métis ruraux ont été interrogés concernant leur utilisation de médicaments traditionnels à base de plantes médicinales pour les infections parasitaires. Les enquêtes ethnopharmacologiques ont été réalisées dans deux villages sur la route Iquitos-Nauta (Région Loreto, Pérou), les communautés *13 de Febrero* et *El Dorado*. Quarante-six plantes ont été recensées et récoltées selon leur utilisation traditionnelle pour le traitement des maladies parasitaires, 50 extraits éthanoliques (des parties différentes pour certaines plantes) ont été testés *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* (souches 3D7 chloroquino-sensible et W2 chloroquino-résistante), *Leishmania donovani* souche LV9 et *Trypanosoma brucei gambiense*. L'évaluation cytotoxique (cellules HUVEC) des extraits actifs a été aussi réalisée. Deux des plantes les plus actives ont été soumises à un fractionnement bioguidé préliminaire pour vérifier et explorer leurs activités.

Résultats : De la liste initiale de plantes, 10 extraits se sont révélé être actifs sur *P. falciparum*, 15 sur *L. donovani* et 2 sur les trois parasites. L'extrait éthanolique des feuilles de *Costus curvibracteatus* (Costaceae) et des écorces de *Grias neuberthii* (Lecythidaceae) ont montré

une forte activité *in vitro* sur *P. falciparum* (souches sensible et résistante) et *L. donovani* et une activité modérée sur *T. brucei gambiense*.

Conclusions : Les communautés de la forêt amazoniennes au Pérou représentent une source de connaissance sur l'utilisation des plantes médicinales. Dans ce travail, plusieurs extraits avec une activité antiparasitaire ont été identifiés. Ce travail contribue à la validation de certaines utilisations traditionnelles et constitue une ouverture à des recherches ultérieures sur l'isolement et l’identification de composés actifs.

2.2. Article

Journal of Ethnopharmacology 210 (2018) 372–385

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

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

Antiprotozoal activity of medicinal plants used by Iquitos-Nauta road communities in Loreto (Peru)

Pedro Vásquez-Ocmín[a,*], Sandrine Cojean[b], Elsa Rengifo[c], Soulaf Suyyagh-Albouz[b], Carlos A. Amasifuen Guerra[d], Sébastien Pomel[b], Billy Cabanillas[c], Kember Mejía[c], Philippe M. Loiseau[b], Bruno Figadère[a], Alexandre Maciuk[a,*]

[a] Equipe "Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France
[b] Equipe "Chimiothérapie antiparasitaire" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France
[c] Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Avenida Abelardo Quiñonez Km. 4.5, Iquitos, Peru
[d] Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Facultad de Ciencias Forestales, Calle Pevas 5ta cuadra, Iquitos, Peru

ARTICLE INFO

Keywords:
Antiprotozoal activity
Medicinal plants
Peruvian Amazon
Plasmodium
Leishmania
Trypanosoma
Ethnopharmacological survey

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: In the Peruvian Amazon, the use of medicinal plants is a common practice. However, there is few documented information about the practical aspects of their use and few scientific validation. The starting point for this work was a set of interviews of people living in rural communities from the Peruvian Amazon about their uses of plants. Protozoan diseases are a public health issue in the Amazonian communities, who partly cope with it by using traditional remedies. Validation of these traditional practices contributes to public health care efficiency and may help identify new antiprotozoal compounds.
Aims of study: to inventory and validate the use of medicinal plants by rural people of Loreto region.
Materials and methods: Rural mestizos were interviewed about traditional medication of parasite infections with medicinal plants. Ethnopharmacological surveys were undertaken in two villages along Iquitos-Nauta road (Loreto region, Peru), namely 13 de Febrero and El Dorado communities. Forty-six plants were collected according to their traditional use for the treatment of parasitic diseases, 50 ethanolic extracts (different parts for some of the plants) were tested *in vitro* on *Plasmodium falciparum* (3D7 sensitive strain and W2 chloroquine resistant strain), *Leishmania donovani* LV9 strain and *Trypanosoma brucei gambiense*. Cytotoxic assessment (HUVEC cells) of the active extracts was performed. Two of the most active plants were submitted to preliminary bioguided fractionation to ascertain and explore their activities.
Results: From the initial plants list, 10 were found to be active on *P. falciparum*, 15 on L. *donovani* and 2 on the three parasites. The ethanolic extract from *Costus curvibracteatus* (Costaceae) leaves and *Grias neuberthii* (Lecythidaceae) bark showed strong *in vitro* activity on *P. falciparum* (sensitive and resistant strain) and L. *donovani* and moderate activity on *T. brucei gambiense*.
Conclusions: The Amazonian forest communities in Peru represents a source of knowledge on the use of medicinal plants. In this work, several extracts with antiprotozoal activity were identified. This work contributes to validate some traditional uses and opens subsequent investigations on active compounds isolation and identification.

1. Introduction

Infections caused by parasitic protozoa take an enormous toll on human health. Their prevalence is higher in tropical and equatorial countries, where the major number of deaths is due to malaria (World Health Organization, 2016a). Although significant progresses have been made in the past decades, malaria is still considered by the World Health Organization as the first parasitic disease with 229 000 deaths in 2016 in 91 countries. Chagas disease, African trypanosomiasis and leishmaniasis are classified as some of the 17 most important neglected diseases by the WHO (Simarro et al., 2012; World Health Organization, 2015a). In the absence of effective vaccines, global antiparasitic strategy relies on a multi-faceted approach based on prevention (*i.e.* vector control and pharmacological prophylaxis), quick and reliable diagnostic procedures, treatment with effective antiprotozoal drugs and medicinal plants. Natural products remain an interesting source of

* Corresponding authors.
E-mail addresses: pedro.vasquez-ocmin@u-psud.fr (P. Vásquez-Ocmín), alexandre.maciuk@u-psud.fr (A. Maciuk).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.039
Received 1 June 2017; Received in revised form 17 August 2017; Accepted 29 August 2017
Available online 05 September 2017
0378-8741/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

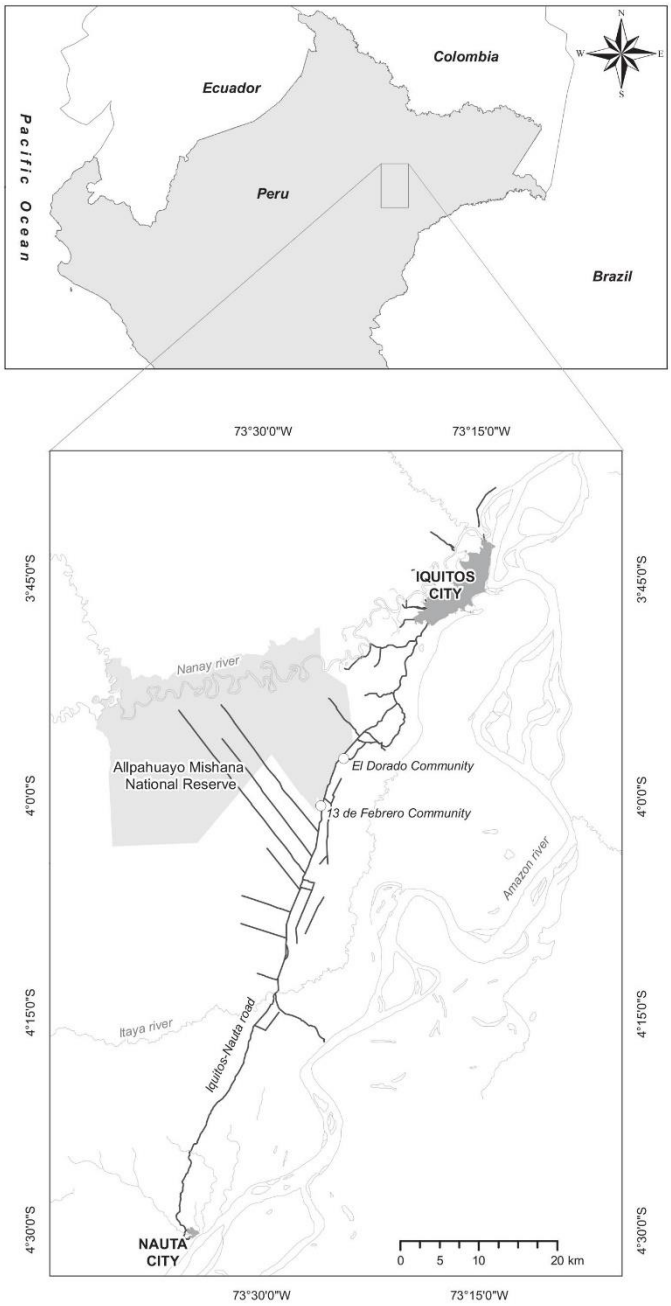


Fig. 1. Map of the place of ethnopharmacological survey.

research for the discovery of new drugs to fight NTDs (neglected tropical diseases) (Zucca et al., 2013).

Malaria is caused by the apicoplexan parasites *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* (Centers for Disease Control and Prevention, 2017). It is transmitted by female anopheles mosquitoes, which bite mainly between dusk and dawn. The

most severe form is caused by *P. falciparum*; variable clinical symptoms include fever, chills, headache, muscular aching and weakness, vomiting, cough, diarrhea and abdominal pain, generalized convulsions, circulatory collapse and can be followed by coma and death if not treated. Initial symptoms, sometimes of mild intensity, may not be easy to recognize as being due to malaria (World Health Organization, 2016a).

Leishmania spp., *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* are protozoan parasites from the Kinetoplastidae family transmitted to mammalian hosts *via* their insect vectors, sandflies (*Phlebotomus* spp.), triatominae (such as *Triatoma infestans*), and tsetse flies (*Glossina* spp.), respectively (McCall and McKerrow, 2014). These parasites partly share similar structural and biochemical features. Recent analysis of their genome sequences identified common metabolic pathways, allowing a better understanding about their pathogenesis and leading to further investigations on biochemical/molecular drug targets (Barrett and Croft, 2012). Chagas disease caused by *T. cruzi*, human African trypanosomiasis caused by *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense*, as well as different forms of leishmaniasis, caused by various species of *Leishmania*, are categorized amongst the most important NTDs (World Health Organization, 2016b).

Altogether, these diseases predominantly affect populations living in poverty and in close proximity with the vectors of disease-causing agents. The effects of NTDs are devastating: over 1 billion people in 149 countries suffer from one or more neglected diseases with millions of others at risk, and economic repercussions of these diseases can be just as damaging as their health effects. These diseases are 'neglected' primarily because there is no financial incentive to develop drugs for a patient population that cannot afford them (Klug et al., 2016; World Health Organization, 2015b). In Peru malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis are the 3 priority health problems for the ministry of health due to increased transmission and risk factors. (Ministerio de Salud del Perú, 2015). These parasitic diseases are especially of public health concern in the Peruvian Amazon, mainly in the poor areas of the Loreto region. For example, of all the cases of malaria in Peru, 94.6% were found in the Loreto region (mostly *P. vivax*) (Ministerio de Salud del Perú, 2016).

Peru is considered to be one of the 12 megadiverse countries, with an estimated flora of approximately 25 000 species. Approximately 10% of the world flora grow in Peru, 30% of the species being endemic. It is estimated that approximately 5 000 Peruvian plants are used by the population for 49 different purposes and uses (Bussmann and Sharon, 2014). Plants traditionally used for the treatment of diseases need to be tested and scientifically validated to corroborate their uses and to know their toxicity.

The aims of this work were to firstly inventory the use of medicinal plants by rural mestizo people, and secondly evaluate the antiprotozoal activity *in vitro* of 50 extracts from 46 medicinal plants. Plants in this work were selected for their antiprotozoal use during an ethnopharmacological survey in Loreto-Peru (communities located along Iquitos-Nauta road).

2. Materials and methods

2.1. Ethnopharmacological survey

The surveys were taken between January and December 2008 in the communities of 13 de Febrero (Coordinates UTM 673903, 9555301; elevation 140 m.a.s.l.; zone 18) and El Dorado (Coordinates UTM 677057, 9562698; elevation 140 m.a.s.l.; zone 18) in km 33 and 25 of the Iquitos – Nauta road in the province of Maynas, located in the region of Loreto, Peru (Fig. 1). These surveys were realized as part of the project "Exploration and evaluation of bioactive substances and natural products: Record and documentation of traditional knowledge on useful plants in native communities of the Peruvian Amazonia". This project was realized in accordance with the Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) guidelines pertaining to ethnopharmacological studies, and a detailed presentation of the project, following a standard procedure of IIAP, was given to the participants before obtaining their informed consent. 75 individuals were selected per community for the survey, with the purpose of getting to know the main use of medicinal plants, including the use against malaria and "uta" (local name for leishmaniasis). From these plants, a list was made of the plants recognized by at least 5 persons within the community to be used against malaria and uta. Later, the species were verified *in situ* and collected, either in backyards or in wild areas close to their homes. The plants referred by the informants were then identified and deposited at the National Herbarium of the San Marcos University, Lima, Peru. Collected information were divided in categories according to their uses against malaria, leishmaniasis or other diseases.

After botanical identification a second collection was realized in December 2015 at: 1) Area surrounding the Iquitos – Nauta road (Coordinates UTM 678002, 9560826; elevation 140 m.a.s.l; zone 18, District of San Juan, Province of Maynas, Region of Loreto); 2) Arboretum of the Research Center Jenaro Herrera "Jose Lopez Parodi" (Coordinates UTM 640726, 9458471; elevation 110 m.a.s.l; zone 18, District of Jenaro Herrera, Province of Requena, Region of Loreto, Peru).

2.2. Extracts preparation

Five grams of each dried and ground plant part were twice soaked 24 h in 15 mL of ethanol 96%, filtrated and evaporated under reduced pressure, below 40 °C. Dried extracts were stored at −4 °C until use. For active extracts or barks, tannins were removed by filtering 50 mg of extract through 150 mg of polyamide (MN-polyamide SC 6, particle size 0.05–0.16 mm). Elution was made using ethyl acetate: methanol 1:1. For *in vitro* bioassays, the extracts were solubilized in DMSO at a starting concentration of 10 mg/mL. For extracts with significant activity on all parasites, liquid-liquid fractionation was performed using solvents of increasing polarity (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water).

2.3. Parasite culture

2.3.1. Plasmodium falciparum

The chloroquine-sensitive 3D7 *P. falciparum* strain (clone of the NF54) and W2 chloroquine-resistant strain were obtained from Malaria French National Reference Center (CNR Paludisme, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris). The strains were maintained in O^+ human erythrocytes in albumin supplemented RPMI medium under continuous culture using the candle-jar method (Trager and Jensen, 1976). The parasites were synchronized to the ring stage by repeated sorbitol treatment (Lambros and Vanderberg, 1979).

2.3.2. Leishmania donovani

The MHOM/ET/67/HU3 strain of L. *donovani* also called LV9 was maintained routinely in special pathogen-free (SPF) female Golden hamsters (Charles Rivers Ltd., UK) by passage every 12 weeks. Parasites were maintained as promastigote forms in M-199 medium (Sigma) supplemented with 40 mM HEPES, 100 mM adenosine, 0.5 mg/L hemin, 10% fetal bovine serum (FBS) at 25 °C in a dark environment. Differentiation of promastigotes into axenic amastigotes was achieved by diluting 1×10^6 promastigotes in stationary growth phase in 5 mL of axenic amastigote medium (promastigote medium supplemented with 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, pH adjusted to 5.5) one day before

Table 1
Medicinal plants collected. Plant names are those given as accepted name on the Tropicos database of Missouri Botanical Garden.

Name Voucher reference (Location: CIN = Iquitos – Nauta road; JH = Jenaro Herrera community) vernacular name	Traditional indications	Traditional recipes
ARACEAE		
Dieffenbachia seguine (Jacq.) Schott (syn. *Dieffenbachia picta* Schott)	1. Mycosis;	1. Wash affected area using an infusion of dried leaves (2 leaves per liter of water). Also, the steam of the infusion can be applied on the affected area;
PV002PA (CIN) **patiquina, hoja blanca**	2. Rheumatism;	2. Apply the leaves on the painful area (2 leaves), by placing a gauze or a thin fabric between the leaves and the skin. Repeat the procedure for three days. Do not get the area wet for at least four days;
	3. Uta.	3. The stem is used topically against uta.
Dracontium spruceanum (Schott) G.H. Zhu (syn. *Dracontium loretense* K. Krause)	1. Snake bite;	1. Mash 1 tuber, wrap the paste in a *bijao* (*Calathea* spp) or banana leaf, and apply on the snake bite. Alternatively, grate the tuber and apply directly on the snake bite, and at the same time drink the paste diluted in a cup of cold, boiled water;
PV003P (CIN) **jergón sacha, hierba del jergón, fer de lance**	2. Hernia;	2. Boil the petioles and tuber in water until a thick liquid is obtained. Apply directly on the affected area;
	3. Wounds / uta.	3. Sun-dry the tuber, grind it, sift it and apply the powder on the wound (previously washed), until the wound is well covered, three times a day, until the wound is healed.
ARECACEAE		
Iriartea deltoidea Ruiz & Pav.	1. Cleaning of the stomach;	1–3. Grate 1 seed or roots and drink it directly with water every hour during 3 days;
PV004R (CIN) **pona**	2. Malaria;	
	3. Children's night terrors;	
	4. Aphrodisiac.	4. Macerate the roots (5 g approximately) in sugar cane alcohol (*aguardiente*). Alternatively, boil it in water, drink before sexual intercourse.
ASTERACEAE		
Tessaria integrifolia Ruiz & Pav.	1. Odontalgia;	1. Chew the bark until pain is alleviated;
PV038 (CIN) **pájaro bobo**	2. Asthma;	2–4. Boil 4 g of the aerial parts for 15 minutes, let it rest overnight, take as a common drinking water during the day;
	3. Fever;	
	4. Urinary tract infection;	
	5. Flatulence.	5. Boil ½ handful of leaves (approximately 10 g) per liter of water. Drink a cup before every meal.
BIGNONIACEAE		
Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos (syn. *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl)	1. Malaria;	1. Boil 10 g of the bark in 1 l of water, take as common drinking water during the day;
PV043 () **tahuari**	2. Uta;	2. Boil 200 g of the bark in 1 l of water. Wash the affected area and apply as a compress until cicatrization of the ulcers;
	3. Diabetes.	3. Boil 25 g of the bark in 1 l of water, take a cup two times a day during five days.
Handroanthus serratifolius (Vahl) S.O. Grose (syn. *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson)	1. Malaria;	1. Boil 10 g of the bark in 1 l of water, take a cup two times a day during five days;
PV005C (CIN) **tahuari, palo arco**	2. Uta;	2. Boil 200 g of the bark in 1 l of water. Wash the affected area and apply as a compress until cicatrization of the ulcers;
	3. Diabetes.	3. Boil 25 g of the bark in 1 l of water, take a cup two times a day during five days.
CELASTRACEAE		
Maytenus macrocarpa (Ruiz & Pav.) Briq.	1. Malaria;	1, 2. Macerate 20 g of bark in *aguardiente* for 15 days, drink a small cup of 30 mL before bathing;
	2. Common cold	
PV006C (CIN) **chuchuhuasi, chuchuhuasha**	3. Uta;	3. Boil 200 g of the bark in 1 l of water. Wash the affected area with it and apply the mixture of bark powder with decoction as a plaster until the cicatrization of the ulcer;
	4. Stomach ache	4. Boil 5 g of bark, drink three times a day.
COSTACEAE		
Costus curvibracteatus Maas (syn. *Costus scaber* Ruiz & Pav.)	1. Fever;	1. Grate the stem pulp or crush the leaves, apply the paste on the head and wrap with a fabric every morning to lower the fever. Extract the juice of the stem and leaves, drink it three times a day;
PV037T (CIN) PV037H (CIN) **caña agria**	2. Pertussis.	2. Scratch the stem and extract the juice, drink it three times a day.
ELAEOCARPACEAE		
Sloanea schomburgkii Spruce ex Benth. (syn. *Sloanea verrucosa* Ducke)	1. Malaria;	In a large pan containing water make a decoctions of 20 g of bark and 20 g of leaves. This decoction is used to take a bath once a day in order to reduce fever.
PV007C (JH) **sepanchina**	2. Fever, inflammation.	
EUPHORBIACEAE		
Alchornea castaneifolia (Humb. & Bonpl. ex Willd.) A. Juss.	1. Antirheumatic;	1. Boil 50 g of the bark and root in 1 l of water, take in on an empty stomach;
PV041H (CIN) **ipururo**	2. Aphrodisiac;	2, 3. Boil the leaves in water, drink it every night;
	3. Fever;	
	4. Bite of stingray, joint pain.	4. Apply a plaster of the grinded leaves on the affected area.
Alchornea triplinervia (Spreng.) Müll. Arg.	1. Diarrhea.	In a large pan containing boiling water, add 10 g of bark during 30 minutes. A small cup is drunk 2 times, after breakfast and lunch.
PV008C (JH) **zancudo caspi, mojarra caspi**	2. Fever.	
Hevea guianensis Aubl. (syn. *Hevea cuneata* Huber)	1. Malaria;	On an empty stomach, take once a day a quarter of a spoon (children) to a full spoon (adult) of latex.
PV009C (CIN) **shiringa**	2. Fever.	
FABACEAE		
Albizia niopoides (Spruce ex Benth.) Burkart PV047 (CIN) **pashaco**	Fever.	Boil 5 g of the bark in a large pan containing water. Drink a spoon every night and wash all the body with a humid towel in order to decrease fever.

(continued on next page)

Table 1 *(continued)*

Name Voucher reference (Location: CIN = Iquitos – Nauta road; JH = Jenaro Herrera community) vernacular name	Traditional indications	Traditional recipes
Bauhinia herrerae (Britton & Rose) Standl. & Steyerm. PV040 (JH) **pata de vaca**	Fever, inflammation.	Boil 5 g of the bark in a large pan containing water. Drink a spoon every night and wash all the body with a humid towel in order to decrease fever.
Campsiandra angustifolia Spruce ex Benth. PV010C (JH) **huacapurana**	1. Rheumatism, joint pain; 2. fever; 3. Diarrhea; 4. Liver.	1, 2. Macerate 100 g of the bark in 1 l of *aguardiente* for 15 days. Drink a cup every morning before shower; 3. Boil 50 g of the bark in water, drink one cup; 4. Macerate 200 g in 1 l of *aguardiente* for 7 days, filter it and add honey.
Copaifera paupera (Herzog) Dwyer PV011C (JH) **copaiba**	1. Wounds; 2. Throat pain; 3. Ulcers, uta; 4. Herpes.	1. Apply the oil (exsudate) of the fruit (obtained directly or after boiling extraction), on the affected area; 2. Mix one tablespoon of honey and three drops of copaiba oil (exsudate), apply on the wound; 3. Take five drops of oil (exsudate) diluted in a tablespoon of warm water, on an empty stomach, for seven days; 4. Mix one part of copaiba oil (exsudate) and one part of *andiroba* oil (*Carapa guianensis* Aubl.), apply on the affected area, leaving it for 30 minutes. Apply twice a day.
Inga sertulifera DC. (syn. *Inga coriacea* (Pers.) Desv.) PV012C (JH) **tuna congona, simbillo**	Malaria.	Boil 5 g of the bark in 1 l of water. Drink one cup of the beverage in the mornings for 3 day.
Abrus arboreus Vell. (syn. *Ormosia arborea* (Vell.) Harms) PV042 (CIN) **huayruro**	1. Hemorrhoids; 2. Malaria, fever.	Roast 7 seeds and 5 g of bark, smash and boil, take the steam in a sitz bath for 15 nights.
Ormosia costulata (Miq.) Kleinhoonte (syn. *Ormosia coccinea* (Aubl.) Jacks.) PV013C (CIN) PV013H (CIN) **huayruro**	1. Hemorrhoids; 2. Malaria, fever.	Roast 7 seeds and 5 g of bark, smash and boil, take the steam in a sitz bath for 15 nights.
Swartzia simplex (Sw.) Spreng. PV014C (CIN) **porotillo**	Malaria.	In a pan boil 50 g of bark in 1 l of water. Take as drinking water during the day, when thirsty.
Tachigali polyphylla Poepp. (syn. *Tachigali poeppigiana* Tul.) PV015C (JH) **tangarana de altura**	1. Intestinal parasites; 2. Fever.	1. Boil approximately 5 g of fresh leaves, take as drinking water during the day; 2. In a pan, boil 100 g of bark in 1 l of water. Take as drinking water during the day, when thirsty.
GENTIANACEAE		
Chelonanthus alatus (Aubl.) Pulle (syn. *Irlbachia alata* (Aubl.) Maas) PV016PA (CIN) **campanita**	1. Fever; 2. Body pain; 3. Rheumatism; 4. Antimalarial; 5. Headache; 6. Diabetes; 7. Liver damage; 8. Wounds; 9. Uta.	Boil 20–30 g of fresh leaves in 1 l of water, drink the beverage three times a day.
LECYTHIDACEAE		
Grias neuberthii J.F.Macbr. PV017C (JH) **sacha mango, sacha mangua**	1. Depurative; 2. Diarrhea, emetic, enema, laxative, purgative; 3. Uterine bleeding; 4. recovering after giving birth; 5. Sinusitis; 6. Fever.	1–5. Boil 20–30 g of leaves per liter of water, drink it when thirsty; 4, 6. Boil 20–30 g of the bark per liter of water, drink it when thirsty.
Gustavia angustifolia Benth. (syn. *Gustavia angusta* Ruiz ex O. Berg) PV018C (CIN) **chopé**	1. Emetic. 2. Purgative. 3. Fever	1, 2. Make an infusion with the leaves, using one leaf per liter of water. Drink the beverage as drinking water; 3. Make an infusion with 5 g of bark per liter of water. Drink the beverage as drinking water.
LINACEAE		
Roucheria columbiana Hallier f. (syn. *Roucheria punctate* (Ducke) Ducke) PV019C (JH) **puma sacha, puma caspi**	Malaria	Boil 5 g of the bark in one liter of water. Drink one cup every morning for three days.
MELIACEAE		
Cedrela odorata L. PV020C (CIN) **cedro**	1. Fever; 2. Snake bite; 3. Diarrhea; 4. Malaria; 5. Spasms; 6. Uta.	1. Boil the bark, take as drinking water during the day; 2. Scratch the bark, boil until a red color is obtained, sweeten and take a cup. Wash the wound with the left over adding a teaspoon of salt; 3–4. Boil the bark (20 g per liter of water). Drink a cup with every main meal; 5. Slightly heat two leaves over direct fire. Apply on the abdomen as a cataplasm; 6. Boil the bark (20 g), wash the wounds with it.
Guarea guidonia (L.) Sleumer (syn. *Guarea trichilioides* L.) PV021C (JH) **requia colorada**	Malaria.	Boil 5 grams of well grated bark in one liter of water, simmer it. Drink one cup every morning for three days.
MORACEAE		
Clarisia biflora Ruiz & Pav. PV045 (CIN) **chimicua**	1. Common cold; 2. Feverish chill; 3. Rheumatism and arthritis; 4. Body pain; 5. Hernia.	Macerate 5 g of the bark in *aguardiente*. Take a small cup (30 mL) before breakfast.
Clarisia racemosa Ruiz & Pav.	1. Common cold;	Macerate 5 g of the bark in *aguardiente*. Take a small cup (30 mL) before

(continued on next page)

Table 1 *(continued)*

Name Voucher reference (Location: CIN = Iquitos – Nauta road; JH = Jenaro Herrera community) vernacular name	Traditional indications	Traditional recipes
PV022C (CIN) **mashonaste**	2. Feverish chill; 3. Rheumatism and arthritis; 4. Body pain; 5. Hernia.	breakfast.
Ficus insipida Willd. PV023C (CIN) **ojé, doctor ojé**	1. Odontalgia; 2. Intestinal parasites; 3. Malaria; 4. Uta; 5. Rheumatism.	1. Apply the fresh latex topically using a piece of cotton; 2, 3. Dilute a cup of the latex in orange juice or sugared water. Drink every three days; 4. Apply directly the latex on the wound for three or more days, until cicatrization is observed; 5. Apply the latex as a plaster on the affected area.
MYRISTICACEAE		
Virola calophylla (Spruce) Warb. PV024C (CIN) **cumala blanca**	1. Antifungal; 2. Stomachache; 3. Malaria, fever; 4. Hallucinogenic.	1–3. Boil 5 g of the bark in one liter of water. Drink one cup every morning for three days.
Virola surinamensis (Rol. ex Rottb.) Warb. PV046 (CIN) **cumala colorada**	1. Stomach cramps; 2. Wound healing; 3. Digestive; 4. Dyspepsia; 5. Erysipelas; 6. Contusions; 7. Uta; 8. Hallucinogenic.	1–7. Boil 5 g of the bark in one liter of water. Drink one cup every morning for three days.
OLACACEAE		
Minquartia guianensis Aubl. (syn. *Minquartia punctata* (Radlk.) Sleumer) PV042 (CIN) **huacapú**	1. Hepatitis; 2. Malaria, fever; 3. Rheumatism.	1–2. Boil 50 g of the bark in 1 l of water. Drink four times a day; 3. Macerate 200 g of the bark in 1 l of *aguardiente*, add honey. Drink one cup on an empty stomach for a month.
PASSIFLORACEAE		
Passiflora quadrangularis L. PV026H (JH) **tumbo**	1. Therapeutic abortion; 2. Malaria, fever.	Boil 20 leaves (approximately 30 g) per liter of water. Boil until water is reduced to a third. Take three cups a day: the first one on an empty stomach, the second one hour later, and the third one, three hours after the first one.
PIPERACEAE		
Piper coruscans (Miq.) C. DC. (syn. *Piper amazonicum* (Miq.) C. DC.) PV048 (CIN) **cordoncillo**	1. Malaria 2. Fever; 3. Purgative.	Crush 50 g of aerial parts in 1 l of water and prepare an infusion. Take as drinking water.
POLYGONACEAE		
Triplaris weigeltiana (Rchb.) Kuntze (syn. *Triplaris americana* L.) PV027C (JH) **tangarana del bajo**	1. Stomach ache; 2. Diarrhea; 3. Swelling; 4. Body pain; 5. Bone-ache; 6. Vomiting; 7. Anemia.	Make an infusion with the bark and leaves (50 g of each in 1 l of water). Drink as drinking water after each meal.
RUBIACEAE		
Calycophyllum multiflorum Griseb. (syn. *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook.f. ex K.Schum.) PV028C (JH) **capirona**	1. Anemia; 2. Uta.	1. Boil the leaves and bark (5 g each) for one hour in water with ripe fruits of *huito* (*Genipa americana* L.). Drink this beverage in the morning and the afternoon for five days; 2. Scrape the bark, apply on the affected area. Renew it every day.
Capirona decorticans Spruce PV029C (CIN) **capirona**	1. Acariasis and psoriasis. 2. Malaria. 3. Uta.	1, 3. Make an infusion with 3 g of the bark and wash the affected area with it; 2. The same infusion can be taken as drinking water.
Isertia hypoleuca Benth. PV030H (CIN) **ocuera blanca**	1. Alterations of the menstrual flow. 2. Malaria.	Make an infusion with 50 g of leaves in 1 l of water, drink the beverage three times a day.
Ladenbergia oblongifolia (Humb. ex Mutis) L. Andersson (syn. *Ladenbergia magnifolia* (Ruiz & Pav.) Klotzsch) PV031C (JH) **cascarilla verde**	Malaria.	Boil 10 g of the bark in 1 l of water, take this beverage three times a day.
Cephaelis tomentosa (Aubl.) Vahl (syn. *Psychotria poeppigiana* Müll.Arg.) PV032H (CIN) **oreja de diablo, boca pintada**	1. Earache; 2. Hemorrhoids, 3. Lung diseases; 4. Uterine bleeding; 5. Vomiting; 6. Fever.	1. Drop the liquid contained inside the flower into the ears; 2–6. Drink the leaves infusion.
SAPOTACEAE		
Prieurella prieurii (A. DC.) Aubrév. (syn. *Chrysophyllum prieurii* A. DC.) PV033C (JH) **cotoquinilla**	1. Wound healing; 2. Uta;3. Malaria.	1. Use the leaves to disinfect wounds locally; 2. Crush the leaves, apply on the wound, let it rest during the night so as "the germs stick to the milk"; 3. Boil the leaves in water, drink the beverage as a common drinking water during the day.
Pouteria guianensis Aubl. (syn. *Pouteria caimito* (Ruiz & Pav.) Radlk.) PV034C (JH)	1. Wound healing; 2. Diarrhea; 3. Uta;	1. Use the leaves to disinfect wounds locally; 2. Crush the leaves, add some water, drink this beverage twice a day; 3. Crush the leaves, apply on the wound, let it rest during the night so as "the

(continued on next page)

Table 1 *(continued)*

Name Voucher reference (Location: CIN = Iquitos – Nauta road; JH = Jenaro Herrera community) vernacular name	Traditional indications	Traditional recipes
PV034H (JH) PV034R (JH) **caimito**	4. Malaria.	germs stick to the milk"; 4. Boil the leaves, drink the beverage as a common drinking water during the day.
SIMAROUBACEAE		
Simarouba amara Aubl. PV035C (CIN) **huamansana, marupa**	1. Skin conditions; 2. Amoebiasis; 3. Cancer; 4. Weakness; 5. Diarrhea, dyspepsia, emetic; 6. Fever; 7. Nervousness; 8. Malaria.	Boil 10 g of the bark in 1 l of water during 15 to 30 minutes. Take this beverage three times a day.
TILIACEAE		
Apeiba tibourbou Aubl. PV036C (CIN) **peine de mono**	1. Asthma; 2. Intestinal parasites. 3. Body pain.	Boil 10 g of the bark in 1 l of water, drink the beverage as common drinking water during the day.
VERBENACEAE		
Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl PV044 (CIN) **sacha verbena, verbena negra**	1. Ulcer healing; 2. Fever; 3. Chronic hepatitis; 4. Diuretic; 5. Arthritis; 6. Anti-inflammatory; 7. Diabetes; 8. Renal problems.	Crush the fresh leaves into a paste, mix it with a few drops of lime and cooking oil, take a teaspoon in the morning on an empty stomach. Repeat three times.

treatment. Axenic amastigotes were grown at 37 C in 5% CO_2 (Balaraman et al., 2015).

2.3.3. Trypanosoma brucei gambiense

T. b. gambiense trypomastigotes (FéoITMAP/1893 strain) were maintained in HMI9 medium (Iscove's medium: Dulbecco's medium supplemented with 36 mM $NaHCO_3$, 1 mM hypoxanthine, 0.05 mM bathocuproine, 0.16 mM thymidine, 0.2 mM 2-mercaptoethanol, 1.2 mM L-cysteine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin) (Pomel et al., 2015).

2.4. In vitro antiprotozoal activity

2.4.1. In vitro antiplasmodial activity on Plasmodium falciparum

A 2.5% (V/V) erythrocytes suspension with 1% parasitemia (number of infected red blood cells per 100 red blood cells) was incubated with the compounds. Compound concentrations ranged between 48.5 nM and 100 μM, obtained by serial dilution, in duplicates. After 44 h of incubation at 37 °C, the plates were subjected to 3 freeze-thaw cycles to achieve complete hemolysis. The parasite lysis suspension was diluted 1:5 in lysis buffer. Monitoring of *in vitro* susceptibility uses the concentration that inhibits 50% of the parasite's growth (IC_{50}). Parasite growth was determined by using SYBR® Green I, a dye with marked fluorescence enhancement upon contact with parasite DNA. Incorporation of SYBR® Green I (Applied Biosystems, France) in parasite DNA was measured using the Mastercycler epRealplex (Eppendorf, France) according to the following program to increase the SYBR® Green I incorporation: 90 °C (1 min), decrease in temperature from 90 °C to 10 °C (during 5 min), followed by fluorescence reading. Untreated infected and uninfected erythrocytes were used as controls and chloroquine diphosphate (Sigma, France) as reference drug (Komlaga et al., 2016). IC_{50} was calculated by IC-estimator online software (http://www.antimalarial-icestimator.net).

2.4.2. In vitro antileishmanial activity on Leishmania donovani axenic amastigotes

Amastigote forms were suspended to obtain 10^7 cells/mL. Final concentrations obtained by serial dilution in triplicates ranged between 780 nM and 100 μM for pure compounds or 780 ng/mL and 100 μg/mL for extracts. Viability of amastigotes was assessed using the SYBR® Green I incorporation method (see above). Parasites were lysed following direct PCR-cell genotyping without DNA isolation protocol (Euromedex, France). 10 μL of lysed parasite solution was added to 40 μL of PCR-Cell reagent containing the SYBR® green I in a qPCR plate of 96 wells, and the contents were mixed. Fluorescence was measured with Mastercycler epRealplex (Eppendorf, France) and compared to those from the range obtained with different known parasite densities. Miltefosine was used as reference compound. The antileishmanial activity was expressed as IC_{50} in μM (concentration of drug inhibiting 50% of the parasite growth, comparatively to the controls treated with the excipient only) (Balaraman et al., 2015). IC_{50} was calculated by IC-estimator online software (http://www.antimalarial-icestimator.net).

2.4.3. In vitro antileishmanial activity on intramacrophagic amastigote form

The mouse monocyte/macrophage cell line RAW 264.7 was maintained in DMEM (Applied Biosystems, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. RAW 264.7 cells were seeded into a 96-wells microtitration plate at a density of 1,00,000 cells/well in 100 μL. After incubation in a 5% CO_2 incubator at 37 °C for 24 h, the culture medium was replaced with 100 μL of fresh DMEM containing a suspension of amastigote forms of 10^6 cells/mL. After incubation in a 5% CO_2 incubator at 37 °C for 24 h (the time needed by the parasite to infect the macrophage) the culture medium was replaced with 100 μL of fresh DMEM containing the test compounds for a new incubation period of 48 h. Final concentrations obtained by serial dilution in duplicates ranged between 780 nM and 100 μM for pure compounds or between 780 ng/mL and 100 μg/mL for extracts. After incubation, cells

Journal of Ethnopharmacology 210 (2018) 372–385

Table 2
In vitro activity of extracts.

FAMILY and *Specie*	Plant part	*P. falciparum* 3D7 strain, IC_{50} ± SD, µg/mL	L. *donovani* LV9 strain (axenic amastigote form), IC_{50} ± SD, µg/mL	L. *donovani* LV9 strain (intramacrophagic amastigote form), IC_{50} ± SD, µg/mL	*Trypanosoma brucei gambiense* IC_{50} ± SD, µg/mL
Abrus arboreus	B	> 10	10.56 ± 0.01	> 20	> 10
Albizia niopoides	B	> 10	> 20	NT	> 10
Alchornea castaneifolia	L	> 10	> 20	NT	> 10
Alchornea triplinervia	B	0.38 ± 0.03	> 20	NT	> 10
Apeiba tibourbou	B	> 10	30.5 ± 3.25	1.71 ± 0.14	> 10
Bauhinia herrerae	L	> 10	> 20	NT	> 10
Calycophyllum multiflorum	B	> 10	> 20	NT	> 10
Campsiandra angustifolia	B	> 10	> 20	NT	> 10
Capirona decorticans	B	> 10	22.98 ± 0.79	0.69 ± 0.11	
Cedrela odorata	B	> 10	6.12 ± 0.67	1.49 ± 0.33	> 10
Cephaelis tomentosa	L	> 10	54.96 ± 4.58	6.39 ± 0.77	> 10
Chelonanthus alatus	AP	> 10	> 20	NT	> 10
Clarisia biflora	B	> 10	1.82 ± 0.26	10.34 ± 3.58	> 10
Clarisia racemosa	B	> 10	1.63 ± 0.08	> 20	> 10
Copaifera paupera	B	> 10	> 20	NT	> 10
Costus curvibracteatus	S	> 10	> 20	NT	> 10
Costus curvibracteatus	L	1.39 ± 0.3	31.68 ± 4.96	0.39 ± 0.07	3.84 ± 0.08
Dieffenbachia seguine	AP	0.7 ± 0.04	13.6 ± 1.53	> 20	> 10
Dracontium spruceanum	T	> 10	6.44 ± 0.72	3.21 ± 0.99	> 10
Ficus insipida	B	> 10	0.4 ± 0.01	3.04 ± 0.38	> 10
Grias neuberthii	B	0.04 ± 0.01	15.91 ± 2.17	2.84 ± 0.57	2.93 ± 0.22
Guarea guidonia	B	> 10	18.37 ± 4.76	1.39 ± 0.1	> 10
Gustavia angustifolia	B	> 10	> 20	NT	> 10
Handroanthus impetiginosus	B	> 10	> 20	NT	> 10
Handroanthus serratifolius	B	> 10	9.52 ± 1.18	1.55 ± 0.55	> 10
Hevea guianensis	B	7.41 ± 3.58	> 20	NT	> 10
Inga sertulifera	B	> 10	> 20	NT	> 10
Iriartea deltoidea	R	> 10	> 20	NT	> 10
Isertia hypoleuca	L	> 10	24.98 ± 3.69	1.51 ± 0.18	> 10
Ladenbergia oblongifolia	B	> 10	> 20	NT	> 10
Maytenus macrocarpa	B	1.49 ± 0.51	15.26 ± 0.9	19.92 ± 1.43	> 10
Minquartia guianensis	B	> 10	3.14 ± 0.15	> 10	> 10
Ormosia costulata	B	> 10	> 20	NT	> 10
Ormosia costulata	L	> 10	> 20	NT	> 10
Passiflora quadrangularis	L	> 10	> 20	NT	> 10
Piper coruscans	AP	1.36 ± 0.06	4.66 ± 0.59	6.1 ± 0.45	> 10
Pouteria guianensis	B	> 10	13 ± 0.34	14.25 ± 1.78	> 10
Pouteria guianensis	L	> 10	> 20	NT	> 10
Pouteria guianensis	R	> 10	> 20	NT	> 10
Prieurella prieurii	B	> 10	> 20	NT	> 10
Roucheria columbiana	B	> 10	> 20	NT	> 10
Simarouba amara	B	> 10	> 20	NT	> 10
Sloanea schomburgkii	B	1.52 ± 0.12	> 20	NT	> 10
Stachytarpheta cayennensis	AP	> 10	49.25 ± 3.87	0.95 ± 0.12	> 10
Swartzia simplex	B	0.12 ± 0.05	17.21 ± 3.37	13.3 ± 1.49	> 10
Tachigali polyphylla	B	0.04 ± 0.01	> 20	NT	> 10
Tessaria integrifolia	L	> 10	4.99 ± 1.27	0.51 ± 0.09	> 10
Triplaris weigeltiana	B	> 10	> 20	NT	> 10
Virola calophylla	B	> 10	0.38 ± 0.12	0.7 ± 0.06	> 10

(continued on next page)

Table 2 (*continued*)

FAMILY and *Specie*	Plant part	*P. falciparum* 3D7 strain, IC_{50} ± SD, µg/mL	*L. donovani* LV9 strain (axenic amastigote form), IC_{50} ± SD, µg/mL	*L. donovani* LV9 strain (intramacrophagic amastigote form), IC_{50} ± SD, µg/mL	*Trypanosoma brucei gambiense* IC_{50} ± SD, µg/mL
Virola surinamensis	B	> 10	> 20	NT	> 10
Chloroquine		0.0062 ± 1.6(20 ± 5.15 nM)	NT	NT	NT
Miltefosine		NT	0.26 ± 0.08(0.65 ± 0.08 µM)	2.49 ± 0.45(6.1 ± 0.45 µM)	NT
Pentamidine		NT	NT	NT	0.0004 ± 0.00007(0.0012 ± 0-.0002 µM)

AP = aerial parts; B = bark; L = leaves; R = roots; S = stems; T = tuber; NT = not tested; NA = not active.

were visualized using an inverted microscope to check their morphology or the presence of parasites outside. The medium was subsequently removed and replaced by lysis buffer and the plates were subjected to 3 freeze-thaw cycles. Parasite growth was quantified by using SYBR® Green I incorporation following the protocol described above using uninfected or infected macrophages as control and miltefosine as reference compound (Balaraman et al., 2015). IC_{50} was calculated by IC-estimator online software (http://www.antimalarial-icestimator.net).

2.4.4. In vitro evaluation on bloodstream form of Trypanosoma brucei gambiense

Two-fold serial dilution of the compounds were performed in 100 µL of HMI9 medium in 96-wells microplates. Parasites were then added to each well (200 µL of a suspension of 4.10^4 cells/mL). After 72 h of incubation at 37 °C in 5% CO_2, 20 µL of 450 µM resazurin was added to each well and further incubated for 6 h at 37 °C in 5% CO_2. In living cells, resazurin is reduced in resorufin. This conversion is monitored by measuring the absorbance at specific wavelengths of resorufin (570 nm) and resazurin (600 nm) using a Multiskan MS microplate reader (Labsystems, France). Compounds activity was expressed as IC_{50}. Pentamidine di-isethionate was used as the reference compound (Pomel et al., 2015).

2.4.4.1. Cytotoxic activity. For determination of cytotoxicity IC_{50}, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEM-F12) medium in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) plus 1% streptomycin and incubated in 5% CO_2 at 37 °C. The cytotoxicity of extracts (starting concentration of 10 mg/mL) was evaluated using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric method (Mosmann, 1983). HUVECs were seeded in a 96-well plate at 15,000 cells per well and incubated for 24 h until cells reached > 80% confluence. After discarding the old medium, the cells were incubated in the medium containing test solutions at eight concentrations ranging from 0.78 to 100 µg/mL. After 24 h incubation, 20 µL MTT (5 mg/mL) was added to each well and cells were incubated for another 3 h. Finally, the culture medium containing MTT solution was removed and the formazan crystals were dissolved in 100 µL DMSO. Absorbance was read with an Eppendorf plate reader at 546 nm. CC_{50}, defined as extract concentration that reduced the number of viable cells by 50%, was calculated using GraphPad Prism Software (Version 5.0, San Diego, CA, USA) (Komlaga et al., 2016).

The mouse monocyte/macrophage cell line RAW264.7 was maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. RAW 264.7 cells were seeded into a 96-well plate at a density of 5.10^3 cells/well in 100 µL of DMEM. After incubation in a 5% CO_2 incubator at 37 °C for 24 h, the culture medium was replaced with 100 µL of fresh DMEM containing the compounds to test. The number of living cells was determined by the Trypan blue dye exclusion assay, after additional 48 h incubation: the cells were suspended with a cell scraper, incubated with Trypan blue, and counted using a hemocytometer. The results are expressed in MTC (Maximum Tolerated Concentration), the maximum concentration in µM for which no toxicity was observed (Balaraman et al., 2015). CC_{50}, defined as extract concentration that reduced the number of viable cells by 50%, was calculated using GraphPad Prism Software (Version 5.0, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Ethnopharmacological survey

Communities where the surveys took place are groups locally called "Mestizos", living in a rural habitat but not far from urbanized areas. They are settled on the merge of the Allpahuayo-Mishana National Reserve, characterized by rare ecosystems (white sand soils, argileous

Table 3
Antiplasmodial activity on *P. falciparum* 3D7 and W2 strain and cytotoxicity on HUVEC cells of most actives extracts filtrated on polyamide (IC_{50} < 10 μg/mL).

Species	*P. falciparum* 3D7 (extract w/o tannins) IC_{50} ± SD, μg/mL	Effect of filtration (activity increasing factor)	*P. falciparum* W2 IC_{50} ± SD, μg/mL	Cytotoxicity (% of living cells)
Alchornea triplinervia	0.62 ± 0.08	0.6	0.72 ± 0.07	100.0 ± 8.4
Costus curvibracteatus	NF	NF	1.16 ± 0.02	9.5 ± 0.8
Dieffenbachia seguine	NF	NF	0.01 ± 0.01	62.2 ± 6.4
Grias neuberthii	0.03 ± 0.01	1.3	0.03 ± 0.01	100.0 ± 19.7
Hevea guianensis	0.08 ± 0.62	92.6	4.94 ± 0.5	88.8 ± 6.4
Maytenus macrocarpa	0.02 ± 0.01	74	0.02 ± 0.01	44.1 ± 8.0
Piper coruscans	NF	NF	2.33 ± 0.26	43.6 ± 8.7
Sloanea schomburgkii	0.36 ± 0.08	4.2	0.7 ± 0.01	90.3 ± 8.1
Swartzia simplex	0.07 ± 0.01	1.7	0.77 ± 0.19	100.0 ± 10.3
Tachigali polyphylla	2.51 ± 0.21	0.02	2.66 ± 0.2	86.1 ± 5.2
Chloroquine	0.0062 ± 1.6 (20 ± 5.15 nM)	–	0.1 ± 0.02 (0.31 ± 0.06 μM)	NT

NT = not tested.

hills, marshes and floodable terraces) showing particular biodiversity. These communities live from traditional agriculture, fishery and animal farming within the reserve. Therefore, they have a daily contact with the rich biodiversity surrounding them, in addition to the traditional knowledge they inherited from their ancestors, parents or relatives. As their habitat, their culture interfaces traditional customs and urban education. As a consequence, their use of medicinal plants is exposed in some extent to modern medical concepts and this context may account for fewer biases in terms of unmatching disease concepts. People were interrogated with the medical concepts of "malaria" and "uta", but during the interviews it appeared that they had their own way to relate the symptoms. They related malaria by: fever after mosquito bite (principally during rainy season when mosquito abundance is very high), headache, body discomfort/body pain (tertiary fever, shivering described as "scrapie"). In case of leishmaniasis, they related it by: exposed wounds in the body, fever, body discomfort/body pain ("They don't wanna go to work"). In some cases, individuals would directly recognize the symptoms and use the terminology of malaria and uta.

Plants with their traditional indications and recipes are shown in Table 1. We collected 46 plants of 24 botanical families. One plant part was collected for each plant, except *Costus curvibracteatus* (stems and leaves), *Ormosia costulata* (bark and leaves) and *Pouteria guianensis* (bark, leaves and roots). Fabaceae is the most important family collected (9 species), followed by Rubiaceae (5), Euphorbiaceae, Moraceae (3 species of each family), Araceae, Bignonaceae, Lecythidaceae, Meliaceae, Myristicaceae, Olacaceae, Sapotaceae (2 species of each family) and other families with only one collected species.

3.2. Antiprotozoal activity

From these collections, 50 ethanolic extracts were made and tested. The plant part collected (bark, leaves, roots or tuber) was the plant part used traditionally (excepted for *C. tomentosa*). The protocols of use of the plants were very diverse, with some traditional preparations described as maceration in a local cane sugar alcohol (aguardiente). We chose cold ethanol extraction as a way to obtain most of the plants metabolites.

The protozoans species used for the screening have limited epidemiological and clinical relevance: *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei gambiense* were tested whereas *P. vivax*, *Leishmania* (*Viannia*) complexes of *L. braziliensis*, L. *peruviana* and L. *guyanensis* that are all associated with cutaneous leishmaniasis and *T. cruzi* are prevalent species in Peru and more widely Latin America (Marsden, 1986; Schwartz et al., 2006; Alroy et al., 2015). As a reminder, for malaria and leishmaniasis the treatment is the same whatever the species or the strain. For trypanosomiasis the treatment differs depending on the species. For all these parasites, development of drug resistance depends on the area and also impacts the choice of the treatment drug. In our case, several aspects including availability, reproducibility and ease of cultivation dictated the species and strains used for the screening. The fact they do not match the species actually affecting interrogated people has an impact on the ethnopharmacological relevance, but does not weakens the pharmacological outcome of the screening, especially the difference of selectivity among parasites. IC_{50} values for antiplasmodial, antileishmanial, antitrypanosomal activities of each extract are shown in Table 2. Ten plants were active on 3D7 *P. falciparum* chloroquine-sensitive strain with an IC_{50} < 10 μg/mL. Several of these extracts displayed a strong activity < 1 μg/mL: barks of *T. polyphylla* and *G. neuberthii* were the most active extracts at 0.04 ± 0.01 μg/mL. These extracts were more active than the reference compound chloroquine (IC_{50} = 0.13 μg/mL ± 0.01). Antileishmanial assays on L. *donovani* LV9 intramacrophagic amastigotes showed an IC_{50} < 10 μg/mL for 15 extracts (Table 2). Among them, 5 plants showed an activity < 1 μg/mL: *C. curvibracteatus* (0.39 ± 0.07), *T. integrifolia* (0.51 ± 0.09), *C. decorticans* (0.6 ± 0.11), *V. calophylla* (0.7 ± 0.06), *S. cayennensis* (0.95 ± 0.12). Only two plants showed moderate activity in the antitrypanosomal assay: *G. neuberthii* and *C. curvibracteatus* with IC_{50} of 3.84 ± 0.08 and 2.93 ± 0.22 μg/mL, respectively. Noteworthy, *G. neuberthii* and *C. curvibracteatus* displayed antiprotozoal activity against the three parasites tested.

Plants with mild or strong antiplasmodial activity (IC_{50} < 10 μg/mL) were tested on the chloroquine resistant *P. falciparum* W2 strain. When plant part was likely to contain tannins, the extracts were filtered on polyamide before testing their activity on W2 parasites and HUVEC cells. (Table 3). Six extracts showed an IC_{50} < 1 μg/mL on W2 strain: *D. seguine*, *M. macrocarpa*, *G. neuberthii*, *S. schomburgkii*, *A. triplinervia* and *S. simplex*, the most active being *D. seguine* (0.01 ± 0.01 μg/mL), *M. macrocarpa* (0.02 ± 0.01 μg/mL) and *G. neuberthii* (0.03 ± 0.01 μg/mL). Filtration on polyamide did in some cases remove a significant part of the extract but did not increase the activity, suggesting that tannins were not responsible of the activity. The cytotoxic assay of *A. triplinervia*, *S. simplex* and *G. neuberthii* extracts revealed no cytotoxicity on HUVEC cells (100% healthy cells). However, *C. curvibracteatus* extract presented a strong cytotoxicity (9% healthy cells).

G. neuberthii and *C. curvibracteatus* were fractionated by liquid/liquid partitioning. For *G. neuberthii*, antiplasmodial activity was concentrated in the ethyl acetate fraction (IC_{50} = 0.58 ± 0.07 μg/mL) whereas antileishmanial activity was concentrated in the cyclohexane and butanol fractions with IC_{50} of 1.93 ± 0.32 and 1.30 ± 0.11 μg/mL, respectively. For *C. curvibracteatus* antiplasmodial and antileishmanial activities were concentrated in water with IC_{50} of 3.02 ± 0.4 and 8.47 ± 1.58 μg/mL, respectively (Table 4).

Table 4
Antiprotozoal activity for the fractionation of *G. neuberthii* and *C. curvibracteatus*.

Species	Solvent	*P. falciparum* 3D7 strain IC_{50} ± SD, µg/mL	HUVEC cells CC_{50} ± SD, µg/mL	selectivity index CC_{50}/IC_{50}	LV9 L. *donovani* IC_{50} ± SD, µg/mL	RAW 264.7 macrophages CC_{50} ± SD, µg/mL	selectivity index CC_{50}/IC_{50}
Grias neuberthii	Cyclohexane	39.82 ± 2.89	> 100	> 2.51	1.93 ± 0.32	62.31 ± 4.29	32.28
	Dichloromethane	> 100	> 100	> 1	> 100	> 100	> 1
	Ethyl acetate	0.58 ± 0.07	12.40 ± 0.8	21.38	29.68 ± 2.87	10.37 ± 1.23	0.35
	1-butanol	56.35 ± 4.02	50.83 ± 2.96	0.9	1.30 ± 0.11	47.96 ± 3.54	36.89
	Water	> 100	18.51 ± 1.75	0.19	45.19 ± 2.54	9.79 ± 1.88	0.22
Costus curvibracteatus	Cyclohexane	42.43 ± 2.97	> 100	2.36	30.65 ± 3.03	> 100	3.26
	Dichloromethane	40.15 ± 2.51	13.75 ± 2.4	0.34	14.73 ± 2.30	12.23 ± 1.26	0.83
	Ethyl acetate	30.14 ± 4.71	> 100	> 3.32	12.12 ± 1.4	34.85 ± 2.41	2.88
	1-butanol	46.18 ± 9.3	> 100	> 2.17	> 100	> 100	> 1
	Water	3.02 ± 0.4	17.78 ± 3.09	5.89	8.47 ± 1.58	11.50 ± 0.86	1.36
Chloroquine		0.0062 ± 1.6 (20 ± 5.15 nM)	NT		NT	NT	
Miltefosine		NT	NT		2.49 ± 0.45 (6.1 ± 0.45 µM)	NT	

NT = not tested.

4. Discussion

People living in the Peruvian Amazon use edible/medicinal plants on a daily basis, either by cultivating them in their houses backyards or finding them near the community (Bussmann and Sharon, 2014). Loreto is the biggest but least populated region of Peru, mostly because of its inaccessibility due to multiple rivers surrounding it. The knowledge on medicinal plants in this region is very little explored and reported in research papers. Some reports exist on the use of medicinal antiprotozoal plants in Loreto, along with validation of their biological activities (Kvist et al., 2006; Ruiz et al., 2011). In our study, it is interesting to note that none of the plants used traditionally in this area were endemic from Peru. This is not surprising, as Amazonian forest overlaps several countries and is not a biodiversity hotspot by itself. Endemic plants, including those in Peru, are usually located in specific ecosystems like particularly dry or wet areas. As a consequence, the plants described in our study are most likely available for other communities or in other countries. In spite of this low specificity, 17% of the plants used traditionally in our survey were never reported as medicinal plants in the scientific literature. This observation highlights the interest of ethnopharmacological studies. Indeed, many traditional uses are probably under-reported, and their inventory can help establishing common aspects of different cultures when it comes to health and diseases. On the other hand, even if a plant is common to a wide geographic area, its use as medicine may be very specific of one particular area or community, thus representing a knowledge to preserve. Noteworthy, among the 46 plants collected, 42 are specific from Latin America, as checked on the Missouri Botanical Garden's "Tropicos" website. Only three plants can be also found in Africa, and one in Australia. During such studies, one of the major drawbacks is the discrepancy between medical and traditional nosologies. In our study the main criterion on which plants were selected as potential antiprotozoal agents was their use against fever. Fever is indeed caused by malaria and leishmaniasis, but can also be due to other etiologies, and an antipyretic remedy may not be antiprotozoal. Therefore, we can expect the *in vitro* validation to be somewhat disappointing, not to mention clinical validation. In our case, on the 46 plants collected, only 22 were active on one or several parasites *in vitro*. In terms of specificity, among these 22 active plants, only 5 were explicitly described traditionally as specifically active on malaria or leishmaniasis (uta), whereas most of them are used against fever, suggesting their use whatever the cause of the infection. However, although *Plasmodium* and *Leishmania* are both protozoan parasites, current treatments of these diseases differ and imply different molecules and mechanisms. Our *in vitro* data clearly indicate that among the active extracts, it is possible to distinguish four groups: one group of 12 extracts specifically active on L. *donovani* with an $IC_{50} < 10$ µg/mL, without any activity on *P. falciparum* (3D7 strain); one group of 5 extracts specifically active on *P. falciparum* with an $IC_{50} < 10$ µg/mL, without any activity on L. *donovani*; one group of 5 extracts simultaneously active on *P. falciparum* and L. *donovani* with an $IC_{50} < 20$ µg/mL; one group of 2 plants simultaneously active on *P. falciparum*, L. *donovani* and *T. b. gambiense* The clearcut specificity of many extracts for one or the other parasite is somewhat surprising.

A first group can be constituted by extracts showing specific antileishmanial activity. Among antileishmanial extracts, only one was described in the ethnopharmacological survey as specific of uta (*Dracontium spruceanum*), although it is not among the most active ones on L. *donovani*. It belongs to a group of extracts with IC_{50} comprised between 1 and 10 µg/mL, including *Apeiba tibourbou*, *Cedrela odorata*, *Cephaelis tomentosa*, *Ficus insipida*, *Guarea guidonia*, *Handroanthus serratifolius* and *Isertia hypoleuca*. Some extracts showed an $IC_{50} < 1$ µg/mL: *Capirona decorticans*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Tessaria integrifolia* and *Virola calophylla*. In order to identify most interesting extracts, we also took into consideration mechanism of action besides activity levels. Leishmania are cellular parasites. Nevertheless, axenic conditions (parasite without host cells) being easier to grow, this model has been

the usual format of biological assays for nearly a decade (*ca* 1997–2007) until intracellular conditions have been developed around 2008. Intracellular assays are more relevant as protein expression, drug susceptibility, membrane hindrance and acidic environment of the phagolysosome is closer to the *in vivo* conditions. It has been shown that axenic assays are more susceptible to drugs and yield more false-positive results (De Rycker et al., 2013). As a rule, hits in axenic assays must be confirmed by intracellular assays. Compounds or extracts must be active on axenic as well as intracellular assays to be of interest. In our case, among the 23 extracts active on the axenic form, only 19 are still active on the intracellular form. Among them, 2 extracts are less active on the intracellular parasites, 7 have an equivalent activity on both forms and 10 are between 5 and 80 times more active on the intracellular form. One could consider that cytotoxicity could account for such a biased interpretation, but the type monitoring of the assay (fluorescence levels compared to those of healthy macrophages) is supposed to avoid confusing antiparasitic effect with unspecific cytotoxic effect. Therefore, a higher specific activity on intracellular forms suggests an activation of the antileishmanial effect by the host cell, which is particularly interesting. Therefore, a subgroup of 3 extracts can be identified, being simultaneously i) specific against leishmania, ii) more active on intracellular from and iii) active with an $IC_{50} < 1$ μg/mL (intracellular form): *Capirona decorticans*, *Stachytarpheta cayennensis* and *Tessaria integrifolia*. *Capirona decorticans* is an important timber tree in the Peruvian Amazon. The bark of this tree is used by Chayauitas community to cure symptoms of cutaneous leishmaniasis (Estevez et al., 2007). In this previous work, a negligible antileishmanial activity on L. *amazonensis* was reported ($IC_{50} > 100$ μg/mL). In our work, the bark extract had a strong activity on L. *donovani* ($IC_{50} = 0.69 \pm 0.11$ μg/mL). *Stachytarpheta cayennensis* displayed a strong antileishmanial activity on L. *donovani* intramacrophagic amastigote form ($IC_{50} = 0.95 \pm 0.12$ μg/mL). In the literature, antileishmanial activity (L. *amazonensis*) was recently demonstrated for the butanolic fraction of an aqueous extract and this activity was associated with selective inhibition of the parasite arginase (Maquiaveli et al., 2016). Antimalarial as well as anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities were previously described, authors suggesting that these activities could be attributed to the main arylpropanoid and iridoid constituents (verbascoside, isoverbascoside and ipolamiide) (Froelich et al., 2008; Penido et al., 2006). *Tessaria integrifolia* was reported in Southern America with other traditional uses than those reported in our work. In the Andes, it is used against liver and kidney diseases (Monigatti et al., 2013). In Central Amazon, Yanesha population use it against liver and kidney pain, urinary inflammation, prostatic pain and throat pain (Valadeau et al., 2010). In our work, the extract of this species showed a strong leishmanicidal activity ($IC_{50} = 0.51 \pm 0.09$ μg/mL) close to miltefosine (0.44 nM, 0.18 μg/mL). Eudesmane-type sesquiterpenoids, with a strong cytotoxic activity against cancer cells, were identified in *T. integrifolia* (Minakawa et al., 2012; Ono et al., 2000). A last extract can also be considered of interest in this group: *Virola calophylla*. It is not significantly more active on intracellular forms, but is shows a strong activity on L. *donovani* intramacrophagic amastigote form ($IC_{50} = 0.70 \pm 0.06$ μg/mL). *Virola calophylla* is a tree widely used as traditional medicine in the Peruvian Amazon (Rengifo, 2007). Neolignans were isolated from this plant, however their antiprotozoal activity has not been tested (Martinez et al., 1990).

In the second group of 5 plants specifically active on *P. falciparum*, none was traditionally described as specific of malaria. *Alchornea triplinervia* presented a strong activity on *P. falciparum* ($IC_{50} = 0.38 \pm 0.03$ μg/mL). In Brazil, leaves and aerial parts are used traditionally in tea form to treat gastric disturbances. Ethyl acetate fraction showed an intense inhibition of H_2O_2 and NO production. It is supposed that such biological effect of *A. triplinervia* was related to the presence of phenolic compounds in the plant leaves (Mascia Lopes et al., 2010). *Dieffenbachia seguine* was very active on *P. falciparum* 3D7 strain and its activity was 70 times higher on W2 strain ($IC_{50} = 0.01 \pm 0.01$ μg/mL). *D. seguine* is used in the Peruvian Amazon as medicinal plant (Kvist et al., 2006; Rengifo, 2007), in spite of it toxicity (Arditti and Rodriguez, 1982; Fochtman et al., 1969; Ladeira et al., 1975). Chemistry of this species has been little explored so far (Walter and Khanna, 1972). *Hevea guianensis* displayed a strong activity on *P. falciparum* 3D7 after tannins filtration ($IC_{50} = 0.08 \pm 0.62$ μg/mL). Until now, no work related to the antiprotozoal activity and chemistry of this species existed, though studies are reported on the Hevea genus and principally on the *H. brasiliensis* latex (Jacob et al., 1993). To our knowledge, the two species *Tachigali polyphylla* and *Sloanea schomburgkii* were never reported as medicinal plants. For *T. polyphylla*, the removal of tannins decreased the activity by a factor 60, suggesting that tannins are responsible for a significant part of the activity. For *S. schomburgkii*, the bark extract displays a strong activity ($IC_{50} = 0.7$ μg/mL on W2), which is obviously not borne by tannins.

Noteworthy, among the 10 extracts tested on 3D7 as well as W2 strains (Table 3), 2 of them are less active on W2 (*H. guianensis* and *S. simplex*), most of them have equivalent activity on both strains and one of them is more active on W2 (*D. seguine*). This variety of results suggests that the assays have been properly performed and are discriminating. For extracts less active on W2, we can assume that their mechanism of action is similar to chloroquine or that the compounds are recognized by the parasite's efflux pumps. For extracts similarly active on 3D7 and W2, we assume that the mechanism(s) of action is/are different from quinolines. The extract more active on W2 is very intriguing and we cannot explain it.

In the third group of 5 plants either active on *P. falciparum* or L. *donovani*, the most active was the bark of *Maytenus macrocarpa*, which is commonly used in Peruvian traditional medicine, with a significant antiplasmodial activity equivalent on 3D7 and W2 strain ($IC_{50} = 0.02 \pm 0.01$ μg/mL). Surprisingly, the removal of tannins led to a 50 times increase of antiplasmodial activity. Activity on L. *donovani* was not as good though not negligible ($IC_{50} = 19.9$ μg/mL). This is not in accordance with a previous report on an hydro-alcoholic extract of the bark of this species, which had no activity on chloroquine resistant strain FCR-3 of *P. falciparum* (Ruiz et al., 2011). Dammaranes, nor-triterpenes, sesquiterpene polyol esters and lignans were isolated from *M. macrocarpa*, and some of these compounds showed an activity on cancer cells (Chávez et al., 2000, 1999; Spivey et al., 2002; Torpocco et al., 2007). Aerial parts of *Piper coruscans* are used as infusion in the Peruvian Amazon to treat malaria. Our study demonstrated that *P. coruscans* extract is active on *P. falciparum* 3D7 strain ($IC_{50} = 1.36 \pm 0.06$ μg/mL), however this activity decreases two times when tested against W2 strain. Cyclopentenediones from *P. coruscans* displaying significant antifungal activity against *Candida albicans* ($IC_{50} < 2$ μg/mL) have been isolated (Li et al., 2004). The bark extract from *Swartia simplex* after filtration exhibited a strong antiplasmodial activity on 3D7 strain ($IC_{50} = 0.07 \pm 0.01$ μg/mL), however was 10 time less active on W2 strain. Antiprotozoal activity of this species was not explored so far. Nevertheless diterpens displaying strong activity against *C. albicans* have been isolated from the roots of *S.* simplex and molluscicidal saponins have been isolated from the leaves (Borel et al., 1987; Favre-Godal et al., 2015).

Finally, according to our biological results (Table 2), the two most interesting extracts found in this work are *Costus curvibracteatus* (Costaceae) leaves and *Grias neuberthii* (Lecythidaceae) bark. These plants were active *in vitro* on the three tested parasites. As shown in Table 3, tannins cannot be responsible for any non-specific antiplasmodial activity. Also, concerning their antileishmanial activity, *G. neuberthii* is 6 times more active on the intracellular form without showing any cytotoxicity, confirming that the surprising increase of activity on the intracellular form is not due to an unspecific effect on the host cells. *C. curvibracteatus* is cytotoxic and this may account for the unique, 2-fold higher activity on intracellular form.

The tropical monocotyledonous family Costaceae belongs to the "gingers family" (Zingiberaceae, Costaceae, Cannaceae, Marantaceae).

Costus, the principal and largest genus, is pantotropical with its greatest diversity centered in the neotropics (*ca* 40 species); 25 species occur in tropical Africa and about 5 species in southeastern Asia (Specht et al., 2001). In Amazon the leaves of *C. curvibracteatus* are used against parasitic pains and inflammation (Rengifo, 2007). No chemical studies had been carried out on its constituents, however saponins, flavonols diglycosides and polysaccharides were identified in rhizomes, leaves and stems of *C. spitacus* (Da Silva et al., 2000, 1999; Pereira da Silva and Paz Parente, 2003). In other articles, anti-inflammatory, antinociceptive and toxicity activities were mentioned for *C. spitacus* and *C. pulverulentus* (Alonso-Castro et al., 2016; Quintans Junior et al., 2010). From the phylogenetic closeness between Costaceae and Zingiberaceae families we can assume a chemotaxonomic proximity. Two germacradiene alcohols isolated from *Reneilmia cincinnata* were reported to be active *in vitro* on *P. falciparum* D6 and W2 strains (Tchuendem et al., 1999). Diterpenes active on *Trypanosoma brucei brucei* were isolated from *Curcuma aromatica* (Schmidt et al., 2012). Two antiparasitic diterpenes have been isolated from *Aframonum spectrum*, one of them presenting a strong activity on L. *donovani* (IC_{50} = 5.7 μM) and a moderate activity on *T. brucei brucei* (IC_{50} = 35.7 μM) (Cheikh-Ali et al., 2011). The strong antiprotozoal activity of *C. curvibracteatus* initial extract on *P. falciparum* (IC_{50} = 3.02 ± 0.04 μg/mL) and L. *donovani* (IC_{50} = 8.47 ± 1.58 μg/mL) was concentrated in the aqueous fraction (Tables 2, 3). From the bibliographic references cited above, we can infer the presence of saponins in the aqueous extract. Such compounds would support the strong cytotoxicity observed against healthy cells (9.5 ± 0.8%) and therefore a selectivity index < 10 (Table 4).

Lecythidaceae family, known as the "Brazil nut family", is considered as the third most abundant phylogenic group of the Amazon with about 25 genera and 489 species (Mori et al., 2007, 1990). People in the Peruvian Amazon consume the fruit of *G. neuberthii* because of its very fatty mesocarp. Bark and leaves are traditionally used against leishmaniasis, malaria and other diseases (Rengifo, 2007). To our knowledge, there are neither studies carried out on the antiprotozoal activity from the *G. neuberthii* bark nor compounds isolated from this species. Phytochemical studies of Lecythidaceae plants are still scarce and are restricted to 21 species in thirteen genera (Oliveira et al., 2012). Chemical constituents identified in plants of the Lecythidaceae family include monoterpenoids, neoclerodane diterpenoids, sesquiterpenoids, pentacyclic triterpenoids and saponins, steroids, alkaloids, phenolic compounds, flavonoids, ellagic tannins, depsides with phenol-ester linkage like gustastatin (Oliveira et al., 2012; Pettit et al., 2004; Ragasa et al., 2012, 2011). Several pharmacological activities of extracts from plants of this family have been reported, such as antinociceptive, antibacterial, antitumoral, anti-inflammatory, antifungal, antileishmanial, antioxidant, hepatoprotective and cytotoxic (Bomba et al., 2015; Oliveira et al., 2012). Another study focused on the cytotoxic activity of the ethanol extract of *Lecythis pisonis* on colon cancer cells HCT-8 highlighting the presence of triterpenoids in the extract (Oliveira et al., 2012). The most representative species of Lecythidaceae family is *Bertholletia excelsa* (Brazil nut or *castanheira*), a typical plant from South America. The internal bark of the fruits is used in traditional medicine for the treatment of malaria (Oliveira et al., 2012). Phytochemical analysis of a stem bark extract from *B. excelsa* afforded several fractions with weak *in vitro* activity (75.4% growth inhibition of *T. cruzi* at 500 μg/mL) (Schmidt et al., 2012). In our study, bioguided fractionation of *G. neuberthii* revealed that ethyl acetate fraction concentrates the antiplasmodial activity and the butanol fraction concentrates the antileishmanial activity (Table 4). These results can be compared with previous studies where hydro-ethanolic extracts of *G. neuberthii* fruits were inactive against *P. falciparum* FCR-3 and 3D7 strains (Kvist et al., 2006; Ruiz et al., 2011). The low and medium polarity compounds conferring activity to the extracts could be terpenes, flavonoids or alkaloids. Moreover, no toxicity on healthy cells was found, giving a good selectivity index to these extracts (*P. falciparum* = 21.4 and L. *donovani* = 36.9), making them interesting for further exploration.

5. Conclusions

Results from our ethnopharmacological surveys and *in vitro* results corroborated the relevance of several of the traditional treatments based on the use of plants. The list of plants presented in this work provides a selection of candidates for antiprotozoal research, with the aim of isolating active components. The traditional use of plants and methods for treating diseases is part of the richness of the mixed culture of rural mestizos. These communities easily share this knowledge, making it a resource that should be respected and preserved with the creation of indigenous pharmacopeias. *Grias neuberthii* (Lecythidaceae) and *Costus curvibracteatus* (Costaceae) have a high potential of providing active principles due to their strong antiprotozoal activity shown on this work. Further isolation and structural identification of active compounds will be performed in our laboratory.

Acknowledgments

The authors thank the Consejo de Ciencia y Tecnología del Perú (CONCYTEC) (*Council for science and technology of Peru*) (299 - 2014 - FONDECYT) for the Ph.D. scholarship (PGVO). Authors are indebted to the communities cited in this work for their essential contribution in order to spread their ancestral knowledge in favor of science. We also appreciate the important collaboration of Lizardo Fachin Malaverri, Stéphanie Denis, Dennis del Castillo Torres and Juan Vásquez Briones.

References

Alonso-Castro, A.J., Zapata-Morales, J.R., González-Chávez, M.M., Carranza-Álvarez, C., Hernández-Benavides, D.M., Hernández-Morales, A., 2016. Pharmacological effects and toxicity of *Costus pulverulentus* C. Presl (Costaceae). J. Ethnopharmacol. 180, 124–130. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.011.

Alroy, K.A., Huang, C., Gilman, R.H., Quispe-Machaca, V.R., Marks, M.A., Ancca-Juarez, J., Hillyard, M., Verastegui, M., Sanchez, G., Cabrera, L., Vidal, E., Billig, E.M.W., Cama, V.A., Náquira, C., Bern, C., Levy, M.Z., Working Group on Chagas Disease in Peru, 2015. Prevalence and transmission of *Trypanosoma cruzi* in people of rural communities of the high jungle of northern Peru. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0003779. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003779.

Arditti, J., Rodriguez, E., 1982. *Dieffenbachia*: uses, abuses and toxic constituents: a review. J. Ethnopharmacol. 5, 293–302. http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(82)90015-0.

Balaraman, K., Vieira, N.C., Moussa, F., Vacus, J., Cojean, S., Pomel, S., Bories, C., Figadere, B., Kesavan, V., Loiseau, P.M., 2015. In vitro and in vivo antileishmanial properties of a 2-n-propylquinoline hydroxypropyl beta-cyclodextrin formulation and pharmacokinetics via intravenous route. Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacother. 76, 127–133. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.10.028.

Barrett, M.P., Croft, S.L., 2012. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. Br. Med. Bull. 104, 175–196. http://dx.doi.org/10.1093/bmb/lds031.

Bomba, F.D.T., Wandji, B.A., Piegang, B.N., Awouafack, M.D., Sriram, D., Yogeeswari, P., Kamanyi, A., Nguelefack, T.B., 2015. Antinociceptive properties of the aqueous and methanol extracts of the stem bark of *Petersianthus macrocarpus* (P. Beauv.) Liben (Lecythidaceae) in mice. J. Ethnopharmacol. 174, 66–73. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.004.

Borel, C., Gupta, M.P., Hostettmann, K., 1987. Molluscicidal saponins from *Swartzia simplex*. Phytochemistry 26, 2685–2689. http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83572-4.

Bussmann, R.W., Sharon, D., 2014. Two decades of ethnobotanical research in southern Ecuador and northern Peru. Ethnobiol. Conserv. 3, 1–50. http://dx.doi.org/10.15451/49.

Centers for Disease Control and Prevention, 2017. Malaria Parasites.

Chávez, H., Callo, N., Estévez-Braun, A., Ravelo, A.G., González, A.G., 1999. Sesquiterpene polyol esters from the leaves of *Maytenus macrocarpa*. J. Nat. Prod. 62, 1576–1577. http://dx.doi.org/10.1021/np990232f.

Chávez, H., Rodríguez, G., Estévez-Braun, A., Ravelo, Á.G., Estévez-Reyes, R., González, A.G., Fdez-Puente, J.L., García-Grávalos, D., 2000. Macrocarpins A–D, new cytotoxic nor-triterpenes from Maytenus macrocarpa. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 759–762. http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00082-2.

Cheikh-Ali, Z., Okpekon, T., Roblot, F., Bories, C., Cardao, M., Jullian, J.-C., Poupon, E., Champy, P., 2011. Labdane diterpenoids from *Aframomum sceptrum*: nmr study and antiparasitic activities. Phytochem. Lett. 4, 240–244. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.006.

Da Silva, B.P., Bernardo, R.R., Parente, J.P., 2000. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. Phytochemistry 53, 87–92. http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00441-0.

Da Silva, B.P., Bernardo, R.R., Parente, J.P., 1999. A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. Phytochemistry 51, 931–935.

De Rycker, M., Hallyburton, I., Thomas, J., Campbell, L., Wyllie, S., Joshi, D., Cameron, S., Gilbert, I.H., Wyatt, P.G., Frearson, J.A., Fairlamb, A.H., Gray, D.W., 2013. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2913–2922. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02398-12.

Estevez, Y., Castillo, D., Pisango, M.T., Arevalo, J., Rojas, R., Alban, J., Deharo, E., Bourdy, G., Sauvain, M., 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. J. Ethnopharmacol. 114, 254–259. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.007.

Favre-Godal, Q., Dorsaz, S., Queiroz, E.F., Marcourt, L., Ebrahimi, S.N., Allard, P.-M., Voinesco, F., Hamburger, M., Gupta, M.P., Gindro, K., Sanglard, D., Wolfender, J.-L., 2015. Anti-candida cassane-type diterpenoids from the root bark of *Swartzia simplex*. J. Nat. Prod. 78, 2994–3004. http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00744.

Fochtman, F.W., Manno, J.E., Winek, C.L., Cooper, J.A., 1969. Toxicity of the genus *Dieffenbachia*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 15, 38–45. http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(69)90129-X.

Froelich, S., Gupta, M.P., Siems, K., Jenett-Siems, K., 2008. Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. Rev. Bras. Farmacogn. 18, 517–520. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400003.

Jacob, J.-L., d'Auzac, J., Prevôt, J.-C., 1993. The composition of natural latex from *Hevea brasiliensis*. Clin. Rev. Allergy 11, 325. http://dx.doi.org/10.1007/BF02914415.

Klug, D.M., Gelb, M.H., Pollastri, M.P., 2016. Repurposing strategies for tropical disease drug discovery. Bioorg. Med. Chem. Lett. 26, 2569–2576. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.103.

Komlaga, G., Cojean, S., Dickson, R.A., Beniddir, M.A., Suyyagh-Albouz, S., Mensah, M.L.K., Agyare, C., Champy, P., Loiseau, P.M., 2016. Antiplasmodial activity of selected medicinal plants used to treat malaria in Ghana. Parasitol. Res. 115, 3185–3195. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5080-8.

Kvist, L.P., Christensen, S.B., Rasmussen, H.B., Mejia, K., Gonzalez, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. J. Ethnopharmacol. 106, 390–402. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.020.

Ladeira, Â.M., Andrade, S.O., Sawaya, P., 1975. Studies on *Dieffenbachia picta* Schott: toxic effects in guinea pigs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 34, 363–373. http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(75)90132-5.

Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J. Parasitol. 65, 418–420.

Li, X.-C., Ferreira, D., Jacob, M.R., Zhang, Q., Khan, S.I., ElSohly, H.N., Nagle, D.G., Smillie, T.J., Khan, I.A., Walker, L.A., Clark, A.M., 2004. Antifungal cyclopentenediones from *Piper coruscans*. J. Am. Chem. Soc. 126, 6872–6873. http://dx.doi.org/10.1021/ja048081c.

Maquiaveli, C.doC., Oliveira e Sá, A.M., Vieira, P.C., da Silva, E.R., 2016. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. J. Ethnopharmacol. 192, 108–113. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.044.

Marsden, P.D., 1986. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80, 859–876.

Martinez, J.C., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 1990. Arylnaphthalene neolignans from *Virola calophylla*. Phytochemistry 29, 2655–2657. http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)85206-U.

Mascia Lopes, F.C., Calvo, T.R., Vilegas, W., Carlos, I.Z., 2010. Anti-inflammatory activity of *Alchornea triplinervia* ethyl acetate fraction: inhibition of H2O2, NO and TNF-α. Pharm. Biol. 48, 1320–1327. http://dx.doi.org/10.3109/13880201003747463.

McCall, L.-I., McKerrow, J.H., 2014. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. Trends Parasitol. 30, 342–349. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.05.001.

Minakawa, T., Toume, K., Arai, M.A., Sadhu, S.K., Ahmed, F., Ishibashi, M., 2012. Eudesmane-type sesquiterpenoid and guaianolides from *Kandelia candel* in a screening program for compounds to overcome TRAIL resistance. J. Nat. Prod. 75, 1431–1435. http://dx.doi.org/10.1021/np300179c.

Ministerio de Salud del Perú, 2016. Casos de malaria por departamentos Perú2016*.

Ministerio de Salud del Perú, 2015. Situación epidemiológica de la leishmaniasis en el Perú, I semestre 2015 (SE 26).

Monigatti, M., Bussmann, R.W., Weckerle, C.S., 2013. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. J. Ethnopharmacol. 145, 450–464. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.066.

Mori, S.A., Prance, G.T., de Zeeuw, Carl H., 1990. Lecythidaceae, Part 2. The zygomorphic-flowered new world genera (Couroupita, Corythophora, Bertholletia, Couratari, Eschweilera, & Lecythis), with a study of secondary xylem of neotropical Lecythidaceae. Flora Neotrop. 21, 1–373.

Mori, S.A., Tsou, C.-H., Wu, C.-C., Cronholm, B., Anderberg, A.A., 2007. Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: information from combined ndhF and trnL-F sequence data. Am. J. Bot. 94, 289–301. http://dx.doi.org/10.3732/ajb.94.3.289.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63. http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Oliveira, J.P.C., Ferreira, É.L.F., Chaves, M.H., Militão, G.C.G., Júnior, V., Costa, G.M., Pessoa, A. de M., Moraes, C. do Ó., de, M.O., Costa-Lotufo, L.V., 2012. Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. Rev. Bras. Farmacogn. 22, 1140–1144. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000053.

Ono, M., Masuoka, C., Odake, Y., Ito, Y., Nohara, T., 2000. Eudesmane derivatives from *Tessaria integrifolia*. Phytochemistry 53, 479–484. http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00580-4.

Penido, C., Costa, K.A., Futuro, D.O., Paiva, S.R., Kaplan, M.A.C., Figueiredo, M.R., Henriques, M.G.M.O., 2006. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. J. Ethnopharmacol. 104, 225–233. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.006.

Pereira da Silva, B., Paz Parente, J., 2003. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. Carbohydr. Polym. 51, 239–242. http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00215-1.

Pettit, G.R., Zhang, Q., Pinilla, V., Herald, D.L., Doubek, D.L., Duke, J.A., 2004. Isolation and structure of gustastatin from the Brazilian nut tree *Gustavia hexapetala*. J. Nat. Prod. 67, 983–985. http://dx.doi.org/10.1021/np030509i.

Pomel, S., Dubar, F., Forge, D., Loiseau, P.M., Biot, C., 2015. New heterocyclic compounds: synthesis and antitrypanosomal properties. New Dev. Anti-infectives Res. 23, 5168–5174. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.029.

Quintans Junior, L.J., Santana, M.T., Melo, M.S., de Sousa, D.P., Santos, I.S., Siqueira, R.S., Lima, T.C., Silveira, G.O., Antoniolli, A.R., Ribeiro, L.A.A., Santos, M.R.V., 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. Pharm. Biol. 48, 1097–1102. http://dx.doi.org/10.3109/13880200903501822.

Ragasa, C.Y., Espineli, D.L., Shen, C.-C., 2012. A new triterpene from *Barringtonia asiatica*. Nat. Prod. Res. 26, 1869–1875. http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.619187.

Ragasa, C.Y., Espineli, D.L., Shen, C.-C., 2011. New triterpenes from *Barringtonia asiatica*. Chem. Pharm. Bull. 59, 778–782. http://dx.doi.org/10.1248/cpb.59.778.

Rengifo, E., 2007. Las ramas floridas del bosque, experiencias en el manejo de plantas medicinales amazónicas. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Iquitos.

Ruiz, L., Ruiz, L., Maco, M., Cobos, M., Gutierrez-Choquevilca, A.-L., Roumy, V., 2011. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. J. Ethnopharmacol. 133, 917–921. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.039.

Schmidt, T.J., Khalid, S.A., Romanha, A.J., Alves, T.M., Biavatti, M.W., Brun, R., Da Costa, F.B., de Castro, S.L., Ferreira, V.F., de Lacerda, M.V.G., Lago, J.H.G., Leon, L.L., Lopes, N.P., das Neves Amorim, R.C., Niehues, M., Ogungbe, I.V., Pohlit, A.M., Scotti, M.T., Setzer, W.N., de N C Soeiro, M., Steindel, M., Tempone, A.G., 2012. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases -part I. Curr. Med. Chem. 19, 2128–2175. http://dx.doi.org/10.2174/092986712800229023.

Schwartz, E., Hatz, C., Blum, J., 2006. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. Lancet Infect. Dis. 6, 342–349. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70492-3.

Simarro, P.P., Cecchi, G., Franco, J.R., Paone, M., Diarra, A., Ruiz-Postigo, J.A., Fèvre, E.M., Mattioli, R.C., Jannin, J.G., 2012. Estimating and mapping the population at risk of sleeping sickness. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1859. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001859.

Specht, C.D., Kress, W.J., Stevenson, D.W., DeSalle, R., 2001. A molecular phylogeny of costaceae (Zingiberales). Mol. Phylogenet. Evol. 21, 333–345. http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2001.1029.

Spivey, A.C., Weston, M., Woodhead, S., 2002. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. Chem. Soc. Rev. 31, 43–59. http://dx.doi.org/10.1039/B000678P.

Tchuendem, M.H.K., Mbah, J.A., Tsopmo, A., Foyere Ayafor, J., Sterner, O., Okunjic, C.C., Iwu, M.M., Schuster, B.M., 1999. Anti-plasmodial sesquiterpenoids from the African *Reneilmia cincinnata*. Phytochemistry 52, 1095–1099. http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00344-1.

Torpocco, V., Chavez, H., Estevez-Braun, A., Ravelo, A.G., 2007. New dammarane triterpenes from *Maytenus macrocarpa*. Chem. Pharm. Bull. 55, 812–814. http://dx.doi.org/10.1248/cpb.55.812.

Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673–675. http://dx.doi.org/10.1126/science.781840.

Valadeau, C., Castillo, J.A., Sauvain, M., Lores, A.F., Bourdy, G., 2010. The rainbow hurts my skin: medicinal concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. J. Ethnopharmacol. 127, 175–192. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.024.

Walter, W.G., Khanna, P.N., 1972. Chemistry of the Aroids I. *Dieffenbachia seguine, amoena* and *picta*. Econ. Bot. 26, 364–372.

World Health Organization, 2016a. Fact Sheet: World Malaria Report 2016. (WWW Document) (accessed 13 December 2016). http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2016/en/.

World Health Organization, 2016b. Tropical Diseases. WHO(WWW Document) (URL: ⟨www.who.int/topics/tropical_diseases/en/⟩) (accessed 7 February 2016).

World Health Organization, 2015a. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Releve Epidemiol. Hebd. 90, 33–43.

World Health Organization, 2015b. Neglected Tropical Diseases (WWW Document). WHO (accessed 12 January 2015). http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.

Zucca, M., Scutera, S., Savoia, D., 2013. New chemotherapeutic strategies against malaria, leishmaniasis and trypanosomiases. Curr. Med. Chem. 20, 502–526. http://dx.doi.org/10.2174/0929867311320040003.

2.3. Commentaires et discussion

2.3.1. Contexte du travail

Le Pérou est un pays hétérogène non seulement du point de vue géographique et climatique mais aussi humain. De grandes disparités existent sur le plan culturel, social et économique et par conséquent l'accès aux services de santé et d'éducation est très inégal. Ce contexte détermine de multiples scénarios d'exposition au risque de maladies parasitaires notamment. Le risque de contracter ces maladies est associé aux caractéristiques sociales, économiques et écologiques du lieu de résidence et lorsque ces facteurs sont combinés ils favorisent la transmission de la maladie (Ministerio de Salud del Perú, 2016b). Les cas d'infections par des parasites sont les plus fréquents dans les petits villages très éloignés des centres-villes et des grands hôpitaux et isolés par les rivières qui les entourent. L'utilisation des plantes médicinales comme traitement de première intention y perdure largement. Par exemple, dans la pratique traditionnelle, les premiers symptômes de fièvres liées au paludisme sont combattus grâce à des Malvacées sylvestres, et des préparations à base d'écorce d'arbres sont utilisées pour contribuer à la cicatrisation de la leishmaniose cutanée.

2.3.2. Enquêtes ethnopharmacologiques

Un programme d'ethnopharmacologie mis en œuvre dans une région particulière se déroule en trois étapes: un travail de terrain destiné à recenser les savoirs thérapeutiques, puis un travail en laboratoire visant à évaluer l'efficacité thérapeutique des remèdes traditionnels; et enfin un programme de développement de médicaments traditionnels préparés avec des plantes cultivées ou récoltées localement (SFE, 2018). Dans le cadre de ce travail nous suivons ce schéma afin des pouvoir établir une liste des plantes utiles.

Les enquêtes se sont déroulées dans deux communautés de Métis de l'Amazonie péruvienne. Deux questions se posent immédiatement : pourquoi interroger des Métis et comment réaliser ces enquêtes ? Concernant l'aspect ethnologique, l'emploi des termes « métis » et « métissage » a tellement évolué depuis l'époque coloniale qu'à présent un métis n'est plus considéré comme issu d'une relation entre un européen et une indienne (Schmidt, 2003). Cette évolution de la terminologie, considérée comme positive, suggère une certaine

approche sociale et culturelle des communautés de Métis. Nous avons décidé de travailler avec deux communautés, *El Dorado* et *13 de Febrero*, qui sont situées à proximité de la ville d'Iquitos sur la seule route pavée qui relie Iquitos à Nauta.

Concernant les aspects pratiques, ces enquêtes datent de l'année 2008, et ont été complétées au cours de l'année 2015 (interrogatoire, reconnaissance des plantes). Bien que dans ces communautés existent souvent un *curandero*, les sujets interrogés étaient l'ensemble des villageois. La communication s'est déroulée parfaitement, car ils parlent l'espagnol couramment et ont un certain degré de connaissances à propos des maladies étudiées. Tout cela nous a permis des créer un tableau des usages et préparations traditionnelles des 46 plantes médicinales.

2.3.3. Collecte des plantes

Les communautés où nous avons fait les enquêtes, sont situées à côté de la réserve nationale protégée *Allapahuayo Mishana*. Ces populations sont établies dans cette zone depuis longtemps, même avant la classification de ce territoire comme réserve. Afin de remédier aux difficultés rencontrées au cours de ce travail, comme l'obtention d'un droit de collecte dans la réserve nationale protégée *Allpahuayo Mishana* ainsi que l'identification botanique des espèces, nous avons décidé de collecter ces plantes dans deux endroits différents : sur la route Iquitos-Nauta, à proximité de ces communautés et dans un jardin appartenant au Centre de Recherche de l'Amazonie péruvienne (Instituto de investigaciones de la Amazonía Peruana - IIAP). L'identification de nos plantes a été réalisée par des botanistes au Muséum d'Histoire Naturelle de l'Université de San Marcos (UNMSM) à Lima.

2.3.4. Résultats-Discussion

Nous avons décidé pour des raisons de disponibilités des souches d'évaluer l'activité des extraits des plantes mentionnées sur trois parasites : *Plasmodium falciparum* (souches sensible et résistante), *Leishmania donovani* et *Trypanosoma brucei brucei gambiense*. Néanmoins ces parasites ne sont pas les parasites responsables de la plupart des cas d'infections parasitaires au Pérou voire ne se trouvent pas en Amérique : au Pérou, le paludisme est causé principalement par *P. vivax*, les leishmanioses cutanées par *L. mexicana*,

et *L. amazonensis*, les leishmanioses muco-cutanées par *L. peruviana*, *L. braziliensis* et *L. guyanensis* et la trypanosomiase par *T. cruzi* (Ministerio de Salud del Perú, 2015). Les parasites de la leishmaniose et la trypanosomiase partagent en partie des caractéristiques structurelles et biochimiques. L'analyse récente de leurs séquences génomiques a identifié des voies métaboliques communes, permettant une meilleure compréhension de leur pathogénie et a initié la recherche sur des cibles biochimiques/moléculaires communes pour des futurs médicaments (Barrett and Croft, 2012). Trouver des médicaments actifs sur un de ces parasites, et *a fortiori* sur une de leurs souches, peut contribuer à la découverte de traitement efficace pour d'autres souches ou d'autres espèces de la famille des Kinetoplastidae.

Dans le cadre de ce travail, deux extraits éthanoliques se sont distingués : l'extrait éthanolique des feuilles de *Costus curvibracteatus* (Costaceae), et l'extrait d'écorces de *Grias neuberthii* (Lecythidaceae). Ces extraits présentent une forte activité antipaludique (souches sensible et résistante) et leishmanicide ainsi qu'une activité moyenne sur trypanosome. Les tanins, susceptibles d'être abondants dans les écorces, ne sont pas responsables de l'activité de l'extrait de *G. neuberthii* car ces derniers ont été retirés par filtration sur polyamide. Pour ces deux plantes une extraction liquide-liquide a été réalisée, donnant déjà une idée de la répartition des produits actifs en fonction de leur polarité. Les fractions acétate d'éthyle et butanol de *G. neuberthii* montrent une activité antiplasmodiale de 0.58 ± 0.07 µg/mL et une activité leishmanicide de 1.30 ± 0.11 µg/mL respectivement. Ces deux extraits montrent une cytotoxicité modérée et par conséquent des indices de sélectivité (21 et 37 respectivement) supérieurs aux autres extraits testés. L'activité sur *T. b. gambiense* était modérée et n'a pas été explorée plus avant. L'extrait aqueux de *C. curvibracteatus* a montré une activité antiplasmodiale et leishmanicide, IC_{50} = 3.02 ± 0.4 et 8.47 ± 1.58 µg/mL respectivement, cependant la cytotoxicité de cet extrait est très élevée, donnant un indice de sélectivité très bas de 6 et 1. La proximité chimiotaxonomique de la famille des Costaceae avec la famille des Zingiberaceae suggère la présence de saponosides dans l'extrait, qui sont vraisemblablement responsables de l'activité biologique de l'extrait de *C. curvibracteatus*. Cette hypothèse est renforcée par les premiers résultats par spectrométrie de masse de l'extrait (données non montrés dans l'article), indiquant des masses élevées de m/z > 800. L'activité moyenne sur *T.b. gambiense* de l'extrait éthanolique peut aussi être expliquée par la présence de ce genre de produits. Aucune de ces deux plantes n'ont jusqu'à présent pas été étudiées du point de vue chimique.

Conclusion du Chapitre 1

Ce travail a permis de mettre en évidence deux plantes actives contre trois parasites différents et plusieurs plantes actives contre un ou deux parasites. Malgré les activités notables remarquées dans cette étude pour deux plantes, ces dernières n'ont pas été utilisées dans la suite de ce travail. En effet, *C. curvibracteatus* présente une forte activité cytotoxique liée probablement aux saponosides. Concernant *G. neubertii*, les résultats n'ont pas pu être reproduits et lors d'une deuxième collecte des écorces de *G. neuberthii*, l'activité a diminué d'un facteur 100 alors que le profil chimique évalué par LC-MS était identique.

La suite de ce travail consiste en le développement d'une méthode adaptée pour identifier rapidement des produits actifs antiplasmodiaux directement dans les extraits. Nous avons donc décidé de travailler avec *Piper coruscans* (Piperaceae), plante utilisée en Amazonie péruvienne pour la phase de fièvre du paludisme. L'extrait éthanolique de la partie aérienne de cette plante montre une forte activité antiplasmodiale *in vitro* avec des IC_{50} de 1.36 ± 0.06 et 2.33 ± 0.26 µg/mL, contre les souches sensible et résistante respectivement. Étant donné que la famille des Piperacées a été largement travaillée sur le plan chimique, nous avons également choisi cette plante dans l'espoir de pouvoir réaliser une déréplication rapide de l'extrait.

Chapitre 2 : Le paludisme et les interactions intermoléculaires par spectrométrie de masse

1 Le paludisme

1.1 Cycle du Plasmodium et vecteur du paludisme

Le paludisme est transmis par la piqûre des moustiques femelles du genre *Anopheles* infectées par *Plasmodium spp*. Pour leur repas sanguin, les moustiques cherchent un espace vasculaire et injectent en quelques instants, dans leur salive anticoagulante, environ 8-15 sporozoïtes, parfois jusqu'à 100. Cette étape est dite infectieuse et mobile (Cook and Zumla, 2003). Pendant la phase suivante dite pré-érythrocytaire, les sporozoïtes se déplacent *via* le système sanguin et entrent dans les hépatocytes (**Figure 3**). Entre 30 et 60 minutes après la piqûre du moustique, tous les sporozoïtes sont entrés dans les hépatocytes ou ont été dégradés. Chaque sporozoïte introduit dans les hépatocytes commence alors une phase de reproduction asexuée (fissions multiples ou schizogonie). Cette étape dure en moyenne 6-7 jours pour *P. falciparum* et 15 jours pour *P. malariae*, avant la rupture des schizontes hépatiques qui libèrent les mérozoïtes dans la circulation sanguine (Phillips et al., 2017). À l'intérieur de l'hépatocyte, un seul sporozoïte peut produire des dizaines de milliers de mérozoïtes qui, une fois dans la circulation sanguine, pénètrent dans les érythrocytes pour se reproduire (Cook and Zumla, 2003; Phillips et al., 2017). Cette étape est appelée phase érythrocytaire asexuée et se déroule chez les humains ou d'autres hôtes vertébrés (Miller et al., 1994). L'attachement des mérozoïtes aux parois érythrocytaires se fait par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique localisé dans le micronème du mérozoïte. Dans *P. vivax* ces protéines sont liées à l'antigène Duffy (Fy^a ou Fy^b) (Miller et al., 1976). Dans *P. vivax* et *P. ovale*, l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes peut être retardée de plusieurs mois ou années si des hypnozoïtes se forment (phase dormante) (CDC, 2018; Phillips et al., 2017).

Pendant la première étape de développement de la phase sanguine (entre 24 et 72 heures selon l'espèce), les petites formes anneaux des quatre espèces de *Plasmodium*, apparaissent souvent similaires sous le microscope (Cook and Zumla, 2003). Une partie des formes anneaux se différencie dans le sang et mûrit en gamétocytes mâles et femelle. Ce processus (gamétocytogonie) dure environ 4 jours chez *P. vivax* et de 10 jours chez *P. falciparum* (Phillips et al., 2017). C'est lors de cette étape que le parasite infecte le moustique vecteur lors d'un repas sanguin sur l'hôte (Baker, 2010; Waters, 2016). Seuls les gamètes matures sont infectieux. Ces derniers persistent pendant une semaine dans la circuation.

Dans l'intestin du moustique les gamétocytes mâles subissent une division nucléaire rapide et chacun des huit noyaux formés s'orne d'un flagelle (20-25 µm de long). Les microgamètes mâles mobiles se séparent alors et cherchent les macrogamètes femelles. La fusion et la méiose ont alors lieu pour former un zygote. Pendant une courte période le parasite du paludisme devient diploïde. Au bout de 24 heures de croissance, le zygote devient mobile et cette forme, l'ookinète, pénètre la paroi de l'intestin moyen chez le moustique où il s'enkyste en un oocyste. L'oocyste éclate finalement pour libérer des myriades de sporozoïtes dans la cavité cœlomique du moustique. Les sporozoïtes migrent alors au niveau des glandes salivaires pour attendre leur inoculation dans un hôte humain lors d'un prochain repas sanguin du moustique vecteur (Cook and Zumla, 2003).

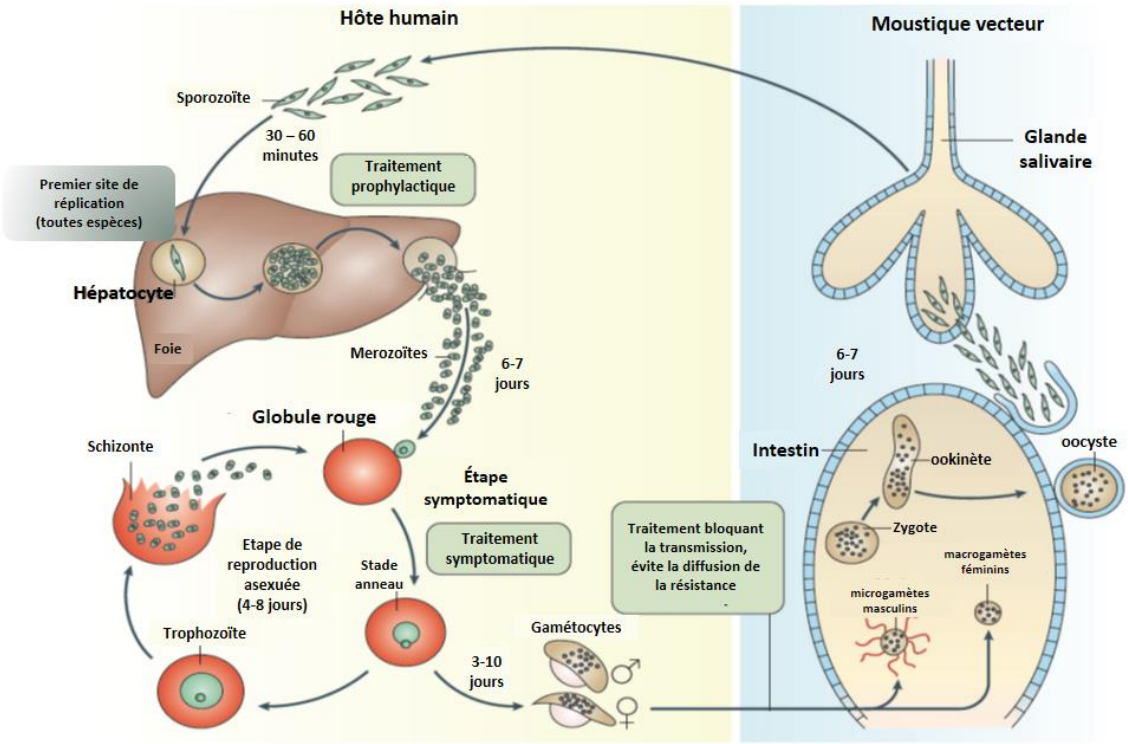


Figure 3. Cycle de vie du *Plasmodium sp* (Phillips et al., 2017).

Pour soutenir sa croissance et sa reproduction pendant la phase trophozoïte, les parasites infectent de grandes quantités d'érythrocytes et se developpent dans une vacuole parasitophore où ils digèrent l'hémoglobine, dans un organelle acide spécialisée appelé vacuole digestive (VD) ou vacuole alimentaire (**Figure 4**) (Goldberg, 2005; Olliaro and Goldberg, 1995). Le parasite ne semble apparemment pas dégrader d'autres macromolécules

que l'hémoglobine lors de son cycle intra érythrocytaire (Francis et al., 1997; Goldberg et al., 1990). De grandes vacuoles contenant des pigments ont été d'abord décrites dans les études de microscopie électronique des coupes minces de *P. knowlesi* en 1956 (Fulton and Flewett, 1956) et le rôle de cette structure dans la digestion de l'hémoglobine a été suggéré pour la première fois en 1957 (Rudzinska and Trager, 1957). La VD parasitaire présente un environnement complexe (Kapishnikov et al., 2013). Elle comprend des interfaces de membrane, une solution aqueuse acide de pH 4.8 - 5.5 (Gligorijevic et al., 2006) et des lipides, surtout mono- et diglycérides, résultant de la dégradation des membranes de la vésicule de transport qui fait pénétrer l'hémoglobine dans la VD (Egan, 2008; Kapishnikov et al., 2013, 2012a, 2012b; Pisciotta et al., 2007).

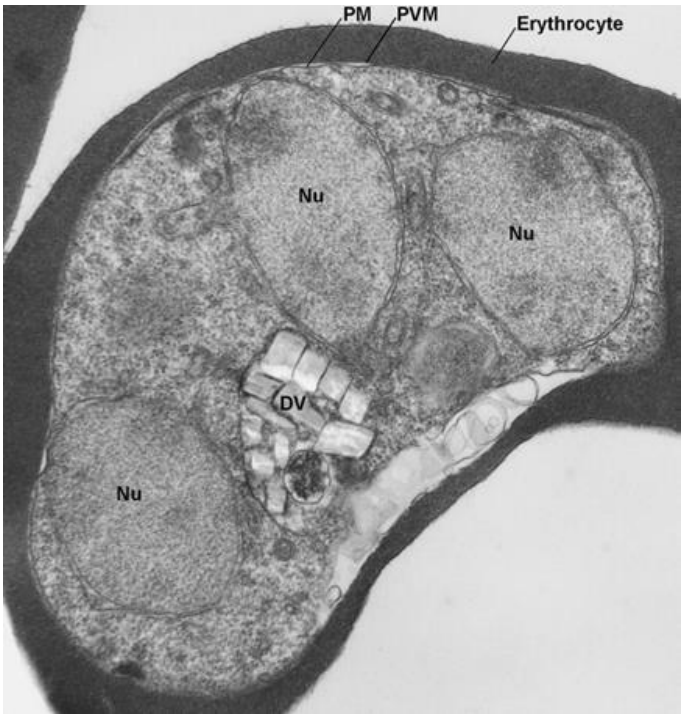


Figure 4. Image de microscopie électronique d'un érythrocyte infecté par *P. falciparum* à la phase schizonte contenant une vacuole digestive avec des cristaux d'hémozoïne (Wunderlich et al., 2012). Nu : Noyau ; DV : vacuole digestive ; PM : membrane cellulaire du parasite; PVM : *membrane* de la *vacuole parasitophore.*

Les parasites sont transmis aux humains par une quarantaine d'espèces de moustique exclusivement du genre *Anopheles* (du grec blessant, nuisible) (Bhatt et al., 2015). Le développement du parasite chez le moustique est nommé sporogonie et prend entre 8 et 35

jours selon la température ambiante et les espèces de parasites et de moustiques (Cook and Zumla, 2003). La capacité vectorielle des différentes espèces d'*Anopheles*, c'est à dire leur capacité à transmettre les parasites, est déterminée par des éléments multiples de la biologie du moustique. Ceux-ci incluent la longévité, les préférences d'alimentation pour le sang, les réactions immunitaires aux parasites et la densité de la population du moustique. Cette dernière est en grande partie déterminée par le succès reproducteur du moustique. La connaissance de la biologie reproductrice de ce genre de moustique provient principalement d'études sur *Anopheles gambiae*, le vecteur primaire du paludisme en Afrique (Mitchell et al., 2015).

Pendant l'accouplement d'*Anopheles spp*., les mâles transfèrent de grandes quantités d'hormone stéroïdienne 20-hydroxyecdysone (20E) aux femelles et la présence de cette hormone a été associée aux conditions favorables pour le développement de *Plasmodium spp* (Mitchell et al., 2015; Phillips et al., 2017). L'augmentation de l'oogenèse est obtenue par l'intermédiaire des transporteurs du lipide vitellogénique qui sont aussi régulés par les niveaux inférieurs de 20E produit par la femelle après un repas sanguin (Bai et al., 2010). De façon intéressante, ces transporteurs de lipides facilitent le développement de *Plasmodium* en réduisant la capacité de tuer le parasite par le système immunitaire du moustique, fournissant un lien entre les processus reproducteurs et immunitaires (Rono et al., 2010).

La transmission du paludisme ne se produit qu'à des températures comprises entre 16°C et 33°C et à des altitudes inférieures à 2 000 mètres car au-dessus de cette altitude, la sporogonie ne peut pas avoir lieu. Les conditions optimales pour la transmission sont une forte humidité et une température ambiante entre 20 et 30 °C (Cook and Zumla, 2003; Peters, 1989).

Les femelles adultes pondent entre 50-200 œufs par oviposition. Les œufs sont déposés séparément directement sur l'eau et présentent la caractéristique d'avoir de chaque côté des flotteurs leur permettant de rester à la surface. Les œufs ne sont pas résistants à la sécheresse et l'éclosion a lieu au bout de 2-3 jours, bien que l'incubation puisse prendre entre 2 et 3 semaines dans des climats plus froids (CDC, 2018). Une divergence considérable dans les phénotypes d'*Anopheles* a été étudiée à travers neuf espèces géographiquement dispersées et qui recouvrent trois de ses sous-genres majeurs (*Cellia*, *Anopheles*, et *Nyssorhynchus*). Cela inclut les vecteurs du paludisme les plus pertinents et comprend une gamme de distances

évolutionnaires par rapport à *A. gambiae* (Mitchell et al., 2015; Neafsey et al., 2015)(**Figure 5**).

Une des alternatives pour l'éradication du paludisme est la lutte contre le vecteur en utilisant des insecticides. Cependant des résistances à de multiples classes d'insecticides ont déjà été rapportées, y compris les organophosphorés, par exemple pour les cas d'*Anopheles albimanus* en Amérique Latine (Liebman et al., 2015).

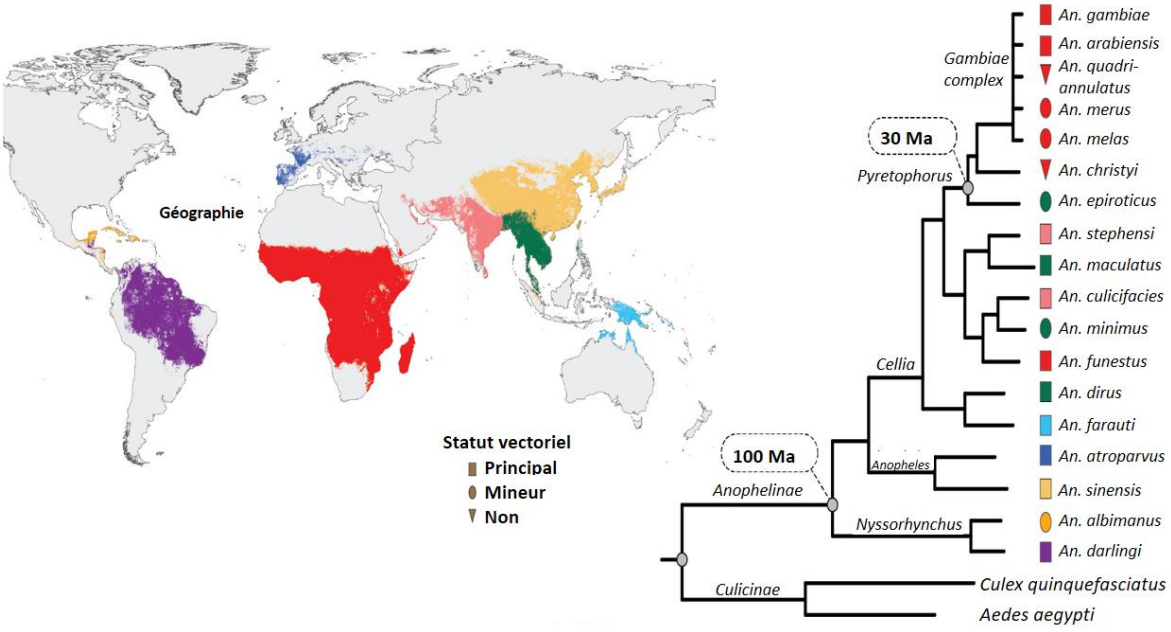


Figure 5. Géographie, statut vectoriel, phylogénie moléculaire, orthologie et aliénabilité génomique chez les *Anopheles* (Neafsey et al., 2015).

1.2 La découverte de nouvelles molécules antiplasmodiales et antipaludiques

Guidés par les connaissances ancestrales de l'ethnobotanique sud-américaine et chinoise, des pharmaciens ont isolé, à partir d'extraits de plantes médicinales soulageant les fièvres, deux classes majeures d'antipaludiques : la quinine et l'artémisinine (Wells et al., 2015). L'usage pendant des décennies de ces molécules ont conduit à des résistances qui imposent leur association ou la recherche de nouvelles molécules (**Figure 6**). Diverses stratégies sont disponibles pour la découverte et le développement de nouveaux médicaments antipaludiques. Une stratégie commune consiste à tester de grandes bibliothèques chimiques sur des cultures *in vitro* de *Plasmodium spp*., typiquement en testant

l'inhibition de la croissance parasitaire (Vallières and Avery, 2017). Des efforts ont été faits aussi pour améliorer les molécules qui sont actuellement disponibles, par exemple, en modifiant leur squelette pour améliorer leur efficacité contre les parasites qui ont acquis une résistance au squelette parental. Avec cette approche, la dernière décennie a vu une transformation de cette classe thérapeutique, avec environ une douzaine de nouvelles entités chimiques entrant en phase de développement clinique (Engwerda et al., 2012). Parmi ces composés, beaucoup ont été découverts en utilisant le criblage haut-débit ou « high throughput screening » (Flannery et al., 2013). En plus de la découverte de nouvelles classes de molécules, de nouvelles façons de collaborer à l'interface chimie-biologie et la mise au point de méthodes pour accélérer le développement de médicaments ont émergé (Wells et al., 2015). Un facteur important a été aussi la meilleure compréhension de la biochimie du parasite du paludisme qui a mis en évidence de nombreuses cibles potentielles de médicaments, dont les mécanismes d'actions ont été éclaircis (Fidock et al., 2004).

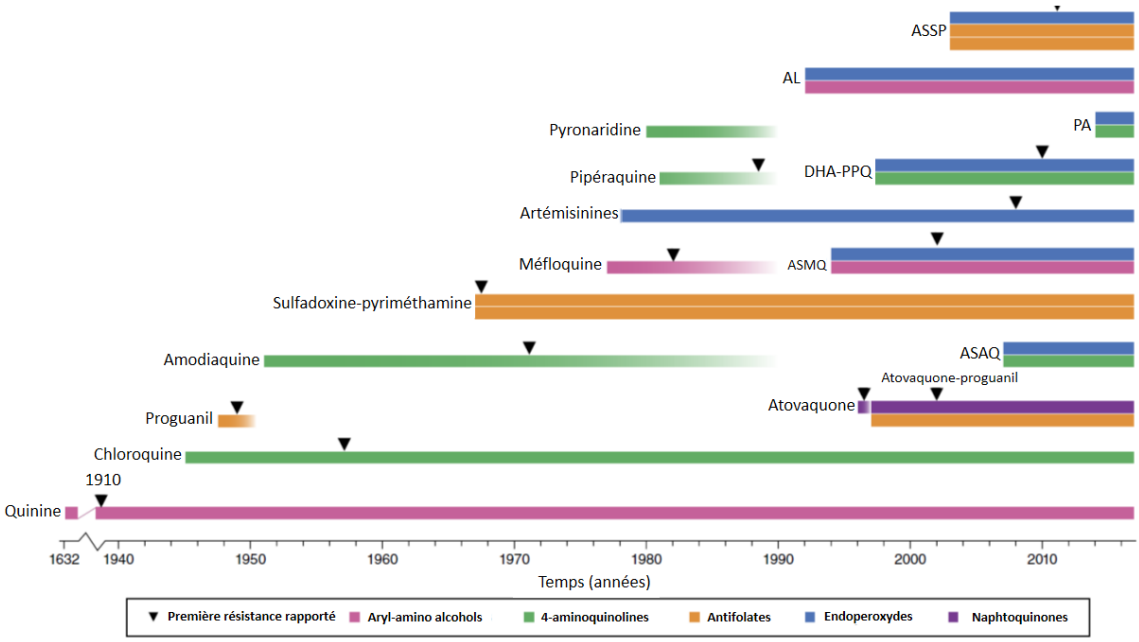


Figure 6. Histoire de l'introduction des principaux médicaments antipaludiques et des premières apparitions de résistance (Blasco et al., 2017). Les barres seules se réfèrent aux monothérapies ; les barres doubles et triples dénotent des thérapies combinées. Les couleurs se réfèrent aux classes chimiques auxquelles les médicaments antipaludiques appartiennent. AL = Artéméther + Luméfantrine; ASMQ = Artésunate + Méfloquine; ASAQ = Artésunate + Amodiaquine; DHA-PPQ = Dihydroartémisinine + Pipéraquine; PA = Artésunate + Pyronaridine; ASSP = Artésunate + Sulfadoxine–Pyriméthamine (SP).

1.3 Molécules antipaludiques et mécanismes d'action

Les mécanismes d'action de chaque classe de molécules antipaludiques sont liés à un ou plusieurs sites spécifiques d'action et par conséquent aux phases du parasite (Phillips et al., 2017) (**Figure 7**). Dans cette partie nous nous proposons de décrire ces mécanismes d'action, en mentionnant un ou deux exemples par groupe et aussi de décrire les principaux mécanismes de résistance à *Plasmodium*. Les structures des médicaments abordés dans cette thèse sont données en annexe (**Annexe 1**, page 295).

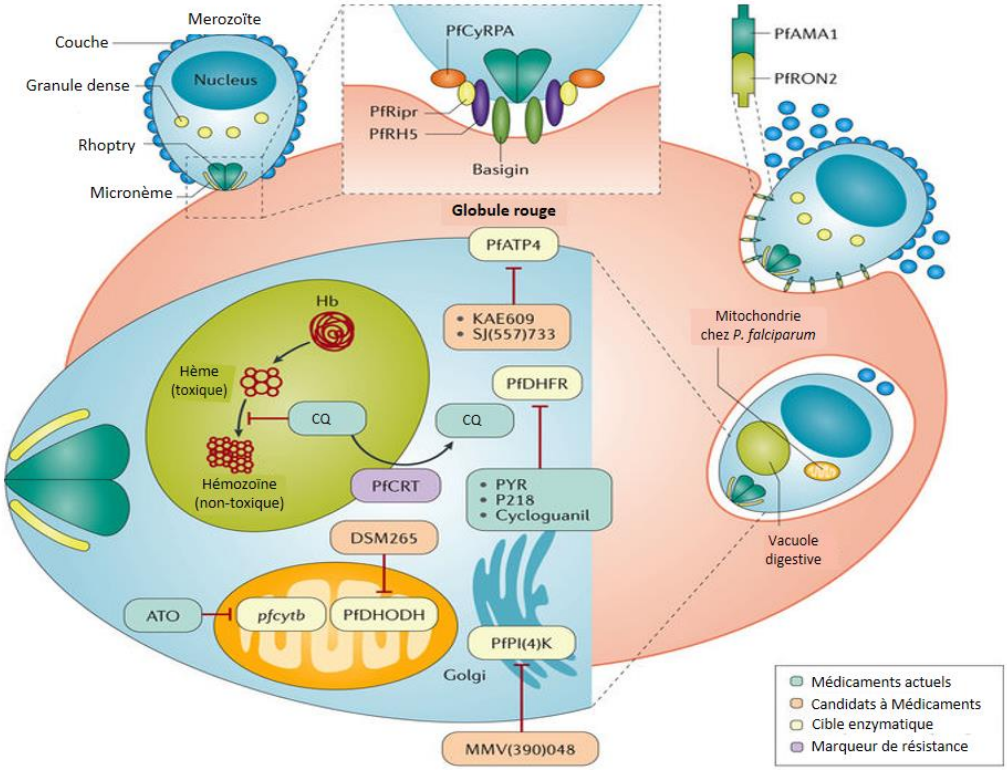


Figure 7. Cibles et mécanismes d'action principaux des médicaments antipaludiques (Phillips et al., 2017). PfCyRPA= antigène protecteur riche en cystéine ; PfRH5= protéine liée au réticulocyte homologue 5 ; PfRipr= PfRH5-interaction de protéine ; PfAMA1= antigène apical de membrane 1 ; PfON2= protéine de rhoptries 2; PfATP4= transporteur de type ATPase4; PfDHFR= enzyme dihydrofolate réductase plasmodiale ; PYR= Pyriméthamine ; Hb= hémoglobine ; CQ= chloroquine ; PfCRT= transporteur de résistance à la chloroquine chez *P. falciparum* ; ATO= Atovaquone ; *pfcytb*= gène mitochondrial qui code pour le cytochrome b chez *P. falciparum* ; PfDHODH= enzyme dihydroorotate déshydrogénase; PfPI(4)K= phosphatidylinositol-4-OH-kinase.

1.3.1 Dérivés de quinoléines : cibler l'hème

La gamme la plus ancienne et efficace de produits antipaludiques sont les dérivés de la quinine (QN), appelés dérivés des quinoléines, comme par exemple la chloroquine (CQ), l'amodiaquine (ADQ), la primaquine (PMQ), la piperaquine (PIP) et la méfloquine (MQ) (structures en **Annexe 1**, page 295). Deux autres antipaludiques importants, de structures plus éloignées que celle de la QN, sont l'halofantrine (HF) et la luméfantrine (LMF; benflumétol), basés sur un squelette aromatique phénanthrène et fluorène respectivement (Müller and Hyde, 2010). Les mécanismes d'action précis des antipaludiques du genre quinoléines ne sont toujours pas complètement compris, bien que divers mécanismes d'action aient été proposés pour la CQ et sont vraisemblablement reliés aux autres composés (Staines and Krishna, 2012). Il est établi que la CQ est active exclusivement dans la phase érythrocytaire, elle n'agit pas dans la phase pré-érythrocytaire ni sur les hypnozoïtes hépatiques ou sur les gamétocytes mûrs (Rocco, 2003). La CQ interfère dans le processus de digestion de l'hémoglobine dans la phase intra-érythrocytaire et conduisant à la libération de la molécule toxique ferriprotoporphyrine IX (FPP IX) (Fitch, 2004). L'importance de l'élimination de la FPP IX est discutée de façon plus détaillé plus loin (sous partie **1.4**). Le succès de cette gamme de médicament est basé sur l'efficacité clinique, la toxicité limitée pour l'hôte, la facilité d'emploi et la synthèse rentable et relativement simple des produits (Staines and Krishna, 2012). Néanmoins la résistance à la CQ est attribuée à la mutation du gène PfCRT (transporteur de la chloroquine chez *P. falciparum* ; **Figure 7**) (Ecker et al., 2012; Roepe, 2011) dans la membrane de la VD, par changement des acides aminés d'une protéine spécifique (Staines and Krishna, 2012; Warhurst et al., 2003). Les autres gènes associés à la résistance sont PfMDR1 (*multidrug resistance*), PfNHE1 (échangeur Na^+/H^+), PfMRP1 (*multidrug resistance* associée à la protéine 1) (Müller and Hyde, 2010).

1.3.2 Antifolates : bloquer la voie des folates

Le deuxième groupe important d'antipaludiques sont les antifolates, première classe d'antimétabolites utilisée en thérapeutique il y a plus de 70 ans (Visentin et al., 2012). Les principaux médicaments antifolates sont la pyriméthamine (PYR), le proguanil (PG, métabolisé *in vivo* en sa forme active cycloguanil (CG) et les médicaments soufrés, dont les plus

importants sont les sulfamides dont la sulfadoxine (SDX) et une sulfone, la dapsone (Müller and Hyde, 2010). Les antifolates bloquent la synthèse ou la conversion de dérivés des folates. Les dérivés de folates sont des cofacteurs cellulaires importants pour la production de deoxythymidylate (dTMP) et donc la synthèse d'ADN. Chez les mammifères et les plantes, la voie des folates produit aussi la méthionine, également obtenue par l'intermédiaire du métabolisme de l'histidine, de l'acide glutamique et de la sérine, et qui contrôle l'initiation de la synthèse de protéines dans la mitochondrie (Nzila et al., 2005a, 2005b). Dans le cas de la PYR et du CG, il a été établi que leur mode d'action est l'inhibition de l'enzyme dihydrofolate réductase plasmodiale (PfDHFR). La PYR est 1000 fois plus active sur l'enzyme parasitaire que sur l'enzyme homologue mammifère (Kuhlmann and Fleckenstein, 2017). Cependant la résistance de *P. falciparum* aux antifolates est apparue rapidement. La résistance à la PYR est due à des mutations de l'ADN du parasite codant pour l'enzyme PfDHFR, impliquant des substitutions d'acides aminés sur des positions clés (S108N, N51I et C59R) (Plowe, 2009). La résistance à la CG est liée à un ensemble de mutations sur les gènes DHFR-S108T et A16V du parasite (Mharakurwa et al., 2011).

1.3.3 Naphtoquinones et tétracyclines : cibler les fonctions mitochondriales

Le troisième groupe d'antipaludiques sont les naphtoquinones, quinones dérivées du naphtalène. Le mécanisme d'action de ce groupe est basé sur l'inhibition de la chaîne électronique mitochondriale de transport (mtETC). À première vue, ce principe semble risqué étant donné que certains poisons puissants comme le cyanure affectent la respiration mitochondriale, en bloquant le transport électronique et aboutissant à une crise bioénergétique menant à la mort. Néanmoins, il a été démontré que l'atovaquone (ATO) par exemple inhibe sélectivement la mtETC parasitaire sans affecter les mitochondries de l'hôte (Staines and Krishna, 2012). L'absence d'action de ces molécules sur la chaîne respiratoire humaine se base sur les différences structurelles entre les coenzymes de l'homme et de *Plasmodium* (Kessl et al., 2005). Le mécanisme d'action détaillé de l'ATO consiste en l'inhibition du mouvement de la sous-unité de protéine de soufre-fer du cytochrome b (CYT b) dans le complexe III, qui est nécessaire pour le transfert d'électrons au CYT c1 d'ubihydroquinone attaché au CYT b (Mather et al., 2005). L'ATO a été combinée avec le PG,

cette combinaison (Malarone®) est utilisé comme traitement prophylactique et curatif contre le paludisme (Kuhlmann and Fleckenstein, 2017; Nakato et al., 2007).

Beaucoup d'antibiotiques comme les tétracyclines, qui ciblent le ribosome 30S dans la mitochondrie, sont souvent utilisés efficacement contre le paludisme, particulièrement contre les parasites CQ-résistants (Clyde, 1974). Néanmoins, en ne ciblant qu'une protéine, cela risque de mener rapidement au développement d'une résistance. En effet, parfois un seul point de mutation est suffisant pour complètement perdre l'efficacité du médicament, comme cela s'est produit lorsque l'ATO était utilisé en monothérapie (Müller and Hyde, 2010).

1.3.4 Artémisinine et dérivés : encore cibler l'hème

La découverte des propriétés antipaludiques de l'artémisinine (ART) par des scientifiques chinois au début des années 1970 a révolutionné le traitement du paludisme (Staines and Krishna, 2012) et sa contribution à la thérapie antipaludique a été valorisée en 2015 avec le prix Nobel de médecine attribué à Youyou Tu (Nobel Prize.org, 2015). L'ART est une lactone sesquiterpénique avec un cycle caractéristique 1,2,4 triaxone dans sa structure (Li and Zhou, 2010). Le mécanisme d'action de l'ART est souvent rapporté à la VD du parasite, ayant pour rôle d'empêcher la cristallisation de l'hème résultant de la dégradation de l'hémoglobine de l'hôte (Staines and Krishna, 2012). Bien que la structure de "base" varie considérablement entre les divers dérivés de l'artémisinine naturels ou synthétiques, tous les composés actifs conservent un fragment endoperoxyde responsable de l'activité antipaludique (Li and Zhou, 2010). Ce groupe peroxyde rappelle la réaction de Fenton, où H_2O_2 est décomposé par le cuivre ou le fer pour produire des radicaux libres $HO^{\cdot}$ (Meshnick et al., 1989). D'autres mécanismes d'action ont été proposés pour l'ART, comme l'alkylation de protéines (formation de radicaux libres), l'inhibition de l'enzyme PfATP6 (essentiel pour le métabolisme oxydatif du parasite) et l'altération des fonctions mitochondriales (Staines and Krishna, 2012), tous ces mécanismes étant vraisemblablement consécutifs à l'activation de l'endoperoxyde.

Un des changements majeurs dans la thérapie du paludisme depuis 2012 a été l'utilisation croissante d'associations médicamenteuses contre *P. falciparum* CQ-résistant (Kuhlmann and Fleckenstein, 2017). Selon l'OMS, les traitements actuels du paludisme peu compliqués dépendent presque exclusivement des thérapies combinées avec l'ART (ACTs)

(Warsame Marian et al., 2010). Cependant les progrès réalisés pour l'élimination du paludisme avec l'utilisation d'ATCs est maintenant gêné par la diffusion d'une résistance médicamenteuse (Dondorp et al., 2009). La mutation de l'acide aminé à la position 263 (L263A ou L263S) de l'enzyme PfATP6 affecte énormément la sensibilité de l'enzyme à l'ART pouvant créer la résistance (Nagasundaram et al., 2016).

La résistance à l'artémisinine, de profil atypique (c'est une diminution de la clairance sans diminution de l'IC^{50}) est médiée par la protéine K13, une protéine chaperonne ubiquitaire lié au maintien des fonctions vitales cellulaires. Malgré les efforts pour comprendre le mécanisme de résistance à l'ART, il reste encore très partiellement compris (Suresh and Haldar, 2018).

1.3.5 Candidats antipaludiques et cibles potentielles

Le récepteur érythrocytaire «basigin» du ligand parasitaire PfRH5 (protéine liée au réticulocyte homologue 5) a été identifié comme essentiel pour l'invasion de l'érythrocyte par toutes les souches testées de *P. falciparum* (Zenonos et al., 2015). La PfRH5 interagit avec la protéine parasitaire PfRipr et l'antigène protecteur riche en cystéine (PfCyRPA) (Phillips et al., 2017; Volz et al., 2016). Pendant la phase de liaison PfRH5-PfRipr-PfCyRPA-basigin, d'autres voies s'ouvrent entre le parasite et le globule rouge, déclenchant la sortie de Ca^{2+} et permettant aux protéines libérées du parasite d'être insérées dans la membrane de globule rouge. Ces protéines sont sécrétées par les micronèmes (rhoptries) et incluent la protéine PfRON2 (**Figure 7**) (Srinivasan et al., 2011). Le blocage du récepteur basigin, permettant d'éviter l'invasion érythrocytaire par *P. falciparum* (Crosnier et al., 2011), peut être une stratégie thérapeutique (Aditya et al., 2015). L'attache entre PfRON2 et l'antigène apical de membrane 1 (PfAMA1) peut être un mécanisme à explorer (Remarque et al., 2008).

Une autre cible importante pour le développement de nouveaux candidats antipaludiques est le transporteur de type ATPase4 (PfATP4) chez *P. falciparum* (Spillman and Kirk, 2015). Ce transporteur est déterminant pour la régulation de l'homéostasie de Na^{+} pendant la nutrition du parasite (Phillips et al., 2017). Deux potentiels futurs médicaments, actuellement en phase clinique ou préclinique utilisent ce mécanisme : la spiroindolone

KAE609 (Cipargamin, actuellement en phase II) (Huskey et al., 2016; White et al., 2014) et le SJ (557) 733 (stade préclinique) (Jiménez-Díaz et al., 2014).

L'enzyme PfPI(4)K (phosphatidylinositol-4-OH-kinase) est une enzyme qui régule la signalisation et le trafic des lipidides phosphorylés. Cette enzyme a été identifiée comme une nouvelle cible pour le développement de médicaments avec un profil d'activité idéal pour la prévention, le traitement et l'élimination du paludisme (McNamara et al., 2013). Les imidazopyrazines sont une nouvelle classe de composés antipaludiques qui ciblent le PfPI(4)K et inhibent le développement intracellulaire de *Plasmodium* dans la phase hépatocytaire (Zeeman et al., 2014; Zou et al., 2014). La classe des molécules dérivées de l'aminopyridine ciblent aussi la PfPI(4)K comme c'est le cas du candidat clinique de phase I MMV (390) 048 (Ghidelli-Disse et al., 2014).

1.4 La ferriprotoporphyrine IX (FPIX) comme cible

L'exigence-clé pour les antipaludiques curatifs est leur capacité à éliminer les parasites dans la phase intra-érythrocytaire asexuée. Chez *P. falciparum*, le cycle intra-érythrocytaire dure environ 48 h post-invasion (Blasco et al., 2017). Pendant ce cycle, 60 à 80 % de l'hémoglobine cellulaire est dégradée dans la vacuole digestive du trophozoïte (Krugliak et al., 2002). La partie protéique de l'hémoglobine est hydrolysée pour libérer des acides aminés par l'action de diverses protéases parasitaires (plasmepsines I, II et IV, protéase histoaspartique, falcipaines 2 et 3 et falcilysin) (Banerjee et al., 2002; Chugh et al., 2013; Eggleson et al., 1999; Rosenthal et al., 2002). L'hème résiduel sous forme réduite Fe(II) est aussi libéré et immédiatement oxydé en FPIX-Fe(III) (Foley and Tilley, 1998; Olafson et al., 2017). L'O_2 est probablement impliqué comme principal oxydant, du fait du pH bas de la VD. Pendant ce processus, des quantités énormes de superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) sont supposées être produites (Egan, 2008). La FPIX libre cause des changements aux membranes et aux protéines, mortels pour le parasite, et sa neutralisation efficace est cruciale pour la survie du parasite. La FPIX n'est pas détruite de manière enzymatique (contrairement à ce qui se passe dans les cellules mammifères par l'hème oxygénase) (Choi and Alam, 1996), mais est convertie en une substance solide cristalline appelée hémozoïne ou « pigment paludique » qui est inoffensif pour le parasite (Hempelmann et al., 2003) (**Figure 8**).

Des études spectroscopiques et de cristallographie ont révélé que la structure de l'hémozoïne est formée par la coordination directe entre le groupe propionate d'une molécule d'hème et l'atome de fer d'une autre unité d'hème (Pagola et al., 2000). Ces dimères forment des liaisons hydrogène avec leurs voisins *via* un autre groupe propionate. La structure unique de l'hémozoïne a mené à l'hypothèse que la formation des liens entre les molécules d'hème monomériques est une étape cruciale dans la production d'hémozoïne (Bendrat et al., 1995; Fitch et al., 1999). La forme synthétique de l'hémozoïne, structurellement identique mais appelée β-hématine, peut être obtenue par de nombreuses méthodes dans des conditions non-physiologiques. Dans le parasite, il a été suggéré que la cristallisation de l'hème est catalysée par des protéines riches en histidine (Chugh et al., 2013; Nakatani et al., 2014; Sullivan et al., 1996) ou par la présence d'un environnement lipidique. Ce dernier point a été exploré par plusieurs groupes de recherche dans le but de répondre à la question : pourquoi et comment l'interface eau-lipide facilite-t-elle la formation de l'hémozoïne ? (Olafson et al., 2015; Pisciotta et al., 2007). Plusieurs résultats montrent que la formation de cristaux d'hémozoïne se localise à l'interface hydro-lipidique qui détermine leur morphologie structurelle et leur taille (**Figure 8**) (Hoang et al., 2010; Ketchum et al., 2013; Olafson et al., 2014; Vekilov et al., 2015). Ces résultats ont permis de répondre à plusieurs questions ouvertes de longue date sur la cristallisation de l'hématine et la détoxification de l'hème, qui était au préalable suggérée comme étant un phénomène enzymatique (Olafson et al., 2015a, 2015b).

Une autre question critique liée à la détoxification de l'hème est de comprendre comment la dégradation de l'hémoglobine et la cristallisation de l'hème sont coordonnées dans le parasite de telle façon que la concentration d'hème libre reste à tout moment négligeable. Il est certain que si la dégradation d'hémoglobine se produit plus rapidement que la cristallisation, l'hème libre s'accumulera dans la VD et tuera le parasite (Kapishnikov et al., 2017). Cette synchronisation est donc déterminante et la perturber est précisément le mécanisme d'action des dérivés de quinoléines et d'artémisinine (Bilia et al., 2002; Fitch, 2004; Foley and Tilley, 1998; Loria et al., 1999; Staines and Krishna, 2012) (Voir sous-partie 1.3). Ce mécanisme est aussi envisagé comme une cible potentielle pour la recherche de futurs médicaments antipaludiques en utilisant plusieurs méthodes de criblage à haut débit (Fong and Wright, 2013; Huy et al., 2017; Sandlin et al., 2014; Tekwani and Walker, 2005).

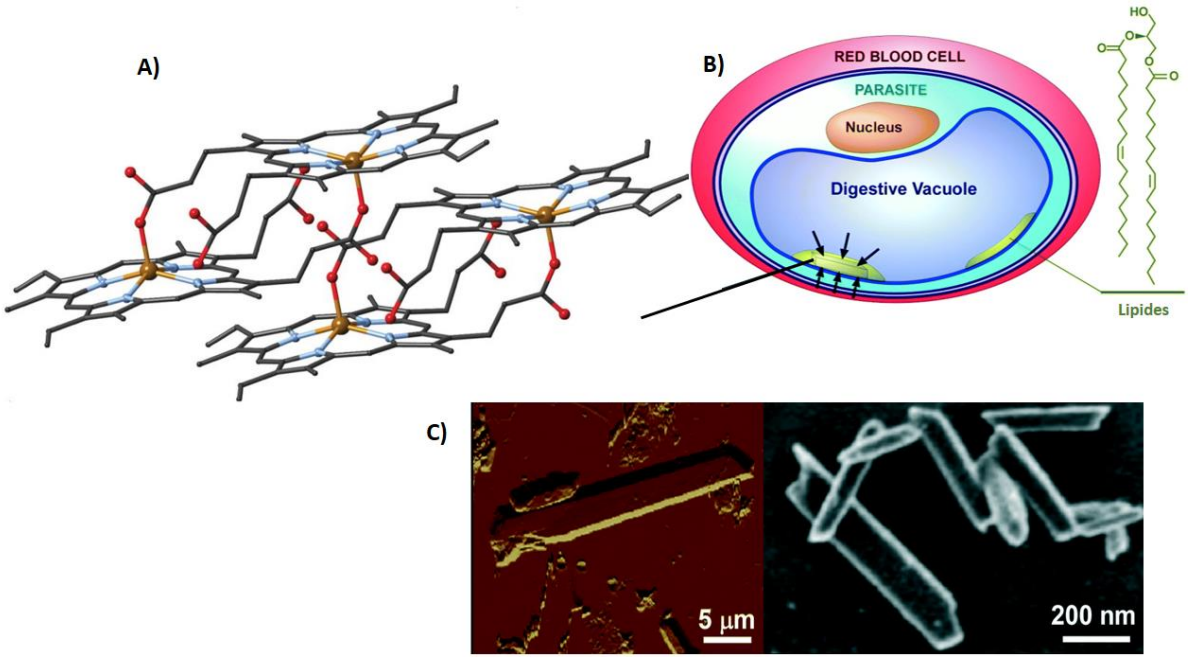


Figure 8. Représentation du mécanisme de cristallisation de l'hème en hémozoïne**. A)** Arrangement chimique de l'hémozoïne : 1) les monomères de l'hémozoïne avec le fer, montré en gris, se joignent pour former un dimère ; 2) les dimères formant une liaison H avec les atomes d'oxygène contigus (en rouge) (Butykai et al., 2013). **B)** Illustration schématique du mécanisme hydrolipidique proposé pour la cristallisation de l'hématine dans la VD chez *Plasmodium*. **C)** Images de microscopie de force atomique et de transmission d'électron des cristaux extraits de *P. falciparum* (Vekilov et al., 2015).

2 Interactions ou forces intermoléculaires

Les Grecs furent les premiers à considérer des forces ou interactions d'une façon non religieuse. Cette idée d'abord a été proposée par Empédocle autour de 450 av. n. è. ; elle a été très "améliorée" par Aristote et a formé la base de la théorie chimique pendant 2000 ans (Israelachvili, 2011). Le concept général d'interactions ou forces moléculaires consiste en l'interaction électrostatique de courte durée entre des distributions de charge complémentaires, positives ou négatives, soit attractive ou répulsive (Clary and Orr, 1997). L'intensité des forces intermoléculaires impliquées s'élève seulement à une énergie de 2-20 $kJ.mol^{-1}$ (Hoffman, 2004) parce que ces forces sont beaucoup plus faibles que les forces de valence habituelles comme les liaisons covalentes (300-400 $kJ.mol^{-1}$) (Walther et al., 2003). D'une façon générale, le point d'ébullition des liquides reflète la puissance des forces intermoléculaires : en effet, le processus d'ébullition sépare les molécules les unes des autres, et donc dissocie les interactions existantes (House and House, 2016). Les interactions intermoléculaires sont à la base des propriétés physiques de la plupart des substances et la compréhension détaillée de ces interactions est donc fondamentale pour l'interprétation et la prévision des relations entre la structure chimique et le comportement de ces molécules dans leur environnement immédiat (Hunter et al., 2001). Ces interactions sont généralement admises comme étant extrêmement importantes en biochimie et en biologie (Walther et al., 2003). Dans cette sous-partie, notre objectif est d'illustrer pourquoi les interactions ou forces intermoléculaires ont une importance fondamentale et pourquoi leur compréhension est une condition *sine qua non* pour la conduite d'études de nature biomoléculaires.

2.1 Interactions de Van der Waals

Il existe plusieurs types d'interactions électrostatiques impliquant des ions et des dipôles. Parmi elles, les interactions de type van der Waals sont des interactions électrostatiques entre dipôles (Riffet, 2014). Ces interactions se produisent quand des atomes adjacents se rapprochent assez et que leurs nuages électroniques extérieurs se touchent à peine. Cette action incite des fluctuations de charge qui aboutissent à une attraction non spécifique et non directionnelle (Pollard et al., 2017). Ces forces résultant de la combinaison de trois effets :

l'orientation (interaction de Keesom), l'induction (interaction de Dedye) et de dispersion (interaction de London) (**Figure 9**).

$$E_{\text{van der Waals}} = -\frac{1}{r^6}\left[\underbrace{\frac{\mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{3(4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon)^2 \cdot k_B \cdot T}}_{E_{\text{Keesom}}} + \underbrace{\frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2 + \mu_2^2 \cdot \alpha_1}{(4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon)^2}}_{E_{\text{Debye}}} + \underbrace{\frac{3}{4} \cdot \frac{h \cdot \nu \cdot \alpha_1 \cdot \alpha_2}{(4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0)^2}}_{E_{\text{London}}}\right]$$

Avec :

ε_0 la constante diélectrique du vide ;

h la constante de Planck ;

k_B la constante de Boltzmann ;

T la température absolue ;

r la distance moyenne entre les molécules considérées ;

μ les moments dipolaires des molécules considérées ;

v la fréquence électronique d'absorption (Hz) ;

α les polarisabilités électroniques.

L'énergie potentielle globale, dite de Van der Waals, est négative ; elle correspond à une force F de Van der Waals attractive entre des atomes éloignés d'une distance d et proportionnelle à $\frac{1}{d^6}$, donc à très faible distance. Celle-ci s'équilibre avec les forces de répulsion qui ont une énergie potentielle de la forme : $V' = \frac{k'}{d^n}$ (avec n entier et 10 ≤ n ≤ 16 ; k' > 0). L'énergie résultante $V = \frac{k'}{d^n} - \frac{k}{d^6}$ est minimum pour une valeur d_e de la distance entre molécules, appelée distance d'équilibre. L'énergie d'interaction correspondante V_e est, en valeur absolue, de l'ordre de quelques $kJ.mol^{-1}$ (1 à 10 $kJ.mol^{-1}$) (Senon, 1998)

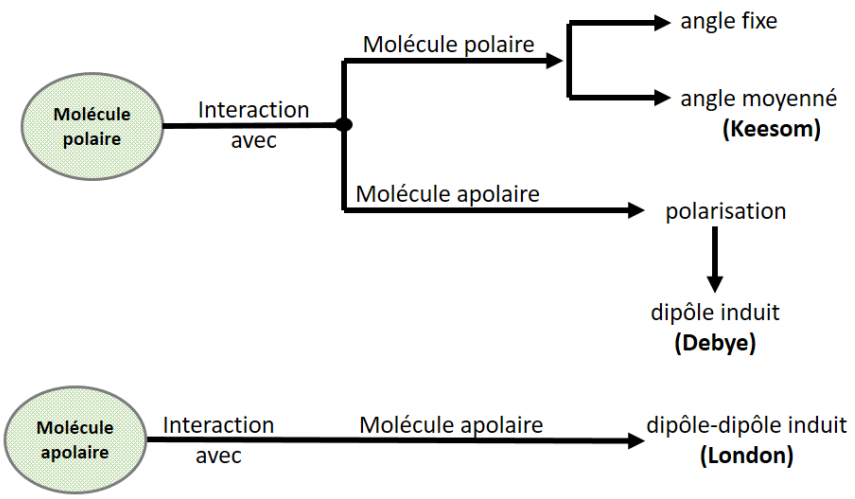


Figure 9. Représentation des interactions de van der Walls, des plus fortes (polaire/polaire) aux plus faibles (apolaire/apolaire).

2.1.1 L'effet d'orientation (Interaction de Keesom)

Deux molécules ayant des moments dipolaires permanents peuvent interagir si elles sont situées dans une proximité suffisante. Ces interactions (anciennement appelée dipôle-dipôle) se produisent principalement entre molécules polaires et sont directionnelles (Hadjittofis et al., 2017). L'énergie de ce genre de liaison varie entre 0,5 et 3 kJ.mol^{-1}. Un exemple de ces interactions (dipôle-dipôle) entre un ∂^+ et un ∂^- est celle formée par les lipides membranaires (comme le phosphatidylinositol et les glycolipides) avec l'eau, par les nombreux groupes hydroxyles des résidus osidique (Ishizuka and Yamakawa, 1985; Wohlert and Edholm, 2004)

2.1.2 L'effet d'induction (Interaction de Debye)

Une molécule polaire crée un champ électrique qui peut polariser d'autres molécules (polaires ou non). L'interaction se produit donc entre le dipôle permanent et le dipôle induit.

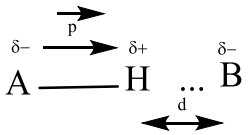
2.1.3 L'effet de dispersion (Interaction de London)

Il concerne les molécules non polaires, pour lesquelles on considère l'existence d'un moment dipolaire instantané, non nul, défini à chaque instant par la position des électrons

autour de la molécule (la valeur moyenne du moment dipolaire étant nulle), et qui induit un moment dipolaire sur une molécule voisine. La dispersion de London a été mentionnée comme étant en partie responsable de l'entassement des nucléobases dans l'ADN, du repliement de protéine et de la liaison protéine-ligand (Kolář et al., 2011). Ces interactions constituent aussi les forces attractives entre des molécules non ioniques et non polaires, comme la paraffine et beaucoup de médicaments (Hadjittofis et al., 2017).

2.2 « Liaison » d'hydrogène

Les principes de base des liaisons hydrogène ou ponts hydrogène ont été formulés par Linus Pauling en 1930 (Pauling, 1931). La « liaison » hydrogène se réfère à une formation obligatoire faible entre 1) un atome d'hydrogène attaché à un atome fortement électronégatif et 2) un autre atome de plus haute électronégativité (**Figure 10**). En pratique, l'atome d'hydrogène, qui est connecté à un atome fortement électronégatif (par exemple, l'oxygène, l'azote ou le soufre) *via* une liaison covalente développe une charge positive partielle et est attiré par un autre atome électronégatif fort (par exemple, l'oxygène, le fluor, l'azote ou le soufre), qui a développé une charge négative partielle en raison de l'attraction entre le nuage électronique et son atome voisin (Roy et al., 2015).



Cette interaction, qui a lieu entre un dipôle ($\vec{p}$) et une charge (localement, l'atome $B^{\delta-}$ peut être considéré comme chargé) est maximum lorsque A, H et B sont alignés. La distance (d) de liaison prend une valeur d'équilibre d_e, correspondant à la distance pour laquelle l'énergie potentielle de liaison est la plus faible : $V_{liaison} = V_e$ (Senon, 1998).

Les « liaisons » d'hydrogènes sont des interactions relativement faibles (elles varient entre 20 et 40 $KJ.mol^{-1}$), mais qui sont néanmoins cruciales pour des macromolécules biologiques comme l'ADN et des protéines (Berg et al., 2002).

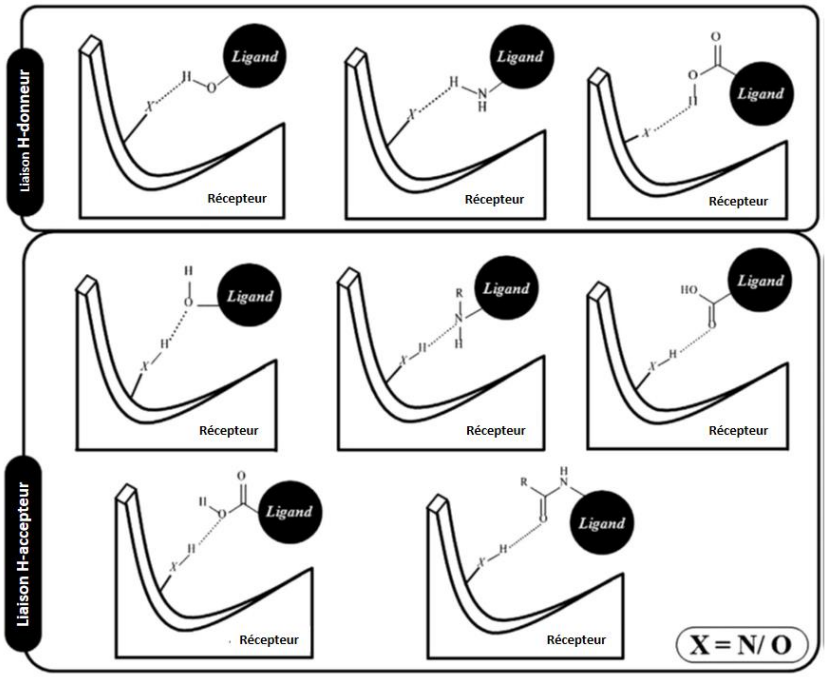


Figure 10. Représentation de la formation de la « liaison » hydrogène par un ligand avec un site de récepteur (Roy et al., 2015).

2.3 Interactions π-π (π-*stacking*)

Les interactions π-π ou π-*stacking* sont des interactions attractives fortes entre les systèmes aromatiques π et ont été identifiées il y a une cinquantaine d'années (Hunter and Sanders, 1990). Expliquée de manière simple, cette interaction est formée par deux molécules organiques plates, dont une est de préférence aromatique et contient des électrons π, et conduit à un complexe en empilement et impliquant des forces de liaisons non covalentes (Roy et al., 2015). Ce genre d'interaction est décrit comme un type d'attraction intermoléculaire spécifique des molécules aromatiques. Bien que la terminologie d'interaction π-π ou π-*stacking* est largement utilisée et comprise, certains auteurs ont argumenté contre l'utilisation de ces expressions. Cela est dû au fait que la plupart de ces interactions sont à l'origine de type « forces de dispersion » entre molécules aromatiques (Martinez and Iverson, 2012). La participation de ces interactions est essentielle dans la structure de biomolécules comme les protéines et les acides nucléiques (Hobza and Muller-Dethlefs, 2009). Nous pouvons citer comme exemples les interactions porphyrine-porphyrine (Hunter and Sanders, 1990), l'hydrosolubilité très basse de certains médicaments (Hadjittofis

et al., 2017), les interactions intra-ADN (paires de bases) (Ishida et al., 1988; Wakelin, 1986). Elles sont également la cible de nouveaux médicaments intercalant de l'ADN pouvant avoir des applications en cancérologie (**Figure 11**) (Zhu et al., 2016).

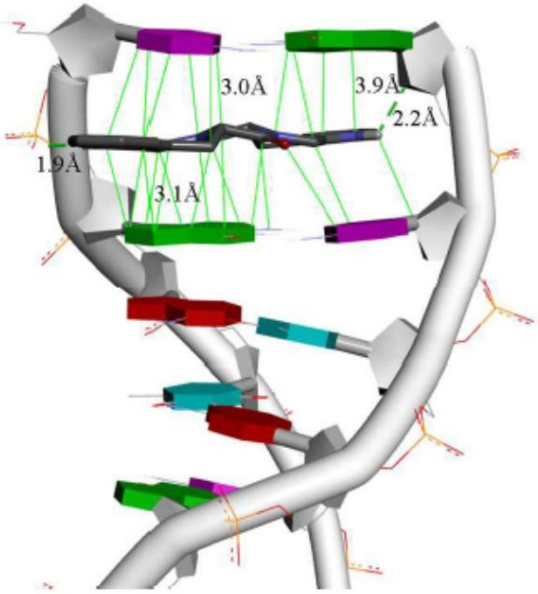


Figure 11. *Docking* de la molécule THPDTPI {(2'S,5'S)-tetrahydropyrazino[1',2':1,6]- di{2,3,4,9-tetra-hydro-1H-pyrido[3,4-b]indole}-1',4'-dione)} entre le double brin d'ADN. THPDTPI est représentée selon le modèle de bâtonnets, les liaisons hydrogènes sont représentées avec des lignes pointillées vertes, tandis que le π- π *stacking* entre THPDTPI et les bases d'ADN sont représentées avec des lignes solides vertes (Zhu et al., 2016).

3 La spectrométrie de masse comme moyen de détection des interactions intermoléculaires

Les interactions non covalentes citées dans la sous-partie précédente peuvent être étudiées par plusieurs méthodes. Ces méthodes incluent l'ultracentrifugation, la résonance des plasmons de surface, la calorimétrie, la fluorescence, le dichroïsme circulaire, la dispersion de la lumière, la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman, la spectroscopie électronique de spin, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la cristallographie (Hensley, 1996; Lakey and Raggett, 1998; Smith David L. and Zhang Zhongqi, 1994). Cependant la

spectroscopie de masse (SM) présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes (Hofstadler and Sannes-Lowery, 2006). John B. Fenn (prix Nobel de chimie 2002), définit de manière simple la SM comme l'attribution d'une masse aux molécules individuelles en les transformant en ions dans le vide et en mesurant ensuite la réponse de leur trajectoire aux champs électriques et magnétiques ou les deux (Fenn et al., 1989; Fenn, 2003). Néanmoins cette définition peut être plus large, incluant la capacité de cette technique à déterminer directement la masse nominale d'un analyte puis à produire et détecter des fragments correspondant à des groupes discrets d'atomes qui révèlent des caractéristiques structurales de la molécule-mère (Watson and Sparkman, 2007). Au cours des années 1990, l'évolution instrumentale de la SM (design des sources d'ionisation, des analyseurs, de l'électronique et de l'informatique associées) a révolutionné la chimie et la biochimie, principalement l'analyse des protéines (Aebersold, 2003), en permettant d'explorer leur expression, leur localisation, leur interaction, leur structure de domaine, leur modification et leur activité (Han et al., 2008). Ces changements ont été catalysés par deux techniques développées à la fin des années 1980 : les méthodes d'ionisation par électronébulisation (*electrospray ionization* - ESI) (Fenn et al., 1989) et par désorption-ionisation laser assisté par matrice (*matrix-assisted laser desorption/ionization* - MALDI) (Karas and Hillenkamp, 1988).

Dans le domaine de la découverte de médicaments, la capacité d'automatisation des spectromètres de masse peut être exploitée pour examiner rapidement des bibliothèques de candidats médicaments par leurs interactions spécifiques avec une cible d'intérêt. Ces approches peuvent être classées en deux principales catégories :

- les approches qui quantifient la fraction de ligand libre après interaction avec une cible ;
- les approches qui quantifient directement les complexes non covalents ligand-cibles dans la phase gazeuse.

Dans les deux cas, ces approches permettent de déterminer l'affinité (et/ou la spécificité) de l'interaction ligand-cible. Ces deux approches sont de plus en plus utilisées dans le processus de découverte de médicaments (Hofstadler and Sannes-Lowery, 2006).

Les principaux avantages de la SM par rapport aux autres méthodes conventionnelles sont les suivants :

1) elle n'exige pas du ligand ou de la cible d'être modifié au préalable en les étiquetant ou en les liant à une surface, ces étapes pouvant avoir des effets délétères sur les propriétés de la liaison (Hofstadler and Sannes-Lowery, 2006) ;

2) la sensibilité de la SM permet l'utilisation de la cible, qui est typiquement une protéine difficile à isoler, en concentrations très basses (de l'ordre du microgramme), ou en tout cas inférieures par rapport aux quantités exigées par la RMN ou les méthodes basées sur la cristallographie (Chen Fan et al., 2015) ;

3) les méthodes basées sur la spectrométrie de masse sont rapides et automatisables (Hofstadler and Sannes-Lowery, 2007) ;

4) les contraintes de pureté des cibles et ligands sont significativement réduites avec l'ESI-MS, parce que les éventuels intermédiaires de réaction, produits de dégradation et autres impuretés sont différenciés par leur masse moléculaire (à l'exception des impuretés isobares ou stéréoisomèriques) (Hofstadler and Sannes-Lowery, 2006).

Les premiers rapports de l'utilisation de la SM pour la détermination d'interactions non covalentes datent des années 1990, et se focalisaient sur l'identification rapide des complexes protéine-ligand (Lakey and Raggett, 1998; Loo, 1997). Néanmoins les deux dernières décennies ont montré une amélioration des techniques par SM, notablement en protéomique et en métabolomique (Hilton and Benesch, 2012; Marcoux and Robinson, 2013). Ces améliorations ont permis d'augmenter les applications liées aux interactions non covalentes avec différentes cibles biologiques dans le but de la découverte de médicaments (**Tableau 1**).

Tableau 1. Techniques par SM utilisées dans le processus de découverte de médicaments (adapté de Hofstadler and Sannes-Lowery, 2006).

Technique	Méthodologie	Application	Avantages	Inconvénients
Affinité multi-cible/screening spécificité (MASS)	Détection directe de complexes cibles de médicament non covalents	Criblage à haut débit (HTS) pour la découverte primaire de médicaments	Peut identifier des composés d'affinité basse manqués par des criblages traditionnels	La taille des cibles par le criblage haut débit est limitée par la gamme de masse du SM
Relation structure-activité (RSA)	Détermination d'interactions compétitives, coopératives ou simultanées de ligands avec une cible	Découverte de composants pouvant être liés ensemble pour former une meilleure liaison entre ligands	Façon rapide d'optimiser les ligands utilisant la RSA	Fournit moins d'informations sur les sites de liaison des ligands que la RSA par RMN
Détection de complexes oligonucléotide-ligand par ionisation ESI-SM	Détection directe de complexes non-covalents entre ligand et oligonucléotides simple et double brin	Différenciation entre vrais *hits* et faux - positifs obtenus lors des essais biologiques traditionnels	Technique rapide, robuste et sensible	La solubilité du composé peut limiter l'applicabilité
Nanopulvérisation	Utilisation de l'ionisation par nanopulvérisation à la place de l'ionisation classique par electronébulisation	Mêmes applications générales que l'ionisation par electronébulisation	Aucun transfert de type échantillon-à-échantillon, petits volumes d'échantillon (1-3 µL)	Le coût par échantillon peut être prohibitif pour des applications de HTS
Détermination de la constante de dissociation (K_d)	détermination des quantités relatives de cibles libres et liée pour le calcul de valeurs de K_d	Déterminer la constante de dissociation absolue et relative de ligands	Possibilité de déterminer la K_d à partir du HTS	Résultats approximatifs pour les ligands interagissant

				électrostatiquement avec les cibles
Dissociation activée par collision (DAC) ou dissociation induite par collision (CID)	dissociation de complexes	Fournit des informations structurelles sur des complexes aussi bien que la structure et l'identité de ligands	Utile pour la différenciation de ligands isobares mais avec des modes ou des sites de liaison différents	Seule la dissociation de ligands chargés est détectable
Dissociation utilisant le photon multiple infrarouge (IRMPD-MS)	IRMPD de complexes			
Mobilité ionique (IMS)	Utilisation des temps de dérive d'ion pour déterminer la surface de section de complexes	Informations sur conformation de la cible et le site de liaison du ligand	Fournit des informations structurelles sur les complexes	Exige une modélisation théorique assez sophistiquée
Forme d'onde inverse stocké par transformée de Fourier	Excitation de la trajectoire d'ions dans la cellule d'ion	Sélection du précurseur par SM/SM	sélection très précise des ions précurseurs	Exige la transformation de Fourrier par résonance cyclotronique d'ions (FTICR-MS), onéreuse

4 Applications de l'analyse des interactions intermoléculaires par spectrométrie de masse

Nous avons utilisé la spectrométrie de masse pour l'analyse de complexes non-covalents entre des ligands et l'hème. Ces travaux font suite aux travaux du laboratoire de Pharmacognosie dans ce domaine depuis quelques années, ayant démontré la pertinence d'interpréter l'interaction ligand-hème comme un révélateur d'une probable activité antiplasmodiale *in vitro*. En outre, selon les projets dans lesquels cette approche a été utilisée, cette analyse a été complétée soit d'une étude de relation structure-activité de flavonoïdes, soit d'une étude de stabilité des sondes fluorescentes basée sur le squelette de l'artémisinine.

4.1 Application d'interactions hème-extrait : l'exemple de *Pentzia monodiana* (Asteraceae)

4.1.1 Taxonomie de *Pentzia monodiana*

Tableau 2. Classification taxonomique de l'espèce *Pentzia monodiana* (gbif, 2018a).

***Pentzia monodiana* Maire**	
Phylum	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	*Pentzia* Thunb.
Espèce	*Pentzia monodiana* Maire

4.1.2 Généralités sur le genre *Pentzia* :

L'espèce *P. monodiana* (**Figure 12**) est connue sous le nom *Tehatit* dans le langage Tamasheq (Afrique saharienne). Le genre *Pentzia* comprend actuellement 27 espèces avec une distribution fortement disjointe (Magee and Manning, 2010). Presque toutes les espèces sont limitées à l'Afrique du sud, avec une forte diversité dans la région Karoo-Namib, seulement trois espèces sont décrites en Afrique du Nord et une quatrième au Yémen. Les espèces de *Pentzia* sont toutes des buissons fortement aromatiques et beaucoup sont des

plantes de fourrage importantes dans la région aride de Karoo en Afrique du Sud (Magee and Tilney, 2012). Les espèces du genre *Pentzia* sont relativement bien connues dans la médicine traditionnelle. Le jus des tiges fraîches de certaines espèces comme *P. incana* et *P. punctata* sont particulièrement utilisées pour soigner le mal de ventre, les affections hépatiques, les douleurs d'estomac et les refroidissements (Van Wyk et al., 2008). La caractérisation phytochimique du genre est ancienne et n'est pas très étendue. Cependant il existe quelques études comprenant l'isolement de lactones sesquiterpéniques (dérivés de guaianolide et germacranolide) à partir d'extrait des parties aériennes de *P. calva*, et l'isolement de flavones, énol éther polyynes, et sesquiterpènes (dérivés de germacranolide, glaucolide, guaianolide) à partir de *P. eeni* (Zdero and Bohlmann, 1990). Les espèces des deux genres sud-africains *Athanasia* et *Pentzia* (tribu Anthemideae), sont morphologiquement semblables et la délimitation de deux groupes est très difficile. Au niveau chimiotaxonomique, les espèces qui synthétisent des furanes sesquiterpéniques sont considérées comme faisant partie du genre *Athanasia* sp, tandis que ceux produisant des spiroketal énol éthers ou des composés biogénétiquement liés aux acétylènes en C14 appartiennent au genre *Pentzia*. Les lactones sesquiterpéniques peuvent aussi être typiques d'espèces de *Pentzia* (**Annexe 2**, page 296) (Bohlmann and Zdero, 1978, 1972). Dans le cadre d'une collaboration existante entre le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris-Descartes et l'Université de Tlemcen, en Algérie, le choix de cette plante pour la recherche de molécules antipaludiques a été fait sur des critères chimiotaxonomiques. En effet, les lactones sesquiterpéniques sont une classe phytochimique montrant une activité biologique importante. De plus, les Asteraceae peuvent permettre d'explorer les effets de synergie connus entre les lactones et les flavonoïdes.

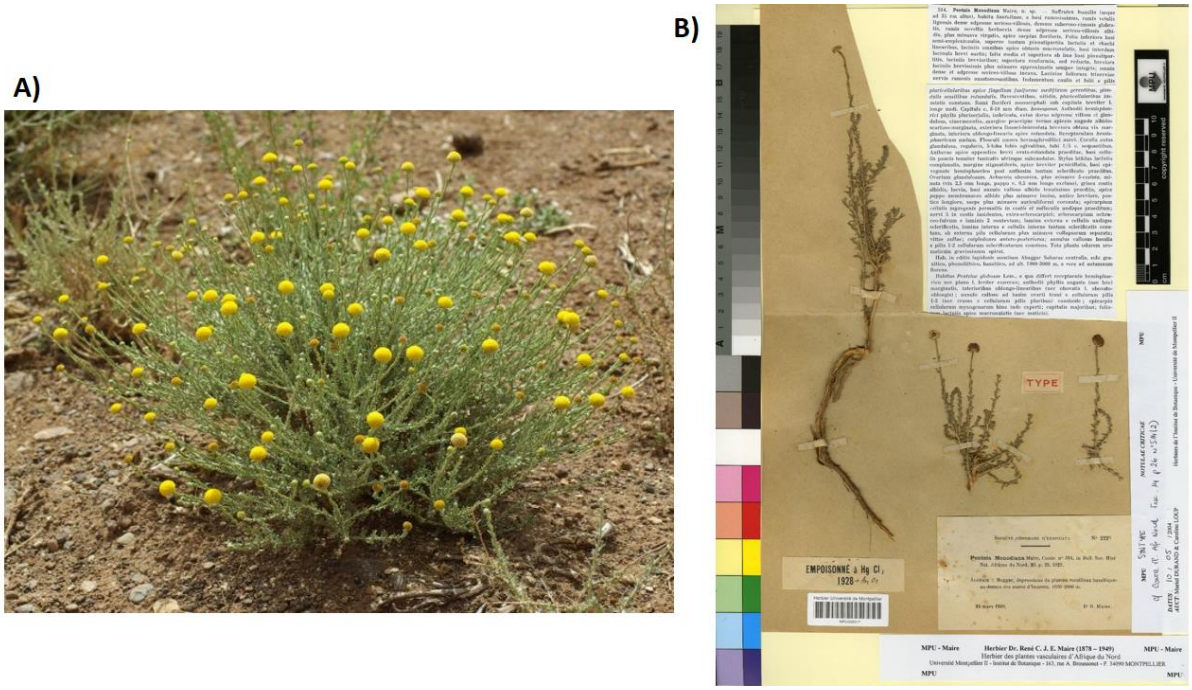


Figure 12. A) *Pentzia monodiana* (http://www.sahara-nature.com/plantes.php?aff=nom&plante=pentzia%20monodiana). **B)** Herbier de l'espèce *P. monodiana* déposée au Museum d'Histoire Naturel de Paris (https://science.mnhn.fr/taxon/species/pentzia/monodiana?lang=fr_FR).

4.1.3 Article 2 : liaison à l'hème des méthoxyflavones de *Pentzia monodiana* (Asteraceae)

Article publié dans *Fitoterapia*

4.1.3.1 Résumé

Le test de liaison à l'hème a été réalisé par spectrométrie de masse pour les extraits de *Pentzia monodiana* Maire (Asteraceae) dans le but d'identifier des métabolites formant des adduits avec l'hème, et donc potentiellement antiplasmodiaux. Plusieurs adduits ont été identifiés et leur stabilité mesurée de façon relative. L'isolement en parallèle de plusieurs constituants de *P. monodiana* a permis l'indentification de deux méthoxyflavones, la 3'-*O*-méthyleupatorine (**7**) et l'artemétine (**8**) identifiées comme formant des adduits avec l'hème. Quatre *seco*-tanapartholides (**1**-**4**), un guaianolide (**5**), un germacranolide (**6**) et deux autres méthoxyflavones (**9**, **10**) ont été aussi caractérisés. L'évaluation des composés isolés sur *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei* ont montré une activité antiprotozoaire moyenne des deux méthoxyflavones (**7**, **8**).

4.1.3.2 Article

Fitoterapia 118 (2017) 1–5

Contents lists available at ScienceDirect

Fitoterapia

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

Heme-binding activity of methoxyflavones from *Pentzia monodiana* Maire (Asteraceae)

Sergio Ortiz [a,1], Kamel Dali-Yahia [b,1], Pedro Vasquez-Ocmin [d], Raphaël Grougnet [a], Philippe Grellier [c], Sylvie Michel [a], Alexandre Maciuk [d,*], Sabrina Boutefnouchet [a,*]

[a] Laboratoire de Pharmacognosie, UMR CNRS 8638 COMETE, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4, av. de l'Observatoire, 75006 Paris, France
[b] Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université de Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algérie
[c] Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Universités, CP52, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France
[d] BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 December 2016
Received in revised form 20 January 2017
Accepted 29 January 2017
Available online 03 February 2017

ABSTRACT

A heme-binding assay based on mass spectrometry was performed on *P. monodiana* Maire (Asteraceae) extracts to identify metabolites able to form adducts with heminic part of haemoglobin, as potential antimalarial drugs. Main adducts were characterized and their stability was measured. Isolation of main constituents of *P. monodiana* Maire lead to identification of the two methoxyflavones 3′-*O*-methyleupatorin (**7**) and artemetin (**8**) involved in the adducts formation. Four *seco*-tanapartholides (**1**–**4**), a guaianolide (**5**), a germacranolide (**6**) and two other methoxyflavones (**9**, **10**) were also characterized. Evaluation of isolated compounds on *P. falciparum* and *T. brucei brucei* showed a moderate antiprotozoal activity of the two methoxyflavones.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Activity of the antimalarial drug artemisinin, as well as quinine derivatives, involves an interaction with the prosthetic group of haemoglobin. Formation of covalent or non-covalent adducts with free heme can inhibit its cristallization into insoluble, non-toxic hemozoin, leading to the parasite death. Such adducts can be characterized by mass spectrometry. An efficient LC/MS *in vitro* assay, described by Muñoz-Durango et al. is based on the identification, in complex mixtures such as plant extracts, of small molecules able to form adducts with heme [1].

In the continuation of our previous investigation of heme-binding molecules, we focused on *P. monodiana* Maire, from the Asteraceae family. *Pentzia monodiana*, "Tehatit" in Tamachek, grows in the southern part of Algeria [2]. Traditional uses of *Pentzia* species are reported for infectious and digestive troubles [3]. Phytochemical studies in the *Pentzia* genus reported occurrence of polymethoxyflavones, sesquiterpene lactones (both from germacranolide and guaianolide type). C-13, C-14 and C-17 acetylenes have also been isolated together with C14-spiroacetal enol-ethers [4,5].

2. Experimental

2.1. General

Automatized pressurized extractions were performed on a Speed Extractor E-914 apparatus provided by Büchi (Fawil, Switzerland) equipped with four cells (120 mL) and a collector with four flat bottom vials (220 mL). Maximum pressure and temperature can be adjusted from 50 to 150 bar and from 30 to 200 °C, respectively. Mass spectrometry was performed on a mass spectrometer ZQ 2000 Waters (Saint-Quentin, France). Silica gel 60 0.025–0.04 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co.) was used for column chromatography (CC). Preparative HPLC was performed on an AP-MOD-100 apparatus provided by Armen Instrument (Saint-Avé, France), with a C18 PursuitTM Varian column (250 mm × 30 mm, 10 μm), Büchi UV/VIS Filter-photometer detector, Merck D-2500 integrator and Büchi C-660 collector. The experiments were conducted at room temperature. CPC was performed on a SCPC-250 + 1000B apparatus provided by Armen Instrument (Sain-Avé, France) fitted with two rotors (total volume: 250 mL or 1 L), containing respectively 1953 or 2016 twin-cells. Rotation speed can be adjusted from 0 to 3000 rpm for the 250 mL rotor and from 0 to 1500 rpm for the 1 L rotor. A valve incorporated in the CPC apparatus allowed operation in ascending or descending mode. The system is

* Corresponding authors.
E-mail addresses: sergio.ortiz.aguirre@gmail.com (S. Ortiz), kameldali@mail.univ-tlemcen.dz (K. Dali-Yahia), pedro.vasquez-ocmin@u-psud.fr (P. Vasquez-Ocmin), raphael.grougnet@parisdescartes.fr (R. Grougnet), grellier@mnhn.fr (P. Grellier), sylvie.michel@parisdescartes.fr (S. Michel), alexandre.maciuk@u-psud.fr (A. Maciuk), sabrina.boutefnouchet@parisdescartes.fr (S. Boutefnouchet).
[1] S.O. and K.D.H. equally contributed to the present work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.012
0367-326X/© 2017 Published by Elsevier B.V.

equipped with a gradient pump and a 10 mL or a 50 mL loop injection 6-way valve. ^{1}H and ^{13}C NMR experiments were performed in deuterated chloroform. Spectra were recorded on a Bruker AC 300 MHz or a Bruker 400 MHz spectrometer (Wissembourg, France). All the reagents and solvents were purchased from Carlo Erba-SDS. Cyclohexane and ethyl acetate were distilled before used. Water was distilled from deionized water.

2.2. Plant material

Aerial parts of *P. monodiana* were collected in the Algerian Southern Sahara, in Tassili Ahaggar area nearby the Tahat mountain (Wilaya of Tamanrasset, 23° 8″39.95″, 5°43″46.28″, alt.: 2019 m), in the Ahaggar National Park (Wilaya of Tamanrasset, Algeria), in September 2013, with the collect agreement delivered by the Ahaggar National Park Office, as *P. monodiana* is an Algerian endemic protected species. The collect agreement was delivered by the director of the Ahaggar National Park Office (OPNA), n°965/DPLBCVPC/MC/13 and 111/SDV/MC/13. Identification was under supervision of M. Belghoul, head of Department of Study of Natural Resources from the Ahaggar National Park. A voucher specimen was deposited in the herbarium of the department of Pharmacognosy, University Paris-Descartes University, France (voucher specimen MKOSB2013KDHPM).

2.3. Isolation of metabolites from P. monodiana Maire

2.3.1. Extraction

A sample of 557 g of aerial part of *P. monodiana* was mixed with sand (1:1). Extraction cells were filled with the mixture and charged in the apparatus. Extraction program consisted in two distinct cycles of 20 min with ethyl acetate. Each cycle comprised a pre-heat period of 5 min, pumping of ethyl acetate through the extraction cell unit at a final pressure of 100 bar and at 50 °C, a hold-on time fixed at 5 min and a final flush of acetate extract into the corresponding vial. The extracts were concentrated under reduced pressure affording 42.72 g (7.67%) of ethyl acetate extract. The residual vegetal material was successively extracted with methanol, using the same extraction procedure, to afford 46.65 g of methanolic extract.

2.3.2. Silica gel chromatography

A sample of 10 g of ethyl acetate extract was subjected to a silica gel chromatography with a gradient of cyclohexane/ethyl acetate (100:0 to 10:90 v/v) to give 32 fractions. Compound **6** recrystallized in ethyl acetate from fraction 13 and 14 (562 mg). Fraction 25 was identified as a mixture of compounds **9** and **10** with 1:1 a ratio (13 mg). Fractions 17 to 22 (F17–22) (1 g) were pooled and submitted to CPC separation, whereas fractions 26 to 28 (F26–28) (400 mg) were submitted to a preparative chromatography (preparative HPLC). Fraction 32 was subjected to a second silica gel CC eluted with cyclohexane/ethyl acetate (50:50, v/v) to afford compound **1**.

2.3.3. CPC separation

Solvents systems were determined using shake-flask method followed by UV examination at 254 and 366 nm and vanillin spraying. Two CPC procedures were developed, the first one using the quaternary solvent system S1 (cyclohexane/ethyl acetate/MeOH/H_2O (1/4/1/4 v/v/v/v)), applied to the ethyl acetate extract, and the second one, using the ternary solvent system S2 (ethyl acetate/THF/H_2O (4/2/5 v/v/v)), applied to previous silica gel chromatography fraction F17–22. An aliquot of 400 mg of material (ethyl acetate extract or F17–22 fraction) was dissolved in 10 mL of a 1:1 (v/v) mixture of both phases of the biphasic systems S1 and S2 respectively. After injection, separation was performed in ascending mode on the 250 mL rotor, at a flow rate of 5 mL/min and at 1600 rpm. A total volume of 1.5 L of mobile phase was collected in 10 mL fractions. Extrusion step was initiated in ascending mode using the lower phase solvent as the mobile phase to ensure that any residual extract was recovered. Compounds **2** (14 mg), **3** (10 mg) and **4** (23 mg) were isolated from ethyl acetate extract and compound **5** was isolated from F17–22 (17 mg).

2.3.4. Preparative HPLC of F26–28

An aliquot of 10 mg of F26–28 was dissolved in 10 mL of a H_2O/MeOH mixture (40:60 v/v), filtered on Acrodisc© Premium 25 mm 0.45 μM nylon filters (Pall Life Science, Port Washington, New York, USA), and injected. Subsequently, a linear elution is started using H_2O/MeOH mixture (40:60 v/v), flow rate: 20 mL/min. Compound **7** (3.4 mg) and **8** (4.1 mg) were isolated.

Identification of isolated compounds was confirmed with ^{1}D and ^{2}D NMR analysis and comparison with literature data: 5-βH-*seco*-tanapartholide (**1**) *seco*-tanapartholide A (**2**), *seco*-tanapartholide B (**3**) [6], iso-*seco*-tanapartholide (**4**) [7], Artecanin (**5**) [8], 3′-*O*-methyleupatorin (**7**) artemetin (**8**) [9], cirsilineol (**9**) [10] and chrysosplenetin (**10**) [11].

2.4. Heme binding assay

Hemin (Fe (III) ferriprotoporphyrin IX) was dissolved just before use at 5 mM in aqueous ammonia 25%. Extracts were dissolved in DMSO

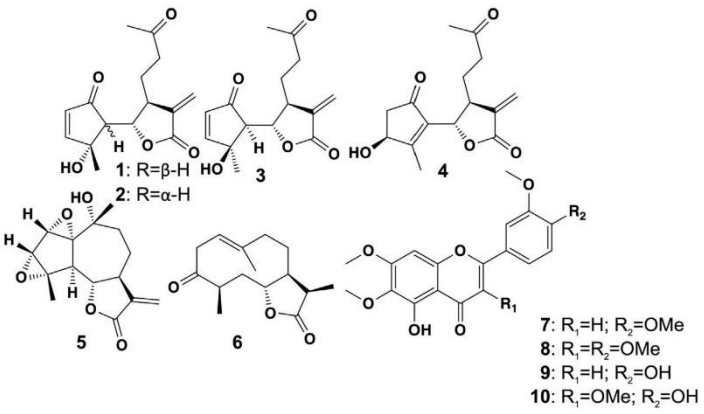


Fig. 1. Structures of compounds **1–10**.

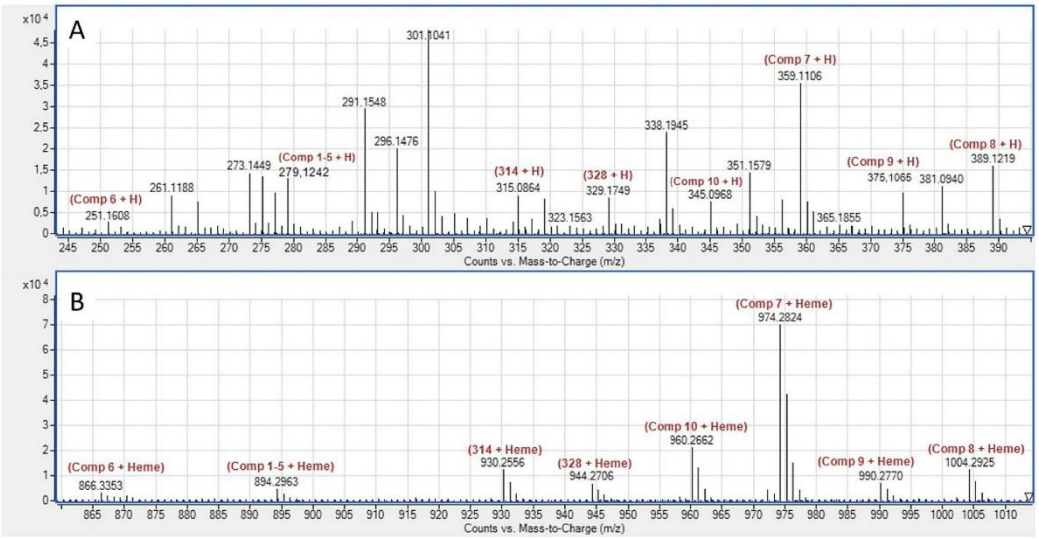


Fig. 2. Spectrum of *P. monodiana* ethyl acetate extract before (2.A) and after (2.B) incubation with hemin.

(5 mM), chloroquine diphosphate was dissolved in water (5 mM). Mixtures were prepared so as to obtain 100 μL of final equimolar concentrations of 250 μM for each compound (hemin, drug or extract) in methanol [1].

2.4.1. Mass spectra acquisition

Mass spectrometry was performed on a LC/MS Agilent (LC 1260 Infinity, MS 6530 Q-Tof (Agilent, Les Ulis, France). The ionization parameter (ESI positive mode) were: nebulizer pressure 40 psig, capillary voltage 3500 V, drying temperature 320 °C, drying gas flow 10 L/min, fragmentor 150 V. Experiments with a collision-induced dissociation (CID) were performed in FIA mode (flow injection analysis) with an voltage increment ranging from 0 to16 eV with 2 eV increments using MS/MS targeted mode (isolation width = 1.3 *m/z*). Injection was done at a flow rate of 300 μL/min of methanol/water (1:1).

2.5. Adducts stability

Data from CID experiments were analyzed by GraphPad Prism software. Relative abundance of heme was plotted *vs* the energy increments and fitted by a sigmoidal dose-response curve.

2.6. Antiprotozoal activity of isolated compounds

Antiplasmodial activity was determined on the FcB1 strain of *P. falciparum*. A modified [^{3}H]-hypoxanthine incorporation assay was used. Briefly, infected human red blood cells in culture were exposed to serial drug dilutions (50, 10 and 1 μM) in 96-well microtiter plates. Each compound at each concentration was tested in triplicate. After 48 h of incubation at 37 °C in a reduced oxygen atmosphere, 25 mL of [^{3}H]-hypoxanthine was added to each well. Cultures were incubated for a further 24 h prior to harvesting on glass-fiber filters and washing with distilled water. Radioactivity was counted using a 1450 Microbeta trilux (Wallac) (liquid scintillation and luminescence counter). The results were recorded as counts per minute per well at each drug concentration and expressed as a percentage of the untreated controls. Antitrypanosomal activity was determined by using the bloodstream form of *T. brucei brucei*. Briefly, bloodstream forms (10^5 parasites/mL) were exposed to 50 and 1 μM drug concentrations in 96-well microtiter plates. Each compound and each concentration was tested in triplicate. Plates were then incubated for 72 h at 37 °C under an atmosphere of 5% CO_2. 20 mL of resazurin (45 mM final concentration) was then added to each well. Incubation was continued for 4 h at 37 °C under 5% CO_2, then at room temperature for 22 h. Wells were read at excitation (535 nm), emission (590 nm) on an FL 600 Microplate Fluorescence Reader (Biotek) and results expressed as a percentage of the untreated control.

3. Results and discussion

Plant material was extracted using pressurized solvent extraction affording an ethyle acetate and a methanolic extract, which were both evaluated for their antiplasmodial activity on chloroquine-resistant strain FcB1/Colombia of *P. falciparum* ([^{3}H]-hypoxanthine test). Ethyl acetate extract showed a promising activity with an IC_{50} = 3.5 μg/mL, whereas methanolic extract showed no significant activity (IC_{50} > 100 μg/L). This interesting antiplasmodial activity led us to look for heme-binding compounds in the ethyle acetate extract of *P. monodiana* Maire.

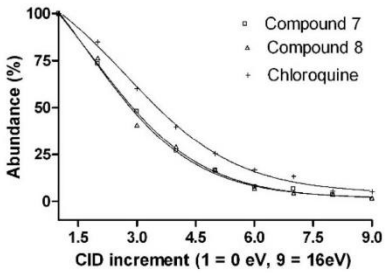


Fig. 3. Comparative stability curves of compounds **7**, **8** and chloroquine.

Table 1
Antiprotozoal activity of compounds **1–10** against *P. falciparum* and *T. brucei brucei* (inhibition percentage). nt: not tested.

	Antiplasmodial activity [%]			Antitrypanosomal activity[a] [%]		
	50 μM	10 μM	1 μM	50 μM	10 μM	1 μM
1	**97,0 ± 4,9**	**69,4 ± 7,6**	31,7 ± 8,4	**102,4 ± 2,7**	46,7 ± 8,4	24,0 ± 3,1
2	**99,5 ± 0,7**	45,2 ± 2,1	–	**50,8 ± 8,1**	9,4 ± 8,8	–
3	**99,8 ± 0,6**	**51,6 ± 4,6**	1,2 ± 6,2	**67,0 ± 9,4**	–	–
4	**99,7 ± 0,8**	40,6 ± 6,7	3,5 ± 4,8	38,7 ± 10,8	13,8 ± 11,8	–
5	nt	nt	nt	nt	nt	nt
6	17,0 ± 13,5	5,4 ± 10,5	–	**95,8 ± 3,4**	39,5 ± 6,8	–
7	**62,4 ± 6,4**	19,7 ± 2,8	4,7 ± 5,1	**96,9 ± 2,9**	**91,8 ± 16,0**	16,0 ± 6,8
8	**88,4 ± 0,8**	**56,1 ± 4,6**	1,2 ± 6,2	**98,1 ± 4,9**	**90,5 ± 3,0**	37,4 ± 1,7
9	48,9 ± 4,4	38,8 ± 6,0	16,3 ± 15,0	**88,4 ± 7,9**	**80,6 ± 1,7**	31,0 ± 15,0
10	**85,5 ± 4,9**	**69,4 ± 7,6**	31,7 ± 8,4	**95,5 ± 3,9**	**82,4 ± 4,2**	32,2 ± 8,4

[a] The IC_{50} of pentamidine, reference compound on *Trypanosoma brucei* is 5 nM.

3.1. Phytochemical study of P. monodiana Maire

The phytochemical study of *P. monodiana* was subsequently initiated and led to isolation and identification of six sesquiterpenes **1–6** and four methoxyflavones **7–10** (Fig. 1). Sesquiterpenes were of seco-guaianolides type (5β-*H* seco-tanapartholide(**1**), seco-tanapartholide A (**2**), seco-tanapartholide B (**3**), *iso-seco*-tanapartholide(**4**)), guaianolide (artecanin **5**), and germacranolide type (ketopelenolide B **6**). Both tri-, tetra- and penta-methoxyflavones have been characterized: 3′-*O*-methyleupatorin (**7**) artemetin (**8**), cirsilineol (**9**) and chrysosplenetin (**10**).

3.2. Heme-binding assay

Heme-binding assay protocol consisted in incubation of plant extracts in presence of hemin. Mass spectrometry analysis used an ES-API ionization in positive mode with Q-TOF detection. Peaks arising only in the incubated extracts are assumed to be adducts. Eight peaks of $m/z > 860$ appear following the incubation of ethyl acetate extract with hemin (Fig. 2A), and every compound suspected to form adducts is detected in the extract (Fig. 2B), corresponding to sesquiterpenic lactones **1–6** and methoxyflavones **7–10** (Fig. 1).

3.3. Stability of heme-adducts

Stability of observed adducts was subsequently regarded. Previous study showed that adducts stability can be evaluated using mass spectrometry by measuring abundance of an adduct increasing the fragmentor voltage. Dissociation of adducts with increasing fragmentor voltages involves a decrease of detected ion abundance. This can be illustrated by stability curves measuring adduct ion abundance as a function of voltages. Compounds **1–6** and **9–10** would form adducts of very low stability and no curve could be obtained, whereas compounds **7** and **8** formed more stable adducts. Stability curves of compounds **7** and **8** and chloroquine heme-adducts are presented in Fig. 3. Compounds **7** and **8** showed a lower stability compared to chloroquine, what is in favor of a weak π-π stacking interaction that may be involved in an antimalarial activity.

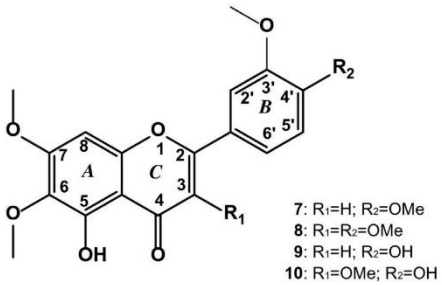


Fig. 4. Structures of methoxyflavones **7–10**.

3.4. Antiprotozoal activity of isolated compounds

To corroborate these results, we evaluated antiplasmodial and antitrypanosomal activities of isolated compounds *in vitro* against of *Plasmodium falciparum* (FcB1-Colombia strain) and *Trypanosoma brucei brucei* (Table 1). Methoxyflavones, showed low activity with percentage of growth inhibition not superior to 37% at 1 μM. *Seco*-guaianolides (**1–4**) showed low activity with percentage of inhibition not higher than 50% at 1 μM. Thus, no IC_{50} were measured. These results suggest that the heme-binding activity of methoxyflavones **7** and **8** is not correlated with a direct toxic effect on parasites.

4. Discussion

Screening of heme-binding compounds in *P. monodiana* Maire showed that two methoxy-flavones 3′-*O*-methyleupatorin (**7**) and artemetin (**8**) present a good affinity for the heminic part of haemoglobin. Such data focused our attention on methoxyflavones as they are known to interact with drug metabolizing enzymes, and by this way, able to enhance drug activity. Several flavonoids have been reported to modulate the drug efflux proteins (P-glycoprotein, breast cancer resistance protein BCRP…), and thus to reverse drug resistance [12]. However, flavonoids can also interact with cytochromes P450, responsible of the phase 1 metabolism of xenobiotics, and consequently, enhance the pharmacokinetic profile of drugs [13]. This undesired effect in case of enhancement of toxicity, may be advantageous to decrease drugs inactivation by cytochromes. For example, the methoxyflavone chrysoplenetin has been reported to inhibit the enzymatic activity of cytochromes CYP1A2 and CYP2C19 *in vitro* and that its co-administration with the antimalarial drug artemisinin is associated to an enhanced antimalarial activity *in vivo*, although the compound showed no antiplasmodial activity [14]. Investigations on the structure-activity relationship of flavonoids regarding inhibition of cytochromes P450 have been reported in several studies [15]. Heterosides are generally poor inhibitors of CYP, as well as 2–3 dihydrogenated flavonoids. An extensive study on the SAR of 33 flavonoids describes the structural requirements for a CYP1A1, 1A2 and 1B1 inhibition. A 5,7-dihydroxy substitution on A ring, associated to a 4′-methoxy group on B ring was observed for the most potent inhibitors [16]. Moreover, the molecular docking studies showed that the B ring of strong inhibitors interacts with the iron center of the heme part of the CYP, and is surrounded by amino-acids residues.

Regarding our results, the two more stables heme-adducts were observed with 3′-*O*-methyleupatorin (**7**) and artemetin (**8**), bearing a 5-hydroxy,-7-methoxy substitution on A ring, and a 3′,4′-dimethoxy

substitution pattern on B ring (Fig. 4). On the other hand, very transient heme-adducts were observed with chrysoplenetin (**9**), and cirsilineol (**10**), where the 4′-methoxy group is lacking on the B ring, which is in accordance with the importance of the 4′-methoxy substitution. Nevertheless, chrysoplenetin has been reported to inhibit CYP1A2 and CYP2C19 at the micromolar range (4.61 and 6.23 μM respectively), with a subsequent significative biological effect *in vivo*, meaning that surrounding amino-acids may contribute to stabilize the compound in the active site [14].

Thus, despite a weak direct antiplasmodial activity, our results are in favor of a good affinity of methoxyflavones for heme, the prosthetic group of hemoproteins such as haemoglobin and cytochromes P450. As a matter of fact, this affinity can lead to two positive effects in case of malaria: the inhibition of haemoglobin crystallization into hemozoin with subsequent plasmodium death, and enhancement of artemisinin activity by inhibition of cytochromes P450. These preliminary data should be investigated more deeply. For a better understanding of a positive effect of methoxyflavones co-administration with antimalarial drugs, further studies should be undertaken to evaluate the adduct formation of methoxyflavones on isolated heme in presence of artemisinin, as artemisinin also binds to the heminic part of haemoglobin. Moreover, evaluation or cytochrome P450 inhibition of methoxyflavones **7**–**10** alone and in combination with artemisinin should be evaluated for their cytochromes P450 inhibitory activity.

Acknowledgements

Financial support was provided by the ChembioFight European program (269301) (FP7-People-2010-IRSES) and the Algerian PROFAS research funding.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.012.

References

[1] K. Muñoz-Durango, A. Maciuk, A. Harfouche, S. Torijano-Gutiérrez, J.-C. Jullian, J. Quintin, K. Spelman, E. Mouray, P. Grellier, B. Figadère, Detection, characterization and screening of heme-binding molecules by mass-spectrometry for malaria drug discovery, Anal. Chem. 84 (2012) 3324–3329.
[2] R. Maire, *Pentzia monodiana* Maire, Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. 20 (1929) 25.
[3] P. Ozenda, Flore et végétation du Sahara, third ed. CNRS Ed, Paris, 2004 (662p).
[4] F. Bohlmann, C. Zdero, New sesquiterpenes and acetylenes from Athanasia and Pentzia species, Phytochemistry 17 (1978) 1595–1599, http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94650-8.
[5] C. Zdero, F. Bohlmann, Glaucolides, fulvenoguaianolides and other sesquiterpene lactones from Pentzia species, Phytochemistry 29 (1990) 189–194, http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)89035-8.
[6] K. Kawazoe, Y. Tsubouchi, N. Abdullah, Y. Takaishi, H. Shibata, T. Higuti, H. Hori, M. Ogawa, Sesquiterpenoids from *Artemisia gilvescens* and an anti-MRSA compound, J. Nat. Prod. 66 (2003) 538–539, http://dx.doi.org/10.1021/np020593m.
[7] S. Huneck, C. Zdero, F. Bohlmann, Seco-guaianolides and other constituents from Artemisia species, Phytochemistry 25 (1986) 883–889, http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(86)80021-8.
[8] N.R. Bhadane, F. Shafizadeh, Sesquiterpene lactones of sagebrush: the structure of artecanin, Phytochemistry 14 (1975) 2651–2653, http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(75)85243-5.
[9] M. Azizzudin, T. Makhmoor, M.I. Choudary, Radical scavenging potential of compounds isolated from Vitex agnus-castus, Turk. J. Chem. 34 (2010) 119–126, http://dx.doi.org/10.3906/kim-0805-46.
[10] Z.S. Kikhanova, Z.B. Iskakova, R.I. Dzhalmakhanbetova, T.M. Seilkhanov, S.A. Ross, E.M. Suleimen, Constituents of *Artemisia austriaca* and their biological activity, Chem. Nat. Compd. 49 (2013) 967–968, http://dx.doi.org/10.1007/s10600-013-0796-5.
[11] S.R. Numonov, S.K. Usmanova, H.A. Aisa, A triterpenoid and flavonoids from *Dracocephalum heterophyllum*, Chem. Nat. Compd. 48 (2013) 1109–1110, http://dx.doi.org/10.1007/s10600-013-0483-6.
[12] Y. Li, J.L. Revalde, G. Reid, J.W. Paxton, Interactions of dietary phytochemicals with ABC transporters: possible implications for drug disposition and multidrug resistance in cancer, Drug Metab. Rev. 42 (2010) 590–611, http://dx.doi.org/10.3109/03602531003758690.
[13] J. Liu, J. Sridhar, M. Foroozesh, Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships, Molecules 18 (2013) 14470–14495, http://dx.doi.org/10.3390/molecules181214470.
[14] S. Wei, H. Ji, B. Yang, L. Ma, Z. Bei, X. Li, H. Dang, X. Yang, C. Liu, X. Wu, J. Chen, Impact of chrysosplenetin on the pharmacokinetics and anti-malarial efficacy of artemisinin against *Plasmodium bergheias* well as in vitro CYP450 enzymatic activities in rat liver microsome, Malar. J. 14 (2015) 432–444, http://dx.doi.org/10.1186/s12936-015-0929-3.
[15] S. Zhai, R. Dai, F.K. Friedman, R.E. Vesta, Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids, Drug Metab. Dispos. 26 (1998) 989–992 (doi: 0090-9556/98/2610-0989–992).
[16] T. Shimada, K. Tanaka, S. Takenaka, N. Murayama, M.V. Martin, M.K. Foroozesh, H. Yamazaki, F.P. Guengerich, M. Komori, Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives, Chem. Res. Toxicol. 23 (2010) http://dx.doi.org/10.1021/tx100286d (1921–193).

4.1.3.3 Commentaires et discussions

L'intérêt de travailler avec *Pentzia monodiana* réside dans le peu d'information sur la chimie et l'activité prometteuse sur *P. falciparum* de l'extrait à l'acétate d'éthyle (IC_{50} = 3.5 µg/mL). Une collaboration avec le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris Descartes (UMR CNRS 8638 COMETE) a permis de tester la liaison à l'hème de 10 produits isolés en utilisant des techniques modernes comme l'extraction automatisée pressurisée et la chromatographie de partage centrifuge (CPC). L'incubation de l'hème avec l'extrait acétate d'éthyle montre la formation d'adduits pour tous les produits (spectre 2a sur l'article), avec de faibles abondances néanmoins, suggérant une faible stabilité. Les produits formant des adduits ont permis d'avoir une première approche de déréplication de l'extrait, bien que l'isolement ait été réalisé par un fractionnement bioguidé mené préalablement. Concernant les paramètres de SM, le fragmenteur a été réglé à 150V afin d'éviter la formation de faux négatifs observés avec des valeurs plus élevées pour ce paramètre, du fait de la dissociation des adduits faibles avant leur détection, en particulier les flavonoïdes (Muñoz-Durango et al., 2012). Toutes les molécules isolées ont été testées en mode MSMS afin de quantifier relativement la stabilité de la liaison à l'hème dans chaque complexe. Les paramètres CID-MSMS utilisés sont : mode cible (targeted), largeur d'isolement = 1,3 *m/z* ce qui permet l'enregistrement de la masse exacte des adduits ciblés. Parmi toutes les molécules testées, nous avons pu obtenir des courbes satisfaisantes pour les méthoxyflavones **7** et **8** (Figure 3 dans l'article), avec des valeurs de DV_{50} de 3,23 et 3,09 eV respectivement. Ces valeurs de DV_{50} obtenues sont plus faibles que celle de la chloroquine (4.87 eV), utilisée comme contrôle positif. Les faibles activités biologiques de ces deux produits (50 µM et 10 µM respectivement) n'ont pas de corrélation stricte avec les données de DV_{50}. Les composés **1** (dérivé séco-guaianolide) et **10** (chrysosplenétine) sont les produits les plus actifs (69 % d'inhibition) à 10 µM, cependant ils n'ont pas donné de valeurs exploitables de DV_{50}. Les interactions des molécules avec l'hème sont connues pour être de type π-stacking (Voir sous-partie 1.3). L'affinité des flavonoïdes pour de nombreuses protéines ou récepteurs est connue (Li et al., 2010), cependant les interactions avec l'hème sont peu explorées. En connaissant les interactions des méthoxyflavones **7** et **8** à l'hème et le manque de liaison forte de la

méthoxyflavone **10**, nous pouvons envisager de futurs travaux de relation structure-activité. Par exemple les substitutions méthoxy en position 4’ et 5’ de l’anneau B et les substitutions 5-hydroxy et 7-méthoxy dans l’anneau A pour les composés **7** et **8** semblent être des substitutions nécessaires pour la liaison à l’hème (**Figure 13**).

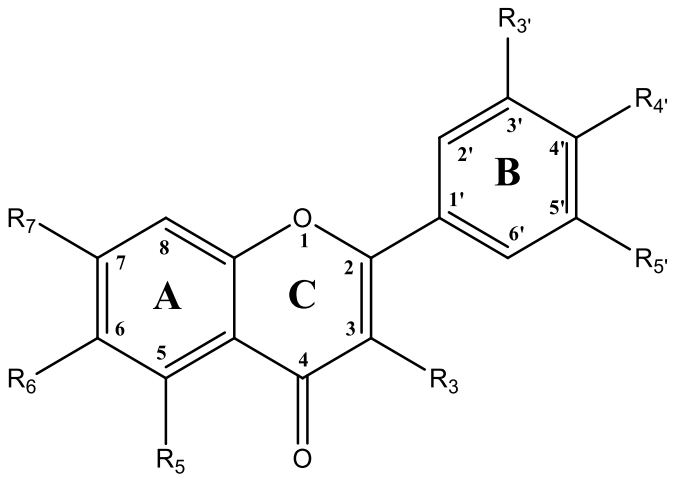


Figure 13. Structure générale des méthoxyflavones.

4.2 Bio-activité de méthoxyflavones hémisynthétiques

4.2.1 Généralités et pertinence biologique des méthoxyflavones

Les flavonoïdes appartiennent à un grand groupe diversifié de métabolites spécialisés, comprenant jusqu’à l’année 2008 de près de 9000 représentants (Ferrer et al., 2008). Ce sont au sens large des pigments universels des végétaux ; ils tirent leur nom du latin *flavus* : blond, jaune (Bruneton, 2016). Le squelette de base d’un flavonoïde est l’enchaînement C6-C3-C6, formé par la condensation progressive d'une molécule initiale comme le *p*-coumaroyl-CoA, avec trois unités Malonyl-CoA, dont chacune subit une décarboxylation, et par cyclisation ultérieur de l’enchaînent polyketide pour former un anneau de phloroglucinol (**Figure 14**) (Berim and Gang, 2016). Selon les modèles de substitution sur l'anneau hétérocyclique (anneau C), les flavonoïdes sont classés en chalcones, flavones, flavonols, flavanols, flavanes, flavanones, anthocyanidines, isoflavonoïdes et autres (Nijveldt et al., 2001).

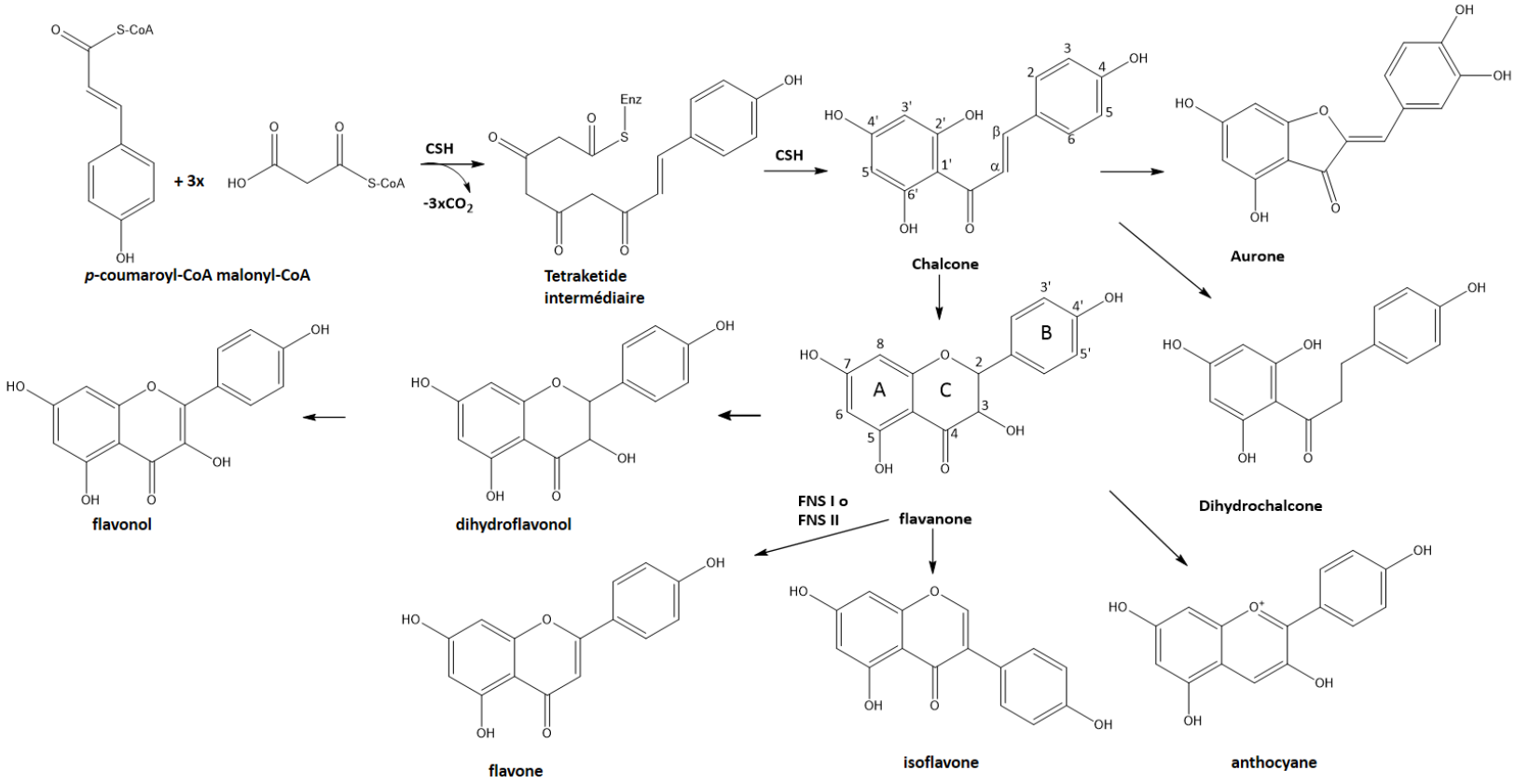


Figure 14. Origine biosynthétique et types de flavonoïdes. CHS = chalcone synthase ; FNS I = flavone synthase (2-oxoglutarate dépendant de di-oxygénases) ; FNS II = flavone synthase (cytochrome P450 dépendant de mono-oxygénases) (Berim and Gang, 2016).

Dans ce sous-chapitre, nous nous sommes concentrés sur les (poly) méthoxyflavones, composés lipophiles dont la dénomination est traditionnellement réservée aux composés avec quatre ou plus résidus méthoxy (Wudtiwai et al., 2011). La méthylation du groupe hydroxyle des flavonoïdes se produit en présence d'une méthyltransférase qui lie les fragments méthyle à l'aglycone. La méthylation peut avoir lieu sur l'oxygène ou un carbone pour former des composés *O*-methylés ou *C*-methylés, respectivement (Koirala et al., 2016). La présence de ces composés *sensu stricto* est plutôt limitée. Cependant, des familles botaniques appartenant aux angiospermes sont connues pour la production de (poly) méthoxyflavones telles que les Lamiaceae (*Scutellaria spp*., espèces du genre *Coleus* et *Plectranthus*…), les Asteraceae (*Praxelis clematidea*, *Euryops arabicus*…) et les Rutaceae (*Casimiroa* spp, *Citrus* spp…) (**Figure 15**) (Berim and Gang, 2016). L'*O*-méthylation est une voie métabolique commune dans le métabolisme des plantes où les flavonoïdes méthoxylés sont largement présents, bien que leur présence soient d'habitude beaucoup plus faible en concentration que celle des flavonoïdes non méthoxylés (Wen et al., 2017). Les rôles de ces produits dans la plante sont la protection contre le rayonnement UV, une activité antimicrobienne, la reproduction de la plante, des répulsifs contre des herbivores (Falcone Ferreyra et al., 2012). La bio-activité *in vitro* et *in vivo* de ces molécules a été reportée dans plusieurs travaux. Koirala et collaborateurs ont fait un travail de révision sur l'occurrence et les bio-activités des principaux flavonoïdes méthoxylés (*O*- et *C*-méthoxyflavones) (Koirala et al., 2016). Au cours des dernières années, les activités préventives anti-cancérigènes de certaines méthoxyflavones ont été démontrées. La tricine (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl) chromène-4-one) inhibe la prolifération de cellules murines gastro-intestinales tumorales (Li et al., 2016) et la diosmétine atténue les oxydes nitriques induits par les polysaccharides et le facteur de nécrose tumoral (TNF) (Chen et al., 2015; Shanmugam Kirubakaran et al., 2008). Comme attendu, la biodisponibilité des (poly) méthoxyflavones est bonne en raison de leur lipophilie et la protection des fragments hydroxyles par des groupes méthyles. Cependant leur solubilité est pauvre dans l'eau, ce qui peut se révéler être un facteur limitant pour déterminer la bonne dose (Walle, 2007).

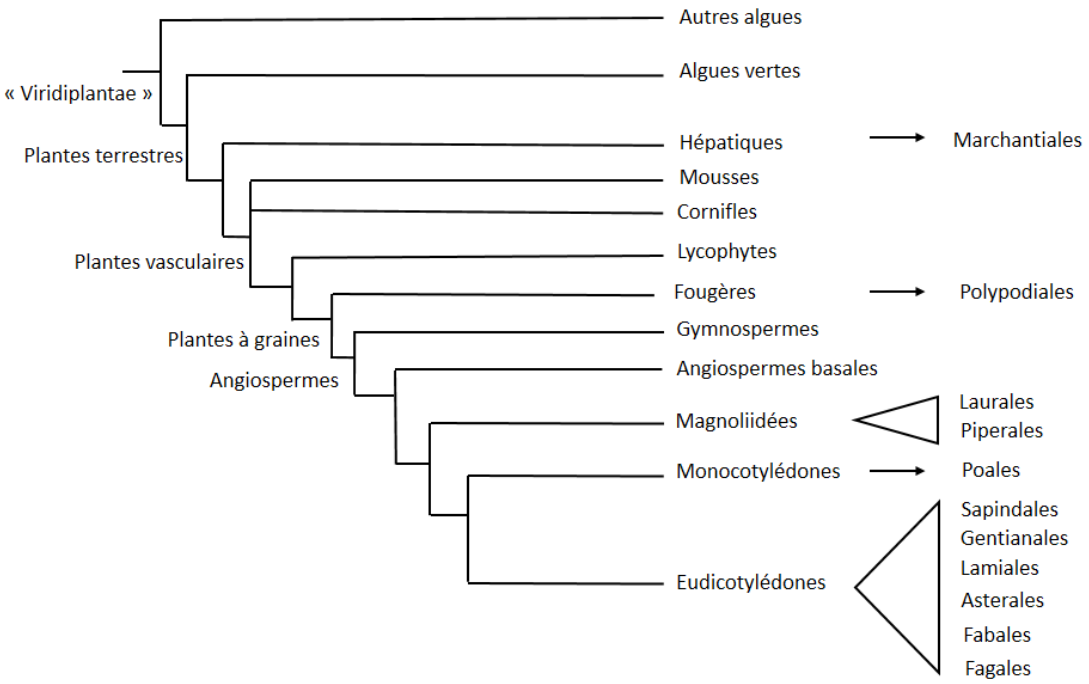


Figure 15. Occurrence de (poly) méthoxyflavones dans les plantes terrestres (Berim and Gang, 2016).

4.2.2 Relations structure-activité de méthoxyflavones évaluées pour leur activité antiplasmodiale et leur liaison à l'hème.

4.2.2.1 Résumé

Plasmodium falciparum est considéré comme un des parasites les plus dangereux à l'échelle mondiale. La recherche visant à caractériser la biologie et la biochimie du paludisme reste nécessaire pour comprendre les mécanismes d'action des molécules antipaludiques. Le principal mécanisme d'action de la plupart des antipaludiques consiste en l'interruption de la cristallisation de l'hème au cours de la phase érythrocytaire, perturbant le processus de détoxification du parasite. Ce mécanisme implique l'interaction de ces médicaments avec l'hème libre pour former des adduits pouvant être suivis par spectrométrie de masse. La formation des adduits est utilisée comme criblage d'activité antipaludique. Nous proposons de déterminer la nature des corrélations entre l'activité antiplasmodiale *in vitro* et le profil de liaison à l'hème sur une série de 33 methoxyflavones choisies pour représenter un large panel de substitutions. Les résultats montrent que les propriétés physicochimiques et géométriques induites par les méthoxylations impactent la liaison des méthoxyflavones avec l'hème. Le panel de flavones testées n'a pas permis d'établir des relations structure-activité entre la liaison à l'hème et l'activité antipaludique *in vitro*.

4.2.2.2 Proposition d'article (décrit ci-dessous « article 3 »)

Format de la revue *European Journal of Medicinal Chemistry*

Structure-activity relationship of methoxyflavones on antiplasmodial *in vitro* assay and correlation with MS heme-binding assay.

P.G. Vásquez-Ocmín[a1], S. Ortiz[b1], S. Cojean[c], G. Bernadat[a], C. Bouzidi[b], S. Michel[b], B. Figadère[a], R. Grougnet[b], S. Boutefnouchet[b*], A. Maciuk[a*].

[a] *Equipe "Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.*

[b] *Laboratoire de Pharmacognosie, UMR CNRS 8638 COMETE, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4, av. de l'Observatoire Paris, France.*

[c] *Equipe "Chimiothérapie antiparasitaire" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.*

[1] these authors contributed equally to the work.

* Corresponding author. Equipe "Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.
E-mail address: alexandre.maciuk@u-psud.fr (A. Maciuk).
Laboratoire de Pharmacognosie, UMR CNRS 8638 COMETE, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4, av. de l'Observatoire Paris, France.
E-mail address: Sabrina.boutefnouchet@parisdescartes.fr (S. Boutefnouchet)

Abstract

Plasmodium falciparum is considered as one of the most dangerous parasite worldwide. Research in malaria biology and chemistry remains important to understand mechanisms of action of active molecules against *Plasmodium*. The principal antimalarial drug mechanism consists in the interruption of heme crystallization during erythrocytic phase, perturbating parasite waste-sorting strategy. This mechanism involves interaction of drugs with free heme to form adducts that can be monitored by mass spectrometry. Formation of heme adducts is used as an antiplasmodial screening assay. We propose to determine the nature of the correlation between *in vitro* antiplasmodial activity and heme-binding profile of a set of 33 methoxyflavones chosen to represent a wide range of chemical substitutions. Results showed that physicochemical and geometrical properties induced by methoxylation impacts binding of methoxyflavones with heme.

Keywords: methoxyflavone, heme, docking.

1. Introduction

Malaria is the most important and dangerous parasitic disease affecting human beings [1]. In 2016, an estimated 216 million cases of malaria occurred worldwide and an estimated US$ 2.7 billions were invested globally in malaria control and elimination efforts by governments of malaria endemic countries and international partners [2]. Malaria is transmitted by the bite of female mosquitoes of the *Anopheles* genus infected by *Plasmodium spp*. [3,4]. During the trophozoite stage of the intraerythrocytic life cycle, *P. falciparum* internalizes up to 80% of the host hemoglobin through a phagocytic organelle known as the cytostome [5]. The cytostome then transports hemoglobin into an acidic digestive vacuole (pH 5.2) [6]. There it is digested by proteolytic enzymes into small peptides used as nutrients by the parasite [7]. For every consumed molecule of hemoglobin, four molecules of heme (ferriprotoporphyrin IX) are released. Free heme-Fe(III) is toxic, and cells usually degrade it by heme oxygenase. In *Plasmodium*, free heme-Fe(III) is crystallized into an insoluble crystal (hemozoin) [8]. Hemozoin has been described as being responsible for multiple deleterious *in vitro* and *ex vivo* immunomodulating effects [9]. Methods of quantification of free or crystallized heme-Fe(III) have been investigated, however the knowledge about its accumulation *in vivo* remains limited [10].

Heme detoxification pathway is specific from the parasite and is the target of many antimalarial drugs including quinoleines [11,12] and artemisinin [13,14]. Several methodologies have been described to assess compounds for their binding to heme [15–17]. Our previous work has identified flavones as mild antiplasmodial compounds and heme binders, and suggested that the methoxylation pattern could be of some significance for antiplasmodial activity [18]. We tested a serial of 33 methoxyflavones both *in vitro* on two strains of *Plasmodium falciparum* and on the heme binding assay by mass spectrometry. Docking studies were used to characterize the binding of methoxyflavones to heme.

Results and discussion

2.1. Preparation of the flavonoids library

Construction of the flavonoids library resulted from previous phytochemical works on exudate of *Gardenia* species (*G. oudiepe* and *G. urvillie*) and aerial parts of *Pentzia monodiana* [18,19]. Compounds **23** (5,7-dihydroxy-3,3',4',6-tetramethoxyflavone) and **30** (3',5,7-trihydroxy-3,4',5',6-tetramethoxyflavone) were previously isolated from *G. oudiepe*. Compounds **7** (3',5,7-trihydroxy-3-methoxyflavone), **11** (viscosine: 5,7-dihydroxy-3,6-dimethoxyflavone), **12**, (santine: 5,7-dihydroxy-3,4',6-trimethoxyflavone) and **31** (5,7-dihydroxy-3,3',4',5',6-pentamethoxyflavone) were previously isolated from *G. urvillie*. Compounds **20** (chrysoplenetin), **21** (artemetin), **24** (cirsilineol) and **25** (3'-*O*-methyleupatorine) were previously isolated from *P. monodiana*.

A total of 33 methoxyflavones were obtained and subjected to heme-binding assay, *in vitro* antiplasmodial evaluation on 3D7 (chloroquine-sensible) and W2 (chloroquine-resistant) strains and cytotoxic activity against HUVEC cell.

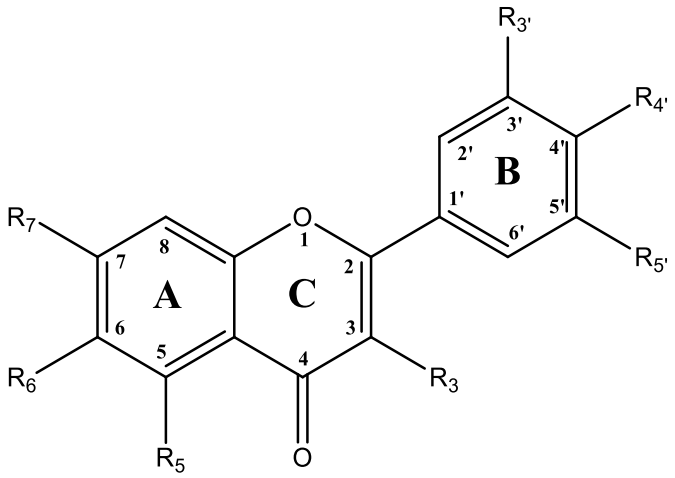


Figure 1. Methoxyflavones skeleton

1 **Table 1.** *In vitro* biological activity and heme-test of methoxyflavones

Derivatives methoxyflavones sub-families	Compounds	Substitutions							*P. falciparum* 3D7 sensitive strain, IC_{50} ± SD, µM	*P. falciparum* W2 resistant strain, IC_{50} ± SD, µM	HUVEC cells cytotoxicity, CC_{50} ± SD, µM	DV_{50} (eV)	cLogP (ACD/ChemSketch)	tPSA (Å²) (FAF-Drug4)	Selectivity index, IC_{50}/ CC_{50}
		C ring	A ring			B ring									
		R3	R5	R6	R7	R3'	R4'	R5'							
Chrysin derivatives	1	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	>50	>50	>50	7.79	2.88±0.53	70,34	≤1
	2	-H	-OH	-H	$-OCH_3$	-H	-H	-H	>50	>50	25.45±1.99	7.81	3.13±0.49	59,67	≤1
Apigenin derivatives	3	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	>50	>50	>50	7.93	2.10±0.56	90,57	≤1
	4	-H	-OH	-H	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	11.94±2.07	30.61 ± 6.3	27.89±2.42	8.09	3.40±0.60	68,9	2.33
	5	-H	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	>50	>50	30.12±2.85	15.94	3.53±0.95	57,9	≤1
Kaempferol derivatives	6	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	3.78±0.88	0.18 ± 0.05	>50	NA	2.05±0.60	110,8	13.22
	7	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	>50	>50	>50	NA	2.22±1.41	99,8	≤1
	8	$-OCH_3$	-OH	-H	$-OCH_3$	-H	-OH	-H	26.46±3.14	30.95 ± 3.48	>50	7.95	2.79±1.41	89,13	1.89
	9	$-OCH_3$	-OH	-H	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	>50	>50	30.18±2.20	7.95	2.97±1.25	78,13	≤1
	10	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	>50	>50	>50	15.77	2.49±1.37	67,13	≤1
Viscosine derivatives	11	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	-H	6.06±0.96	10.01 ± 1.19	23.98±2.07	7.85	1.80±1.46	109,03	3.96
	12	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	-H	$-OCH_3$	-H	30.29±4.69	>50	14.60±2.04	7.91	1.98±1.41	98,03	≤1
	13	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	>50	>50	>50	8.16	2.67±1.41	87,36	≤1
	14	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-H	24.97±3.53	>50	>50	15.83	2.30±1.45	76,36	≤1
Quercetin derivatives	15	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-H	8.52±2.25	10.02 ± 3.53	>50	4.11	2.07±0.72	131,03	2.0
	16	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-H	3.33±0.63	29.66 ± 3.96	17.81±0.81	7.93	2.02±1.44	120,03	5.35
	17	$-OCH_3$	-OH	-H	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-H	7.99±1.03	>50	18.45±1.22	8.05	2.43±1.37	98,36	2.31
	18	-OH	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-H	6.88±0.58	>50	>50	8.04	3.06±1.14	98,36	7.27
	19	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	3.96±1.36	9.51 ± 1.51	>50	15.89	2.37±1.37	76,36	12.63
Chrysoplenetin derivatives	20	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-OH	-H	>50	>50	15.50±2.03	11.96	2.26±1.46	107,59	≤1
	21	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	>50	>50	18.45±2.45	11.72	2.55±1.41	96,59	≤1
	22	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	12.7±1.34	9.51±1.51	>50	12.25	2.18±1.45	85,59	3.94
	23	-H	-OH	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	29.31±3.58	14.52 ± 2.36	6.25±2.03	8.03	2.46±1.22	98,03	≤1

Eupatilin derivatives	24	-H	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-OH	-H	>50	>50	31.25±2.35	8.29	1.67±1.14	98,36	≤1
	25	-H	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	>50	16.38 ± 4.81	25.91±1.02	11.98	2.83±1.20	87,36	≤1
Myricetin derivatives	26	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-OH	>50	>50	15.02±1.26	8.01	1.85±1.37	118,26	≤1
	27	$-OCH_3$	-OH	-H	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-OH	>50	>50	>50	8.15	2.43±1.38	107,59	≤1
	28	$-OCH_3$	-OH	-H	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	28.04±3.76	11.08 ± 1.26	>50	8.09	2.62±1.26	96,59	17.83
	29	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	>50	>50	>50	16.01	2.13±1.38	85,59	≤1
5'-Hydroxyquercetagetin derivatives	30	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-OH	30.29±4.63	>50	>50	8.03	1.43±1.45	127,49	≤1
	31	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	18.5±3.91	>50	>50	7.99	1.62±1.41	116,49	2.7
	32	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	7.28±3.34	9.93±0.68	>50	11.76	2.32±1.42	105,82	6.87
	33	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	12.94±1.68	>50	>50	15.96	1.95±1.45	94,82	3.86
	Chloroquine								0.02± 3.14	0.13±32.29	NT	15.86	NT	NT	NT

NA= not adducts; NT= not tested.

2.2. Correlation of methoxylation and affinity to heme

For each flavone subfamily, and also an overall correlation can be observed between the degree of methoxylation and the stability of the binding to heme (**Figure 2**).

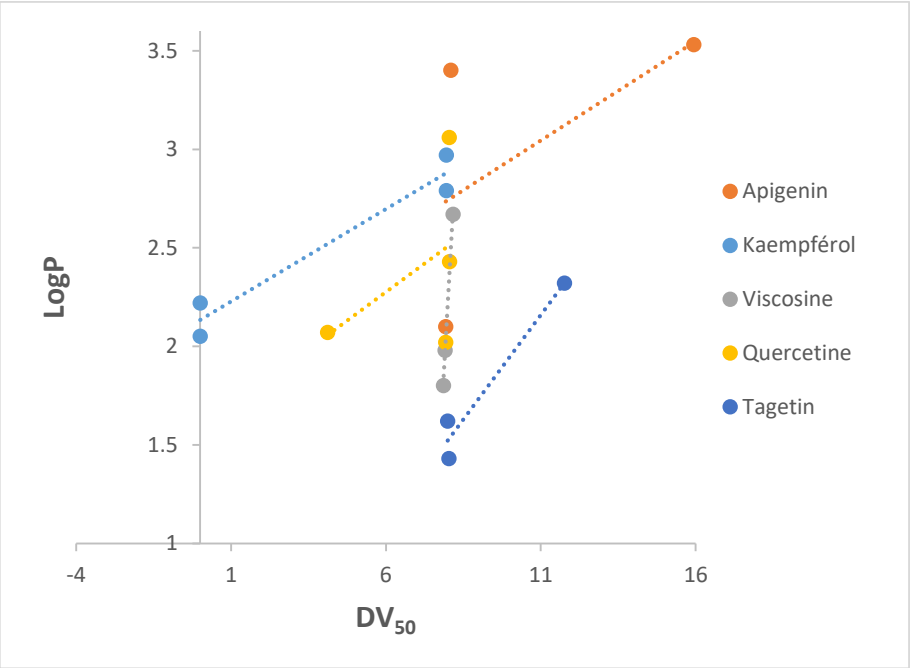


Figure 2. Positive correlation between LogP values and DV_{50}. Compound methoxylated on position 5 are excluded, see discussion.

Heme is hydrophobic in nature, and hydrophobic interactions are involved in the formation of adducts with heme [20]. As methoxylation increases hydrophobicity of the flavones, an effect of methoxylation can be expected on the ability to bind to heme. Indeed, a higher hydrophobic interaction can easily explain the increasing stability of adduct with increasing cLogP through methoxylation. Nevertheless, the R5 position does not follow this trend: its methoxylation decreases cLogP, but systematically increases the stability of the binding to heme, by a factor 2. This drop of hydrophobicity for the methoxylated analog is at first sight surprising, but it is well known for flavonoids: the 5-OH is engaged in a strong intramolecular hydrogen bound with the carbonyl in position 4 [21]. This bound effectively diminishes the partial negative charge on the carbonyl oxygen atom and partially blocks the carbonyl group from dipolar interactions with other polar molecules. At the contrary and paradoxically, a methoxy group remains the electron pairs of the oxygen atoms free to form hydrogen bounds. If the 5-OH is substituted by a methoxy group, this effect is cancelled and even if the hydrophobicity

is partly increased by the addition of a methoxy group, the total hydrophobicity decreases. This effect is obvious when comparing the following pairs of compounds: **9/10**, **13/14**, **21/22**, **28/29** and **32/33**. For compounds **18/19** show that either hydroxyl on position 3 or 5 can form hydrogen bound with the carbonyl. This effect also has an effect on the binding to heme: unexpectedly, methoxylation of position 5 significantly increases the binding to heme. In each methoxyflavone family, an increased DV_{50} is observed for the 5-OMe derivative (**Figure 3**).

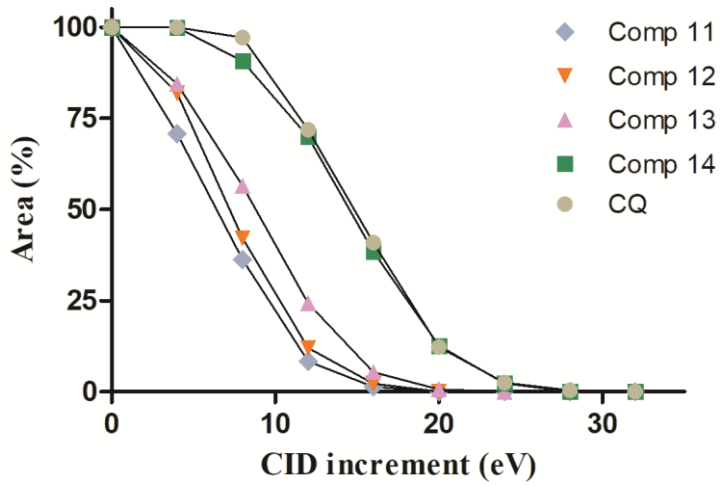


Figure 3. DV_{50} of the viscosine derivatives.

This suggests a specific positional role beyond lipophilicity. In order to understand the observation, we performed computational studies. The first simulations undertaken involved docking of kaempferol on the structure of a simplified derivative of heme. Early results seem to indicate that ligand might position itself parallel to the average plane of heme, and that endocyclic oxygen might lie in close proximity to metallic center (**Figure 4**). (Work under process at this date).

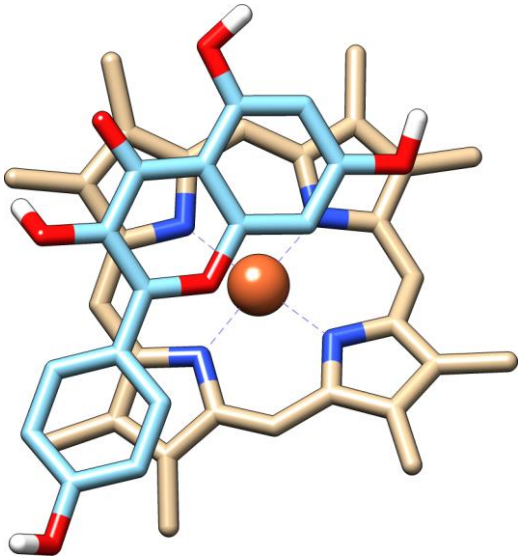


Figure 4. Preliminary theoretical model of kaempferol-heme complex obtained by molecular docking.

Flavonoids are known ligands for CYP450 enzymes, which bear a heme in their active site. Shimada et al. docked several flavonoids in cytochrome P450 enzymes, and outlined that surrounding amino acids have an important effect on the interaction of flavonoids with these enzymes, and also that there are several binding site and inhibition/induction mechanisms involved to explain effects of flavonoids. Nevertheless, it appeared that hydroxylation in positions 3 and 5 increase the inhibiting effect, suggesting that hydrophobicity might be involved in the binding [22]. Authors did not explore the effect of the methoxylation of positions 3 and 5. Another unexpected result in our work is the absence of adduct formation with the poorly methoxylated derivative of kaempferol 6, although this compound is the most active of the whole set. Undergoing computational data may help to explain this experimental result.

One of the goal of this was to determine whether the heme binding assay by MS would allow to predict in vitro antiplasmodial activity based on DV_{50} values. Ideally, Higher DV_{50} values should be correlated to lower IC_{50} values. The set of flavonoids tested in this work did not allow to establish such a correlation. Among 33 methoxyflavones, only the quercetin derivative **19** (3′,4′,5′,5,7-pentamethoxyflavone) showed a good activity associated to a significant stability of the adduct. Interestingly, all the tested quercetin derivatives showed good activity on *P. falciparum* 3D7 strain. This absence of correlation can be explained by the fact that 1) many mechanisms can account for

antiplasmodial activity beside heme binding, 2) heme-binding compounds may not penetrate the parasite or cross the digestive vacuole membranes.

Kaempferol (**6**) showed the lowest IC_{50} value of 0.18 µM against W2 and 3.78 µM on 3D7 strains, without being methoxylated and without being able to form adduct with heme. These data suggest that the antiplasmodial activity of kaempferol is not mediated by an association with heme, and that it could be explained by another type of antiplasmodial mechanism. Literature data corroborates this assumption. Indeed, kaempferol and quercetin (**15**) present inhibitory activity on FabG, FabZ and FabI enzymes, involved in the type II fatty acid biosynthesis (FAS-II) of *P. falciparum* [23]. Kaempferol was also reported to be active against *Leishmania donovani* to 9.7 ± 0.3 µM, a parasite which does not rely on hemoglobin for its metabolism [24].

According to the WHO guidelines, antiplasmodial activity is considered as good for IC_{50} values of 10 µM. Among the 33 compounds tested, only 8 could be considered as active. In most cases, activity was decreased on W2 strain. W2 strain is a multi-drug-resistant line originating from the Indochina III/CDC isolate, which contains point mutations in pfcrt as well as amplifications in pfmdr1 and GTP cyclohydrolase [25]. Kaempferol, the most active compound of 3D7 strain surprisingly showed an activity on W2 strain 20 times higher than its activity on 3D7 strain. This has also been described by Lopez et al [24].

The diversity of natural flavonoids is mainly due to their substitution pattern in the A, B and C rings by hydroxylation, methoxylation, prenylation, or glycosylation. Polymethoxylated flavones (PMFs) are a general term for flavones bearing four or more methoxyl groups on their benzo-γ-pyrone (15 carbon, C-6−C-3−C-6) skeleton with a carbonyl group at the C-4 position [26]. SAR studies of PMFs were reported for antibacterial and antioxidant activities [26,27]. In addition methylated flavonoids are suggested to be protective against cancer cells proliferation [28].

2. Conclusions

Impairment of hemozoin formation is the major mechanism of action of most antimalarial drugs. Their binding of heme is the "achilles hell" of the parasite. The thorough assessment of a series of methoxyflavones for their *in vitro* antiplasmodial activities, their affinity for heme and their physicochemical characteristics allowed to establish that the number and location of methoxylated phenols has a significant influence on heme binding, principally methoxylation in position 5. Nevertheless this set of methoxyflavones did not allow to establish a clear structure activity relationship. Only compound **19** showed simultaneously a significant biological activity and a strong interaction with heme. At the contrary, compound **6** (kaempferol) showed a surprising antiplasmodial activity especially on the resistant W2 strain, without binding to heme. Docking studies allowed to understand the role of position 5 in the formation and the stability of flavones adducts with heme.

3. Material and methods

3.1. *Chemical and reagents*

Mass spectrometry analyses of compounds was performed on a Waters ZQ 2000 mass spectrometer (Saint-Quentin, France). Silica gel 60 25-40 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Germany) was used for column chromatography (CC). ^{1}H and ^{13}C NMR experiments were performed in deuterated chloroform on a Bruker AC 300 MHz or a Bruker 400 MHz spectrometer (Wissembourg, France). All the reagents and solvents were purchased from Carlo Erba-SDS (Chaussée Du Vexin, France). Cyclohexane and ethyl acetate were distilled before us. Deionized water was used for all experiments. Compounds **1** and **3** were purchased from Sarsyntex (Merignac, France); **6** and **15** from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.2. *Flavonoids library*

Flavonoids library is composed of either isolated, commercial or semi-synthetic derivatives. Compounds **23**, **30** and **31** were previously isolated from bud exudates of

Gardenia oudiepe (Rubiaceae); **7**, **11** and **12** from *G. urvillei*; and **20**, **21**, **24** and **25** from *Pentzia monodiana* (Astearceae) [18,19]. Compounds **26** and **27** were isolated from bud exudates of *G. oudiepe* (Rubiaceae). Coumpounds **1**, **3**, **6** and **15** were purchased from Sarsyntex (Merignac, France) or Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Compounds **7**-**8**, **13**-**14** and **32**-**33** were previously synthetized [19]. Compound **2** was obtained by methylation from **1**; **4** and **5** from **3**; **9** and **10** from **6**; **16**-**19** from **15**; **22** from **20** and **28**-**29** from **27** (see section 4.5).

3.3. *Plant material*

G. oudiepe budswere collected in October 2008 in Forêt Plate, North Province of New Caledonia. Voucher specimens (POU-0290 respectively) were deposited at the Herbarium of the Botanical and Tropical Ecology Department of the IRD Center, Noumea, New Caledonia.

3.4. *Extraction and isolation*

55 g of *G. oudiepe* exudate were subjected to silica gel chromatographic separation using cyclohexane/DCM, EtOAc/DCM and DCM/MeOH mixtures of increasing polarity as eluent. Fraction obtained with AcOEt/DCM 60/40 (3.28 g) was subjected to another silica gel chromatography with AcOEt/DCM as eluent and allowed the isolation of compound **26** (15 mg) and **25** (2.1 g, previously isolated). 27 g of exudate of *G. urvillei* were also subjected to silica gel chromatography with cyclohexane/DCM and DCM/MeOH as eluent. Fraction obtained with cyclohexane/DCM (65:35) (128 mg) was subjected to another silica gel chromatography with cyclohexane/DCM mixture as eluent, allowing the isolation of compound **27** (20 mg). Identification of isolated compounds was confirmed by NMR analysis and MS spectrometry data and by comparison with literature data: 3',5,7-trihydroxy-3,4',5'-trimethoxyflavone (compound **26**) [29] and 5,5’-dihydroxy-3,7,3’,4’-tetramethoxyflavone (compound **27**) [30].

3.5. *Synthesis of the compounds **2, 4-5**, **9-10**, **16-19**, **22**, **28** and **29***

Hemisynthesis of compounds **8** from **7**; **13** and **14** from **12**; **32** and **33** from **31** were previously reported, using dimethyl sulfoxide (Me_2SO_4, 4 equiv.) and 1,8-diazobiciclo[5.4.0]undec-7-en (DBU, 2 equiv.) in dried acetone as solvent at room temperature [19]. Furthermore, methylation of isolated compounds **20** and **27** and synthesis of compounds 2, 4-5, 9-10, 16-19 from the commercial available compounds **1**, **3**, **6** and **15** were performed. Methylation consisted in stirring the substrate with methyl iodide (MeI, 135 equiv.) and carbonate of potassium (K_2CO_3, 66 equiv.) in dried acetone at room temperature for 1 h. The crudes reaction were precipitated and washed with ice water. The resulting residue were solubilized with ethyl acetate (EtOAc, 10 mL) and treated with 1N HCl solution (3 mL). The final products were extracted with EtOAc (3x10 mL) and the organic phases were washed with saturated NaCl solution and dried over Na_2SO_4. After filtration, and solvent evaporation, methylated compounds were purified by silica gel chromatography column, using a mixture of DCM/MeOH (99.1/0.1 to 95/5 v/v) as eluent [31]. Identification of resulting pure compounds were confirmed by comparison of ^{1}H, ^{13}C NMR and MS analysis with literature data.

Methylation of 50 mg (0.20 mmol) of 5,7-dihydroxyflavone (chrysin, **1**) afforded **2** (48.5 mg, 92 % of yield) [32].

Methylation of 50 mg (0.19 mmol) of 5,7,4'-trihydroxyflavone (apigenin, **3**) gave **4** (31.6 mg, 60 %) and **5** (8.3 mg, 15 %) with a ratio of 4/1 [32].

Methylation of 100 mg (0.35 mmol) of 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (kaempferol, **6**) gave **9** (71.1 mg, 62 %) and **10** (14.3 mg, 12 %) with a ratio of 5/1 [33].

Methylation of 150 mg (0.5 mmol) of 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone (quercetin, **15**) gave **16** (15.6 mg, 10 %), **17** (15.6 mg, 9.5 %), **18** (97.8 mg, 55 %) and **19** (17.0, 9.2 %) with a ratio of 1/1/6/1 [34–37].

Methylation of 6 mg (0.017 mmol) of isolated compound **20** gave **22** (5.5 mg, 85 %) [38].

Methylation of 12 mg (0,032 mmol) of isolated compound **27** gave **28** (7.5 mg, 61 %) and **29** (3.9 mg, 28 %) in ratio of 2/1 [39].

3.6. *Heme-binding assay by MS*

Hemin and compounds were dissolved in DMSO at 5 mM. An auto sampler (G1367E 1260 Hip ALS, Agilent Technologies, Les Ulis, France) was used to realize the automatic mixing in 384 well-plates of: compound 5 µL + heme 5 µL + tween 20 (10 µM in water) 5 µL + CBSO (citric buffer saturated octanol, pH = 5.2) 85 µL. Citric buffer saturated octanol (CBSO) was prepared by mixing 5 mL of citric acid 50 mM pH 5.2 and 15 mL of n-octanol (anhydrous, ≥99%) and letting it to settle at 23 °C for 30 min. Upper phase of CBSO was used. Five microliter of the sample were injected in a 6530 Accurate-Mass Q-ToF LC/MS instrument (Agilent Technologies). Positive ESI (electrospray ionization) was used, in 1700 range / 2 GHz mode. Ionization source conditions were: drying gas temperature 325 °C, drying gas flow 11 L/min, nebulizer 35 psig, fragmentor 175 V, skimmer 65 V. Mass range for MS acquisition was *m/z* 200-1700. Masses were detected for heme at *m/z* 616.16 and for adducts of compound of mass "X" at *m/z* $(616.16 + \text{"X"})^+$. Chloroquine diphosphate (5 mM in water) was used as positive control.

3.7. *Collision induced dissociation of non-covalent adducts*

Dissociation voltage at 50% was determined by means of applying increasing collision energy from 0 to 32 eV. MSMS targeted mode, with isolation width of ~1.3 *m/z* and flow injections analyses (FIA) were used. MSMS parameters in source were the same as described above. Results were plotted and sigmoidal regression curve was calculated using GraphPad Prism software. DV_{50} is the collision energy dissociating 50% of the initial adduct [15].

3.8. *Parasite culture of Plasmodium falciparum*

The chloroquine-sensitive 3D7 *P. falciparum* strain and W2 chloroquine-resistant stain were obtained from Malaria French National Reference Center (CNR Paludisme, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris). The strains were maintained in O^+ human erythrocytes in albumin supplemented RPMI medium under continuous culture using the candle-jar method [40]. The parasites were synchronized to the ring stage by repeated sorbitol treatment [41].

3.9. *In vitro antiplasmodial activity on Plasmodium falciparum*

A 2.5% (V/V) erythrocytes suspension with 1% parasitemia was incubated with the compounds. Compound concentrations ranged between 48.5 nM and 1 µM, obtained by serial dilution, in duplicates. After 44 h of incubation at 37 °C, the plates were subjected to 3 freeze-thaw cycles to achieve complete hemolysis. The parasite lysis suspension was diluted 1:5 in lysis buffer. Monitoring of *in vitro* susceptibility uses the concentration that inhibits 50% of the parasite's growth (IC_{50}). Parasite growth was determined by using SYBR® Green I, a dye showing strong fluorescence enhancement upon contact with parasite DNA. Incorporation of SYBR® Green I (Applied Biosystems, Strasbourg, France) in parasite DNA was measured using the Mastercycler epRealplex (Eppendorf, France) according to the following program to increase the SYBR® Green I incorporation: 90 °C (1 min), decrease in temperature from 90 °C to 10 °C (during 5 min), followed by fluorescence reading. Untreated infected and uninfected erythrocytes were used as controls and chloroquine diphosphate (Sigma, France) as reference drug [42,43]. IC_{50} was calculated by IC-estimator online software (http://www.antimalarial-icestimator.net).

3.10. *Cytotoxic activity*

For determination of cytotoxicity IC_{50}, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEM-F12) medium in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) plus 1% streptomycin and incubated in 5% CO_2 at 37 °C. The cytotoxicity of compounds (starting concentration of 10 mM) was evaluated using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric method [44]. HUVECs were seeded in a 96-well plate at 15,000 cells per well and incubated for 24 h until cells reached >80% confluence. After discarding the old medium, the cells were incubated in the medium containing test solutions at eight concentrations ranging from 0.78 to 100 µg/mL. After 24 h incubation, 20 µL MTT (5 mg/mL) was added to each well and cells were incubated for another 3 h. Finally, the culture medium containing MTT solution was removed and 100 µL DMSO were added to dissolve formazan crystals. Absorbance was read with an Eppendorf plate reader at 546 nm. CC_{50}, defined as extract concentration that reduces the number of

viable cells by 50%, was calculated using GraphPad Prism Software (Version 5.0, San Diego, CA, USA) [43].

3.11. *ADMET Prediction*

FAF-Drugs4 [45] and ChemSketch (ACD/Labs Products) software were used to screen the flavonoids library in order to predict their ADMET proprieties. For FAF-Drugs4 on line service, the input structures (previously generated SDF files) were formatted according to FAF-Drugs4's requirements using Bank-Formatter. XLOGP3 was chosen as the clogP computation program to estimate the lipophilicity and the derived ADMET descriptors. For ChemSketsh software, the input file were previously generated as SK2 files and prediction of clogP were estimated for all compounds.

3.12. *Molecular docking studies:*

Starting coordinates of heme and kaempferol were obtained by minimization using a molecular mechanics force field implemented by MarvinSketch v17.28 software package [www.chemaxon.com]. Resulting structure of kaempferol was then docked against heme using AutoDock Vina 1.1.2 software package [46]. Depiction of the highest ranked solution was performed using UCSF Chimera v1.11 software package [47].

Acknowledgments

The authors thank the Consejo de Ciencia y Tecnología del Perú (CONCYTEC) (Council for science and technology of Peru) (299 - 2014 -FONDECYT) for the Ph.D. scholarship (PGVO). The authors thank Dr. Guy Lewin for fruitful discussion.

References

[1] N.J. White, S. Pukrittayakamee, T.T. Hien, M.A. Faiz, O.A. Mokuolu, A.M. Dondorp, Malaria, The Lancet. 383 (2014) 723–735. doi:10.1016/S0140-6736(13)60024-0.

[2] WHO, World malaria report 2017, World Heal, Luxembourg, 2017.

[3] A.F. Cowman, J. Healer, D. Marapana, K. Marsh, Malaria: Biology and Disease, Cell. 167 (2016) 610–624. doi:10.1016/j.cell.2016.07.055.

[4] L.H. Miller, H.C. Ackerman, X. Su, T.E. Wellems, Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments, Nat. Med. 19 (2013) 156.

[5] D.E. Goldberg, Hemoglobin degradation., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 295 (2005) 275–291. doi:https://doi.org/10.1007/3-540-29088-5_11.

[6] J. Wunderlich, P. Rohrbach, J.P. Dalton, The malaria digestive vacuole., Front. Biosci. Sch. Ed. 4 (2012) 1424–1448.

[7] T.J. Egan, Haemozoin formation, Mol. Biochem. Parasitol. 157 (2008) 127–136. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.11.005.

[8] A.M. Choi, J. Alam, Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15 (1996) 9–19. doi:10.1165/ajrcmb.15.1.8679227.

[9] M.T. Shio, F.A. Kassa, M.-J. Bellemare, M. Olivier, Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin, Microbes Infect. 12 (2010) 889–899. doi:10.1016/j.micinf.2010.07.001.

[10] K. Deroost, N. Lays, S. Noppen, E. Martens, G. Opdenakker, P.E. Van den Steen, Improved methods for haemozoin quantification in tissues yield organ-and parasite-specific information in malaria-infected mice, Malar. J. 11 (2012) 166–166. doi:10.1186/1475-2875-11-166.

[11] C.K. Carney, L. Pasierb, D. Wright, Heme Detoxification in Malaria: A Target Rich Environment, in: Med. Inorg. Chem., American Chemical Society, 2005: pp. 263–280. https://doi.org/10.1021/bk-2005-0903.ch015 (accessed September 17, 2018).

[12] K.Y. Fong, D.W. Wright, Hemozoin and antimalarial drug discovery, Future Med. Chem. 5 (2013) 1437–1450. doi:10.4155/fmc.13.113.

[13] J. Li, B. Zhou, Biological actions of Artemisinin: Insights from medicinal chemistry studies, Molecules. 15 (2010) 1378–97. doi:10.3390/molecules15031378.

[14] R. Kannan, D. Sahal, V.. Chauhan, Heme-Artemisinin Adducts Are Crucial Mediators of the Ability of Artemisinin to Inhibit Heme Polymerization, Chem. Biol. 9 (2002) 321–332. doi:10.1016/S1074-5521(02)00117-5.

[15] K. Muñoz-Durango, A. Maciuk, A. Harfouche, S. Torijano-Gutiérrez, J.-C. Jullian, J. Quintin, K. Spelman, E. Mouray, P. Grellier, B. Figadère, Detection, Characterization, and Screening of Heme-Binding Molecules by Mass Spectrometry for Malaria Drug Discovery, Anal. Chem. 84 (2012) 3324–3329. doi:10.1021/ac300065t.

[16] V. Thomas, A. Góis, B. Ritts, P. Burke, T. Hänscheid, G. McDonnell, A Novel Way to Grow Hemozoin-Like Crystals *In Vitro* and Its Use to Screen for Hemozoin Inhibiting Antimalarial Compounds, PLOS ONE. 7 (2012) e41006. doi:10.1371/journal.pone.0041006.

[17] B.L. Tekwani, L.A. Walker, Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for *in vitro* beta-hematin formation assay., Comb. Chem. High Throughput Screen. 8 (2005) 63–79. doi:10.2174/1386207053328101.

[18] S. Ortiz, K. Dali-Yahia, P. Vasquez-Ocmin, R. Grougnet, P. Grellier, S. Michel, A. Maciuk, S. Boutefnouchet, Heme-binding activity of methoxyflavones from Pentzia monodiana Maire (Asteraceae), Fitoterapia. 118 (2017) 1–5. doi:10.1016/j.fitote.2017.01.012.

[19] L.H. Mai, G.G. Chabot, P. Grellier, L. Quentin, V. Dumontet, C. Poulain, L.S. Espindola, S. Michel, H.T.B. Vo, B. Deguin, R. Grougnet, Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Caledonian *Gardenia* species (Rubiaceae), Eur. J. Med. Chem. 93 (2015) 93–100. doi:10.1016/J.EJMECH.2015.01.012.

[20] K. Bachhawat, C.J. Thomas, N. Surolia, A. Surolia, Interaction of Chloroquine and Its Analogues with Heme: An Isothermal Titration Calorimetric Study, Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 (2000) 1075–1079. doi:10.1006/bbrc.2000.3592.

[21] W.L. Whaley, J.D. Rummel, N. Kastrapeli, Interactions of Genistein and Related Isoflavones with Lipid Micelles, Langmuir. 22 (2006) 7175–7184. doi:10.1021/la0606502.

[22] T. Shimada, K. Tanaka, S. Takenaka, N. Murayama, M. V. Martin, M.K. Foroozesh, H. Yamazaki, F.P. Guengerich, M. Komori, Structure−Function Relationships of Inhibition of Human Cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 Flavonoid Derivatives, Chem. Res. Toxicol. 23 (2010) 1921–1935. doi:10.1021/tx100286d.

[23] D. Tasdemir, G. Lack, R. Brun, P. Rüedi, L. Scapozza, R. Perozzo, Inhibition of *Plasmodium falciparum* Fatty Acid Biosynthesis: Evaluation of FabG, FabZ, and FabI as Drug Targets for Flavonoids, (2006). doi:10.1021/JM0600545.

[24] D. López, L. Cherigo, C. Spadafora, M.A. Loza-Mejía, S. Martínez-Luis, Phytochemical composition, antiparasitic and α–glucosidase inhibition activities from *Pelliciera rhizophorae*, Chem. Cent. J. 9 (2015) 53. doi:10.1186/s13065-015-0130-3.

[25] V.C. Corey, A.K. Lukens, E.S. Istvan, M.C.S. Lee, V. Franco, P. Magistrado, O. Coburn-Flynn, T. Sakata-Kato, O. Fuchs, N.F. Gnädig, G. Goldgof, M. Linares, M.G. Gomez-Lorenzo, C. De Cózar, M.J. Lafuente-Monasterio, S. Prats, S. Meister, O. Tanaseichuk, M. Wree, Y. Zhou, P.A. Willis, F.-J. Gamo, D.E. Goldberg, D.A. Fidock, D.F. Wirth, E.A. Winzeler, A broad analysis of resistance development in the malaria parasite, Nat. Commun. 7 (2016) 11901.

[26] L. Liu, X. Xu, D. Cheng, X. Yao, S. Pan, Structure–Activity Relationship of Citrus Polymethoxylated Flavones and Their Inhibitory Effects on *Aspergillus niger*, J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 4336–4341. doi:10.1021/jf3012163.

[27] T. Wu, X. Zang, M. He, S. Pan, X. Xu, Structure–Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-Escherichia coli Activity and Inhibition of DNA Gyrase, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 8185–8190. doi:10.1021/jf402222v.

[28] J.C.J.M.D.S. Menezes, B. Orlikova, F. Morceau, M. Diederich, Natural and Synthetic Flavonoids: Structure–Activity Relationship and Chemotherapeutic Potential for the Treatment of Leukemia, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 56 (2016) S4–S28. doi:10.1080/10408398.2015.1074532.

[29] E. Ayanoglu, A. Ulubelen, W.D. Clark, G.K. Brown, R.R. Kerr, T.J. Mabry, Myricetin and quercetin methyl ethers from *Haplopappus integerrimus* var. Punctatus, Phytochemistry. 20 (1981) 1715–1717. doi:10.1016/S0031-9422(00)98561-3.
[30] C. Demetzos, D. Angelopoulou, A. Kolocouris, I. Daliani, T. Mavromoustakos, Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative, J. Heterocycl. Chem. 38 (2001) 703–710. doi:10.1002/jhet.5570380327.
[31] R.G. Britton, E. Horner-Glister, O.A. Pomenya, E.E. Smith, R. Denton, P.R. Jenkins, W.P. Steward, K. Brown, A. Gescher, S. Sale, Synthesis and biological evaluation of novel flavonols as potential anti-prostate cancer agents, Eur. J. Med. Chem. 54 (2012) 952–958. doi:10.1016/J.EJMECH.2012.06.031.
[32] Z. Sipos, K. Kónya, Synthesis of Benzopyran-Fused Flavone Derivatives via Microwave-Assisted Intramolecular C–H Activation, Synthesis. 50 (2018) 1610–1620. doi:10.1055/s-0036-1591773.
[33] K. Lu, J. Chu, H. Wang, X. Fu, D. Quan, H. Ding, Q. Yao, P. Yu, Regioselective iodination of flavonoids by N-iodosuccinimide under neutral conditions, Tetrahedron Lett. 54 (2013) 6345–6348. doi:10.1016/J.TETLET.2013.09.051.
[34] K. Kato, M. Ninomiya, K. Tanaka, M. Koketsu, Effects of Functional Groups and Sugar Composition of Quercetin Derivatives on Their Radical Scavenging Properties, J. Nat. Prod. 79 (2016) 1808–1814. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00274.
[35] Z. Yuan, G. Luan, Z. Wang, X. Hao, J. Li, Y. Suo, G. Li, H. Wang, Flavonoids from *Potentilla parvifolia* Fisch . and Their Neuroprotective Effects in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells *in vitro*, Chem. Biodivers. 14 (2017) e1600487. doi:10.1002/cbdv.201600487.
[36] M. Cormier, F. Ghouili, P. Roumaud, L.J. Martin, M. Touaibia, Influence of flavonols and quercetin derivative compounds on MA-10 Leydig cells steroidogenic genes expressions, Toxicol. In Vitro. 44 (2017) 111–121. doi:10.1016/J.TIV.2017.06.027.
[37] M.A. Arai, Y. Kofuji, Y. Tanaka, N. Yanase, K. Yamaku, R.G. Fuentes, U.K. Karmakar, M. Ishibashi, Synthesis of rocaglamide derivatives and evaluation of their Wnt signal inhibitory activities, Org. Biomol. Chem. 14 (2016) 3061–3068. doi:10.1039/C5OB02537K.
[38] Shiming Li, and Chih-Yu Lo, C.-T. Ho*, Hydroxylated Polymethoxyflavones and Methylated Flavonoids in Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Peel, (2006). doi:10.1021/JF060234N.
[39] M.S. Butler, P.C. Healy, P.I. Forster, G.P. Guymer, R.J. Quinn, 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone from the Australian plant *Eremophila debilis* (Myoporaceae), Fitoterapia. 126 (2018) 90–92. doi:10.1016/J.FITOTE.2017.07.014.
[40] W. Trager, J.B. Jensen, Human malaria parasites in continuous culture., Science. 193 (1976) 673–675.
[41] C. Lambros, J.P. Vanderberg, Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture., J. Parasitol. 65 (1979) 418–420. doi:.10.2307/3280287.
[42] G. Komlaga, S. Cojean, R.A. Dickson, M.A. Beniddir, S. Suyyagh-Albouz, M.L.K. Mensah, C. Agyare, P. Champy, P.M. Loiseau, Antiplasmodial activity of selected

medicinal plants used to treat malaria in Ghana, Parasitol. Res. 115 (2016) 3185–3195. doi:10.1007/s00436-016-5080-8.

[43] P. Vásquez-Ocmín, S. Cojean, E. Rengifo, S. Suyyagh-Albouz, C.A. Amasifuen Guerra, S. Pomel, B. Cabanillas, K. Mejía, P.M. Loiseau, B. Figadère, A. Maciuk, Antiprotozoal activity of medicinal plants used by Iquitos-Nauta road communities in Loreto (Peru), J. Ethnopharmacol. 210 (2018) 372–385. doi:10.1016/j.jep.2017.08.039.

[44] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods. 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

[45] D. Lagorce, L. Bouslama, J. Becot, M.A. Miteva, B.O. Villoutreix, A. Valencia, FAF-Drugs4: free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery, Bioinformatics. 33 (2017) 3658–3660. doi:10.1093/bioinformatics/btx491.

[46] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, J. Comput. Chem. 31 (2009) 455–461. doi:10.1002/jcc.21334.

[47] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis., J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084.

Supporting informations

Structure-activity relationship of methoxyflavones on antiplasmodial *in vitro* assay and correlation with MS heme-binding assay.

P.G. Vásquez-Ocmín[a1], S. Ortiz[b1], S. Cojean[c], G. Bernadat[a], C. Bouzidi[b], S. Michel[b], B. Figadère[a], R. Grougnet[b], S. Boutefnouchet[b*], A. Maciuk[a*].

[a] *Equipe "Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.*

[b] *Laboratoire de Pharmacognosie, UMR CNRS 8638 COMETE, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4, av. de l'Observatoire Paris, France.*

[c] *Equipe "Chimiothérapie antiparasitaire" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.*

[1] these authors contributed equally to the work.

* Corresponding author. Equipe "Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.

E-mail address: alexandre.maciuk@u-psud.fr (A. Maciuk).

Laboratoire de Pharmacognosie, UMR CNRS 8638 COMETE, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4, av. de l'Observatoire Paris, France.

E-mail address: Sabrina.boutefnouchet@parisdescartes.fr (S. Boutefnouchet)

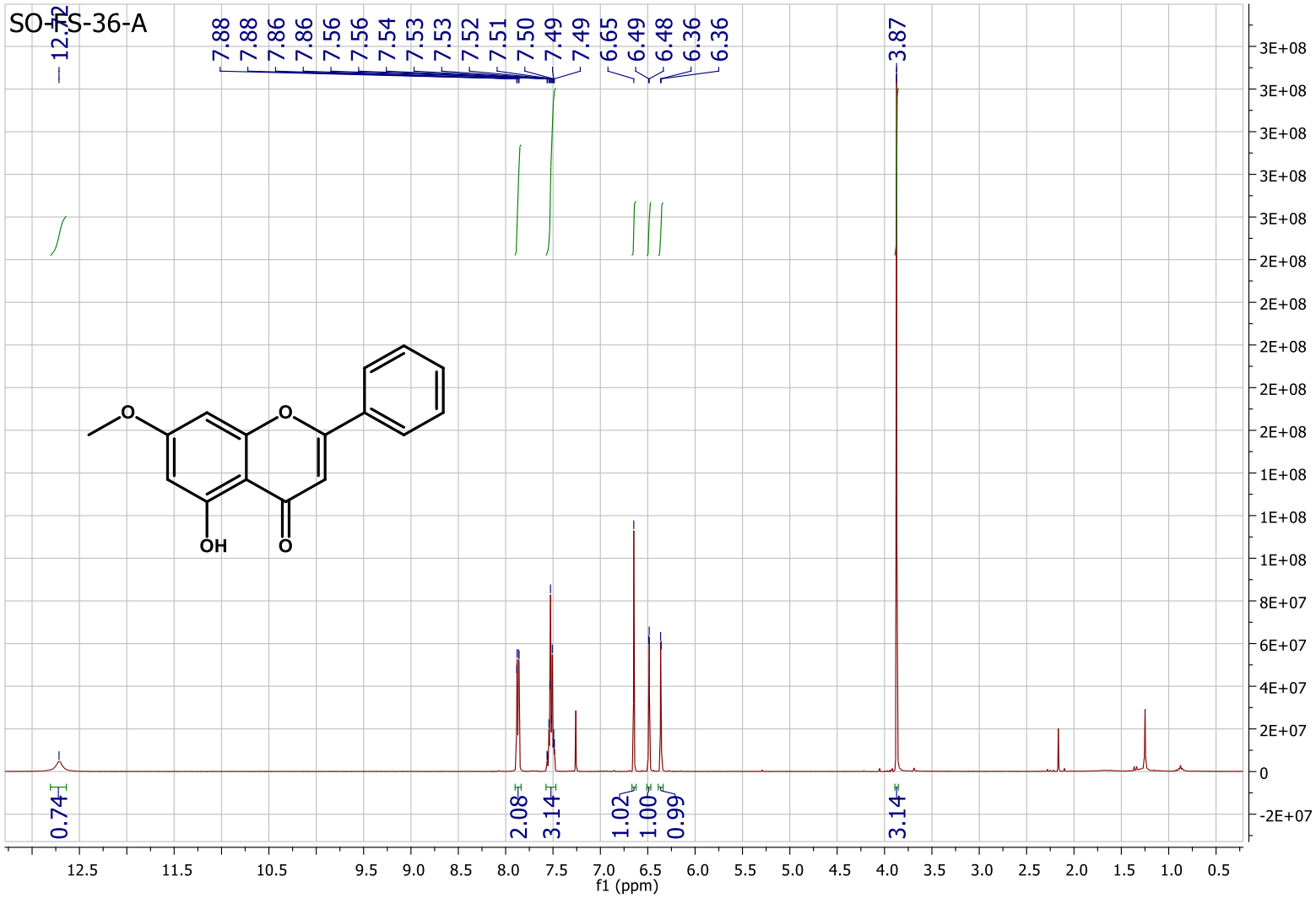
Table 1: ^{1}H-NMR Chemical shift of synthetized (**2**, **4**-**5**, **9**-**10**, **16**-**19**, **22** and **28**-**29**) and isolated (**26**-**27**) compounds.

Pos.	**2**[(a)]	**4**[(a)]	**5**[(a)]	**9**[(a)]	**10**[(a)]	**16**[(b)]	**17**[(b)]	**18**[(a)]	**19**[(a)]	**22**[(a)]	**26**[(a)]	**27**[(a)]	**28**[(a)]	**29**[(a)]
3	6.65 s	6.56 s	6.63 s											
6	6.49 d 2.0	6.35 d 2.1	6.37 d 2.0		6.34 d 2.2	6.25 d 2.2	6.23 d 2.0	6.35 d 2.1	6.35 d 2.5		6.21 s	6.37 s	6.34 d 2.2	6.35 d 2.5
7														
8	6.36 d 2.0	6.47 d 2.1	6.57 d 2.0	6.46 s	6.50 d 2.2	6.49 d 2.2	6.69 d 2.0	6.44 d 2.1	6.44 d 2.5	6.75 s	6.45 s	6.46 s	6.43 d 2.2	6.50 d 2.5
2’	7.87 dd 7.7, 1.6	7.00 d 9.1	7.00 d 9.0	7.05 d 9.2	7.01 d 9.6	7.70 d 2.2	7.66 d 2.0	7.69 d 2.0	7.70 d 2.7	7.70 dd 7.9, 2.4	7.24 s	7.37 s	7.35 s	7.36 s
3’	7.56-7.48 m	7.83 d 9.1	7.82 d 9.0	8.23 d 9.2	8.06 d 9.6									
4’														
5’		7.83 d 9.1	6.57 d 2.0	7.05 d 9.2	8.06 d 9.6	6.99 d 8.9	7.14 d 9.0	6.97 d 9.0	6.96 d 8.7	6.99 d 7.9	7.18 s	7.35 s	7.35 s	
6’	7.87 dd 7.7, 1.6	7.00 d 9.1	7.00 d 2.0	7.05 d 9.2	7.01 d 9.6	7.58 dd 8.9, 2.2	7.70 dd 9.0, 2.0	7.71 dd 9.0, 2.0	7.69 dd 8.7, 2.7	7.69 dd 7.9, 2.4				7.36 s
OMe-3				3.99 s	3.96 s	3.86 s	3.86 s	3.87 s	3.89 s	3.87 s	3.82 s	3.90 s	3.86 s	3.88 s
OMe-5			3.92 s		3.88 s			3.99 s	3.95 s	4.01 s				3.97 s
OMe-6										3.92 s				
OMe-7	3.87 s	3.87 s	3.88 s	3.89 s	3.89 s		3.96 s		3.95 s	3.97 s		4.01 s	3.86 s	3.91 s
OMe-8														
OMe-3’									3.95 s	3.97 s	3.86 s	3.96 s	3.93 s	3.94 s
OMe-4’		3.89 s	3.91 s	3.89 s	3.87 s		3.93 s	3.87 s	3.87 s	3.98 s	3.77 s	3.89 s	3.94 s	3.93 s
OMe-5’													3.93 s	3.94 s

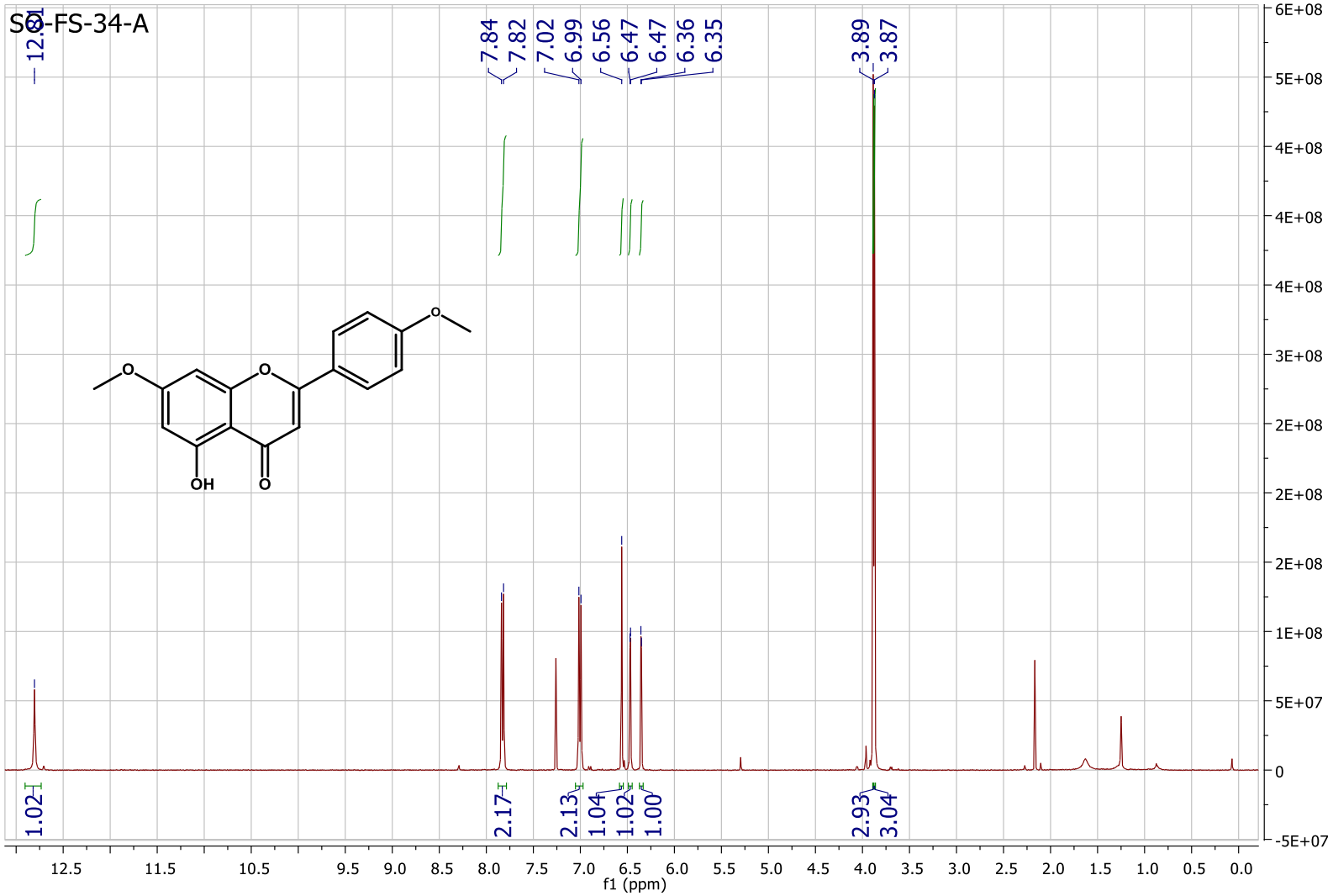
(a) ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$).

(b) ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3COCD_3).

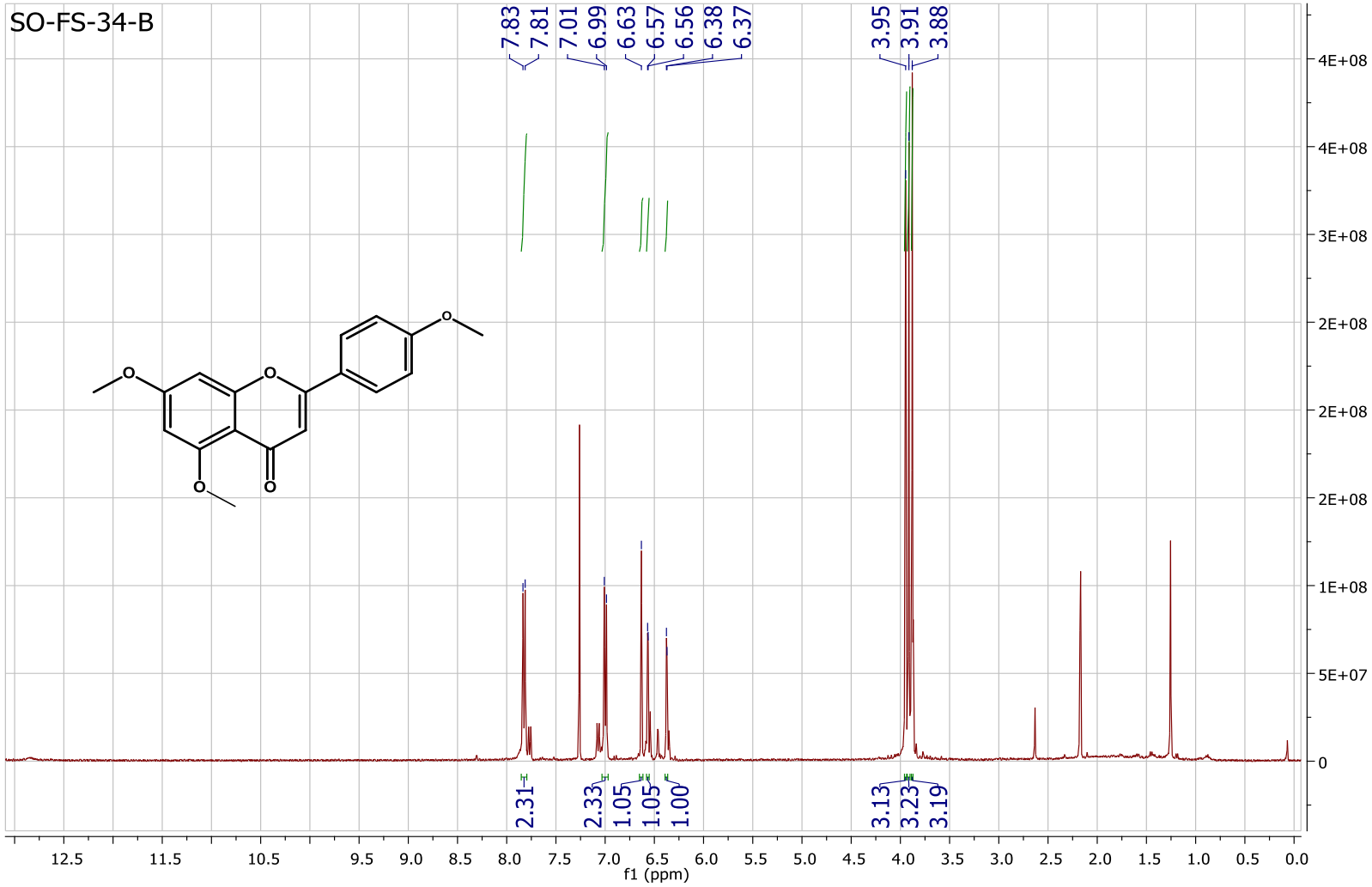
Proton NMR of **2** in CDCl3.



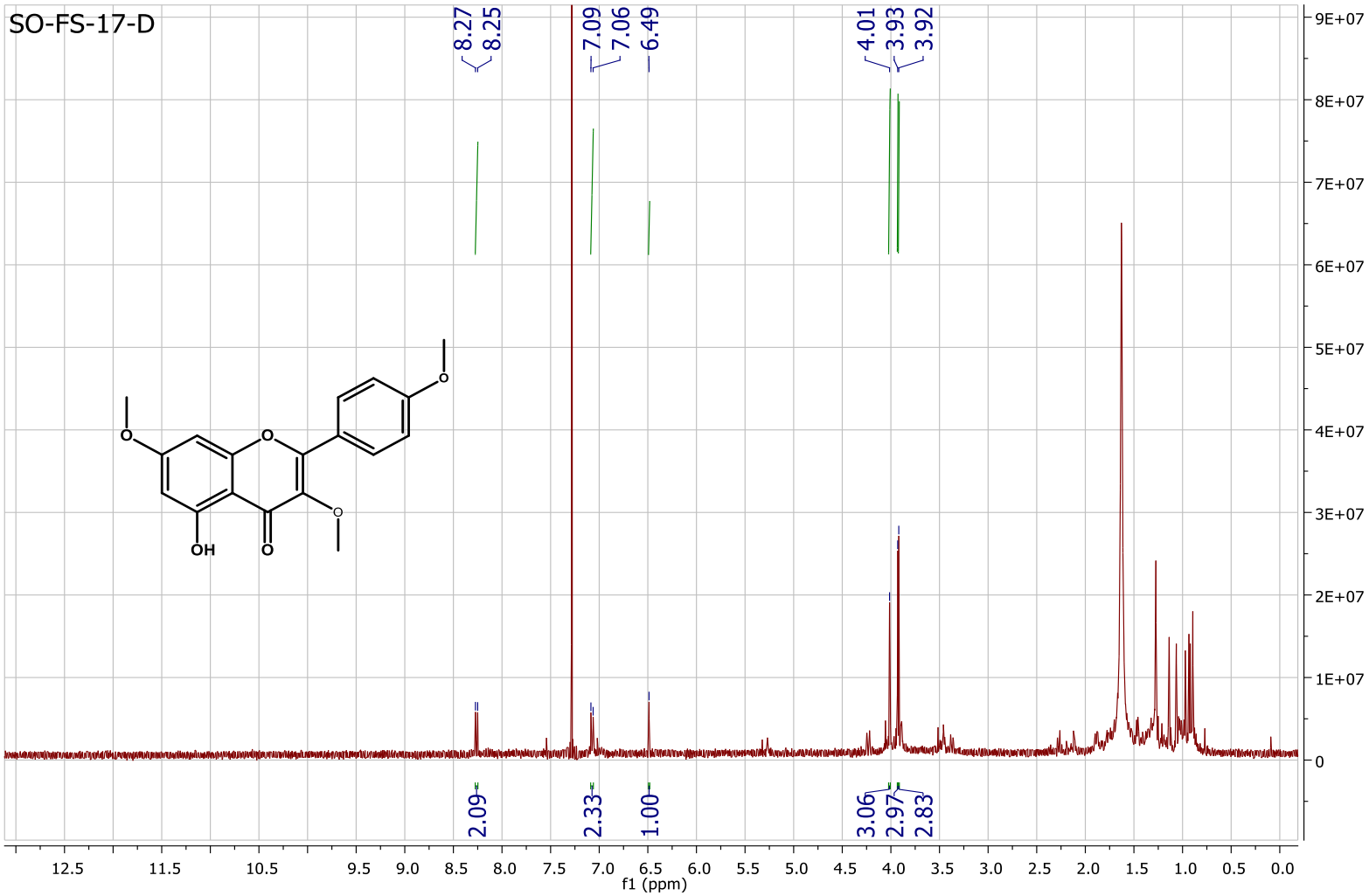
Proton NMR of **4** in CDCl3.



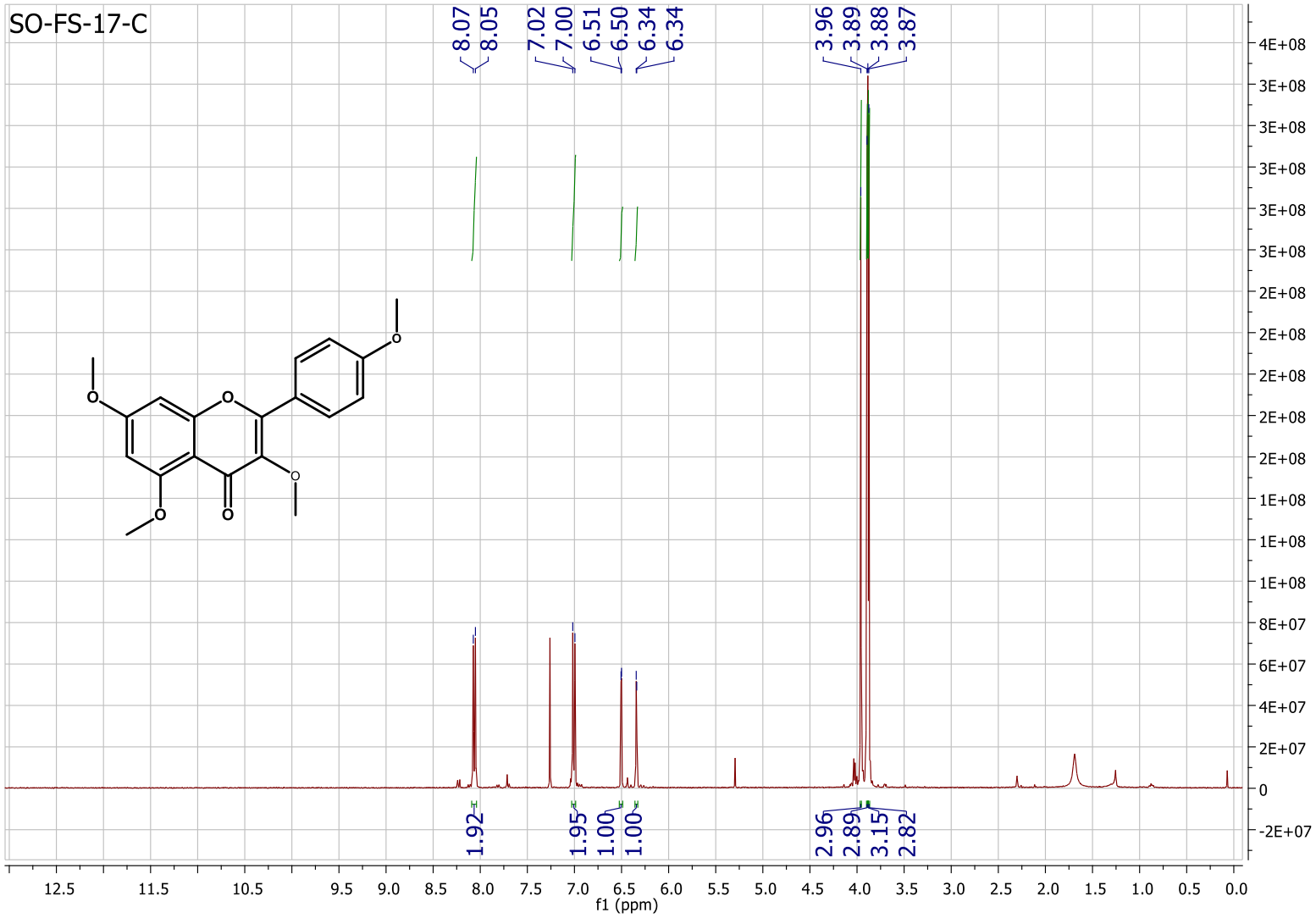
Proton NMR of **5** in CDCl3.



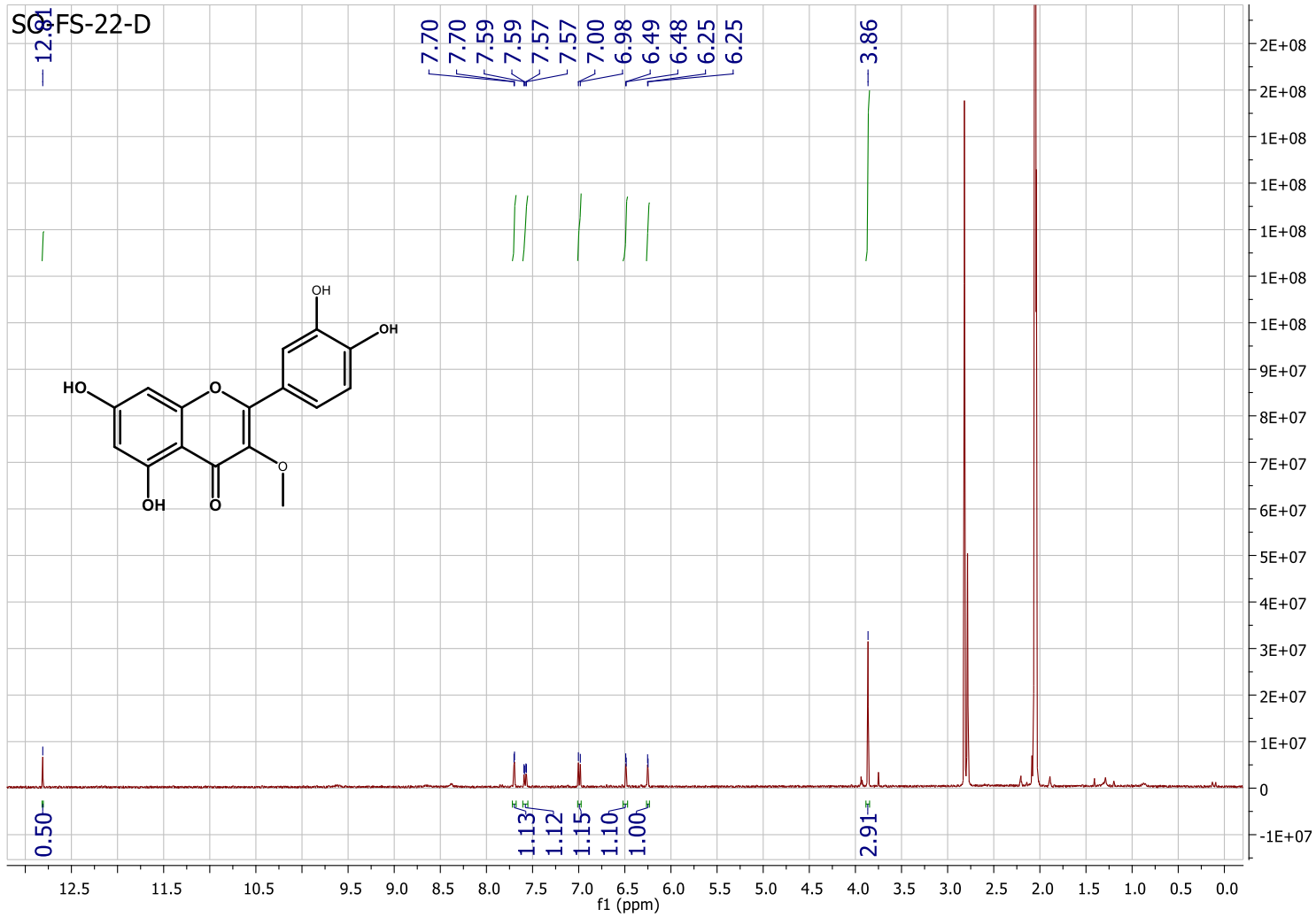
Proton NMR of **9** in CDCl3.



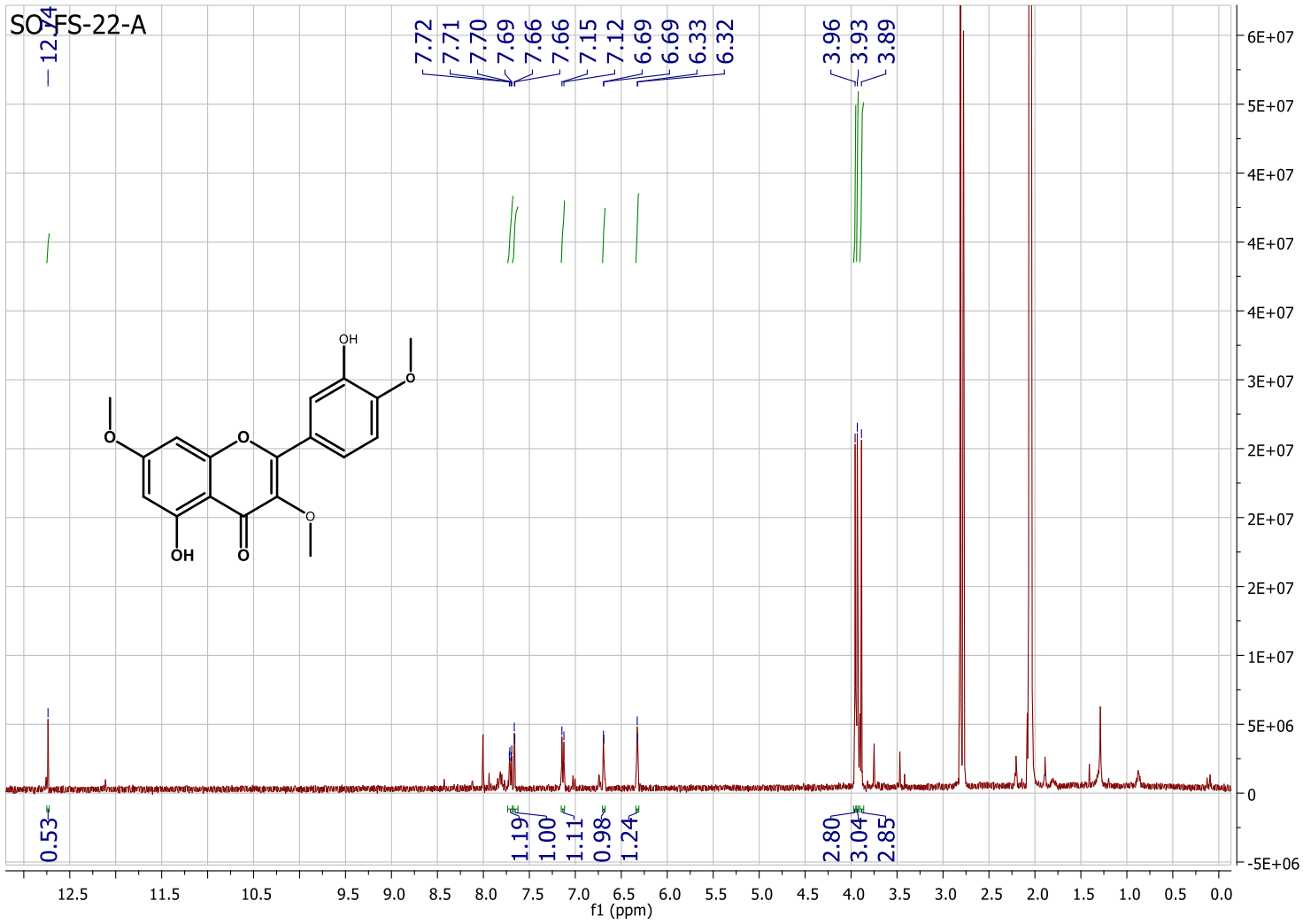
Proton NMR of **10** in CDCl3.



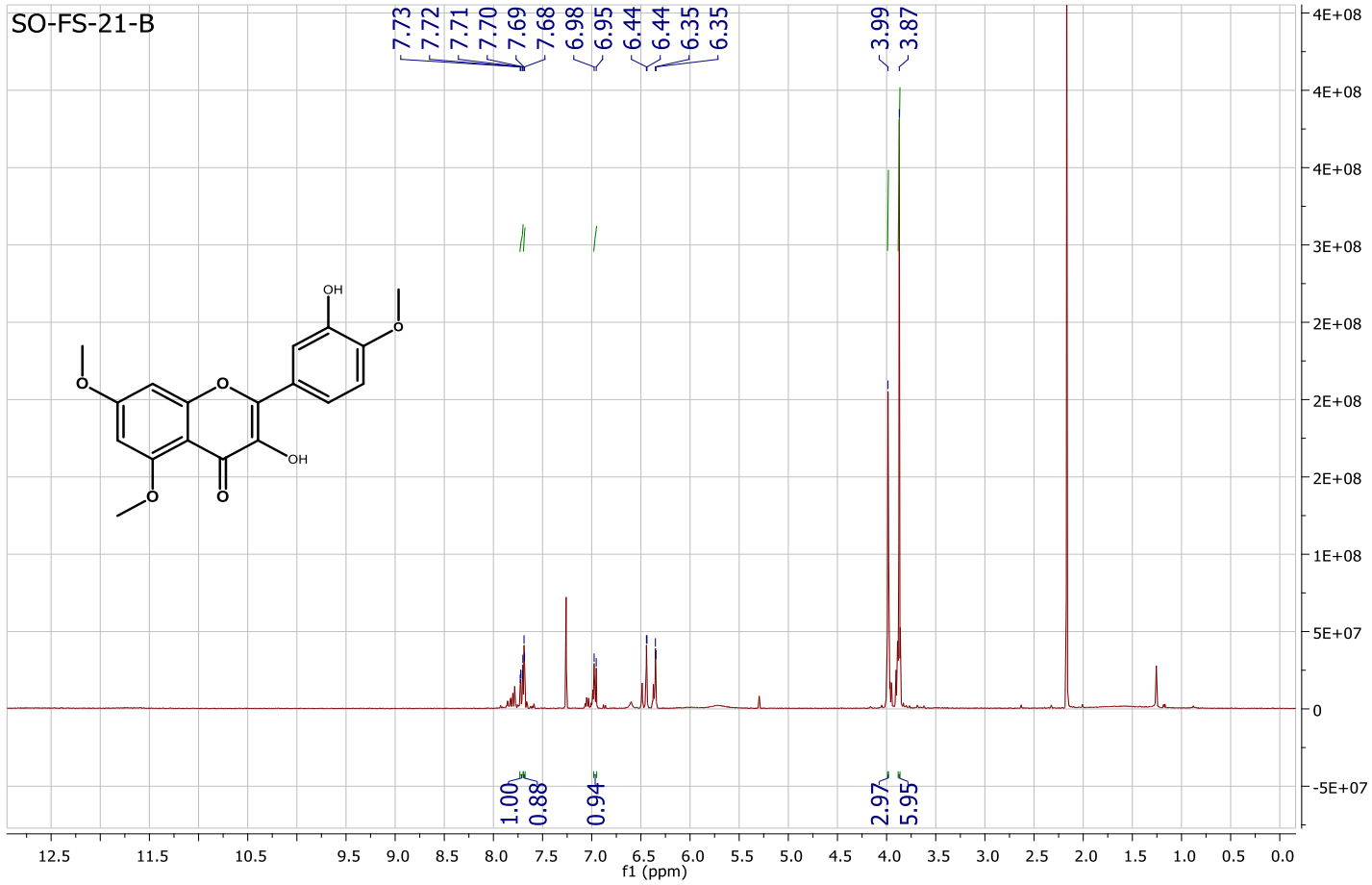
Proton NMR of **16** in CDCl3.



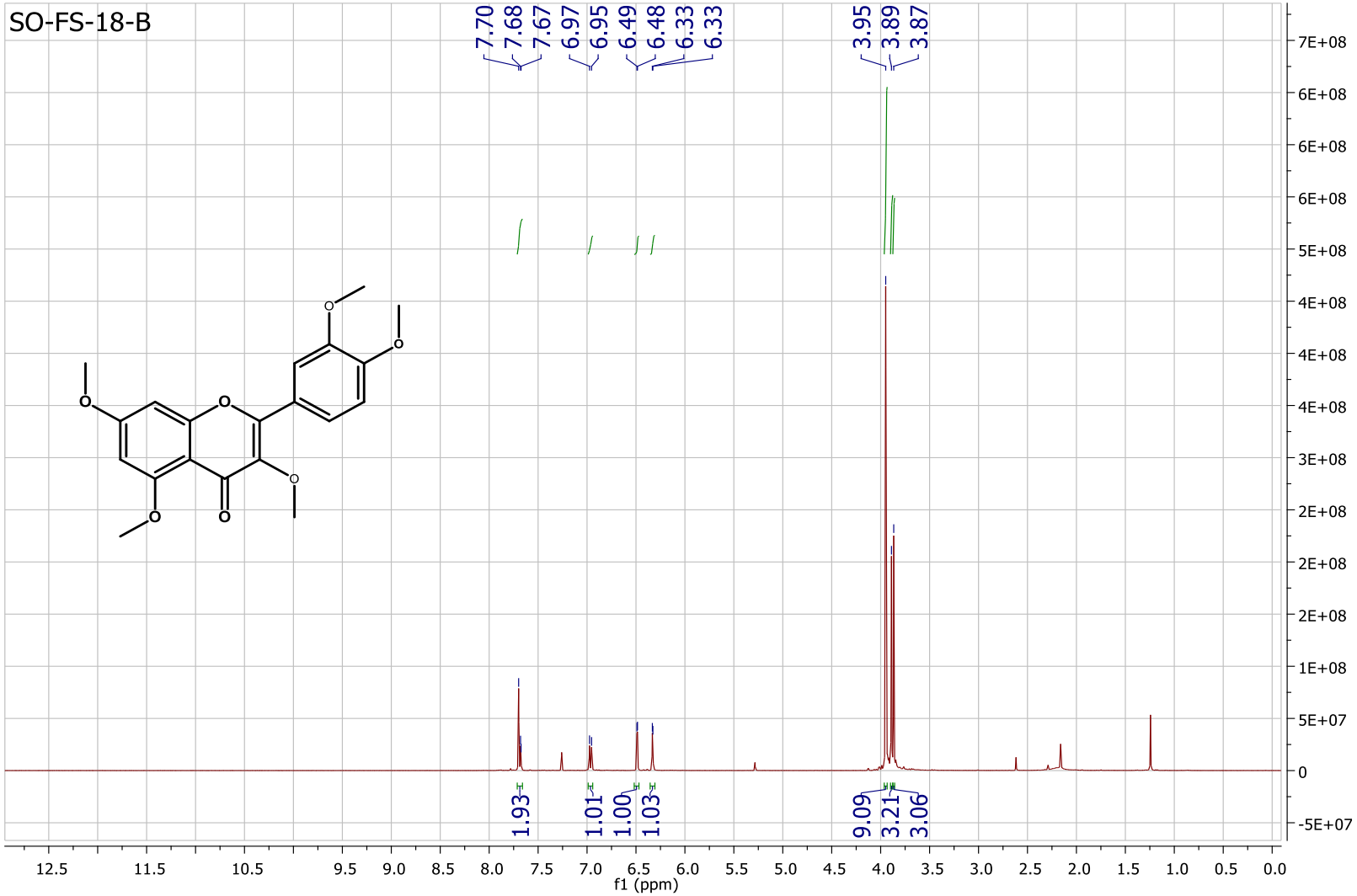
Proton NMR of **17** in CDCl3.



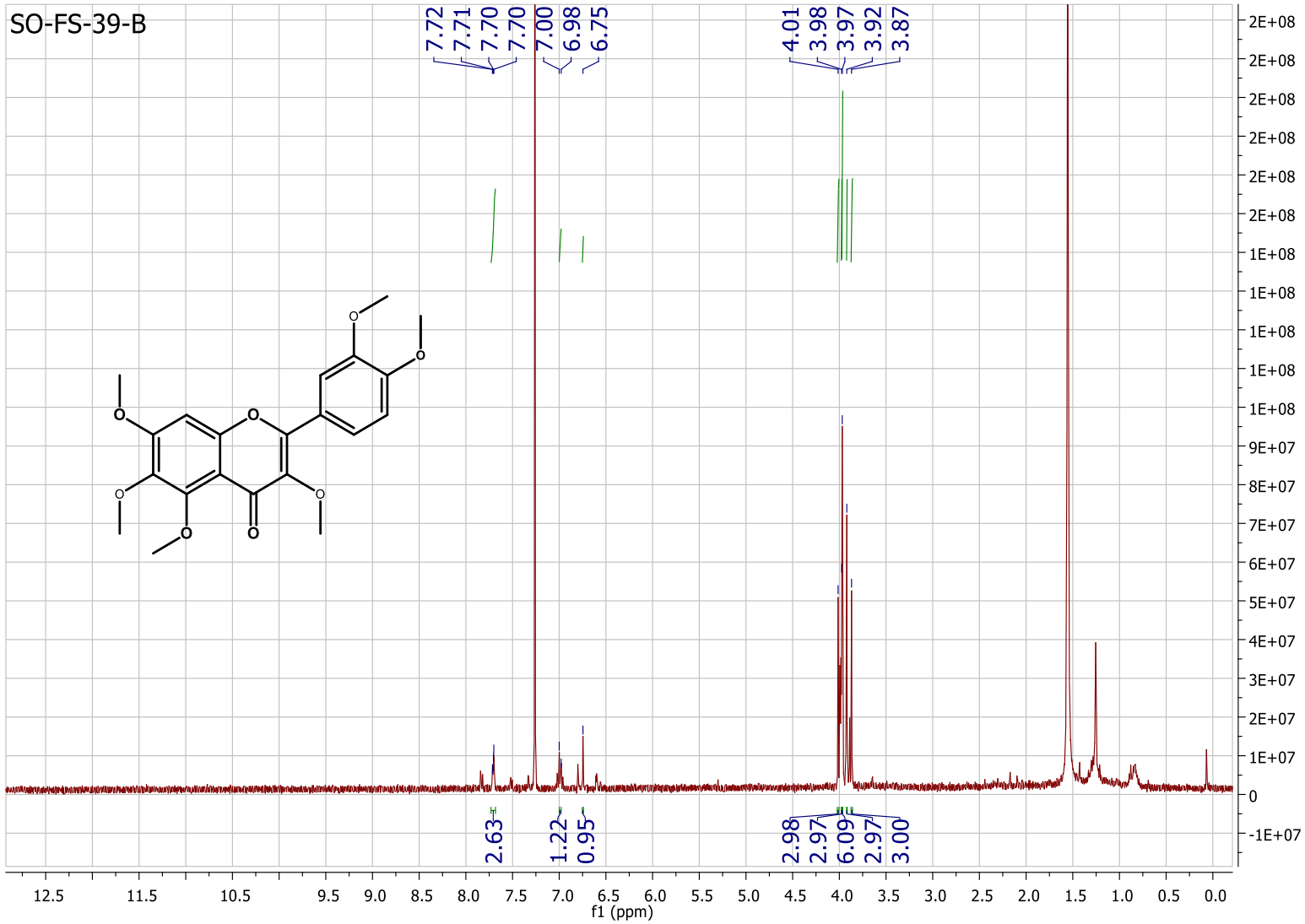
Proton NMR of **18** in CDCl3.



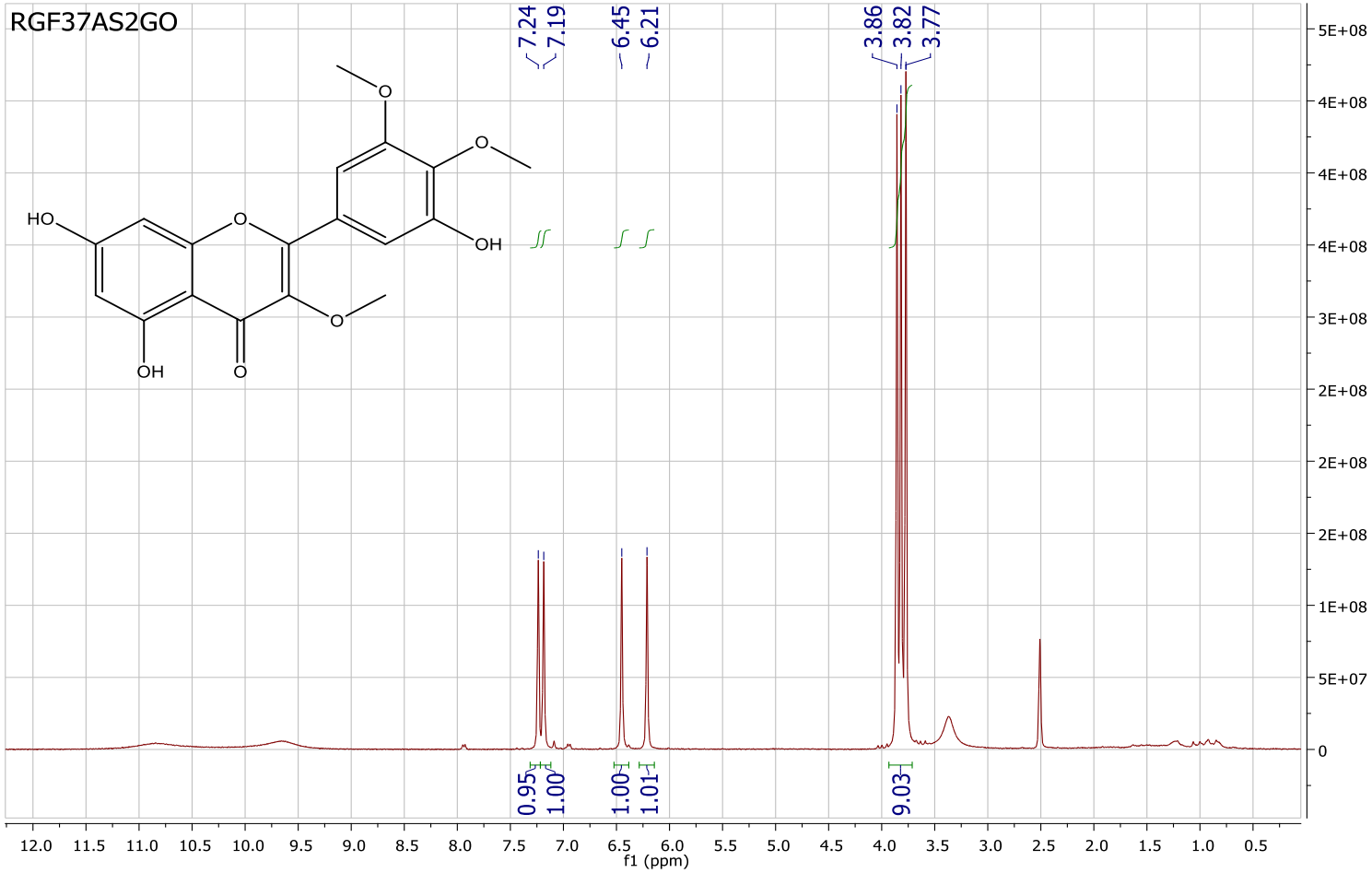
Proton NMR of **19** in CDCl3.



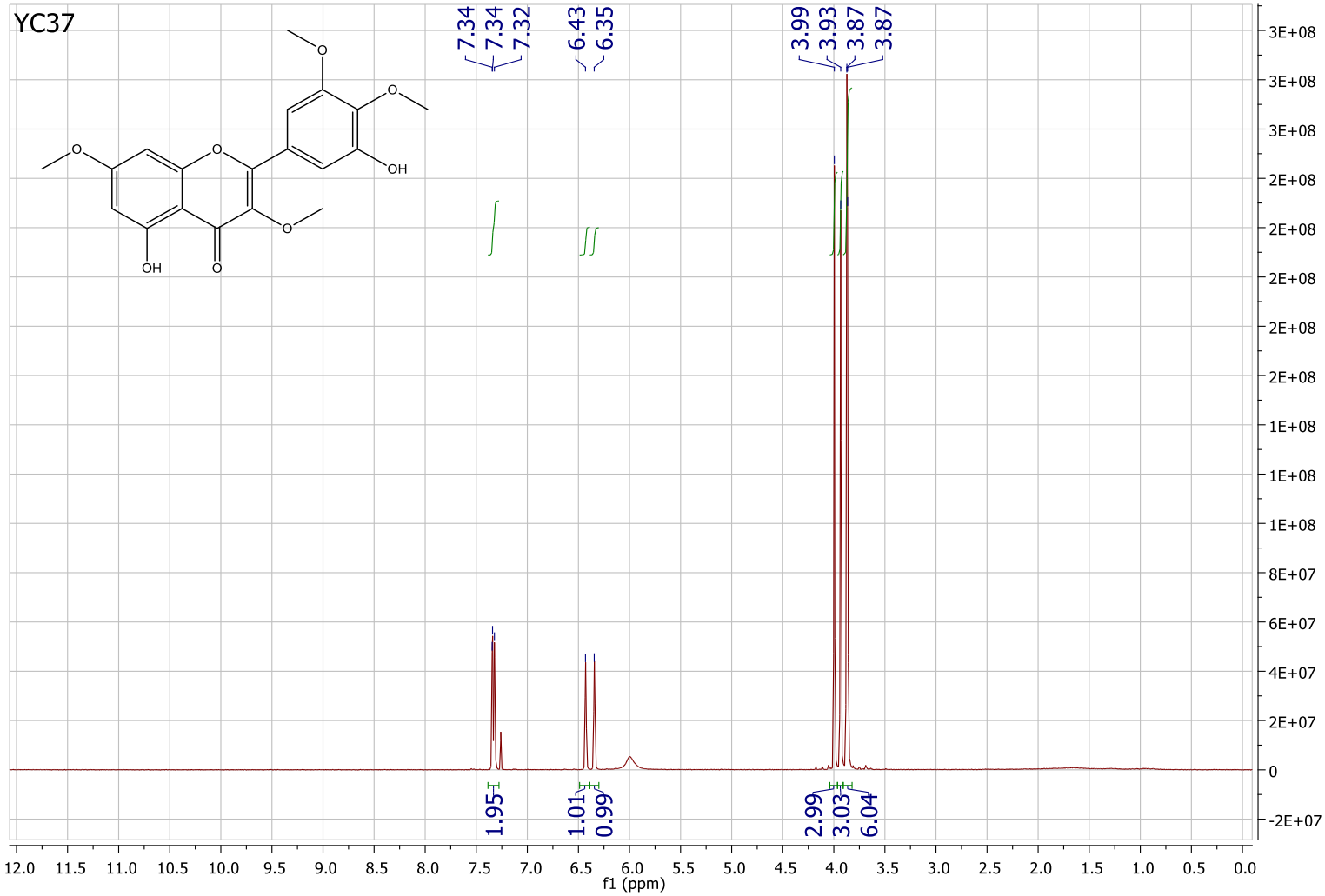
Proton NMR of **22** in CDCl3.



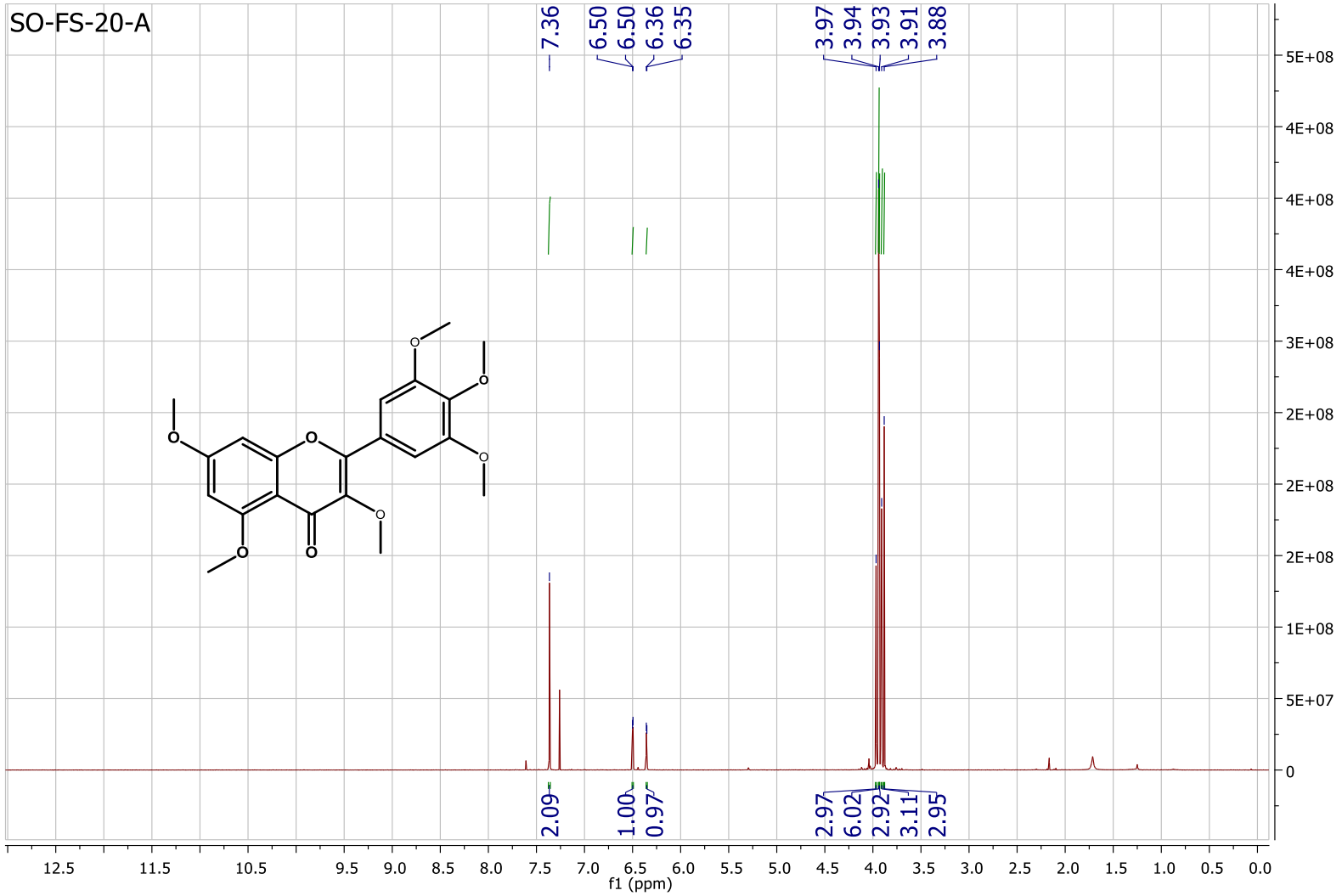
Proton NMR of **26** in CDCl3.



Proton NMR of **27** in CDCl3.



Proton NMR of **29** in CDCl3.



4.2.2.3 Commentaires et discussions

La caractérisation systématique de l'activité antiplasmodiale et de l'affinité pour l'hème d'une série de méthoxyflavone a permis d'identifier le rôle important de la position 5 dans la formation de l'adduit non-covalent des flavones avec l'hème. La méthoxylation de cette position conduit à l'annulation de la liaison hydrogène entre ce phénol et le carbonyle voisin. Cet effet a des conséquences d'ordre physicochimique puisque le LogP de l'analogue méthoxylé diminue quand bien même la méthoxylation d'un phénol augmente son caractère lipophile. Certaines observations de terrain suggèrent que la méthoxylation en 5, peu courante à l'état naturel, augmente significativement la fluorescence. Un tel effet pourrait avoir des conséquences d'ordre écologique (attraction de certains insectes, comme on peut l'observer sur des espèces de *Nepenthes* par exemple). La méthoxylation a également des conséquences sur l'affinité des flavones avec l'hème, ce qui peut laisser envisager un impact sur une éventuelle activité antiplasmodiale, même si cette hypothèse n'est pas vérifiée sur la série de flavones examinée. Cela peut s'expliquer par la localisation très restreinte de la formation d'hémozoïne dans le parasite. En effet, la cristallisation de l'hème en hémozoïne ne se produit que dans la vacuole digestive, délimitée par une membrane à l'intérieur du cytosol du parasite, lui-même caché dans le tissu sanguin de l'hôte. Une étape intermédiaire permettant d'explorer plus finement l'effet des molécules se liant à l'hème pourrait consister en la mesure de la quantité d'hémozoïne produite par le parasite, pour déterminer si des molécules de forte affinité à l'hème diminuent l'hémozoïne produite, indépendamment de l'effet antiplasmodial global. La nature de la corrélation entre l'affinité pour l'hème et l'effet biologique pourrait ainsi être précisée. Par ailleurs, les causes exactes de la modification du LogP *per se*, la détermination expérimentale de la solubilité dans l'eau et les conséquences sur la biodisponibilité des molécules devraient être étudiées.

4.3 Profilage de protéine selon l'activité (ABPP)

Les défis majeurs dans le domaine de la recherche de médicament sont le développement et l'identification des cibles biologiques (Schenone et al., 2013). Les approches expérimentales comme des techniques génomiques et protéomiques sont les outils primaires pour l'identification de cibles. En complément à ces techniques, des approches métabolomiques, notablement celle du profilage de protéine selon l'activité (*activity-based protein profiling*-ABPP), ont été proposées (Ismail et al., 2016). Le principe de cette technique est l'utilisation de sondes chimiques orientées vers les sites actifs (*activity-based probes* - ABP) pour déterminer l'état fonctionnel des enzymes dans des protéomes complexes, par exemple la distinction des enzymes actives de leurs précurseurs inactifs (Speers and Cravatt, 2004). Ces sondes sont destinées au site actif d'une protéine cible particulière (ou à une famille de protéines) où ils réagissent en fonction de son mécanisme enzymatique et s'associent à un résidu du site actif (Willems et al., 2014). En général, une sonde ABP contient trois éléments structurels essentiels : un **groupe réactif**, qui réagit avec le site actif de l'enzyme cible (aussi appelé "**l'ogive**") ; un **élément de reconnaissance**, qui impose la sélectivité de l'ogive pour une enzyme spécifique ou une classe d'enzymes ; et un **agent détectable** (ou groupe rapporteur) qui permet la récupération ou la visualisation par imagerie de l'enzyme en question (**Figure 16**). Les agents détectables généralement utilisés sont des groupes fluorescents, la biotine, des alkynes ou des azides, qui peuvent être modifiés par des méthodes également appelée aussi chimie clic «*click chemistry* ou *tagging*». Selon les agents détectables choisis, des expériences ultérieures peuvent être effectuées. Par exemple, des groupes fluorescents peuvent être utilisés pour le dépistage rapide sur gel et l'identification de sondes dans des cellules ou des animaux, et la biotine peut être utilisée pour l'enrichissement de protéine-cibles par affinité et ensuite détection par SM (Wang et al., 2018). Pour la formation de sonde d'ABPP, des groupes réactifs électrophiles, y compris des époxydes, des accepteurs de Michael, des disulfures, lactones, ß-lactams et des quinones ont été utilisés (Böttcher Thomas and Sieber Stephan A., 2008). Parmi les méthodes de détection utilisées en ABPP, la migration sur gel (SDS-PAGE) permet d'analyser de façon commode un ensemble raisonnablement divers d'enzymes dans des systèmes biologiques et est typiquement exécutée avec un fluorophore conjugué et la MS pour l'identification et la quantification de protéines étiquetées pour la sonde (**Figure 17**) (Niphakis and Cravatt, 2014).

Un exemple d'application avec une série d'insecticides modifiés dérivés des pyréthrinoïdes (alkyne/azide) qui a permis d'identifier plusieurs enzymes (cytochromes P450 notamment) responsables de leur métabolisation dans des microsomes de foie de rat (Ismail et al., 2013).

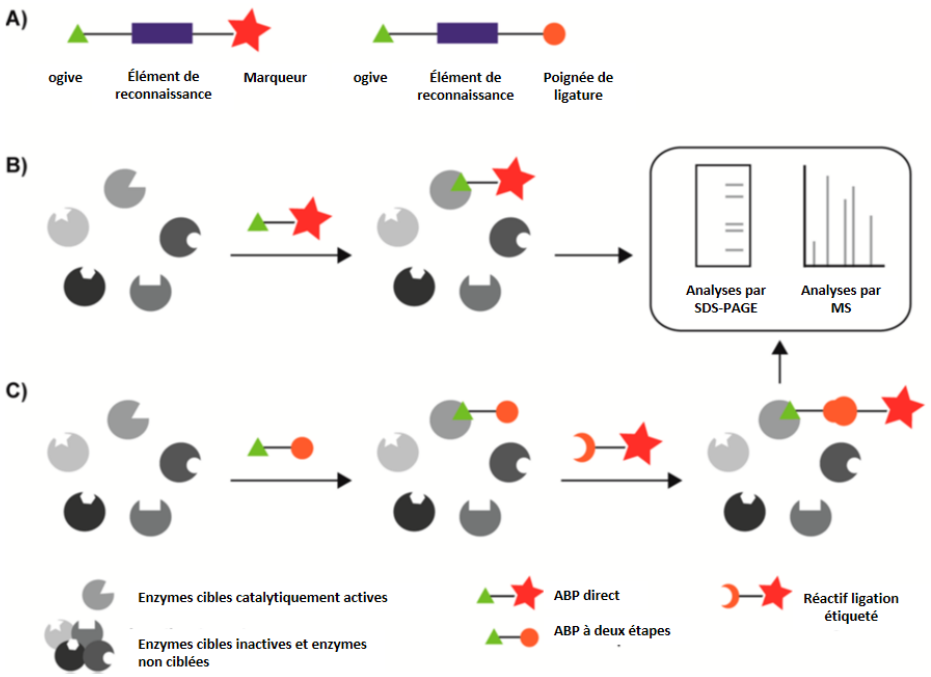


Figure 16. Représentation schématique des stratégies ABPP en une ou deux étapes. **A)** Composition générale d'un ABP direct (à gauche) et à deux étapes ABP (à droite) ; **B)** Marquage d'activité enzymatique par ABP direct ; **C)** marquage par ABP à deux étapes. SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate ; MS : spectrométrie de masse (Willems et al., 2014).

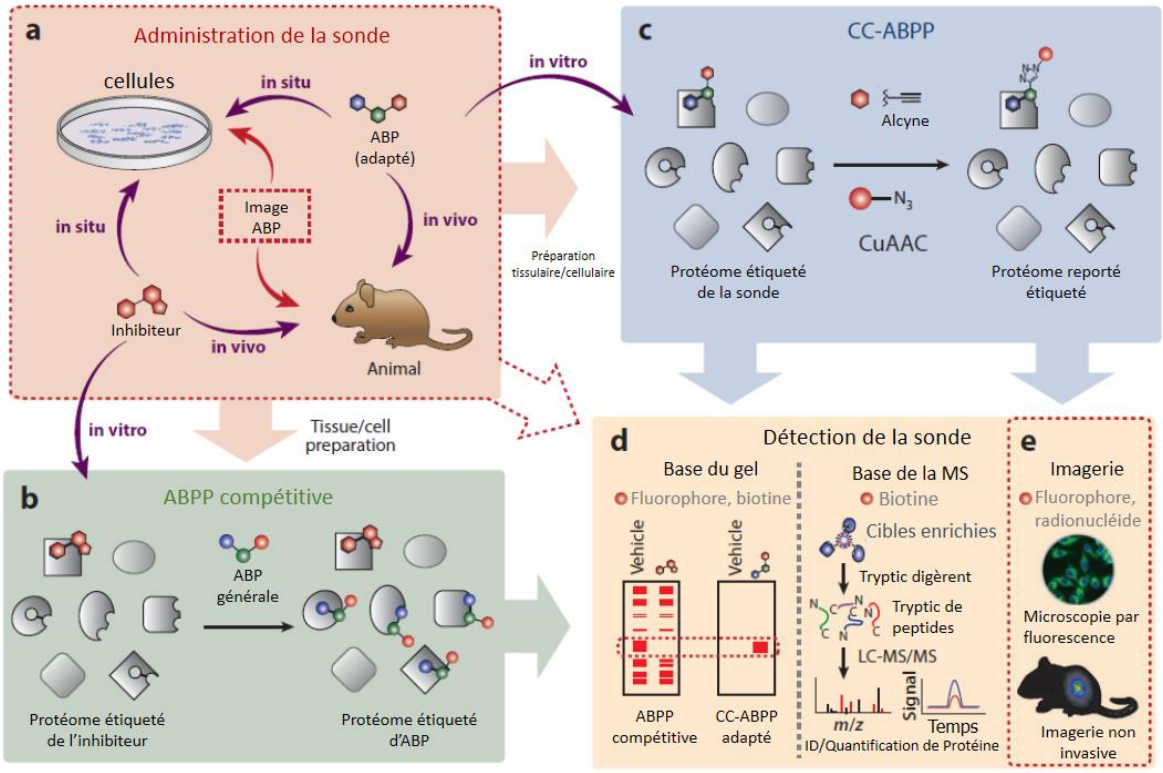


Figure 17. *Workflow* typique d'une expérience de profilage de protéine à base d'activité (ABPP). **a)** Les sondes chimiques ciblées vers les sites actifs (ABP) ou l'inhibiteur de choix sont d'abord administré à un système biologique comme une cellule ou un animal. À l'exception des applications en imagerie (lignes pointillées rouges), les cellules ou les tissus sont lysés ou homogénéisés avant un traitement par chimie clic. **b)** En exécutant l'ABPP dans un mode compétitif avec un inhibiteur, les protéomes de ces systèmes biologiques sont ensuite traités avec un ABP qui est approprié pour les cibles d'intérêt aboutissant à l'étiquetage sélectif d'enzymes actives. **c)** Pour la détection de cibles de protéine, les protéomes sont soit directement préparés pour le gel ou l'analyse par SM **d)** ou, en utilisant une sonde cliquable comme un alcyne. d) La chimie clic ABPP (CC-ABPP) fournit une mesure directe de l'étiquetage, tandis que l'ABPP compétitif mesure des réductions de signaux. **e)** les ABP permettent la localisation de l'activité enzymatique dans des systèmes vivants quand ils sont associés avec la microscopie de fluorescence (Niphakis and Cravatt, 2014).

4.3.1 Sondes d'artémisinine

L'artémisinine est efficace non seulement contre les souches multi-résistantes de *P. falciparum* via une activité contre le cycle de vie asexué du *Plasmodium*, mais possède aussi une activité contre la phase sexuée au sein des gamétocytes, pouvant réduire la diffusion de la maladie dans les zones de transmission basse. Cependant même après plusieurs décennies d'études intensives sur le mécanisme d'action de l'ART, deux questions critiques restent pourtant non résolues. Le premier point concerne l'origine des sources de fer exigées pour l'activation de l'artémisinine (Wang et al., 2015). L'ion ferreux libre et l'hème ont été proposés comme pouvant être les sources de fer de cette activation, mais les résultats de ces recherches sont controversés (O'Neill et al., 2010). Un des mécanismes d'action suggéré implique le clivage du pont endoperoxyde par le Fe(II) de l'hème (Accardo et al., 2007; Robert et al., 2005, 2001; Robert and Meunier, 1997) (**Figure 18**). Ce clivage aboutit à la formation d'oxyradicaux qui se réarrangeraient en des radicaux centrés sur des carbones primaires ou secondaires (Eckstein-Ludwig et al., 2003; Ismail et al., 2016). La deuxième question concerne les cibles exactes de l'activité de l'artémisinine. En raison à la fois de la proximité de l'hème lors de la catalyse, de la réactivité de l'ART activée et de l'activité intrinsèque de l'hème, il est logique que ce dernier subisse une alkylation, et cela a été démontré de façon univoque. Ce mécanisme se rapprocherait donc de celui des quinoléines en empêchant la cristallisation de l'hème. Concernant les protéines, bien que plusieurs protéines aient été rapportées pour être des cibles de médicaments, aucune d'entre elles ne peut à elle seule et d'une manière satisfaisante expliquer le puissant effet de lyse rapide de l'ART (Wang et al., 2015). Il est possible que l'ART activée puisse avoir beaucoup d'autres cibles directes en raison de la nature très réactive des radicaux libres (alkylation des protéines parasitaire qui aboutissent d'une façon ou d'une autre à la mort du parasite) (O'Neill et al., 2010). Jusqu'à présent, une cible protéique démontrée pour l'ART est l'enzyme PfATP6 (Eckstein-Ludwig et al., 2003).

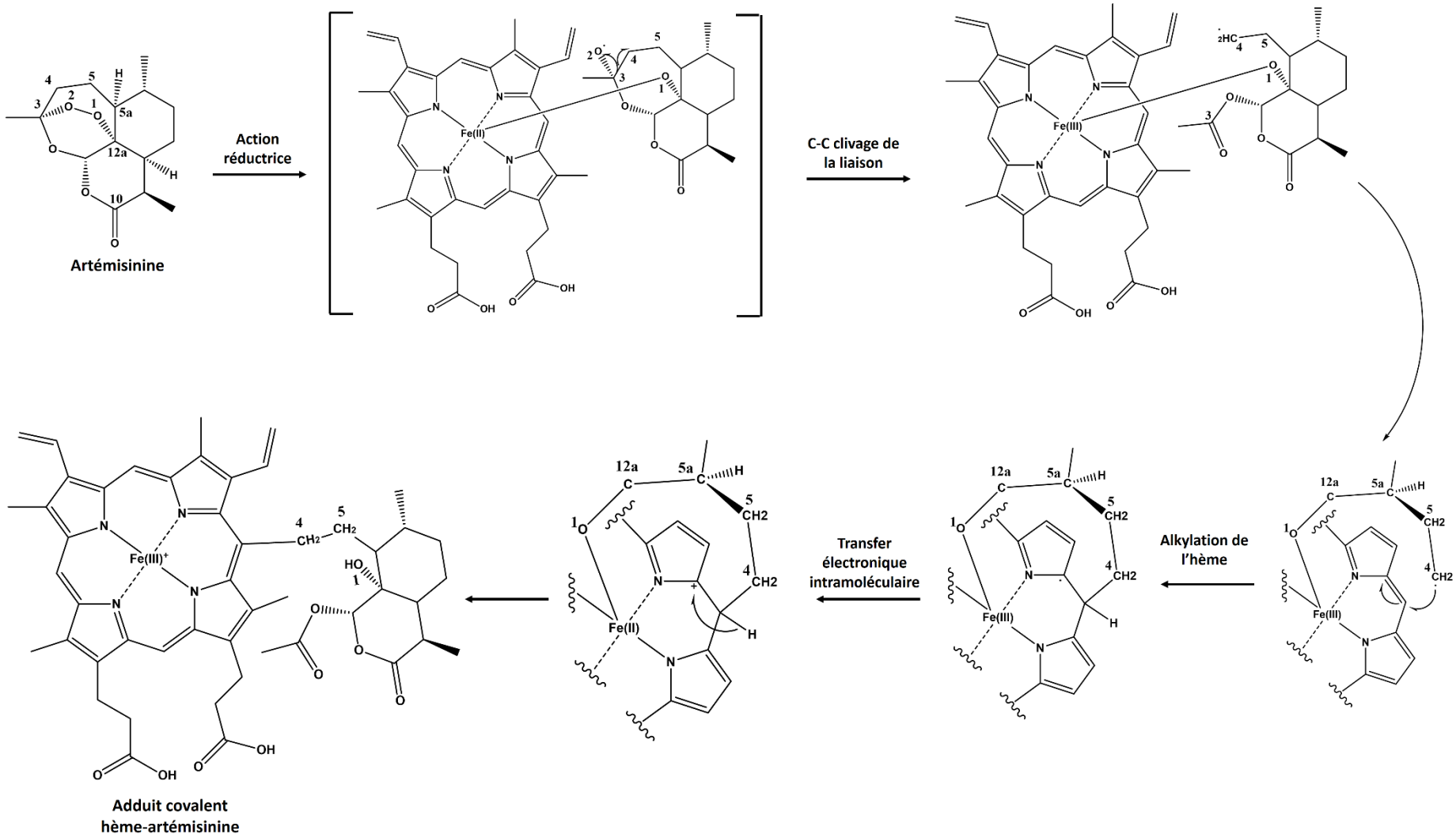


Figure 18. Mécanisme d'alkylation de l'hème après l'activation réductrice d'artémisinine.

Ces dernières années, des avancées ont été faites en utilisant la technique ABPP, en incorporant des groupes (« *tags* ») alcyne et azide au niveau du carbone 10 de la structure de l'ART (**Figure 19**), dans le but d'identifier la cible moléculaire de l'ART dans la phase asexuée de *Plasmodium* (Ismail et al., 2016). Les *tags* fluorescents liés de façon covalente à leur cible peuvent être visualisés sur un gel d'électrophorèse et cette protéine peut être purifiée et identifiée par spectrométrie de masse (Wang et al., 2015). Cette méthodologie permet aussi de comprendre les types d'interactions sonde-protéine, mais pour cela il est impératif de connaitre auparavant la stabilité de la liaison d'un fluorophore à des sondes fluorescentes dans le milieu biologique.

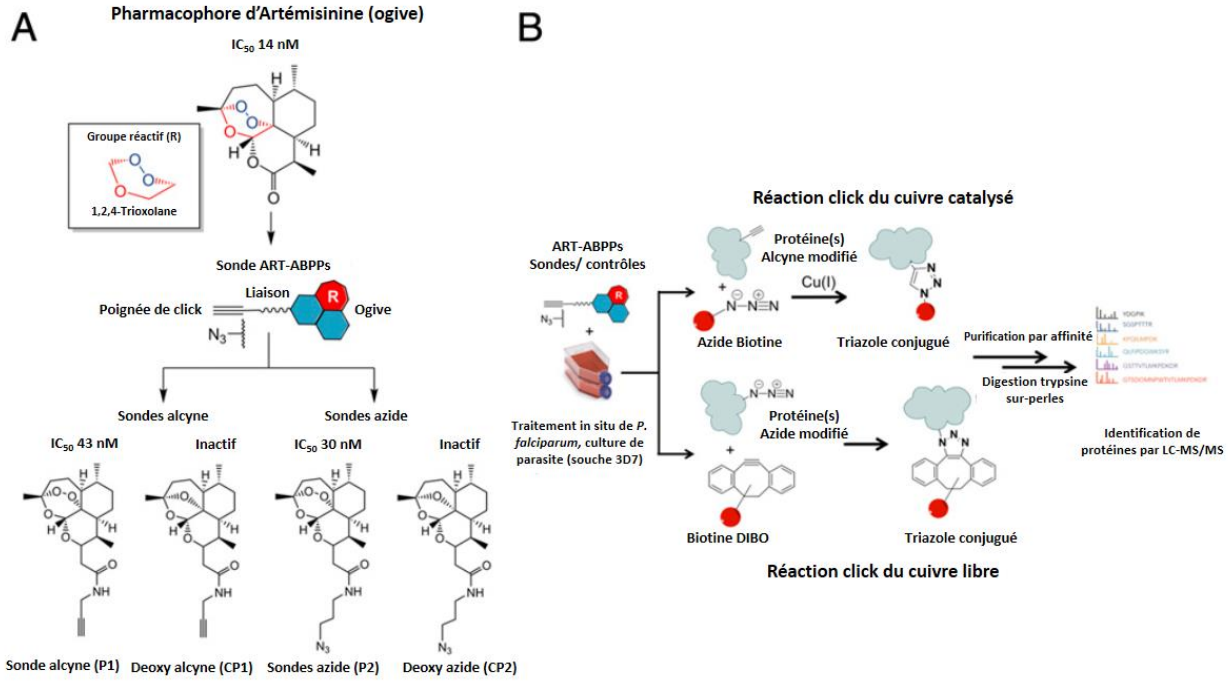


Figure 19. Design logique de l'ART-ABPPs. **A)** La conversion d'ART en ART-ABPPs implique l'addition d'une poignée cliquable (par exemple un alcyne ou azide au pharmacophore de l'ART). **B)** *Workflow* général de la chimie clic du cuivre catalysé et du cuivre libre utilisée dans l'identification de protéines alkylées après le traitement *in situ* de *P. falciparum* avec l'ART-ABPPs alcyne et azide. Les protéines modifiées par azides et alcynes sont étiquetés avec la biotine azide et la biotine dibenzocyclooctyne (Biotine-DIBO), respectivement, par des réactions clic suivies par la purification et l'identification de protéines par LC-MS/MS.

4.3.2 Développement d'une sonde fluorescente chimiquement stable mimant l'artéméther et l'artéether, pertinente du point vue mécanistique en conservant l'activité biologique et la spécificité.

4.3.2.1 Résumé

Trois nouveaux traceurs fluorescents imitant les médicaments antipaludiques dérivés de l'artémisinine ont été conçus à partir de la dihydroartémisinine. Un analogue aminal-lactone unique résultant d'un réarrangement intramoléculaire spécifique du type Kornblum-DeLaMare a été obtenu ; un mime d'artémether/artéether a montré une combinaison de propriétés physicochimiques et biologiques satisfaisantes : i) stabilité chimique, ii) activité inhibitrice élevée contre la phase sanguine du parasite, supérieure aux activités des sondes dérivées de l'ART conçues jusqu'à au présent, iii) valeur du test en phase anneau similaire aux médicaments cliniques, iv) étiquetage covalent pléiotropique et spécifique du protéome de *P. falciparum* compatible avec l'action multi-cible connue pour ces médicaments, une bonne cytopermeabilité et un étiquetage spécifique des cellules de *P. falciparum*. Notre étude démontre que des sondes dérivées d'artémisinine imitant le mécanisme de liaison covalent à l'hème sont des outils pertinents pour déchiffrer les mécanismes d'action complexes de ces médicaments antipaludiques.

4.3.2.2 Proposition d'article (décrit ci-dessous « article 4 »)

Format de la revue *Chemical Science*

A chemically-stable fluorescent mimic of artemether and arteether with conserved biological activity and specificity shows high mechanistic relevance to the clinical antimalarial drugs

A. Sissoko[1,2], P. Vásquez-Ocmín[3,4], A. Maciuk[3,4], G. Neveu[5,6], D. Barbieri[5,6], R. Grougnet[7,8], M. Blaud[9,10], S. Michel[7,8], C. Lavazec[5,6], J. Clain[1,2], S. Houzé[1,2] and R. Duval[1,2,*]

[1] Université Paris Descartes, UMR 216, Paris, France.

[2] IRD, UMR 216, Paris, France. Correspondence and requests for materials should be adressed to R. D. (email: romain.duval@ird.fr).

[3] Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.

[4] CNRS, UMR 8076, BioCIS, Equipe "Chimie des substances naturelles", Châtenay-Malabry, France.

[5] Universite Paris Descartes, Paris, Île-de-France France.

[6] CNRS, UMR 8104, Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, Île-de-France, France.

[7] Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4, av. de l'Observatoire, 75006 Paris, France

[8] CNRS, UMR 8638 COMETE, Laboratoire de Pharmacognosie.

[9] Université Paris-Descartes, Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Paris, France.

[10] CNRS, UMR 8015, Paris, France.

Abstract

Three novel fluorescent tracers mimicking the very structural units of artemisinin-derived antimalarial drugs were designed and synthesized from dihydroartemisinin. In addition to a unique aminal-lactone analogue arising from a specific intramolecular Kornblum-DeLaMare rearrangement, one artemether / arteether mimic showed a combination of excellent physicochemical and biological properties such as chemical stability, high inhibitory potency against blood-stage parasites that was stronger than that of all ART-derived probes designed so far, conservation of ring-stage assay value compared to the clinical drugs, specific pleiotropic covalent labelling of *P. falciparum* proteome consistent with a multi-target action of these drugs, as well as high cytopermeability and specific labelling of *P. falciparum cells*. Our study demonstrates that mechanism-based probes mimicking the very structural units of artemisinin derivatives are relevant tools to decipher the complex mechanisms of action of these frontline antimalarial drugs.

Introduction

Artemisin (ART) and its derivatives (ARTDs) continue to be the frontline antimalarials prescribed worldwide. They are estimated to have saved millions of lives along the last two decades due to their fast curative action against malaria parasites, particularly the most deadly and African-prevalent *Plasmodium falciparum*.[1] This major achievement is currently threatened by the current spread of ARTD-resistant parasite strains in South-East Asia, which emerged one decade ago in the greater Mekong region.[2] Resistance to ARTDs is conferred by mutations on the K13 kelch-containing protein and manifests as delayed clearance of young, ring stage parasites.[3,4] The protection mechanisms confered by mutant K13, resulting in increased parasite survival, are poorly understood. Even more alarming is the fact that *P. falciparum* K13 mutants exhibit a decreased sensitivity to several ARTD companion drugs (e. g., piperaquine).[5] The possible spread or emergence of these resistance mutations in Sub-Saharan Africa, where ca. 90 % malaria cases and deaths occur, would have dramatic sanitary consequences. These facts underline the urgency to understand which are the biological targets of ARTDs and why these drugs specifically select for K13 mutations. This knowledge could facilitate the chemical design of target-specific ARTDs against P. falciparum K13 mutants, and contain resistance. One of the major current modalities for investigating drug

targets are proteomic probes. Recently, a small number of structurally similar ARTD-mimicking proteomic probes were demonstrated to covalently bind up to 124 plasmodial proteins, including important enzymes.[6,7] These results validated the long-suspected protein alkylation mechanism for ART[8–10] *via* Fe(II)-dependent reductive cleavage of the endoperoxide of ARTand generation of carbon-centered, protein-reactive radicals,[11–14] although the source of activating iron (heme or free ferrous iron) remains controversial up to now.[6,7,13,15,16] The apparently low-specificity, pleiotropic-type covalent modification of the parasite proteome by ARTDs is consistent with earlier reports that ART was a powerful alkylator of isolated proteins[10,17] but also heme iself,[11,18,19] hemozoin,[20] and lipids. In comparison to this direct inhibition and/or modification of targets, the generation of reactive oxygen species (ROS) by ART radicals might turn out to be a minor phenomenon,[21] as the known oxidative toxicity of ART[22–24] could be attributed be the undirect result of redox homeostasis disruption within the parasite following proteome-wide alkylation. Indeed, ART is irreversibly bioactivated and therefore cannot possibly act as a redox cycler; second, experimentally-detected ROS were observed at very high drug concentrations (> 100 µM), whereas the plasmocide action of ARTDs takes place at concentrations classically 1,000 fold lower.[21] Therefore, target alkylation seems to correspond to a major physiological scenario for the bioactivity of ARTDs. However, the pharmacological relevance of promiscuous protein alkylation by ARTDs remains difficult to delineate for a number of reasons:

(i) ARTDs behavior remains poorly characterized in biochemical and cellular contexts where a great bulk of malaria research is conducted. ARTDs are sensitive to mild chemical[25–27] and biochemical[27,28] hydrolysis with release of dihydroartemisinine (DHA) **1**, in addition to being *in vivo* prodrugs of **1** mainly through liver CYP 3A4 metabolization.[26,29–31] For these reasons, their biological action is believed to recapitulate that of DHA **1**. However, their distinct IC_{50} values could reflect a combination of time-dependent hydrolysis and ARTD-specific plasmocidal action.

(ii) in order to tackle the potential unstability of ARTDs at their C-10 center -presence of an acetal group for artemether (ARTMT) and arteether (ARTET), aminal group for artemisone (ARTMS),[31] acetal ester group for artesunate (ARTS)- all the proteomic probes designed so far are generic tetrahydropyrane analogues at C-10 of DHA **1** (Fig. 1).[6,7,32] While these probes have proven highly suitable for ***e***stablishing a pleiotropic protein alkylation mechanism for ARTDs,

their specific binding (i. e., assessed with radiolabelled ART or ARTDs[17,33]) and relevance to the parents drugs remains to be demonstrated;

(iii) most of identified target candidates are abundant proteins of the trophozoite stage of *P. falciparum*.[16] Among these, the identity of key targets accounting for the inhibitory activity of the clinical drugs remain to be established, relatively to abundant protein ballast not relevant in parasite killing;

(iv) covalent inhibition of protein targets by ARTD-mimicking probes has only been documented in ART-sensitive *P. falciparum* lines,[6–8] and remains to be fully investigated in ART-resistant genotypes;

(v) parasite persistance in Ring Survival Assay (RSA) provides up to now the most robust *in vitro* assay assessing K13-mediated ART resistance, correlating with clinical resistance.[4] RSA values of *P. falciparum* K13 mutants exposed to ARTD-mimicking proteomic probes need to be similar to that of the clinical ARTDs to establish their clinical relevance, but this has never been assessed so far;

For these reasons, we designed and synthesized the first true fluorescent surrogates of ARTDs retaining the key heteroatomic linkages at C-10 (Fig. 1), studied their stability by monitoring fluorophore release in conditions relevant to proteome and cell labelling experiments, then investigated their full biochemical and biological profile in comparison with parent ARTDs.

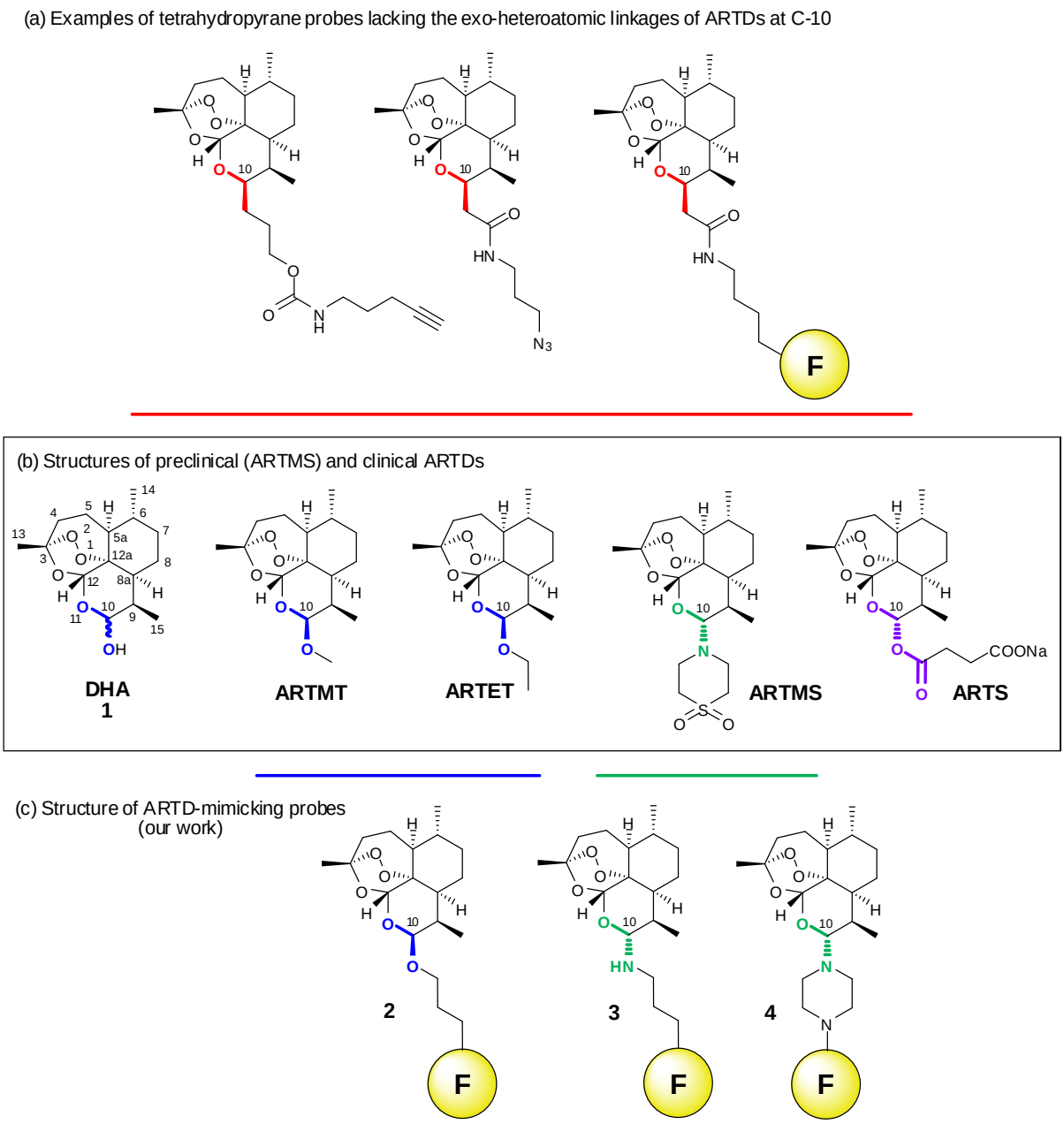


Figure 1. Comparison of the generic tetrahydropyrane probes in the ART series with designed ARTDs-mimicking probes integrating exo-heteroatomic linkages at C-10 (F = fluorophore).

Synthesis. All fluorescent analogues of ARTDs consisted in derivatives of (α,β)-DHA **1**. We used 4-nitrobenzoxadiazole (NBD) and related 4-dimethylsulfamoylbenzoxadiazole (SBD) fluorophores due to their compact size, aiming to keep to a minimum the pharmacological alteration of the tracers in comparison with the mimicked drugs (Fig. 1 and 2). NBD and SBD also feature strong fluorescence emissions in the green-yellow region of the visible spectrum,

allowing specific analytical (i. e., UV-HPLC), biochemical (e. g., SDS-PAGE) and imaging (e. g., cell microscopy) detection of the probes in systems where biological autofluorescence could be an issue. We chose a spacer size of 4-5 atoms to properly separate the endoperoxide pharmacophore and the fluorescent labels without implementing excessive lipophilicity. 3-Amino-1-propanol **5** reacted regioselectively with NBD-Cl by a S_NAr reaction under basic conditions, yielding the fluorophore-spacer moieties **6** with a 23 % yield. Similarly, *N*-BOC-diaminopropane **7** yielded the amino congener **8** under its trifluoroacetate (TFA) salt with a 15 % yield by a two-steps, "one-pot" sequence (Fig. 2). When DHA **1** was reacted under acidic conditions with alcohol **6**, clean acetalization occurred at C-10 to furnish **2** as the desired β diastereoisomer ($^3J_{H10\text{-}H9a}$ = 3.6 Hz),[34] which was isolated with a 22 % yield. Following a general two-steps procedure for introducing secondary amines at C-10,[35] DHA **1** was firstly activated into a trimethylsilyloxyl intermediate by action of TMS-Cl in pyridine, with a quantitative yield. The latter was then allowed to react with *N*-piperazino-SBD **9** in presence of TMS-Br and hexafluoro-2-propanol, to yield tertiary aminal **4** as the desired α diastereoisomer ($^3J_{H10\text{-}H9a}$ = 10.4 Hz)[35] with a 18 % yield over a two-steps, "one-pot" sequence (Fig. 2). Unexpectedly, when **1** was allowed to react with **8** in precisely buffered conditions (triethylamine / **8** 10:1 mol/mol), a single derivative formed that did not possess the awaited structure of C-10 secondary aminal **3**. Instead, 1-deoxyartemisinin derivative **10**, featuring an ether bridge at C-3, aminal linkage at C-12 and oxidation at C-10, was produced with a 34 % yield (Fig. 2). The structure of **10**, possessing to our knowledge an unprecedented aminated skeleton among all ART analogues described, was elucidated from extensive 1D and 2D NMR including N-H HMBC, HRMS and IR analysis (see Supporting Information). In particular, a strong ^3J coupling between the first methine group of the fluorophore spacer and C-3 in HMBC excluded the alternative heteroatomic aminal-lactame linkage, found in derivatives of ART with primary amines,[36–38] relatively to the aminal-lactone of **10**.

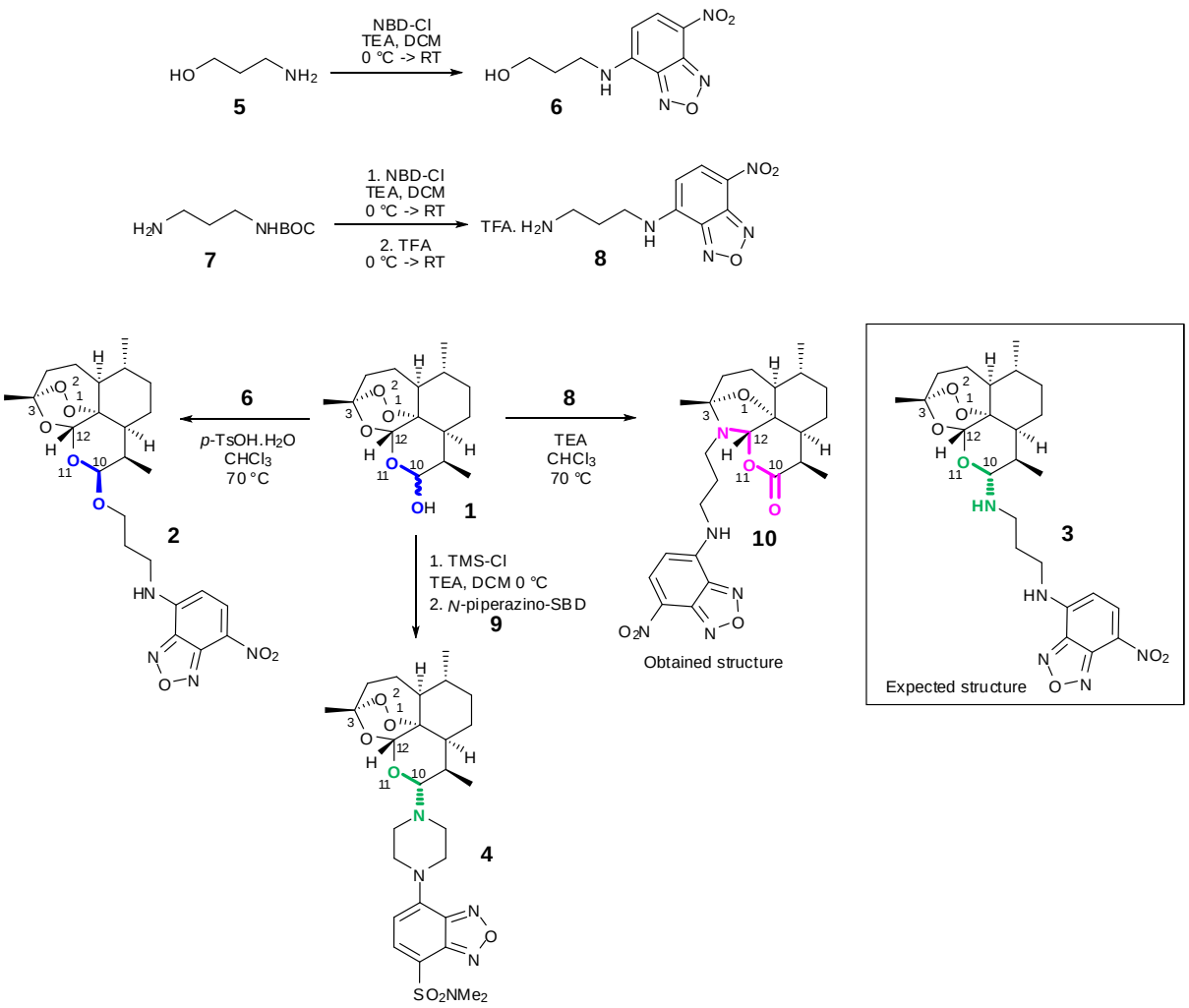


Figure 2. Synthesis of ARTDs-mimicking probes **2**, **4** and **10**. *Reagents and conditions:* (i) NBD-Cl, NEt_3, CH_2Cl_2, 0 °C -> RT (23 %); (ii) NBD-Cl, NEt_3, CH_2Cl_2, 0 °C -> RT then CF_3COOH, 0 °C -> RT (15 %, two steps); (iii) **6**, *p*-TsOH.H_2O, Na_2SO_4, $CHCl_3$, RT (22 %); (iv) TMS-Cl, Pyridine, 0 °C (93 %); (v) TMS-Br then *N*-piperazino-SBD **9**, hexafluoropropan-2-ol, CH_2Cl_2, 0 °C -> RT (18 %, two steps); (vi) **8**, NEt_3, $CHCl_3$, RT (34 %).

Formation of **10** can be rationalized by the nucleophilic attack of the amino group of **8** onto the masked aldehyde at C-3 of DHA **1**. Indeed, **1** consists of a tricyclised ("zipped") endoperoxyde cetal (C-3)-acetal (C-12)-hemiacetal (C-10) sesquiterpene, which can potentially equilibrate ("unzip") with its keto (C-3) dialdehyde (C-10 and C-12) hydroperoxide open form **I** in protic medium[26] (Fig. 3). Intermediate **I** is prone to an intramolecular dismutation to 1-desoxy-ART **11** by hydroperoxide reprocessing *via* a Kornblum-DeLaMare rearrangement[26] that would explain the oxidized state of C-10 found in **10**. However, no ART

could be detected in this reaction mixture. To investigate the mechanism accounting for the formation of **10**, DHA **1** was submitted to the same reaction conditions (triethylamine / trifluoroacetic acid 10:1 mol/mol) in absence of nucleophile. We found that **1** was fully stable under these conditions and did not lead to any detectable amount of ART, suggesting that primary amino **8** itself rather than triethylamine was the necessary base to induce the skeletal rearrangement of **1** to **10**. To validate this hypothesis, we found that pentylammonium trifluoroacetate as a surrogate for **8** was not yielding any detectable amount of the *N*-pentyle-1-desoxy-ARTanalogue **12** in the same conditions indicating that the NBD moiety present in **8** possessed a key role in the reaction. To confirm this assumption, DHA **1** was reacted with the reduced (Pd-C, H_2) anilino derivative of fluorophore **8**, featuring an electrodonating function instead of the strongly electro-withdrawing nitro group on the benzoxadiazole ring. Again, no formation of the corresponding 1-desoxy-DHA derivative **13** was observed in the same conditions than those used to obtain **10**, demonstrating that the acid N-H proton present in fluorophore **8** was necessary for the transformation of DHA **1** into **10** (Fig. 3). Based on these observations, we propose a Kornblum-DeLaMare rearrangement driven by the intramolecular acido-basic catalysis by **8** to account for for the formation of **10**. Accordingly, **8** would form an imine by reacting with the most electrophilic carbonyle at C-12, followed by lactonisation at C-12 then aminalization at C-3 (Fig. 3). Importantly, **10** was obtained as a unique diastereoisomer consistent with the predicted stereochemical control upon re-cyclisation ("re-zipping") of **I** from C-3 to C-12 to C-10,[26] which is also reminiscent of the biogenesis of (+) ART from dihydroartemisinic acid in absence of enzymatic control.[39]

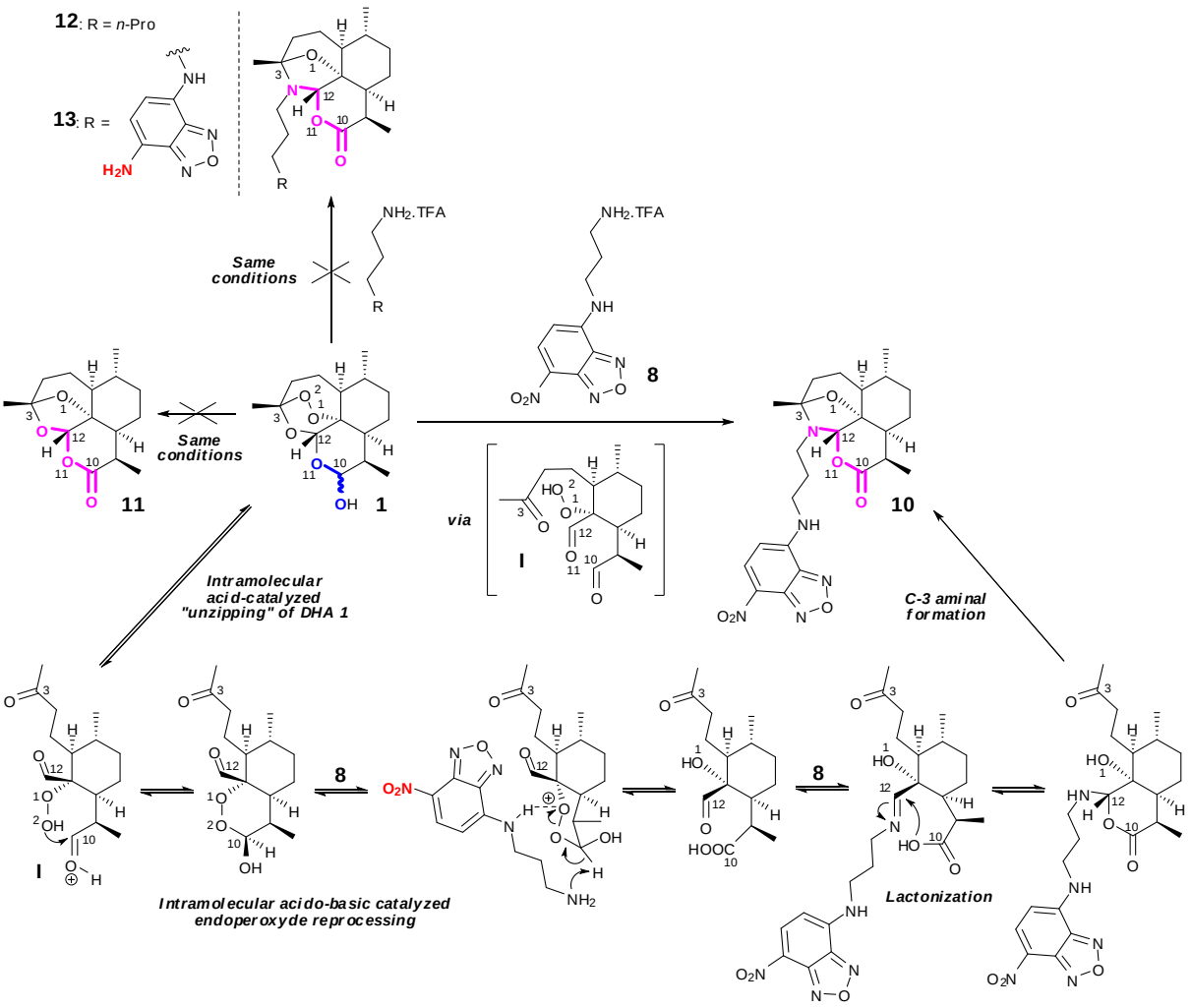


Figure 3. Formation of aminal-lactone **10** from DHA **1** according to a Kornblum-DeLaMare rearrangement and evidence for intramolecular acido-basic catalysis by **8**.

Kinetic stability study. We evaluated the hydrolytic stability of the obtained ARTDs probes **2**, **4** and **10** over time at 23 °C in three different conditions, in order to select the optimal tracer for subsequent biological validation. These conditions were: (i) PBS buffer pH 5.2 (to mimic the digestive vacuole of *P. falciparum*,[40] where ARTDS are supposed to be mainly activated to exert their antiplasmodial effects,[33,41] (ii) PBS buffer pH 1 defined as the harshest hydrolytic conditions to detect even low susceptibility to hydrolysis, and (iii) fresh parasite lysate containing most putative protein targets as well as various hydrolases. This study was performed by LC-DAD-MS monitoring of both the disappearance of native **2**, **4** and **10** and the release of the corresponding fluorophore-spacer moieties **6**, **8** and *N*-piperazino-SBD **9**,

respectively. Results are expressed as the ratio of absorbance areas at a given time over the initial absorbance areas The molar attenuation coefficient of the probe and the corresponding free fluorophore have not been measured, therefore areas of these species cannot be compared, but we assumed that they would remain in the same order of magnitude. ARTMT / ARTET mimic **2** (Fig. 4, pannels A and B, *red curves*) was very stable at vacuolar pH and expectedly (being an acetal) unstable at pH 1. The profile of sheer disappearance of **2** in the lysate does not seem to correspond to a release of fluorophore **6**, as this latter remains in low concentrations throughout time. This suggested that **2** reacted with proteins from the cell lysate, an effect that was faster for **2** than for the two other ARTDs probes synthesized **4** (Fig. 4, pannels A and C, *blue curves*) and **10** (Fig. 4, pannels A and D, *red curves*). Indeed, while **2** was fully hydrolyzed into DHA **1** and fluorophore **6** in PBS at pH 1 (fig. 4, pannel B, *red and orange curves* and Supporting Information for the monitoring of DHA **1** by MS), the decrease of **2** in the parasite lysate was not accompanied with a corresponding increase of **6** (Fig. 4, pannel B, *red and orange curves*). This is consistent with covalent attachment of **2** to a fraction of the lysate proteins in absence of hydrolysis of the C-10 acetal function, as the protein content of each sample being precipitated with acetonitrile prior to LC-DAD-MS analysis and therefore excluded from quantification. In this case, it appeared that the small amount of free heme present in the *P. falciparum* lysate was sufficient to induce Fe(II)-dependent endoperoxide reductive cleavage and protein alkylation according to the established mechanisms.[8–10] Small amounts of novel fluorescent species distinct from fluorophore **6** were formed over time in the lysate (Fig. 4, pannel B, *clear blue and pink curves*), which can be attributed to soluble proteins and/or peptides covalently tagged by **2**. Regarding ARTD probes **4** and **10**, we found that the ARTMS analogue **4** was prone to hydrolysis in every condition and consistently released the *N*-piperazino-SBD fluorophore **9** along with DHA **1** (Fig. 4, pannel D, *blue and purple curves*and Supporting Information for the monitoring of DHA **1** by MS). Compound **4** thus behaved as a genuine ARTMS mimic and DHA prodrug, but its pending fluorophore lability precluded its use as a biological tracer. This result is somewhat contradictory with data showing that ARTMS itself was not releasing free DHA **1** when undergoing *in vitro* metabolization by recombinant CYPs or microsomes.[31] However, several ARTMS analogues do undergo hydrolysis into **1**,[42] indicating that metabolization kinetics *in vitro* may compensate the otherwise hydrolytic liability in the ARTMS series. On the other

hand, **10** was quite stable in every condition (Fig. 4, pannel C) as the result of its C-10 lactone group and lack of endoperoxide bridge, with absence of detectable release of fluorophore **8**. At pH 1, some decrease of **10** was observed but mostly in the first 15 min, suggesting that the loss of **10** is rather due to a saturable, thermodynamic process than chemical hydrolysis (see Supporting Information). Altogether, the ARTD presented with the best physicochemical profile (stability in physiological conditions and covalent reaction with proteins).

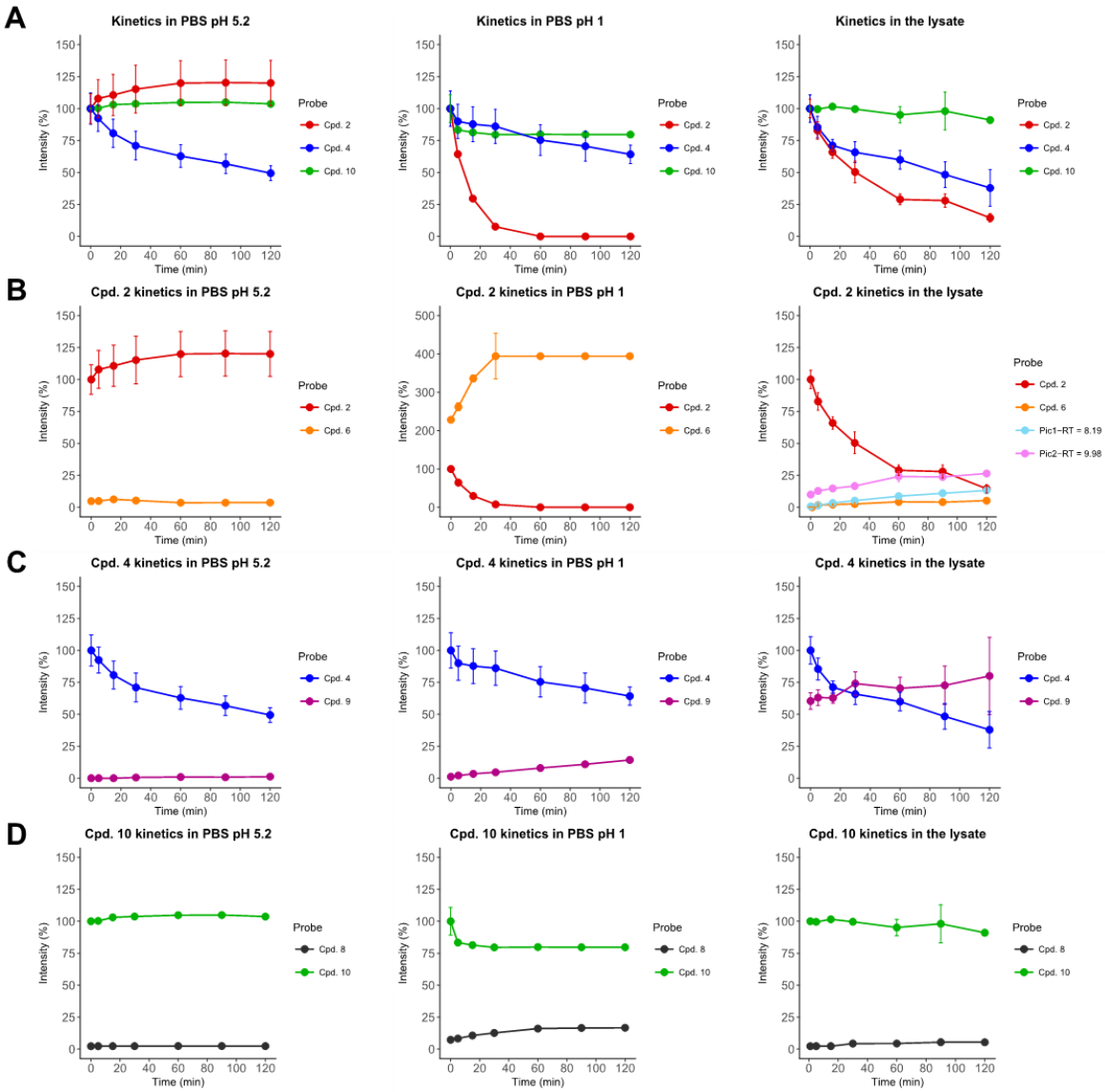


Figure 4. LC-DAD (455 nm)-monitored stability over time of ARTDs probes **2** (*red curves*), **4** (*blue curves*) and **10** (*green curves*) at 23 °C in various conditions with concomitant detection of their corresponding released (if any) fluorophore **6** (*orange curves*), **8** (*black curves*) and *N*-piperazino-SBD **9** (*purple curves*). A) Stability of the three fluorescent probes **2**, **4** and **10**, B) stability of probe

2 and its fluorophore **6**, C) stability of probe **4** and its fluorophore **9**, D) stability of probe **10** and its fluorophore **8**. Intensity ratios were calculated as the ratios of absorbance areas of a given peak over the total peak areas at the same wavelength. Probes and free fluorophores do not have the same molar absorption coefficient, therefore intensities for ARTDs probes **2**, **4** and **10** and free fluorophores **6**, **8** and **9** cannot be quantitatively compared on these figures, but we assumed they were of the same order of magnitude. Standard deviations are systematically shown on the plots but are often invisible due to their close-to-zero values. Experimental conditions are detailed in the Supplementary Information.

Evaluation of IC_{50} and RSA values. The ARTDs-mimics **2**, **4** and **10** were evaluated *in vitro* against blood-stage ART-sensitive and ART-resistant *P. falciparum* strains using both standard growth inhibitory assays and RSA, in comparison with the clinical ARTDs DHA **1**, ARTMT and ARTS, as well as preclinical ARTMS (Table 1). We first evaluated the inhibitory potency of the ARTDs-mimics using growth inhibitory assays. Regarding ART-sensitive reference strains carrying wild-type *k13* gene, the ARTMT / ARTET mimic **2** maintained a high level of inhibitory potency, being 9-fold less active (3D7 and W2 lines) or equally active (NF54 line) than ARTMT, with IC_{50} of *ca.* 10-20 nM. Clearly, connecting a bulky spacer-fluorophore unit onto DHA **1** was responsible for 10-fold decrease of inhibitory potency relatively to both **1** and ARTMT against the standard laboratory 3D7 and W2 lines, although still in the low nanomolar range (Table 1). On the other hand, ARTMS mimic **4** was moderately active against the NF54 line, with a 17-fold loss of potency compared to ARTMS, and inactive ($IC_{50} \geq 250$ nM) against the 3D7 and W2 lines. Regarding ART-resistant strains carrying mutant *k13* gene, **2** exhibited similar or even superior activity than ARTMT against the two lines studied (Dd2 and NF54), with again IC_{50} of *ca.* 10-20 nM. Partial conservation of the bioactivity of ARTMS was observed for **4,** which was 17-fold less active than the reference ARTD against the CRISPR-Cas9-edited, *k13* mutant NF54 line, but however poorly active against Dd2, with IC_{50} of *ca.* 500 nM. In all cases, compound **10** was totally devoid of inhibitory activity against all tested strains with $IC_{50} \geq 500$ nM, a fact that was unambiguously correlated to the absence of endoperoxide pharmacophore (1-deoxyartemisinin derivative).[7,37,38,43] Importantly, the absence of difference in IC_{50} between wild-type and mutant *k13* parasites obtained with growth inhibitory assays is fully consistent with published studies.[4,44]

Table 1. Antiplasmodial activity of ARTDs mimics **2**, **4** and **10** against ART-sensitive (wild type *k13*) and ART-resistant (mutated *k13*) *P. falciparum* cell lines. Experimental conditions are detailed in the Supplementary Information. NA = not active (IC_{50} > 500 nM).

IC_{50} (nM)	DHA	ARTMT	ARTMS	ARTS	Cpd. 2	Cpd. 4	Cpd.10
3D7^{WT}	2.25 ± 0.55	2.52 ± 0.35	0.93 ± 0.07	3.44 ± 0.22	22.61 ± 0.64	348.05 ± 3.31	NA
W2 ^{WT}	1.07 ± 0.13	1.03 ± 0.23	0.53 ± 0.01	0.66 ± 0.40	9.59 ± 1.22	249.42 ± 35.70	NA
NF54 ^{WT}	1.5 ± 0.14	10.72 ± 1.79	0.94 ± 0.01	1.52 ± 0.19	11.16 ± 1.09	16.45 ± 4.12	NA
Dd2^{C580Y}	1.41 ± 0.18	16.44 ± 2.52	1.41 ± 0.05	2.28 ± 0.17	19.62 ± 2.05	497.06 ± 19.28	NA
NF54^{C580}	1.08 ± 0.21	14.33 ± 1.84	0.69 ± 0.08	1.13 ± 0.12	9.55 ± 2.54	13.53 ± 1.76	NA

ART efficacy and resistance are not evaluated by IC_{50} measurements only. Indeed, clinical isolates from patients with either fast- or slow-clearing infections do not show any difference in terms of sensitivity (clearance time) when exposed to ARTDs in standard growth inhibition assays.[4,44,45] Thus, because of their short half-lives time (1-6 hours), resistance to ARTDs, which is observed only in early ring stage (0-3 hours), is assessed by a specific test called Ring-stage Survival Assay (RSA). RSA corresponds to the experimental signature of the parasite clearance delay in case of K13 mutations, and correlate with clinical resistance.[4] To the best of our knowledge, none of the described ART probes described up to know have been profiled regarding RSA values, yet constituting critical characteristics to assess probe validity and relevance to the clinical ARTDs. RSA performed on the ARTDs mimics **2**, **4** and **10** showed that **2** and **4** had excellent RSA values of respectively 8.1 % and 15.0 %, similar to the values of model ARTMT (10.3 %) and ARTMS (9.0 %). These values were also similar to those of DHA **1** (11.9 %) and ARTS (12.5 %). On the other hand, compound **9** showed high RSA value of 87.3 %, emphasizing its profound lack of similarity with the archetypal ARTDS (Table 2).

Table 2. RSA values of the ARTDs mimics **2**, **4** and **10** against ART-sensitive (wild type K13) and ART-resistant (mutated K13) *P. falciparum* cell lines.

Conditions	**3D7**	**Dd2^{R539T}**
	Average survival (%)	**Average survival (%)**
Non exposed	100	100
DMSO	89.6	74.2
DHA	1.3	11.9
ARTS	1.3	12.5
ARTMs	1.2	9.0
ARTMT	2.6	10.3
Cpd. 2	4.0	8.1
Cpd. 4	12.9	15.0
Cpd. 10	50.1	87.3

RSA results (Table 2) showed that *Dd2^{R539T}* has better survival rates than *3D7* in all the conditions tested excepted for the control DMSO. In our case, we choose 1.5% RSA survival cutoff to denote resistance as proposed by Witkowski and colleagues[4]. Therefore, *3D7* has proven to be sensitive as expected to all ART (1.3% for DHA and artesunate and 1.2% for artemisone) excepted artemether, which showed 2.6% survival rates. It also showed different level of decrease in survival rates to all three probes (4%, 50.1% and 12.9% for **2**, **10** and **4** respectively) compared to the controls DMSO (89.6%) and non-exposed (100%) conditions (Table 2). The reference ART-resistant *Dd2^{R539T}* showed as expected, survival rates over 1.5% (8.1-87.3%) to ART and probes. It also showed different level of susceptibility to ART (11.9% for DHA, 12.5% for artesunate and 9% for artemisone) compared to the controls DMSO 74.2%) and non-exposed (100%) conditions. Comparing by conditions, *Dd2^{R539T}* has proven to survive to ART and probes exposition 9.1 times (DHA), 9.6 times (artesunate), 7.5 times (artemisone), 3.9 times (artemether), 2 times (**2**), 1.7 time (**10**) more than *3D7*. Both *Dd2^{R539T}* and *3D7* responded almost similarly to **4** (15% and 12.9% respectively). Compared to ART, **2** showed 3 times less of killing effect than DHA and ARTS, 3.3 times less than ARTMS and 1.5 time less than ARTMT on reference ART-sensitive *3D7* strain. **10** showed 38.5 times less of killing effect than DHA and ARTS, 41.7 times less than ARTMS and 19.6 times less than ARTMT on the same

strain. For the third probe **4**, it also showed lesser killing effect than DHA and ARTS (9.9 times lesser), 10.7 times less than ARTMS and 4.9 times less than ARTMT on the same strain.
Different results were observed for reference ART-resistant *Dd2*^{R539T} strain. In fact, **2** has shown to have the same, if not better killing effect than ART (1.4 time better than DHA, 1.5 time than ARTS, 1.1 time than ARTMS and 1.2 time better than ARTMT). **10** showed 7.3 times less killing effect than DHA, 6.9 times than ARTS, 9.7 time than ARTMS and 8.4 times than ARTMT on the same resistance strain. **4** showed slightly lesser antiparasitic effect than DHA and ARTS (1.2 time less), 1.6 time less than ARTMS and 1.4 time lesser than ARTMT.
Together, those results showed that **2** is most effective probe compared to the two others (**10** and **4**) on either strain (*3D7* and *Dd2*^{R539T}) and has nearly the same killing effect than ART on reference ART-resistant *Dd2*^{R539T} strain.

Overall, the ARTMT / ARTET mimic **2** exhibited the strongest antiplasmodial activity of the three ARTDs probes obtained, possessing highly similar activity than ARTMT on parasite lines harboring either wild-type or mutated K13 genes, as well as similar RSA values than the clinical ARTDs. Being both a successful structural and functional mimic of the drug ARTMT and a very stable compound in physiological conditions, **2** was selected for further biological evaluation on *P. falciparum* model systems.

Native fluorescent labelling of target proteins in a *P. falciparum* cell lysate. The covalent modification of proteins by the ARTMT / ARTET mimic **2** upon Fe(II)-mediated endoperoxide cleavage, suggested by our stability study, was fully confirmed by SDS-PAGE analysis. When incubated in fresh parasite lysates from either ART-sensitive (3D7) or ART-resistant (Dd2^{R539T}) strains, **2** induced extensive yellow-fluorescent labelling of parasite proteins from low to high molecular weights (Fig. 5). The fact that the labelling was maintained in denaturing conditions (SDS) implies the covalent labelling of proteins, consistent with the heme-dependent bioactivation of the endoperoxide pharmacophore.[6,7] Again, it appeared that the small amount of free reducing heme present in the cell lysate was enough to induce protein alkylation *via* generation of carbon radicals from **2**. The labelling profiles were similar between the ART-sensitive and ART-resistant strains, constituting a novel strong presumption that ARTDs targets do not significantly differ between these strains. This observation is consistent

with the hypothesis that ART resistance arises from deregulated metabolism and /or signaling pathways in the malaria parasite rather than differences in target(s).[16] Discrimination of key, specifically-alkylated clinical targets of ARTDS within this pleiotropic covalent labelling of the parasite proteome, remains to be performed. Indeed, while the covalent labelling of both *P. falciparum* strains by ARTMT / ARTET mimic **2** was pharmacologically specific, being competitively inhibited by 20-fold excess of DHA **1** at constant protein quantity (Fig. 5), this labelling appears chemically non-specific by nature: we demonstrated that bovine serum albumin (BSA) was also alkylated by **2** when incubated in presence of artificially-generated heme (Fe(III)-protoporphyrin IX / sodium ascorbate),[6,17] suggesting that the high reactivity of the radical species generated by ARTDs could induce the alkylation of virtually *any* surrounding proteins (Fig. 5).

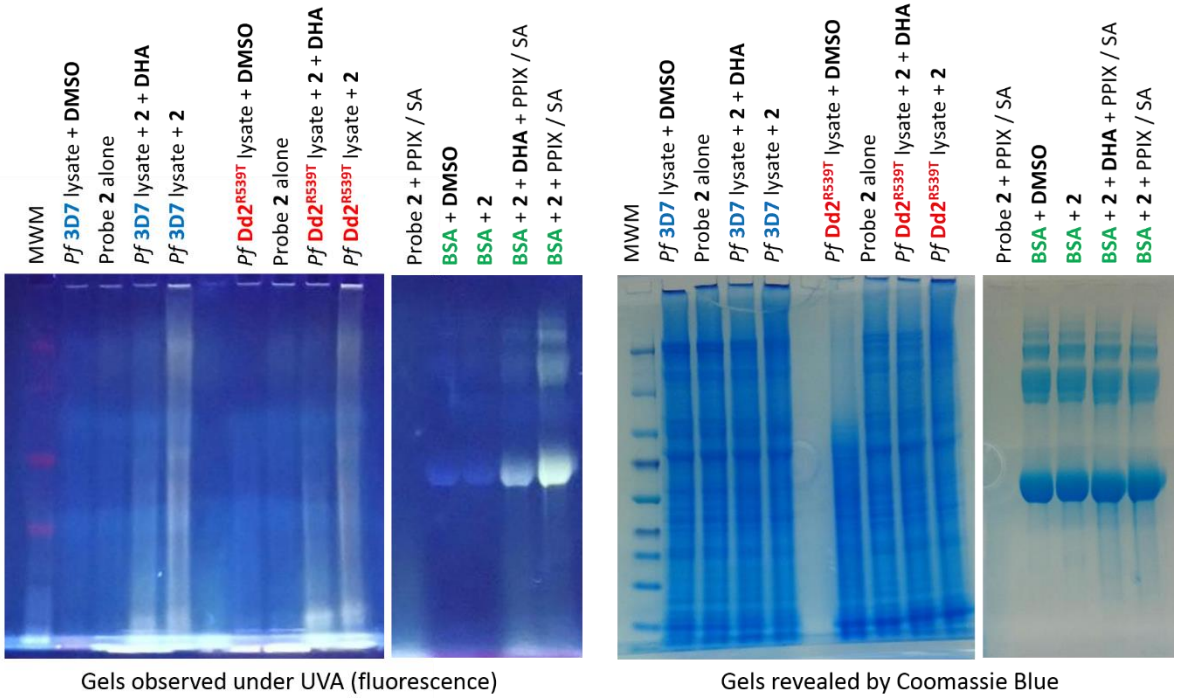


Figure 5. ARTMT / ARTET mimic **2** induces native fluorescent labelling of target proteins in both ART-sensitive and ART-resistant *P. falciparum* cell lysates, as well as fluorescent labelling of BSA in presence of artificially-generated heme. Noteworthy, certain proteins within *P. falciparum* lysate, as well as BSA, shows slight blue autofluorescence in absence of **2**. *Reagents and conditions:* [cell lysate] = 5 mg / mL; [BSA] = 1 mg / mL; [probe **2**] = 50 µM; [DHA **1**] = 1 mM; [PPIX] = 500 µM; [SA] = 500 µM. Abbreviations used: MWM, molecular weight marker; BSA, bovine serum albumin; PPIX, protoporphyrin IX; SA, sodium ascorbate.

Characterization of covalent binding of 2 to heme. The mechanism of heme alkylation by ART upon cleavage of the endoperoxide ring by heme-Fe(II) has been extensively described, and is considered to contribute to its antiplasmodial activity by preventing hemozoin crystallization.[46,47] We assessed the ability of the ARTMT / ARTET mimic **2** to covalently modify heme under biomimetic condition (buffer-octanol interface at pH 5.2), using heme-Fe(II) produced by the *in situ* reduction of hemin (*syn*. Fe(III)-ferriprotoporphyrin IX) with glutathione. [48] **2**-heme covalent adduct can be observed on the HRMS spectrum at *m/z* 1120.3778, along with the rearranged product following loss of an acetate moiety at *m/z* 1060.3586 (Fig. 6 and Electronic Supplementary Information). The covalent adduct shows a MS-MS fragmentation similar to the covalent adduct of ART with heme (see Electronic Supplementary Information), suggesting that the mechanism of action of ART is maintained for **2**. However, the easier fragmentation (slightly lower DV_{50} value) observed for the **2**-heme adduct relatively to the ART-heme adduct in collision-induced dissociation MS (Fig. 7) suggests that the bulky fluorophore moiety in **2** compared to ART leads to a stronger strain on the ethyl bond formed between in the **2**-heme adduct.

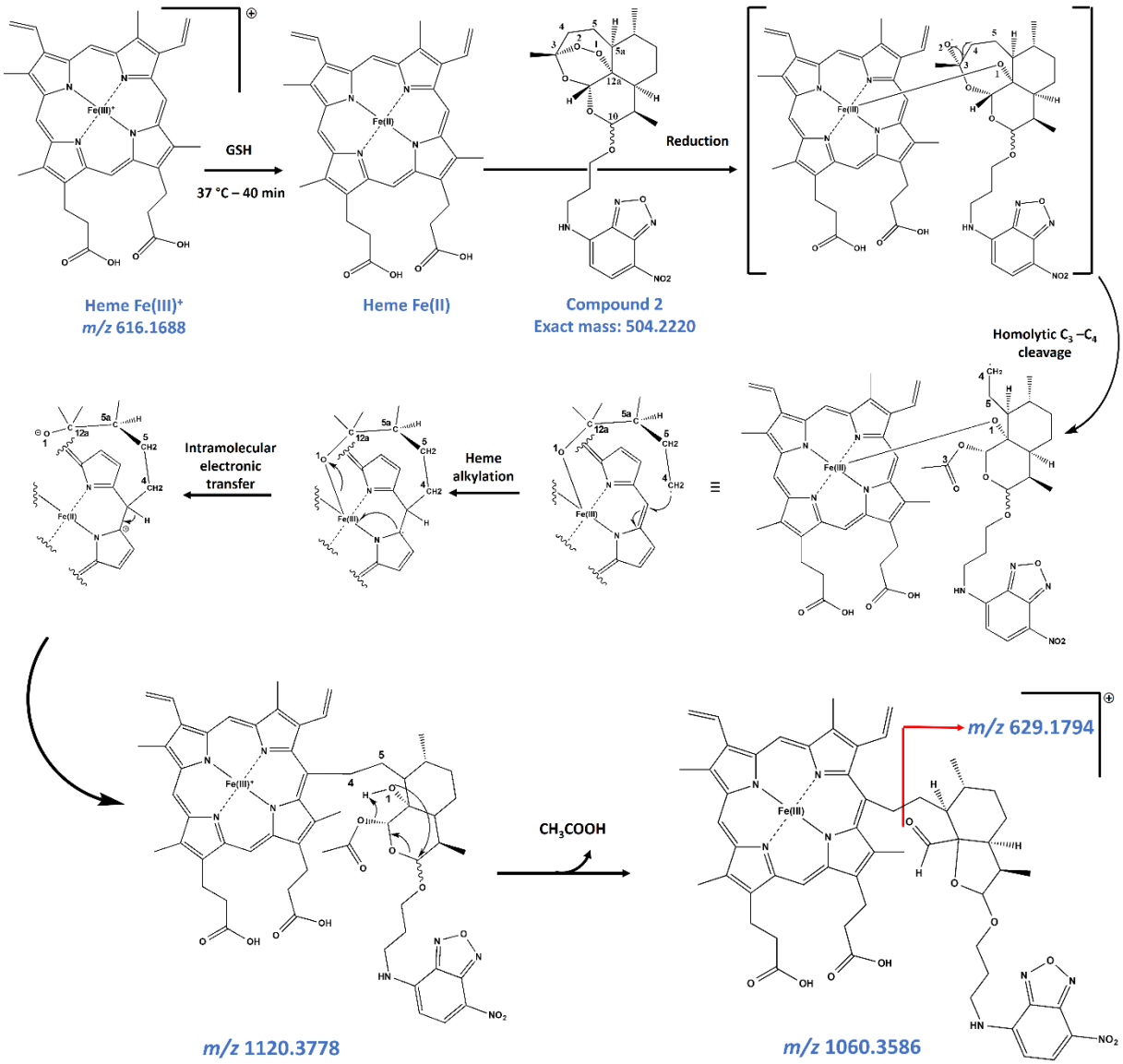


Figure 6: Alkylation and fragmentation pathway for heme-compound 2 adduct. GSH = reduced glutathione.

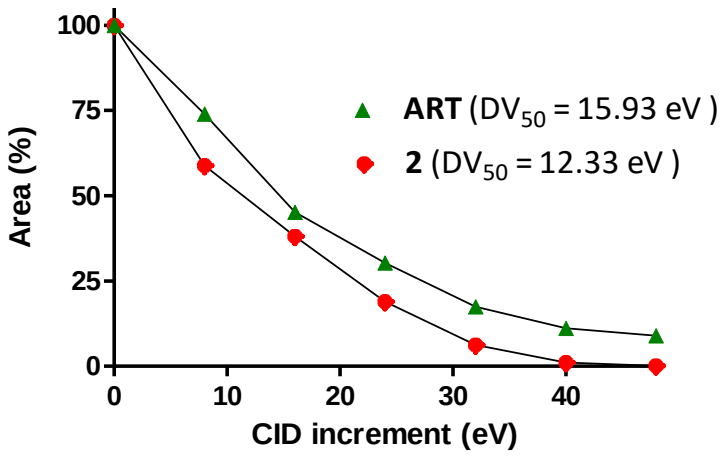


Figure 6. Decrease of adduct of heme with ART or compound 2. DV_{50} = value of the voltage applied in collision cell (in eV) corresponding to a 50% decrease of the adduct area.

In conclusion, three original ARTDs-mimicking fluorescent tracers **2**, **4** and **10** were designed and synthesized from DHA **1**, among which **10** possessed a novel aminal-lactone structure arising from the acid-catalyzed ring-opening / ring closing nucleophilic addition of a primary amine. Despite the inactivity of **10** against *P. falciparum* due to the destruction of the endoperoxide pharmacophore, this original incorporation of nitrogen nucleophiles during the "unzipping" of DHA **1** into reactive aldehyde species could open exciting synthetic directions in related chemical series. Among the obtained probe, the ARTMT / ARTET mimic **2** showed a combination of excellent physicochemical and biological properties such as (i) stability at the parasite digestive vacuole pH of 5.2 as well as in fresh parasite lysate, (ii) high inhibitory potency against asexual blood-stage parasites, that was stronger than that of all ART-derived probes designed so far, (iii) retension of RSA value of ARTMT and other ARTDs, (iii) specific pleiotropic covalent labelling of *P. falciparum proteomes* consistent with a multi-target antiplasmodial action of ARTDs, as well as (iv) high cytopermeability and specific labelling of *P. falciparum* cells. In particular, the specific action of the ARTMT / ARTET mimic **2**, exemplified by the first RSA values described for ART-derived probes, was unambigously demonstrated by the competitive inhibition of fluorescent labelling by native DHA in biochemical (i. e. covalent proteome labelling) and biological (i. e. cell imaging labelling) context, a crucial assessment not systematically validated in previous studies. Overall, our study demonstrated that probes mimicking the very structural units of acetal ARTDs are relevant tools to decipher the intricate mechanisms of action and targets of these frontline, yet threatened, antimalarial drugs.

Capitalizing on our results, we are currently evaluating 10-propargyloxy-DHA as the ideal ARTMT / ARTET mimic, a probe designed for “click-chemistry”-based target visualisation and semi-quantitative profiling.

Acknowledgements.
We thank Dr. Sandrine Cojean (Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France) for the kind gift of artesunate (ARTS) and artemether (ARTMT), and Dr. Gordon Langsley (Institut Cochin, Paris, France) for the generous gift of artemisone (ARTMS). Pascale Leproux (UMR 8638 CNRS, Université Paris-Descartes, Paris, France) is acknowledged for recording HRMS spectra. We also thank Dr. Emmanuel Roulland (UMR 8638 CNRS, Université Paris-Descartes, Paris, France) and Prof. Erwan Poupon (UMR 8076 CNRS, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France) for constructive critics regarding the preparation of this work, as well as Romain Coppée (UMR 216, IRD & Université Paris Descartes) for his kind help with preparing Figure 4 .

Notes and references.

1 S. Bhatt, D. J. Weiss, E. Cameron, D. Bisanzio, B. Mappin, U. Dalrymple, K. E. Battle, C. L. Moyes, A. Henry, P. A. Eckhoff, E. A. Wenger, O. Briët, M. A. Penny, T. A. Smith, A. Bennett, J. Yukich, T. P. Eisele, J. T. Griffin, C. A. Fergus, M. Lynch, F. Lindgren, J. M. Cohen, C. L. J. Murray, D. L. Smith, S. I. Hay, R. E. Cibulskis and P. W. Gething, Nature, 2015, 526, 207.

2 M. Imwong, K. Suwannasin, C. Kunasol, K. Sutawong, M. Mayxay, H. Rekol, F. M. Smithuis, T. M. Hlaing, K. M. Tun, R. W. van der Pluijm, R. Tripura, O. Miotto, D. Menard, M. Dhorda, N. P. J. Day, N. J. White and A. M. Dondorp, Lancet Infect. Dis., 2017, 17, 491–497.

3 F. Ariey, B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A.-C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Ménard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J.-C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon and D. Ménard, Nature, 2013, 505, 50.

4 B. Witkowski, C. Amaratunga, N. Khim, S. Sreng, P. Chim, S. Kim, P. Lim, S. Mao, C. Sopha, B. Sam, J. M. Anderson, S. Duong, C. M. Chuor, W. R. J. Taylor, S. Suon, O. Mercereau-Puijalon, R. M. Fairhurst and D. Menard, Lancet Infect. Dis., 2013, 13, 1043–1049.

5 S. Ménard, T. Ben Haddou, A. P. Ramadani, F. Ariey, X. Iriart, J. Beghain, C. Bouchier, B. Witkowski, A. Berry, O. Mercereau-Puijalon and F. Benoit-Vical, Emerg. Infect. Dis., 2015, 21, 1733–1741.

6 J. Wang, C.-J. Zhang, W. N. Chia, C. C. Y. Loh, Z. Li, Y. M. Lee, Y. He, L.-X. Yuan, T. K. Lim, M. Liu, C. X. Liew, Y. Q. Lee, J. Zhang, N. Lu, C. T. Lim, Z.-C. Hua, B. Liu, H.-M. Shen, K. S. W. Tan and Q. Lin, Nat. Commun., 2015, 6, 10111.

7 H. M. Ismail, V. Barton, M. Phanchana, S. Charoensutthivarakul, M. H. L. Wong, J. Hemingway, G. A. Biagini, P. M. O'Neill and S. A. Ward, Proc. Natl. Acad. Sci., 2016, 113, 2080.

8 W. Asawamahasakda, I. Ittarat, Y. M. Pu, H. Ziffer and S. R. Meshnick, Antimicrob. Agents Chemother., 1994, 38, 1854–1858.

9 Y. Wu, Z.-Y. Yue and Y.-L. Wu, Angew. Chem. Int. Ed., 1999, 38, 2580–2582.

10 Y. Ying-Zi, B. Little and S. R. Meshnick, Biochem. Pharmacol., 1994, 48, 569–573.

11 A. Robert, J. Cazelles and B. Meunier, Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40, 1954–1957.

12 W.-M. Wu, Y.-L. Chen, Z. Zhai, S.-H. Xiao and Y.-L. Wu, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003, 13, 1645–1647.

13 P. A. Stocks, P. G. Bray, V. E. Barton, M. Al-Helal, M. Jones, N. C. Araujo, P. Gibbons, S. A. Ward, R. H. Hughes, G. A. Biagini, J. Davies, R. Amewu, A. E. Mercer, G. Ellis and P. M. O'Neill, Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46, 6278–6283.

14 G. H. Posner, D. Wang, J. N. Cumming, C. H. Oh, A. N. French, A. L. Bodley and T. A. Shapiro, J. Med. Chem., 1995, 38, 2273–2275.

15 F. Bousejra-El Garah, M. H.-L. Wong, R. K. Amewu, S. Muangnoicharoen, J. L. Maggs, J.-L. Stigliani, B. K. Park, J. Chadwick, S. A. Ward and P. M. O'Neill, J. Med. Chem., 2011, 54, 6443–6455.

16 L. Tilley, J. Straimer, N. F. Gnädig, S. A. Ralph and D. A. Fidock, Trends Parasitol., 2016, 32, 682–696.

17 Y. Ying-Zi, W. Asawamahasakda and S. R. Meshnick, Biochem. Pharmacol., 1993, 46, 336–339.

18 A. Robert, F. Benoit-Vical, C. Claparols and B. Meunier, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005, 102, 13676.

19 S. R. Meshnick, A. Thomas, A. Ranz, C.-M. Xu and H.-Z. Pan, Mol. Biochem. Parasitol., 1991, 49, 181–189.

20 Y.-L. Hong, Y.-Z. Yang and S. R. Meshnick, Mol. Biochem. Parasitol., 1994, 63, 121–128.

21 S. R. Meshnick, Malar. Prog. Probl. Plans Genomic Era, 2002, 32, 1655–1660.

22 P. M. O'Neill and G. H. Posner, J. Med. Chem., 2004, 47, 2945–2964.

23 S. R. Krungkrai and Y. Yuthavong, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1987, 81, 710–714.

24 P. A. Berman and P. A. Adams, Free Radic. Biol. Med., 1997, 22, 1283–1288.

25 J. K. Baker, J. D. McChesney and H. T. Chi, Pharm. Res., 1993, 10, 662–666.

26 R. K. Haynes, H.-W. Chan, C.-M. Lung, N.-C. Ng, H.-N. Wong, L. Y. Shek, I. D. Williams, A. Cartwright and M. F. Gomes, ChemMedChem, 2007, 2, 1448–1463.

27 N. Lindegardh, W. Hanpithakpong, B. Kamanikom, P. Singhasivanon, D. Socheat, P. Yi, A. M. Dondorp, R. McGready, F. Nosten, N. J. White and N. P. J. Day, J. Chromatogr. B, 2008, 876, 54–60.

28 L. Huang, A. Olson, D. Gingrich and F. T. Aweeka, Bioanalysis, 2013, 5, 10.4155/bio.13.91.

29 J. M. Grace, A. J. Aguilar, K. M. Trotman and T. G. Brewer, Drug Metab. Dispos., 1998, 26, 313.

30 K. Silamut, P. N. Newton, P. Teja-Isavadharm, Y. Suputtamongkol, D. Siriyanonda, M. Rasameesoraj, S. Pukrittayakamee and N. J. White, Antimicrob. Agents Chemother., 2003, 47, 3795–3798.

31 R. K. Haynes, B. Fugmann, J. Stetter, K. Rieckmann, H.-D. Heilmann, H.-W. Chan, M.-K. Cheung, W.-L. Lam, H.-N. Wong, S. L. Croft, L. Vivas, L. Rattray, L. Stewart, W. Peters, B. L. Robinson, M. D. Edstein, B. Kotecka, D. E. Kyle, B. Beckermann, M. Gerisch, M. Radtke, G. Schmuck, W. Steinke, U. Wollborn, K. Schmeer and A. Römer, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 2082–2088.

32 P. M. O'Neill, N. L. Searle, K.-W. Kan, R. C. Storr, J. L. Maggs, S. A. Ward, K. Raynes and B. K. Park, J. Med. Chem., 1999, 42, 5487–5493.

33 Y. Maeno, T. Toyoshima, H. Fujioka, Y. Ito, S. R. Meshnick, A. Benakis, W. K. Milhous and M. Aikawa, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1993, 49, 485–491.

34 A. R. Butler, L. Conforti, P. Hulme, L. M. Renton and T. J. Rutherford, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1999, 2089–2092.

35 S. A.-L. Laurent, A. Robert and B. Meunier, Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44, 2060–2063.

36 A. M. Galal, M. S. Ahmad, F. S. El-Feraly and A. T. McPhail, J. Nat. Prod., 1999, 62, 54–58.

37 D. S. Torok, H. Ziffer, S. R. Meshnick, X.-Q. Pan and A. Ager, J. Med. Chem., 1995, 38, 5045–5050.

38 A. S. Singh, V. P. Verma, M. Hassam, N. N. Krishna, S. K. Puri and C. Singh, Org. Lett., 2008, 10, 5461–5464.

39 D.-Y. Xie, D.-M. Ma, R. Judd and A. L. Jones, Phytochem. Rev., 2016, 15, 1093–1114.

40 J. Wunderlich, P. Rohrbach and J. P. Dalton, Front. Biosci. Sch. Ed., 2012, 4, 1424–1448.

41 C. L. Hartwig, A. S. Rosenthal, J. D'Angelo, C. E. Griffin, G. H. Posner and R. A. Cooper, Biochem. Pharmacol., 2009, 77, 322–336.

42 R. K. Haynes, W.-Y. Ho, H.-W. Chan, B. Fugmann, J. Stetter, S. L. Croft, L. Vivas, W. Peters and B. L. Robinson, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43, 1381–1385.

43 M. A. Avery, F. Gao, W. K. M. Chong, S. Mehrotra and W. K. Milhous, J. Med. Chem., 1993, 36, 4264–4275.

44 C. Amaratunga, S. Sreng, S. Suon, E. S. Phelps, K. Stepniewska, P. Lim, C. Zhou, S. Mao, J. M. Anderson, N. Lindegardh, H. Jiang, J. Song, X. Su, N. J. White, A. M. Dondorp, T. J.

C. Anderson, M. P. Fay, J. Mu, S. Duong and R. M. Fairhurst, Lancet Infect. Dis., 2012, 12, 851–858.

45 C. Amaratunga, B. Witkowski, N. Khim, D. Menard and R. M. Fairhurst, Lancet Infect. Dis., 2014, 14, 449–450.

46 A. Robert and B. Meunier, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 5968–5969.

47 A. Accardo, S. A.-L. Laurent, H. Mazarguil, M. Meyer, A. Robert and B. Meunier, Spec. Issue Mem. Edw. Stiefel, 2007, 101, 1739–1747.

48 K. Muñoz-Durango, A. Maciuk, A. Harfouche, S. Torijano-Gutiérrez, J.-C. Jullian, J. Quintin, K. Spelman, E. Mouray, P. Grellier and B. Figadère, Anal. Chem., 2012, 84, 3324–3329.

Supporting Information

A chemically-stable fluorescent mimic of artemether and arteether with conserved biological activity and specificity shows high mechanistic relevance to the clinical antimalarial drugs

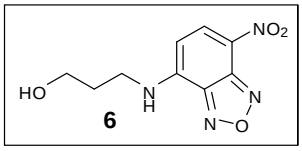
A. Sissoko[1,2], P. Vásquez-Ocmín[3,4], A. Maciuk[3,4], G. Neveu[5,6], D. Barbieri[5,6], R. Grougnet[7,8], M. Blaud[9,10], S. Michel[7,8], C. Lavazec[5,6], J. Clain[1,2], S. Houzé[1,2] and R. Duval[1,2,*]

Synthesis.

Chemical reagents and equipment.

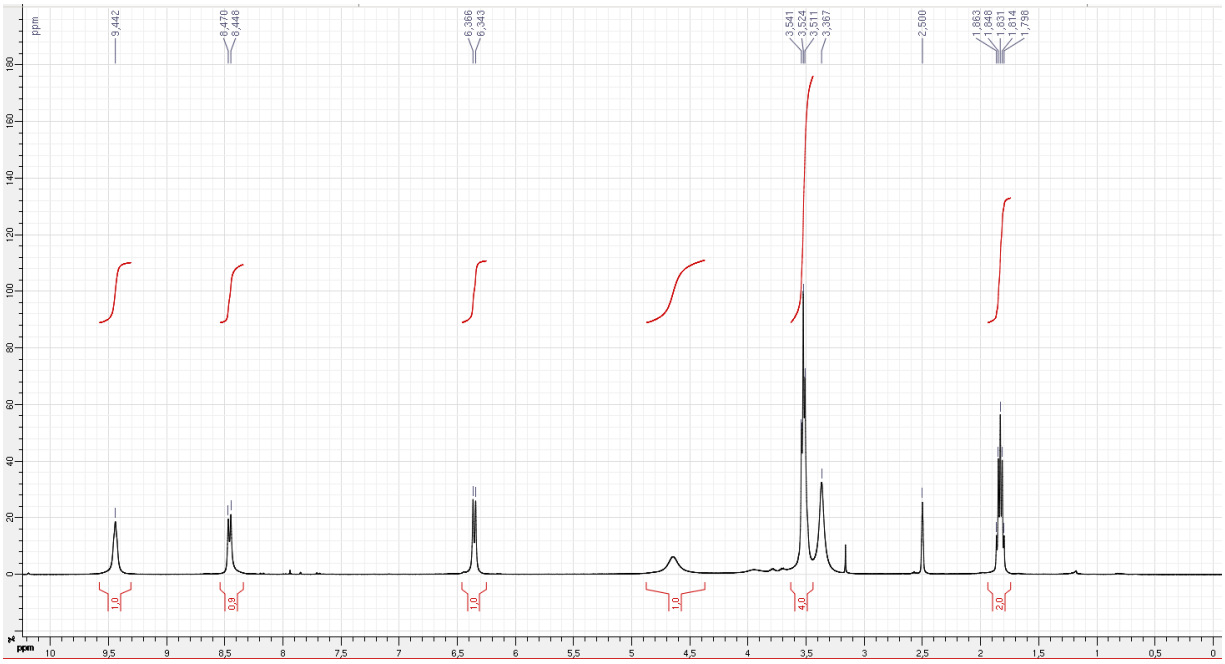
Reagents and anhydrous solvents were of high grade (Merck-Sigma) and used as received. Column chromatography was performed with silica gel 60 (9385 Merck). Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on aluminium plates coated with silica gel $60F_{254}$ (554 Merck), visualized with UV light (254 and 366 nm) and revealed with sulfuric vanillin and/or ninhydrin. NMR spectra (^{1}H and ^{13}C) were recorded on a 400 MHz Avance Bruker spectrometer, using solvent signal as an internal standard ($CDCl_3$: δ 7.24 and 77.2 ppm, d_6-DMSO: δ 2.50 and 39.5 ppm, CD_3OD: δ 3.31. and 49.1 ppm). High-Resolution Mass spectra (HRMS) was recorded in the ESI mode on a LCT Mass Spectrometer (Waters) equipped with a TOF analyser.

<u>Compound 6.</u>

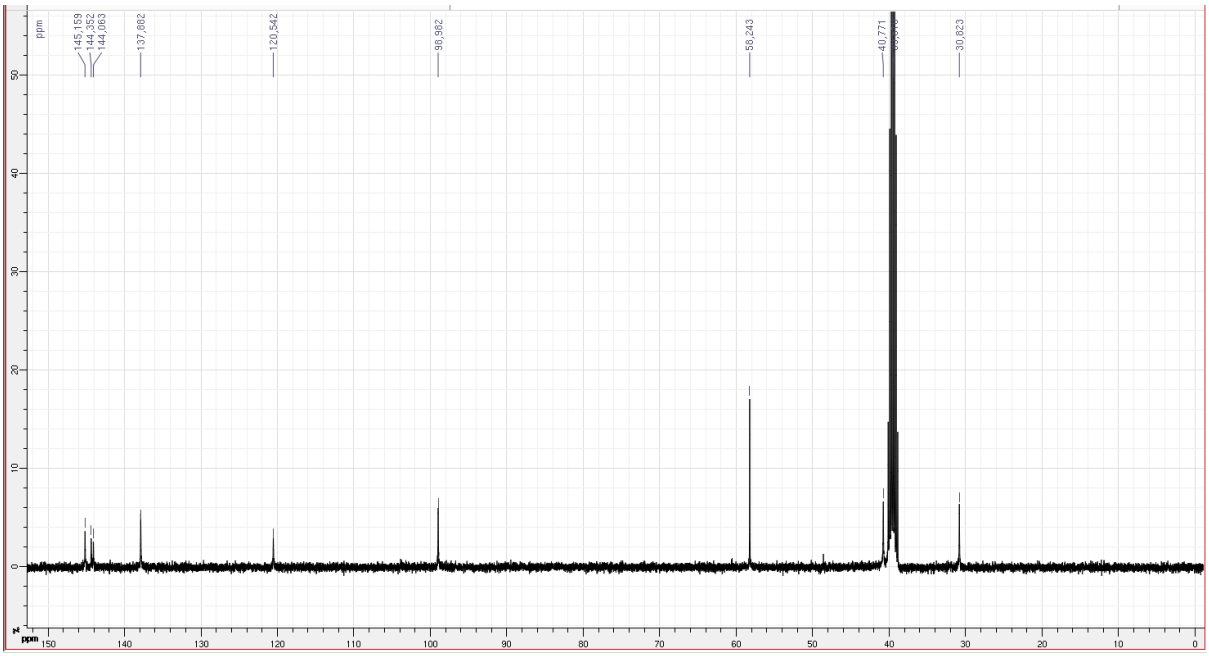


To a stirred solution of 3-amino-1-propanol 5 (115 µL, 1.50 mmol) in dichloromethane (6.0 mL) at 0°C, placed under an atmosphere of argon, was added triethylamine (232 µL, 1.65 mmol) then 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (300 mg, 1.50 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 hrs then evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography (CH_2CH_2 / toluene / propanol 85 : 10 : 5 v/v/v), yielding 6 (83 mg, 23 %) as a yellow resin. R_f (silica TLC) = 0.37 (CH_2CH_2 / toluene / propanol 85 : 10 : 5

v/v/v); ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 9.44 (*s*, 1H), 8.46 (*d*, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.35 (*d*, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.64 (*bs*, 1H), 3.52 (*t*, *J* = 6.0 Hz, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2H), 1.83 (*tt*, *J* = 13.0 Hz, *J* = 6.2 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, d_6-DMSO) δ 145.1, 144.3, 144.1, 137.9, 120.5, 99.0, 58.2, 40.8, 30.8; ESI-HRMS [M+Na]$^{+}$, m/*Z* 261.0600 (calculated), 261.0589 (found); [M+K]$^{+}$, m/*Z* 277.0339 (calculated), 277.0386 (found).

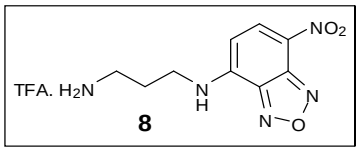


^{1}H NMR spectrum of Cpd. 6 (*d6*-DMSO)

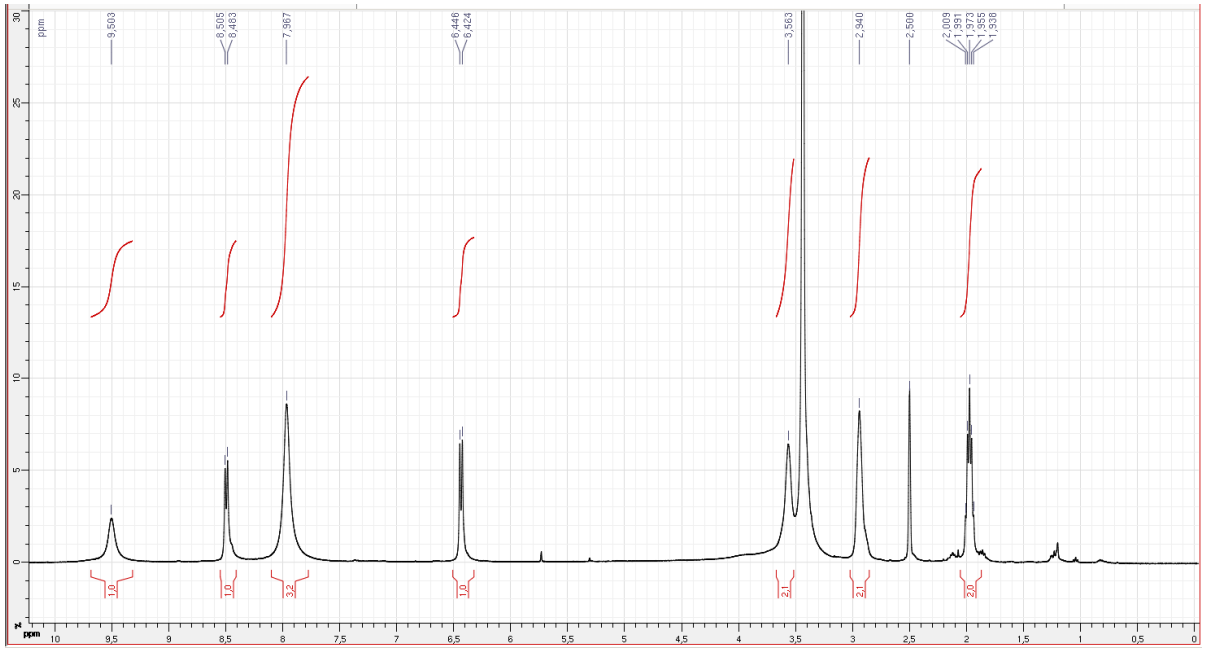


^{13}C NMR spectrum of Cpd. 6 (*d6*-DMSO)

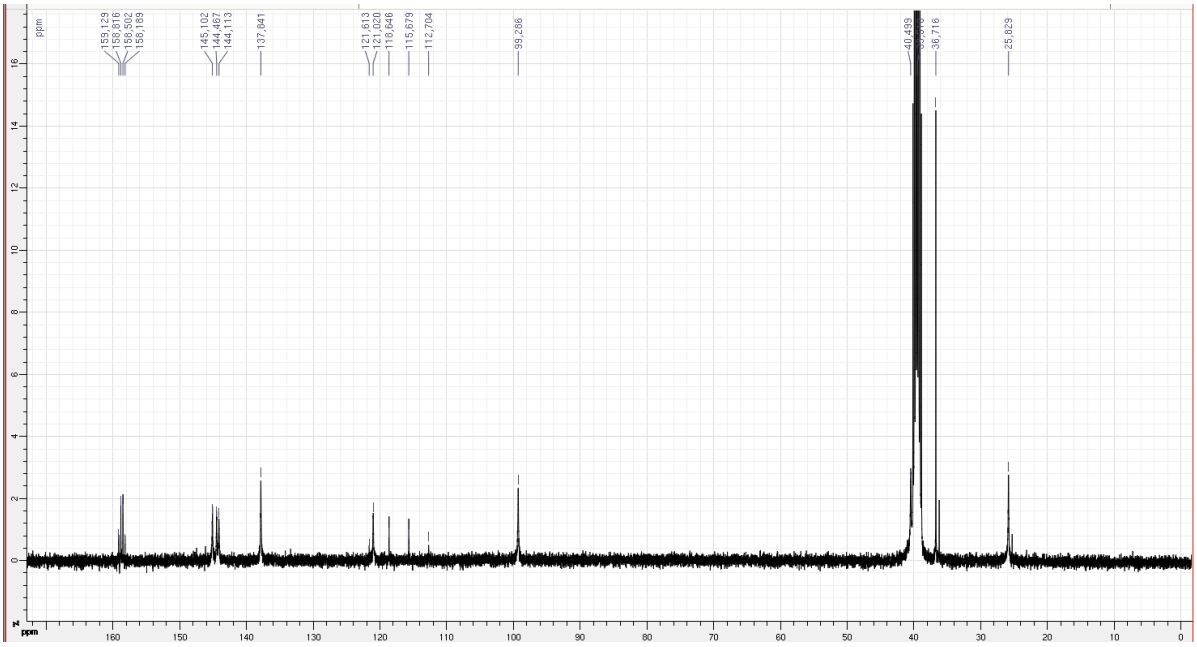
Compound 8.



To a stirred solution of *N*-Boc-1,3-propanediamine 7 (262 mg, 1.50 mmol) in dichloromethane (6.0 mL) at 0°C, placed under an atmosphere of argon, was added triethylamine (232 µL, 1.65 mmol) then 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (300 mg, 1.50 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 hrs then cooled again to 0 °C, and trifluoroacetic acid (2.7 mL, 35.2 mmol) was added dropwise. After 5 hrs at room temperature, the mixture was evaporated under reduced pressure. The crude black residue was purified by column chromatography (CH_2CH_2 / MeOH / triethylamine 85 : 15 : 1 v/v/v), yielding 8 (80 mg, 15 %) as an orange solid. R_f (silica TLC) = 0.63 (CH_2CH_2 / MeOH / TEA 95 : 5 : 1 v/v/v); ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ 9.50 (*bs*, 2H), 8.49 (*d*, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.97 (*s*, 3H), 6.43 (*d*, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.56 (*bs*, 2H), 2.94 (*bs*, 2H) , 1.97 (*tt*, *J* = 14.2 Hz, *J* = 7.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, d_6-DMSO) δ 158.6, 145.1, 144.5, 144.1, 137.8, 121.0, 117.1, 99.3, 40.5, 36.7, 25.8; ESI-HRMS $[M+H]^+$, m/*Z* 238.0940 (calculated), 238.0932 (found); $[M+Na]^+$, m/*Z* 260.0760 (calculated), 260.0759 (found); $[M+K]^+$, m/*Z* 276.0499 (calculated), 277.0499 (found).

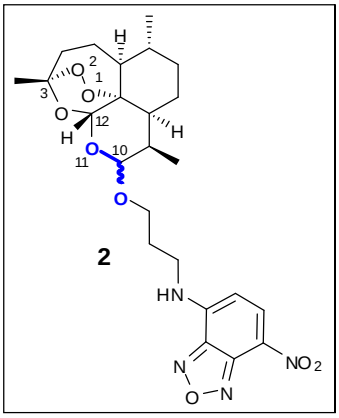


^{1}H NMR spectrum of Cpd. 8 (*d6*-DMSO)



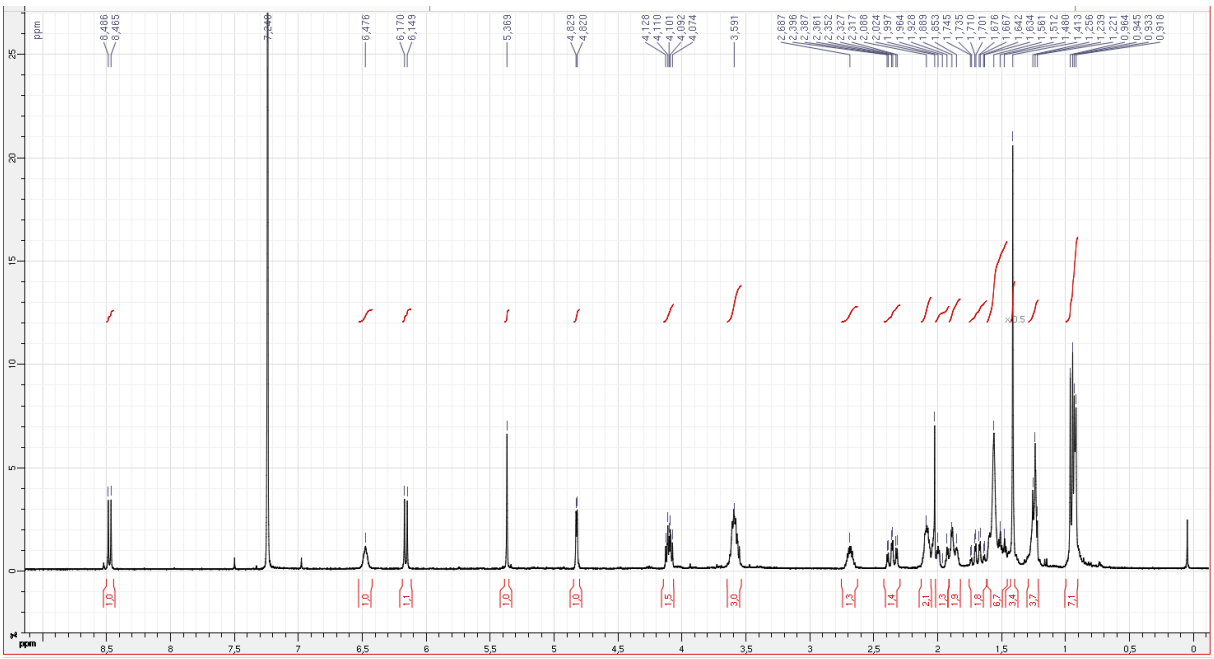
^{13}C NMR spectrum of Cpd. 8 (*d6*-DMSO)

<u>Compound 2.</u>

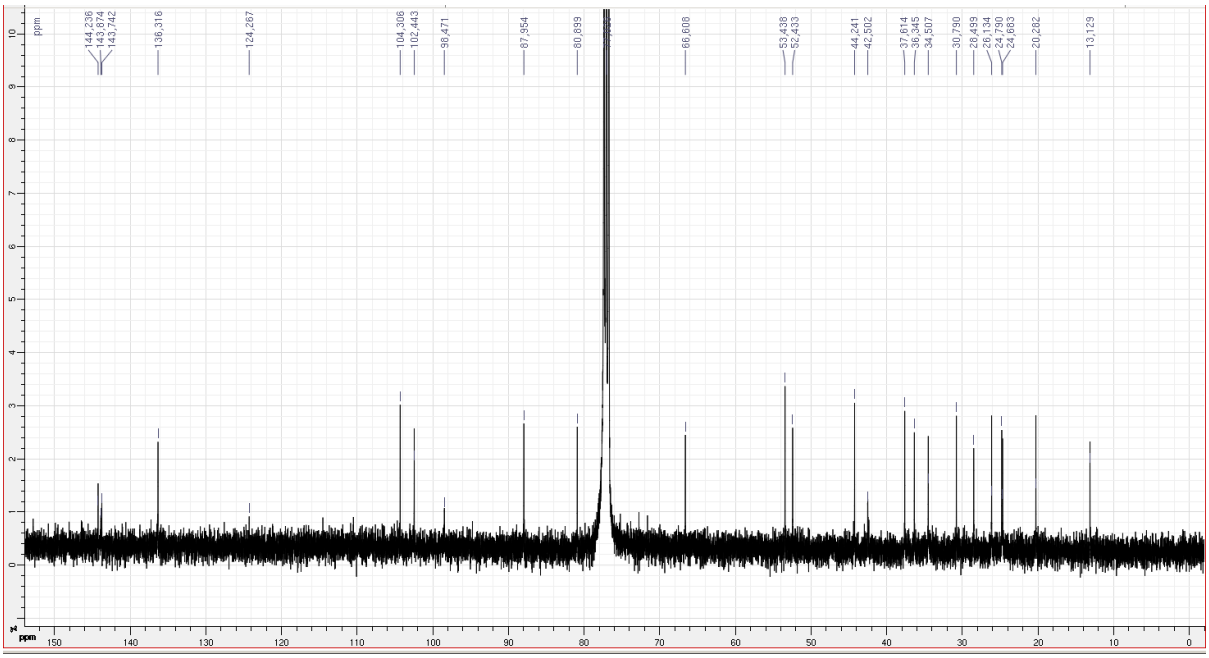


To a stirred solution of DHA 1 (20 mg, 70.3 μmol) and 6 (17.0 mg, 71.4 μmol) in chloroform (350 μL) at room temperature, placed under an atmosphere of argon, was added *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (14 mg, 73.6 μmol) and anhydrous sodium sulfate (45 mg, 0.32 mmol). The mixture was stirred for 24 hrs at room temperature, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by preparative thin layer chromatography (Merck, SiO_2 2 mm thickness, CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2 v/v), yielding 2 (8 mg, 22 %) as an orange solid. R_f (silica TLC) = 0.65 (CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2 v/v); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.47 (*d*, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.48 (*bs*, 1H), 6.16 (*d*, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.37 (*s*, 1H), 4.82 (*d*, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.59 (*m*, 3H), 2.69 (*m*, 1H), 2.36 (*td*, *J* = 13.7 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1H), 2.09 (*m*, 2H), 1.96 (*dt*, *J* = 13.7 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1H), 1.89 (*m*, 2H), 1.69 (*ddd*, *J* = 17.2 Hz, *J* = 13.7 Hz, *J* = 3.6 Hz, 2H),

1.57 (*m*, 1H), 1.49 (*dt*, *J* = 13.7 Hz, *J* = 4.4 Hz, 2H), 1.41 (s, 3H), 1.24 (*m*, 2H), 0.95 (*d*, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.94 (*m*, 1H), 0.93 (*d*, *J* = 6.0 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 144.2, 143.9, 143.7, 136.3, 124.3, 104.3, 102.4, 98.5, 87.9, 80.9, 66.6, 53.4, 52.4, 44.2, 37.6, 36.3, 34.5, 30.8, 28.5, 26.1, 24.8, 24.7, 20.3, 13.1; ESI-HRMS $[M+Na]^+$, m/*Z* 527.2118 (calculated), 527.2108 (found); $[M+K]^+$, m/*Z* 543.1857 (calculated), 543.1846 (found).

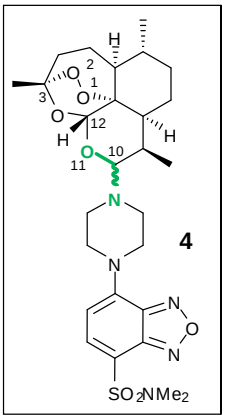


^{1}H NMR spectrum of Cpd. 2 ($CDCl_3$)

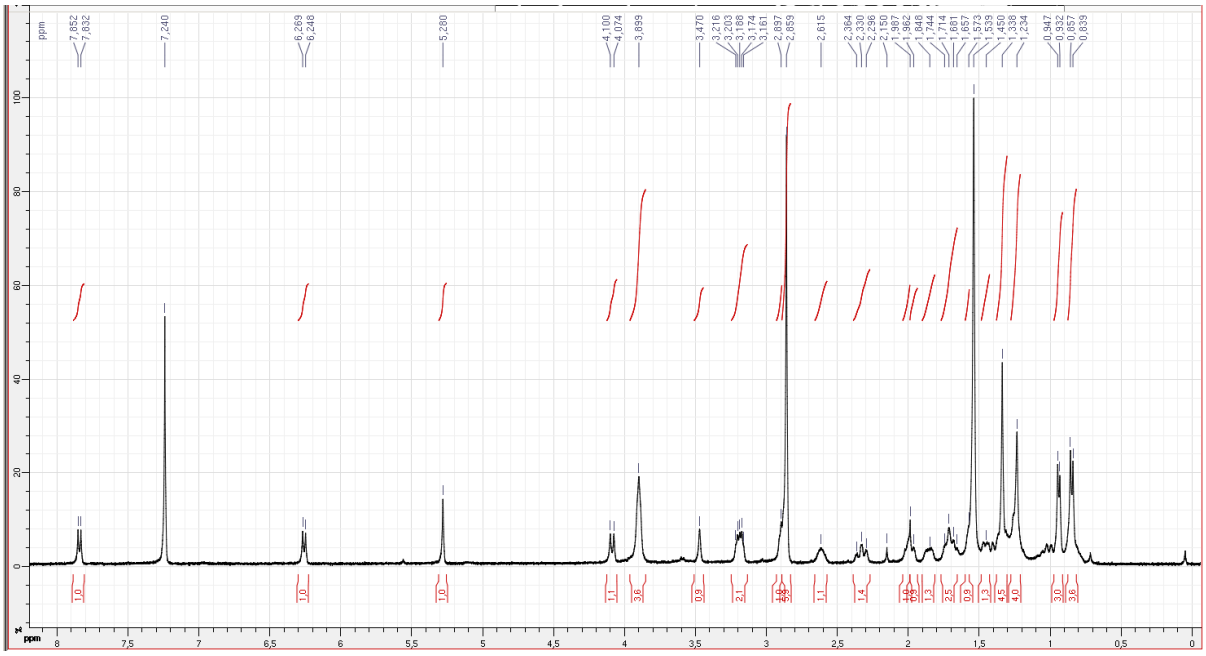


^{13}C NMR spectrum of Cpd. 2 ($CDCl_3$)

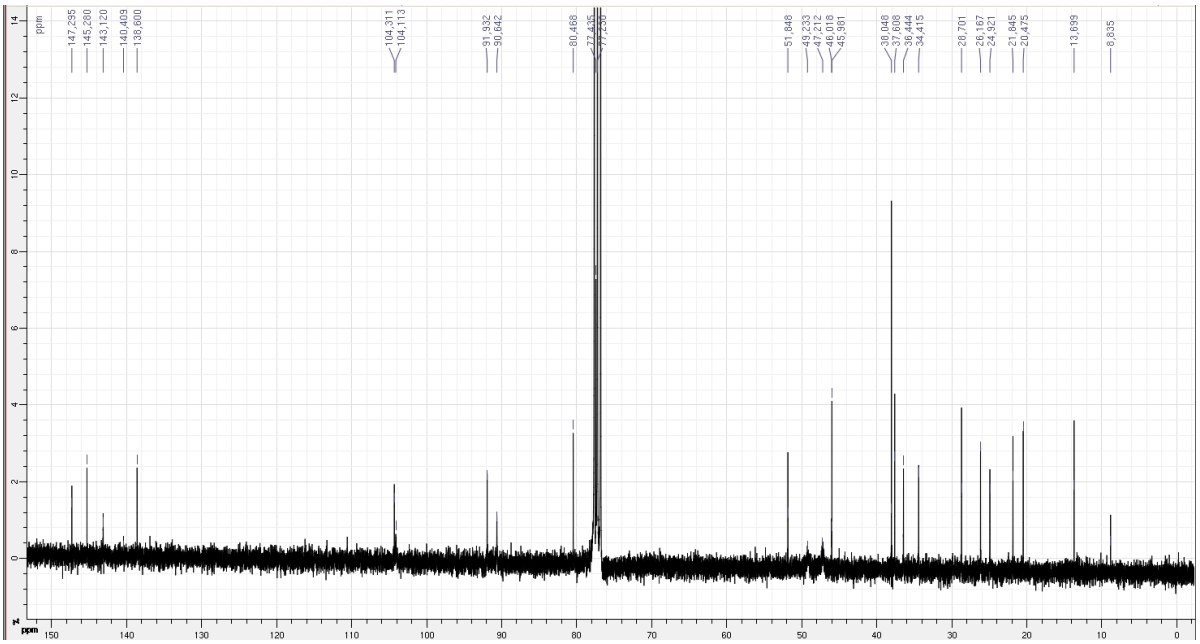
Compound 4.



To a stirred solution of DHA 1 (30 mg, 105 μmol) in pyridine (5 mL) at 0°C, placed under an atmosphere of argon, was added chlorotrimethylsilyl chloride (105 μL, 0.83 mmol) dropwise. The mixture was stirred for 4 hrs at 0°C and the reaction was quenched by the addition of ice-cold water (5 mL). Following extraction with ethyle acetate (10 mL), washing of the organic phase with ice-cold water (3 x 5 mL) and drying on anhydrous sodium sulfate, 10-trimethylsilyloxy-dihydroartemisinin (35 mg, 93 %) was obtained as a white powder. R_f (silica TLC) = 0.56 (ethyl acetate / cyclohexane 10:90 v/v). The NMR of this product was identical to that described previously.[1] To a solution of 10-trimethylsilyloxy-dihydroartemisinin (10 mg, 28.0 μmol) in CH_2Cl_2 (750 μL) at 0°C, placed under an atmosphere of argon, was added trimethylsilyl bromide (4.5 μL, 34.1 μmol), and the mixture was stirred for 30 min, before 4-(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)-7-piperazino-benzofurazan (38 mg, 122.0 μmol) then hexafluoropropan-2-ol (15 μL, 142 μmol) were added. The mixture was stirred for 2 hrs at room temperature then evaporated under reduced pressure. The orange residue was purified by column chromatography (SiO_2, CH_2CH_2 / MeOH / triethylamine 99.5 : 0.5 : 1 v/v/v), yielding 4 as an orange solid (3 mg, 18 % over two-steps "one-pot"). R_f (silica TLC) = 0.43 (CH_2Cl_2 / MeOH / triethylamine 99.5 : 0.5 : 1 v/v/v); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.26 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.28 (*s*, 1H), 4.09 (*d*, *J* = 10.4 Hz, 1H), 3.90 (*m*, 4H), 3.19 (*m*, 2H), 2.90 (*m*, 1H), 2.86 (*s*, 6H), 2.61 (*m*, 1H), 2.33 (*td*, *J* = 13.8 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1H), 1.99 (*m*, 2H), 1.85 (*m*, 1H), 1.70 (*m*, 2H), 1.57 (*m*, 1H), 1.45 (*m*, 1H), 1.34 (*m*, 4H), 1.23 (*s*, 3H), 0.94 (*d*, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.85 (*d*, *J* = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 147.3, 145.3, 143.1, 138.6, 104.3, 104.1, 91.9, 90.6, 80.5, 77.4, 51.9, 49.2, 47.2, 46.0 (2x), 38.0, 37.6, 36.4, 34.4, 28.7, 26.2, 24.9, 21.8, 20.5, 13.7; ESI-HRMS $[M+Na]^+$, m/*Z* 600.2468 (calculated), 600.2472 (found); $[M+K]^+$, m/*Z* 616.2207 (calculated), 616.2242 (found).

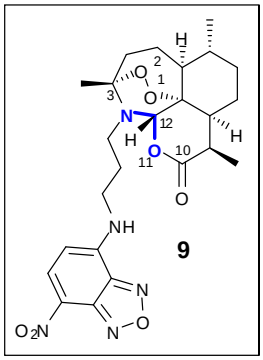


^{1}H NMR spectrum of Cpd. 4 ($CDCl_3$)

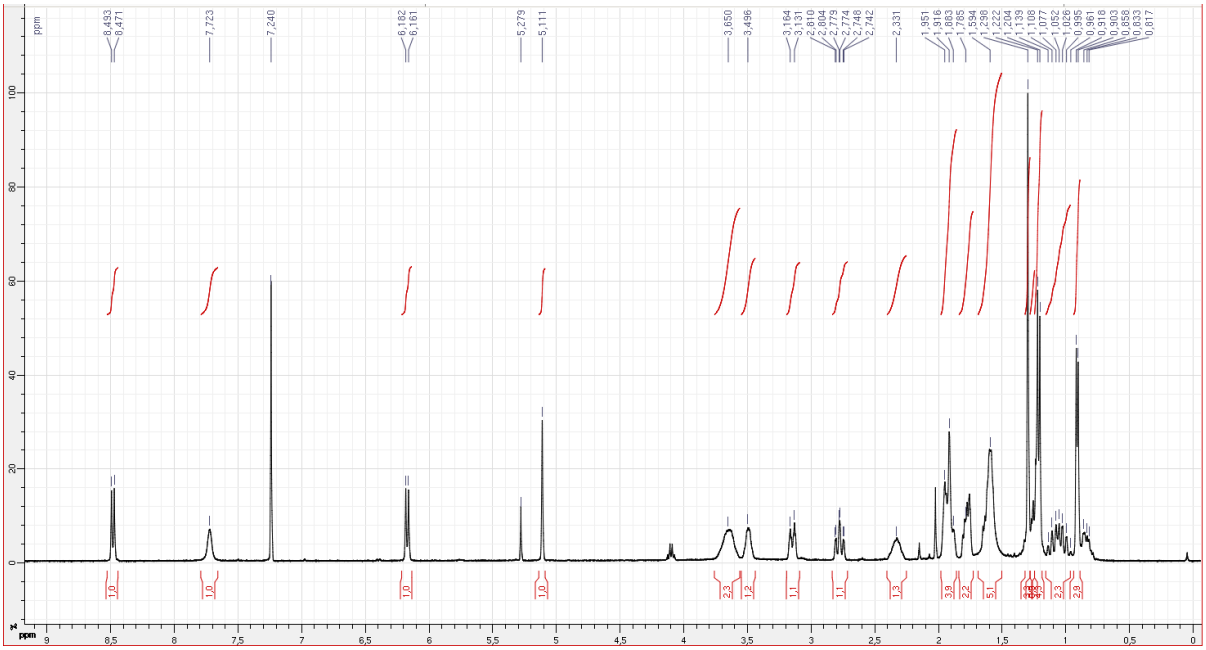


^{13}C NMR spectrum of Cpd. 4 ($CDCl_3$)

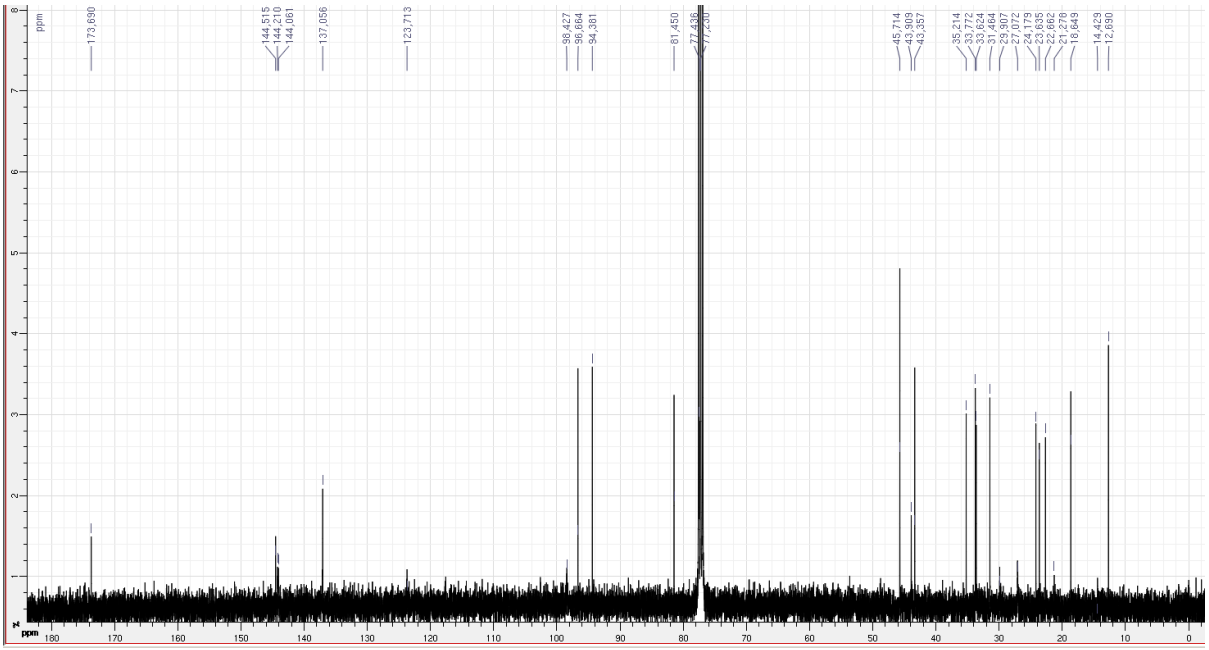
Compound 10.



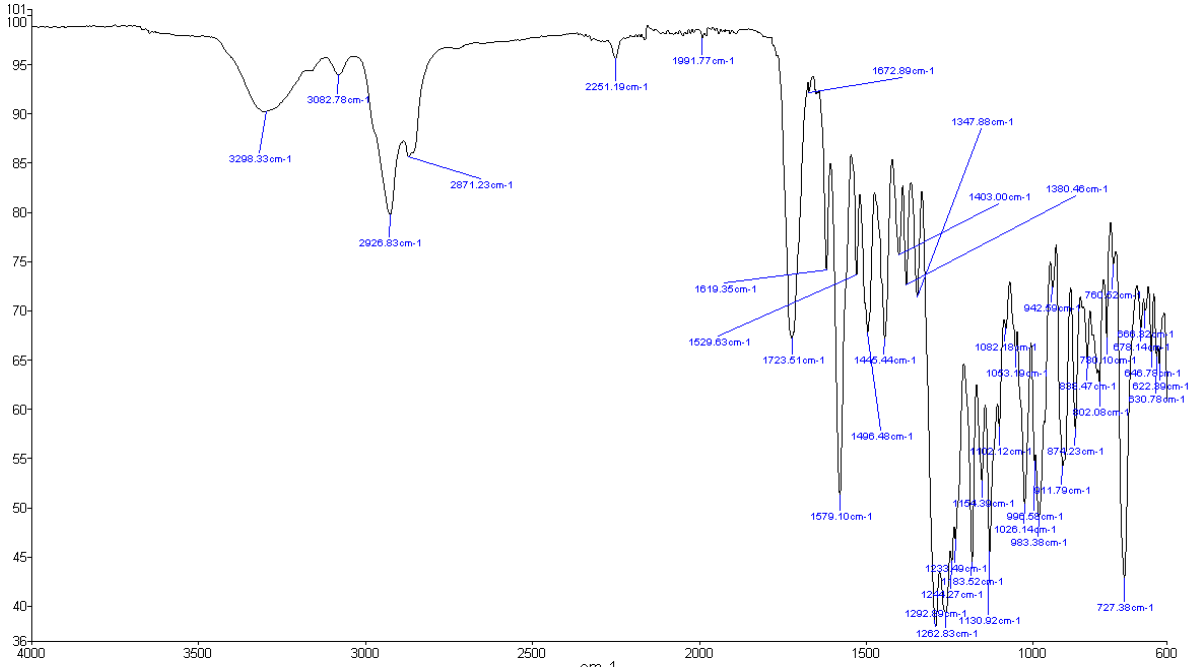
To a stirred solution of DHA 1 (5 mg, 17.6 μmol) and 8 (6.5 mg, 18.5 μmol) in chloroform (200 μL) at room temperature, placed under an atmosphere of argon, was added triethylamine (24 μL, 171.0 μmol). The mixture was stirred for 48 hrs at room temperature then evaporated under reduced pressure. The crude orange residue was purified by preparative thin layer chromatography (SiO_2, Merck, ethyle acetate / cyclohexane 50 : 50 v/v), yielding 10 (3 mg, 34 %) as an orange solid. R_f (silica TLC) = 0.39 (ethyle acetate / cyclohexane 50 : 50 v/v); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.48 (*d*, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.72 (*bs*, 1H), 6.17 (*d*, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.11 (*s*, 1H), 3.65 (*m*, 2H), 3.50 (*m*, 1H), 3.15 (*dt*, *J* = 12.9 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1H), 2.78 (*td*, *J* = 12.9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.33 (*m*, 1H), 1.98-1.86 (*m*, 4H), 1.82-1.74 (*m*, 2H), 1.63 (*m*, 1H), 1.30 (*s*, 3H), 1.25 (*m*, 2H), 1.21 (*d*, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.05 (*m*, 2H), 0.91 (*d*, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.84 (*m*, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 173.7, 144.5, 144.2, 144.1, 137.1, 123.7, 98.4, 96.7, 94.4, 81.4, 45.7, 43.9, 43.3, 35.2, 33.8, 33.6, 31.5, 29.9, 27.1, 24.2, 23.6, 22.7, 18.6, 12.7; ESI-HRMS $[M+Na]^+$, m/*Z* 508.2172 (calculated), 508.2169 (found); $[M+K]^+$, m/*Z* 524.1911 (calculated), 524.1904 (found).



^{1}H NMR spectrum of Cpd. 10 ($CDCl_3$)



^{13}C NMR spectrum of Cpd. 10 ($CDCl_3$)



IR spectrum of Cpd. 10 (solid film)

Stability studies.

Sample preparation.

Kinetic analysis was carried out on 1.2 µL of solution of probes 2, 4 and 10 (10 mM in DMSO) at 23 ° C in 120 µL of the studied medium (PBS pH 5.2 or 1, and fresh *P. falciparum* lysate adjusted to a protein concentration of 1 mg / mL). At each point of the monitoring, 10 µL of the solutions were injected in the pre-equilibrated HPLC system. In case of the parasite lysate, 15 µL of the solution were vortexed with 30 µL of acetonitrile for LC-MS to precipitate proteins, centrifuged at 5000 rpm, then 10 µL of the supernatant was injected. Analyses were performed at 0, 5, 15, 30, 60, 90 and 120 min. Each incubate was analyzed by LC-DAD-MS in triplicated, and the signal intensity was calculated for each probe as the ratio of absorbance (455 nm) areas at a given time over the initial absorbance area at t_0.

LC-MS analysis.

LC-MS analysis was performed on an Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, equipped with an Agilent Poroshell EC-C18 column (50 x 4.6 mm, 2.7 µm). Mobile phase consisted of water containing 0.1 % (v/v) of formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B), in a gradient elution as follows: from 95 % A to 100 % B in 10 min and maintained for 1

min, with a flow rate at 1 mL/min, oven temperature of 25 °C. UV-Visible absorption was monitored at 254 and 455 nm. Source ionization conditions were as follows: positive ESI, drying gas at 11 L/min and 320 °C, nebulizer 40 Psi, fragmentor at 120 V, skimmer at 65 V. The instrument was used in 2 GHz mode (extended dynamic range) and scanned from *m/z* 100 to 1700.

Biological studies.

Chemicals and reagents.

Dihydroartemisinin (DHA 1) was obtained from Merck-sigma. Artesunate (ARTS) and artemether (ARTMT) were kindly provided by Dr. Sandrine Cojean (Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France). Artemisone (ARTMS) was a generous gift from Dr. Gordon Langsley (Institut Cochin, Paris, France). HEPES and PBS buffers, D-glucose, sodium bicarbonate, hypoxanthine, L-glutamine and methanol were purchased from Merck-Sigma. RPMI 1640 medium and AB human serum were purchased from Gibco.

Parasite culture.

Chloroquine and ART-sensitive (3D7), ART-resistant ($Dd2^{R539T}$) and chloroquine-resistant strains (W2) were obtained from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4). The $Dd2^{R539T}$ strain is a Cambodian K13-propeller mutant of the Dd2 laboratory line. The other reference ART-sensitive $NF54K13^{WT}$ line and ART-resistant $NF54K13^{C580Y}$ strain were kindly provided by Dr. Sandrine Cojean. The transfected NF54/HSP70 strain was kindly provided by Dr. Catherine Lavazec (Institut Cochin, Paris, France). All *P. falciparum* lines and strains were maintained in human erythrocytes (O^+, provided by Etablissement français du sang, EFS, France) at 5 % haematocrit, suspended in complete culture medium RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM HEPES, 20 mM D-glucose (Merck-Sigma), 25 mM sodium bicarbonate (Merck-Sigma), 0.4 mM hypoxanthine, 5 mM L-Glutamine and 10 % AB human serum. Parasite cultures were kept at 37 °C in a gaseous environment composed of 5 % CO_2, 5 % O_2 and 90% N_2. The culture medium was changed daily, with control of parasitaemia using light microscopy (Axioskop microscope, ZEISS, Germany) under oil immersion, after fixing thin blood smears by methanol and staining with Diff-Quik™ stain Set (RAL DIAGNOSTICS, France).

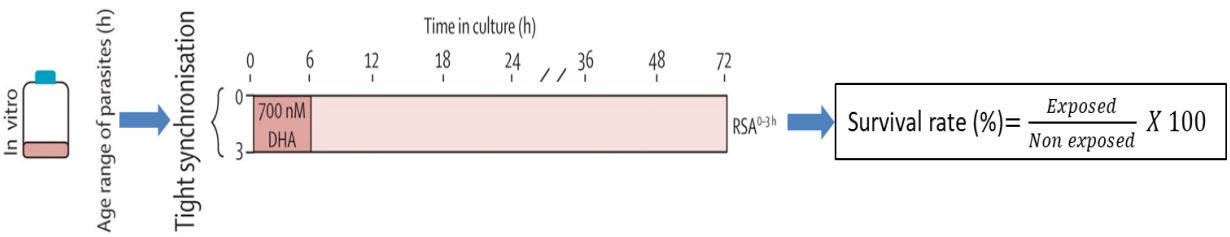
IC_{50} measurement.

50% inhibitory concentrations (IC_{50}) determination test was carried out by isotopic 42 hrs ^{3}H-hypoxanthine incorporation assays as previously described[2] with minor modifications. Briefly, *P. falciparum* cultures at ring-stage were highly synchronized by two consecutive treatments with 5 % sorbitol (Merck-Sigma) in PBS (v/v) at 40 hrs intervals and diluted down to 0.3-0.5 % parasitaemia and 2 % haematocrit. Parasites were dispensed into 96-well plates containing 14 serially diluted concentrations of drug ranging from 0-952 nM for DHA 1, ARTMT, ARTMS, ARTS and probes 2, 4 and 10, and incubated as described above in presence of 5 % ^{3}H-hypoxanthine (Perkin Elmer, USA) for 42 hrs. ^{3}H-hypoxanthine uptake was then evaluated by scintillation counting (Top Count NXT, Perkin Elmer, USA) and results were expressed as the inhibitory concentrations IC_{50} and IC_{90}, defined as drug concentrations at which 50 % or 90 % of ^{3}H-hypoxanthine incorporation was inhibited compared with drug-free controls. IC values were established by non-linear regression with ICEstimator software (http://www.antimalarial-icestimator.net/).[3-4] All tests were done in triplicates.

In-vitro ring-stage 0-3 h survival assay ($RSA^{0-3\ h}$)

This test was carried out as previously described[5] with minor modifications. Briefly, parasite cultures were first synchronized as described previously and once synchronous 10-12 nuclei schizonts reached, those last were enriched and purified on 75 % Percoll (Merck-Sigma) in 90 % RPMI 1640 – phosphate buffered saline PBS 1X (v/v). Purified 10-12 nuclei schizonts were cultured for 3 hrs with fresh erythrocytes (2 % haematocrit), treated with 5 % sorbitol to remove remaining schizonts, adjusted to 2 % haematocrit and 0.3-0.5 % parasitaemia (0-3 h early ring-stage parasites) by adding fresh uninfected erythrocytes. The suspension was then dispensed in a 24-well (1 mL per well) and exposed to 700 nM of DHA 1, ARTMT, ARTMS, ARTS or probes 2, 4 and 10, 0.1 % DMSO (control) or nothing (second control) for 6 hrs. Then, parasite cultures were washed with 10 mL RPMI-1640 to remove drug and DMSO, resuspended in complete culture medium RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM HEPES, 20 mM D-glucose, 25 mM sodium bicarbonate, 0.4 mM hypoxanthine, 5 mM L-Glutamine, 10 % AB human serum and cultured for 66 hrs at 37°C in gaseous atmosphere (5 % CO_2, 5 % O_2 and 90 % N_2). Survival rates were assessed microscopically with Giemsa-stained thin blood smears by counting the proportion of viable parasites that developed into second-

generation parasites possessing normal morphology. The RSA work-flow and mean of value determination are shown below.



Parasite lysate preparation.

Unsynchronized *P. falciparum* (*NF54K13*^{WT} and *NF54K13*^{C580Y}) parasites (5% haematocrit) were cultured in several 75 cm^2 flask (Life Science) in gassed incubation chamber as described previously. Medium was changed daily until parasitaemia reached 7-10 %. Cultures were transferred to 50 mL Falcon tubes and centrifuged at 500G for 5 min. The pellets were washed once with 25 mL PBS 1X before saponin lysis as previously described previously with minor modifications briefly, the pellets were resuspended in 25 mL saponin lysis buffer freshly made (wish consisted of 0.03 % saponin w/v in PBS 1X kept at 4°C) and incubated on ice for 15 min. Erythrocyte-free parasites were pelleted by centrifugation at 13,000G for 5 min to discard the supernatant and repeatedly washed thrice with PBS 1X until no red colour could be detected with the naked eye. The pellet was then resuspended in 500 µL parasite lysis buffer (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, CHAPS 0.5%, NaF 1 mM, sodium *ortho*-vanadate 100 µM) supplemented with 10 % protease inhibitor cocktail 10X (ThermoFisher, USA) before a brief sonication on ice (50 % amplification, 20 s on, 40 s off, twice-thrice). The homogenate was centrifuged at 4000G for 30 min at 4°C to obtain a clear lysate. Protein concentration was determined by Coomassie Plus^{TM} Protein Assay (ThermoFisher, USA) and the lysate concentration was adjusted to 5 mg/mL. After lysate quality verification by SDS-PAGE on 4-12 % gradient gel (NuPAGE^{TM} 4-12% Bis-Tris Gel, Life technologies, USA), equal amounts (90 µg) of the lysate was used for each individual covalent labelling experiment. Equal amounts of PBS (negative controls) or bovine serum albumin BSA (positive control) were used for labelling according to adapted protocols[6] with modifications as followed: lysates, BSA or PBS were pre-incubated with or without different pre-treatments that involve L-ascorbic acid (Merck-Sigma) at 500µM and haemin (Merck-Sigma) at 500 µM before adding probe 2 at 50 µM or DMSO (control), and incubated with shaking at 37 °C for 15 min. For the competition assay, lysates

or BSA were pre-treated with excess DHA 1 (1 mM) in combination with L-ascorbic acid and haemin as aforementioned for 15 min, before adding probe 2 at 50 µM, and incubated for another 15 min. All labellings were stopped by adding Laemmli buffer 5X (1X final concentration) and heated at 95 °C for 10 min before cooling down to room temperature. Labelled proteins were separated by SDS-PAGE on 4-12% gradient gel and fluorescence visualization was carried out with E-Box VX2 scanner (Vilber-Lourmat, France).

Fluorescence microscopy.

To assess the localization of probe 2 in *P. falciparum*, we used the transfected NF54/HSP70 strain. Infected erythrocytes were treated with 2 (1 µM) or free fluorophore-spacer 6 (10 µM) or DMSO 0.1 % as controls for 30 min at 37 °C. For the competition assays, cells were pre-treated with excess DHA 1 (20 µM) for 30 min before incubation with 2 for 30 more min. Cells were fixed for 10 min at room temperature with 1 % paraformaldehyde (Merck-Sigma) in PBS and then incubated with Hoechst 33342 (Life technologies) (1/20,000, v/v) for 30 min at room temperature, protected from light. After three washes with PBS 1X containing 2 % Bovine Serum Albumin (Sigma, France), infected cells were resuspended in the same solution and observed at X100 magnification using a Leica DMi8 microscope.

Flow Cytometry.

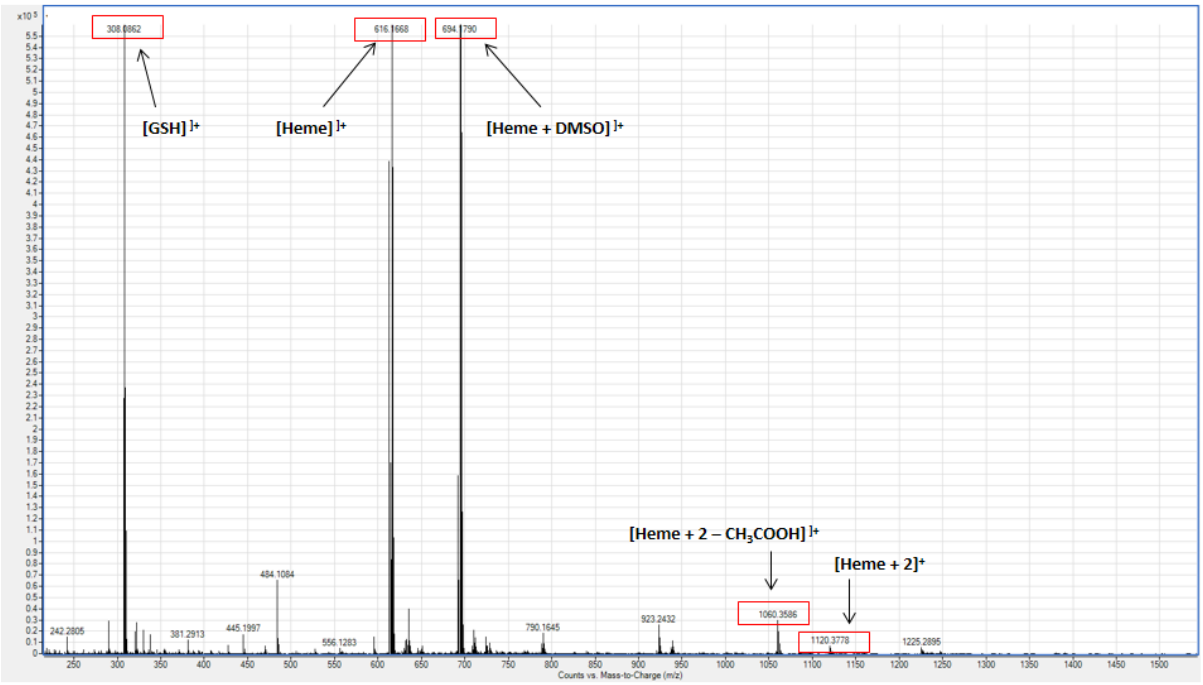
To evaluate the uptake percentage and the pharmacological specificity of probe 2, the transfected NF54/HSP70 culture was synchronized at trophozoite stage using MACS® Columns (Miltenyi Biotec) following the supplier's recommendations before treating with 2 (10 µM) or free fluorophore-spacer 6 (10 µM) or DMSO 0.1 % as controls for 30 min at 37 °C. For the competition assay, the culture was pre-treated with DHA 1 (200 µM) for 30 min before incubation with 2 for 30 more min. Cells were then washed with PBS 1X, fixed as described above and stained with Hoechst 33342 (1/10,000, v/v) for 30 min at room temperature, protected from light. After another wash step, cells were resuspended in 500 µL PBS 1X and immediately injected in a FACS Cytometer.

Characterization of covalent binding of 2 to heme

Heme-binding assay by MS.

To obtain Fe(II)-heme from hemin (Fe(III)-heme), glutathion (50 mM in water) was mixed with hemin (5 mM in DMSO) in a ration 1:1 and let to incubate 40 min. Cpd. 2 were dissolved in DMSO at the concentration of 5 mM. Citric buffer saturated octanol (CBSO) was prepared by mixing 5 mL of citric acid 50 mM pH 5.2 and 15 mL of n-octanol (anhydrous, ≥99%) and letting it to settle at 23 °C for 30 min. Upper phase of CBSO was used. Auto sampler 1260 infinity G1367E 1260 Hip ALS (Agilent Technologies) was used to do the automatic mixing of aliquots in a 384 well. Incubation mixture was as follows: 5 µL of Cpd. 2 + heme-Fe(II) 5 µL + tween 20 (10 µM) 5 µL + organic phase of CBSO 85 µL. Samples were injected in infusion mode in a 6530 Accurate-Mass QToF LC/MS instrument (Agilent Technologies) with the following settings: positive ESI mode, standard 50-3200 mass range calibration, 2 GHz acquisition rate. Ionization source conditions were: drying gas temperature 325 °C, drying gas flow rate 11 L/min, nebulizer 35 psig, fragmentor 150 V, skimmer 65 V. Range of *m/z* was 200-1700.

On the same spectrum appears GHS at *m/z* 308, heme at *m/z* 616.16, heme + DMSO at *m/z* 694.19, covalent adducts at *m/z* 1060.358 [heme + 2 – CH_3COOH]$^+$ and *m/z* 1120 [heme + 2]$^+$. Artemisinin (Sigma-Aldrich) was used also as positive control.



Collision induced dissociation of non-covalent binds

Dissociation in the collision chamber was caused by increasing kinetic energies from 0 to 72 eV. MSMS targeted mode, isolation width of *m/z* 1.3 and flow injections analyses (FIA) were used. Parameters of the source were the same as described above. Results were plotted and the sigmoidal regression curve could allow to calculate the energy necessary to dissociate 50 % of adducts (DV_{50}).

1. Haynes, R.K.*, et al.* Artemisone--a highly active antimalarial drug of the artemisinin class. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 2082-2088 (2006).
2. Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. & Chulay, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16, 710-718 (1979).
3. Le Nagard, H., Vincent, C., Mentre, F. & Le Bras, J. Online analysis of *in vitro* resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Comput Methods Programs Biomed* 104, 10-18 (2011).
4. Kaddouri, H., Nakache, S., Houze, S., Mentre, F. & Le Bras, J. Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a Plasmodium lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3343-3349 (2006).
5. Witkowski, B.*, et al.* Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies. *Lancet Infect Dis* 13, 1043-1049 (2013).
6. Wang, J.*, et al.* Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 6, 10111 (2015).

4.3.2.3 Commentaires et discussions

L'artémisinine (ART) et ses dérivés sont les médicaments les plus actifs sur une série de souches sensibles et résistantes de *Plasmodium*. Cependant ces molécules sont la plupart du temps fragiles quand elles sont testées dans des expériences biochimiques de paillasse au laboratoire et sont également difficiles à suivre dans l'organisme du fait de leur métabolisation hépatique. Les principaux dérivés synthétiques ou hémisynthétiques de l'ART sont des analogues génériques qui conservent l'hétéroatome lié à C10 sur le tétrahydropyrane car ce motif structural joue un rôle important dans la stabilité de la molécule.

Le présent travail collaboratif de chimie-biologie a permis de mettre en évidence que de nouveaux dérivés de l'artémisinine peuvent être aussi efficaces que le produit de départ. Trois vrais substituts fluorescents dérivés de l'ART (sondes) ont été conçus et synthétisés à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes. Ces trois sondes conservent la liaison de l'hétéroatome clé placé en C10 de l'ART, dans le but d'étudier leur stabilité dans des conditions biologiques différentes et aussi suivre la fluorescence en conditions relevant du protéome. Ces sondes ont été comparées aux dérivés connus de l'ART.

Dans ce projet nous avons contribué à deux points :

1) l'étude de la stabilité de ces trois sondes dans trois conditions biologiques différentes : un milieu aqueux tamponné à pH1, un milieu aqueux tamponné à pH 5.2 et dans un lysat parasitaire contenant les principales protéines et enzymes du parasite.
2) Pour la sonde identifiée ainsi comme la plus stable et par ailleurs identifiée également comme la plus active, nous avons étudié la liaison covalente entre la sonde et l'hème-Fe(II) dans des conditions imitant le milieu réducteur de la vacuole digestive du *Plasmodium*.

Pour obtenir les informations requises sur la stabilité, nous avons mis au point une méthodologie par LC-DAD-MS permettant d'obtenir, dans les trois conditions biologiques décrites auparavant, une bonne séparation chromatographique et suivre les sondes entières et l'éventuel relargage de leur fluorophore au cours du temps. De plus, nous avons dû mettre au point un protocole d'extraction pré-injection du lysat parasitaire dans but d'extraire tous les résidus non protéiniques restant (l'hème par exemple). La cinétique a été déterminée sur une durée totale de 2 heures (0 ; 5 ; 15 ; 30 ; 60 ; 90 et 120 minutes) en triplicat. Les mesures

des valeurs d'absorbance des sondes et de leurs fluorophores ont été obtenues à λ = 455 nm. Des essais préliminaires avaient montré que les valeurs d'aires obtenues par MS, étaient très fluctuantes (écart-types aberrants) et ne permettaient pas une quantification fiable.

Comme nous l'avons montré dans l'article 4 (Fig. 4), parmi les trois sondes (Composé **2**, **4**, **10**), le composé **10** (dérivé aminal-lactone) est le plus stable dans les trois conditions sans relargage de son fluorophore (Fig. 4-D dans l'article). Cependant la sélection d'une sonde doit répondre aussi à certaines conditions biologiques comme l'activité *in vitro*, or le composé **10** montre une faible activité sur 5 souches différentes de *Plasmodium falciparum* (IC_{50} > 500 µM). La faible activité du composé **10** s'explique par l'absence de pont endoperoxyde résultant du réarrangement intramoléculaire spécifique de la molécule. Le composé **4** montre également une faible activité biologique. Le composé **2** se montre très stable à pH 5.2, non stable à pH 1 et ne montre pas de relargage de son fluorophore avec le lysat parasitaire. Néanmoins il est susceptible à se lier à certaines protéines dans le lysat. Le relargage des sondes au cours du temps devrait montrer aussi l'apparition de la dihydroartémisinine, cependant nous ne l'observons pas, probablement à cause de sa mauvaise ionisation en ESI (+).

Afin d'explorer le comportement de la sonde **2** en conditions biomimétiques, la réduction de l'heme-Fe(III) en hème-Fe(II) a été réalisée avec le glutathion avec un temps d'incubation de 40 minutes suivi de l'ajout du composé **2**. Le milieu CBSO (buffer d'octanol saturé avec un tampon d'acide citrique) à pH 5.2 a été utilisé pour mimer les conditions biologiques de la vacuole digestive du parasite, comme décrit dans le chapitre 3 (article 5) de cette thèse. Nous avons pu observer par spectrométrie de masse la formations des adduits covalent à *m/z* 1120 et *m/z* 1060. La perte d'un fragment $[CH3COOH]^+$ de masse 60 entre ces deux espèces est la signature du processus d'alkylation typique au niveau de l'endoperoxide. Nous avons donc mis en évidence que la sonde **2** suit le même processus d'alkylation que l'ART et ses dérivés et que le fluorophore attaché en C10 n'est pas fragile. Des expériences MSMS sur le composé **2** ont montré que sa DV_{50} (12.33 eV) est légèrement inférieure à celle de l'artémisinine (15.93 eV). Ce résultat peut être expliqué par la présence d'un fragment d'alkylation plus volumineux du composé **2,** menant à une contrainte plus forte sur le bras éthyle formé et qui est par conséquent plus enclin à fragmentation.

Conclusions du chapitre 2

Les articles présentés dans ce chapitre ont concrétisé des collaborations avec le Laboratoire de Pharmacognosie (UMR CNRS 8638 COMETE) et l'Unité MERIT-UMR IRD 216 de l'Université Paris-Descartes. Les objectifs de ces collaborations ont principalement consisté en l'évaluation par spectrométrie de masse de produits d'origine naturelle, d'hémisynthèse ou de synthèse pour leur liaison à l'hème. Le but a été de déterminer dans un premier temps la liaison de la ferriprotoporphyrine IX avec les produits, et dans un deuxième temps, évaluer la force de cette liaison. Au cours de ces travaux nous avons cherché à améliorer la méthodologie publiée par notre unité de recherche (Laboratoire de Pharmacognosie –BioCIS) en 2012 (Muñoz-Durango et al., 2012). Cette amélioration a été réalisée avec un appareil LC/MS Agilent (LC 1260 Infinity, MS 6530 Q-TOF) différent du LC/MS quadripôle simple utilisé en 2012, et permettant un contrôle fin de l'énergie de collision lors de l'étape de mesure de la stabilité des adduits. Nous avons utilisé des énergies croissantes (eV) dans la chambre de collision, tandis que Munoz-Durango et collaborateurs ont utilisé de voltages croissants au niveau du fragmenteur. L'utilisation du fragmenteur pour mesurer la dissociation peut être trompeuse car la fragmentation est occasionnée par le passage de l'azote résiduel dans la source et les interactions avec les molécules ne sont pas standardisées ni strictement reproductibles. Du point de vue de la formulation de la solution d'injection nous n'avons pas ajouté de modification concernant l'étude des composés isolés de *P. monodiana*, cette solution continuant à être basique du fait de la solubilité de l'hème dans l'ammoniaque 25 %. Par contre les autres études (méthoxyflavones et sondes fluorescentes) ont été réalisées dans un milieu acide dont le développement est décrit dans le chapitre suivant. Nous avons également cherché à automatiser davantage le procédé, en utilisant le mode d'analyses par injection en flux continu (FIA) pour des injections successives du même échantillon. Cela nous a permis d'obtenir tous les spectres dans un même fichier, permettant l'automatisation de la méthode et l'interprétation rapide des données (voir **Annexe 3,** page 297).

Un des défis de la méthode de liaison à l'hème est de trouver une corrélation entre l'activité biologique *in vitro* et la force de liaison à l'hème par MS/MS. Comme nous l'avons démontré pour la série des flavonoïdes méthoxylés, les corrélations physico-chimiques sont

fortement liées, par exemple les résultats du LogP, la polarité des produits et les liaisons non-covalentes à l'hème (article 3). Nous nous attendons à trouver aussi des corrélations avec le test biologique *in vitro*, cependant les résultats sont contradictoires. Cela peut être expliqué pour le fait de la complexité biologique du parasite même en étant dans un milieu *in vitro*. Les produits à tester doivent se confronter à des « barrières » biologiques comme les membranes, les enzymes. Ils peuvent subir des dégradations (hydrolyse chimique ou enzymatique…) conduisant à une instabilité. Enfin ils peuvent réagir avec d'autres cibles. Néanmoins parmi toutes les molécules analysées dans ce chapitre de thèse, nous n'avons identifié cette corrélation qu'avec certaines d'entre elles. Des alcaloïdes synthétiques dérivés du 3-(2'-aryl-*N*-methyl acetamido)indolin-2-ones (**Figure 20**) (Pudlo et al., 2012) (**structures non montrées dans ce travail pour des raisons de confidentialité**) ont été testés *in vitro* sur *P. falciparum* (Résultats en **Annexe 4**, page 297). Dans ce groupe de composés structurellement reliés, la corrélation de l'activité était néanmoins significative: le produit le plus actif donnait l'adduit le plus stable (IC_{50} = 0.02 µM ; DV_{50} = 4.292 eV) et le produit le moins actif l'adduit le moins stable (IC_{50} = > 1 µM ; DV_{50} = 3.397 eV).

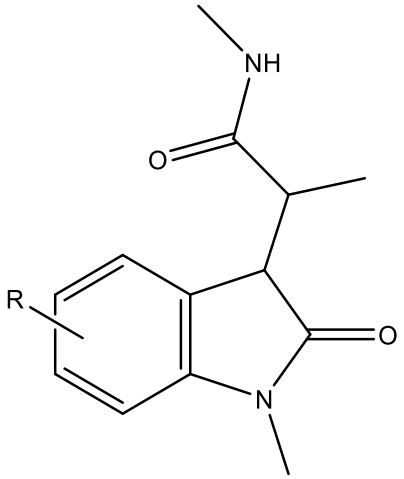


Figure 20. Structure de base des alcaloïdes synthétiques dérivés du 3-(2'-aryl-*N*-methyl acetamido)indolin-2-ones.

Chapitre 3 : Développement et application d'une méthode de biodéréplication antiplasmodiale

Résumé graphique : A soumettre à *Analytical Chemistry* (Ref Article 5, page 199).

1 Déréplication

1.1 Définition

Les produits naturels (PNs) sont des points de départ classiques pour la découverte de médicaments (Bent, 2008). En 2014, les produits naturels étaient impliqués dans le développement d'environ 63 % de tous les médicaments (Newman and Cragg, 2016). Malgré les efforts dans la recherche de nouvelles molécules, le domaine de la chimie de substances naturelles souffre de difficultés qui peuvent conduire à une perte de temps considérable. Il s'agit par exemple de la redécouverte fréquente de composés connus après une purification consommatrice de temps, la recherche redondante des organismes lié à une mauvaise identification taxonomique (microbiens, plantes, animaux, etc.) ou l'étude des organismes sans rapport avec la cible biologique choisie (aucun lien entre l'usage traditionnel) (Hubert et al., 2017).

Chronologiquement l'utilisation du mot «déréplication» et les premières questions liées à ce concept remonte à l'année 1978 (Hanka et al., 1978). Après des années de silence, Beutler en 1990 a repris ce terme (Beutler et al., 1990) pour désigner la démarche d'identification rapide de chimiotypes connus («*process of quickly identifying known chemotypes*»), impliquant une cartographie chimique d'un mélange complexe pour y repérer des constituants typiques identifiés auparavant. Depuis, l'utilisation de ce terme est courante et largement employée pour distinguer, dans une matrice biologique, les produits déjà connus de ceux qui ne sont pas connus, ceci indépendamment de l'activité biologique. On peut définir aussi la déréplication comme la mise au rebut de composés connus (Gaudencio and Pereira, 2015), ce qui suggère bien que pour certains chercheurs, les molécules déjà décrites chimiquement perdent tout intérêt, une opinion qui peut être néanmoins contestée. De nos jours, une large gamme de techniques modernes est mise à disposition des chercheurs pour réaliser la déréplication et est en constante évolution. Toute les témoignages suggèrent que les ensembles de séquences opérationnelles (« *workflows »)* les plus prometteurs pour le profilage chimique de produits naturels doivent impliquer, au moins en partie, une procédure de déréplication (Hubert et al., 2017). Des stratégies novatrices pour réduire toujours plus la durée de découverte de produits naturels restent donc à développer, en utilisant notamment

des librairies ou des bases de données de produits naturels (Bitzer et al., 2007). Nous décrivons ici les techniques les plus courantes sur lesquelles se reposent les différentes approches de déréplication.

1.2 Méthodes

1.2.1 La spectroscopie ultra-violette

Une des voies de déréplication primitive mais qui a été longtemps la seule disponible pour les petites molécules a été la détection par chromatographie liquide haute performance couplé à la détection UV-Visible (DAD - *diode array detector*), relativement peu coûteuse. L'état de l'art a considérablement changé durant les 20 dernières années (Nielsen et al., 2011). De nos jours, seulement les chimistes organiciens peuvent compter dans certains cas sur les données UV-Vis comme un outil primaire pour l'élucidation structurale. Dans le domaine des substances naturelles néanmoins, de nombreux types de produits naturels comme les polyacétates (par exemple, les tétracyclines), les composés dérivés de l'acide shikimique (par exemple, le chloramphénicol) et les alcaloïdes dérivés d'acides aminés aromatiques (ergotamine), ont tous des spectres UV tout à fait caractéristiques. Ces substances contiennent souvent une fonction polyinsaturée, comme des systèmes aromatiques, un ou plusieurs groupes carbonyle, une fonction acide carboxylique, ester ou des groupes fonctionnels amide (Hansen et al., 2005). Néanmoins une limitation majeure de cette approche est que les fréquences absorbantes des liaisons C-C, C-H et groupes C=C non conjugués ne peuvent pas être observées dans une région spectrale UV facilement accessible et sont brouillées par les solvants.

Le profilage des composés par DAD a été largement utilisé en chimiotaxonomie. Par exemple dans les champignons et les lichens, le nombre de chromophores est corrélé au nombre de familles biosynthétiques (Frisvad, 1989). Le groupe de recherche de Larsen au Danemark à la fin des années 90 a appliqué la déréplication guidée par la similarité des spectres UV dans le genre *Penicillium*. Ils ont ainsi pu cibler les travaux d'isolement vers de nouveaux alcaloïdes comme la fumiquinazoline F et l'alantrypinone à partir de *P. thymicola* (Larsen et al., 1998), ainsi que de nouvelles quinazolines, les verrucines A et B issues de *P. verrucosum* (Larsen et al., 1999). D'autres exemples de cette approche montrent l'isolement

de la benzodiazépine sclerotigénine (auranthine B) comme un possible marqueur chimiotaxonomique pour les espèces *P. sclerotigenum* et *P. commune* (Larsen et al., 2000). Un peu plus tard dans le même groupe de recherche, un algorithme « X-hitting » a été développé et appliqué sur des classes différentes de métabolites secondaires et se base sur leurs spectres UV-Vis obtenus par HPLC en phase inverse. Il permet aussi à l'utilisateur de construire une base de données spectrales UV-Vis (Hansen et al., 2005). L'utilisation de cette méthodologie a permis d'isoler deux nouvelle spiro-quinazoline, les lapatins A et B (Larsen et al., 2005).
Le *workflow* de déréplication d'un organisme peut être envisagé de nos jours comme un mélange de techniques où la spectroscopie UV-Vis accomplit un rôle important mais secondaire. Aujourd'hui on ne peut pas imaginer une déréplication faite sans l'utilisation de méthodologies plus informatives comme la SM et la RMN.

1.2.2 Les couplages avec la spectrométrie de masse (SM)

1.2.2.1 CPG-SM

La CPG-SM est la combinaison synergique de deux techniques micro-analytiques puissantes. L'appareil de CPG sépare les composants d'un mélange dans le temps et le spectromètre de masse fournit les informations qui facilitent l'identification structurelle de chaque composant (Sparkman et al., 2011). Cependant, la CPG-SM est incompatible avec des composés non volatiles et thermiquement labiles. En conséquence, des méthodes de dérivation ont été développées pour rendre ces métabolites moins polaire, plus volatils ou thermiquement stable pour qu'ils puissent être analysés par CPG-SM (Du and Zeisel, 2013). En parlant de déréplication par CPG-SM, l'ionisation standard par impact électronique (IE) à 70 eV fournit des ions moléculaires et des fragments reproductibles et caractéristiques. L'identification moléculaire peut être établie en comparant l'ensemble des données spectrales avec des bases de données spectrales massiques standards (NIST, GPC-MS Agilent Fiehn Metabolomics Retention Time Locked Library, GOLM, Wiley…) (Carnevale Neto et al., 2016). Dans ce but, des méthodologies ont été développées en envisageant la déréplication simultanée et sans équivoque par CPG-SM pour identifier des dérivés de triterpénoïdes pentacycliques (acides oléanolique, bétulinique et ursolique) ayant été auparavant signalés pour avoir une activité modérée contre *Mycobacterium tuberculosis* (Gu Jian-Qiao et al.,

2005). Dans le domaine de l'écologie chimique, les extraits apolaires adaptés à une analyse par CPG-SM sont riches en produits essentiels pour les bactéries par exemple. Une méthode d'analyse a été développée pour le traitement de données basée sur le screening par CPG normalisée, qui combine la conversion de ces données et le traitement statistique par HCA (*hierarchical cluster analysis*) pour évaluer les grands ensembles d'extraits bactériens (Böröczky Katalin et al., 2006). D'autres approches plus modernes de déréplication par CPG-SM ont été proposées en combinant des méthodes de déconvolution (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System* – AMDIS et *Ratio Analysis of Mass SpectrometrY* - RAMSY) dans le but d'améliorer l'identification de composés dans un extrait (Carnevale Neto et al., 2016).

Ces études déréplicatives avec la CPG-SM ont des limites importantes, par exemple quand deux ou plusieurs molécules sont co-éluées, et également à cause de la fragmentation élevée par IE qui conduit à une perte d'information structurale (Du and Zeisel, 2013). Cependant des techniques d'ionisation douces, comme l'ionisation chimique (IC) peuvent surmonter cette question en préservant l'intégrité moléculaire dans la source (Carnevale Neto et al., 2016).

1.2.2.2 CLHP-SM^n

Pendant les 30 dernières années, la chromatographie liquide de haute performance (CLHP) est devenue la technique de référence pour l'analyse de produits naturels. À côté des améliorations considérables des performances de colonnes, le couplage avec des détecteurs de plus en plus performants (DAD, SM ou RMN) a ouvert de nouvelles possibilités pour la caractérisation de métabolites secondaires dans des extraits naturels.

Le couplage entre la CLHP et la spectrométrie de masse, en synergie avec les outils chimio-informatiques, constituent à présent le *workflow* le plus puissant en chimie de substances naturelles (Hubert et al., 2017). S'appuyant sur un article publié en 2002 sur les corrélations de fragmentations par SM (Wan et al., 2002), le Professeur Nuno Bandeira de l'Université de Californie à San Diego a commencé ses travaux sur l'analyse en protéomique en utilisant des réseaux spectraux, regroupant dans une représentation en constellation des molécules qui partagent une même voie de fragmentation. Cette approche a permis d'élaborer une base de données de protéines *in-house* (Bandeira, 2007; Bandeira et al., 2007).

L'équipe du Professeur Pieter Dorrestein de la même université a continué le développement de cette approche des réseaux moléculaires (auparavant appelés réseaux spectraux) comme une moyen de déréplication à haut débit (Yang et al., 2013). Les spectres générés à partir d'organismes d'origine marine ou terrestre sont mis en ligne sur une plateforme de libre accès qui sert aussi de libraire spectrale, appelé GNPS (*Global Natural Products Social Network*) (Wang et al., 2016). En Europe, d'autres laboratoires ont commencé à utiliser immédiatement cette approche et à l'améliorer, principalement le groupe du Pr. Jean-Luc Wolfender de l'Université de Genève. Ils ont développé par exemple une stratégie de déréplication basée sur la combinaison du réseau moléculaire avec une vaste base de données de fragmentation SM/SM de produits naturels modélisée *in silico* (Allard et al., 2016). En France, l'Institut de chimie de substances naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette) a utilisé cette approche pour cibler et isoler une série de diterpènes dérivés du daphnane, tigliane, et jatrophane provenant des espèces du genre *Euphorbia* (Euphorbiaceae). Ces produits ont aussi montré une forte activité contre le virus du chikungunya et celui du VIH (Nothias-Scaglia et al., 2015). À présent, ce *workflow* LC/SM-SM-bioinformatique a de multiples applications. Par exemple au sein du laboratoire BioCIS-Université Paris Sud, il est utilisé pour l'exploration chimique de plantes déjà étudiées dans le but d'isoler des produits minoritaires nouveaux (Fox et al., 2017) ou bien il peut être utilisé dans des stratégies de synthèse biomimétique dans le but d'identifier des produits structuralement originaux.

1.2.3 La résonance magnétique nucléaire

La SM est un outil puissant et la méthode la plus commune de déréplication. Cependant beaucoup de composés sont isobariques (ils ont des poids moléculaires identiques) et les données de fragmentation peuvent être ambiguës (Fink and Reymond, 2007; Williams et al., 2015). La RMN fournit donc un avantage significatif sur la SM pour assigner des structures moléculaires. La spectroscopie RMN est considérée comme le détecteur chimique universel puisqu'il produit des données riches en informations pour identifier les caractéristiques structurales des composés. Avec l'apparition de hauts champs magnétiques et des sondes cryogéniques ou capillaires, la sensibilité moins importante de la RMN en comparaison à la SM été progressivement contrebalancée et même l'élucidation de structure de composés minoritaires dans des mélanges devient possible (Hubert et al., 2014).

Au cours des dernières années, dans le but de faciliter l'acquisition de spectres RMN haut-débit, le traitement de données issues de grands ensembles d'échantillons a été développé. Clos et collaborateurs ont mis en place une méthodologie automatisée simple et directe qui exploite les avancées récentes des logiciels (*hardware* et *software*) du spectromètre Bruker BioSpin NMR (Clos et al., 2013).

L'équipe de Pharmacognosie de Reims a développé une méthode originale de déréplication par RMN. Comme nous le montrons dans la **Figure 21**, le *workflow* de cette approche se décompose en plusieurs étapes. Dans un premier temps, un processus de fractionnement est réalisé pour obtenir une séparation simplifiée des composés. Idéalement, la technique de fractionnement doit être sélective, rapide et capacitive, et la chromatographie de partage centrifuge (CPC) s'avère être une technique présentant ces caractéristiques. Dans un deuxième temps, l'ensemble des métabolites contenus dans les fractions générées par CPC sont analysé par RMN ^{13}C. L'alignement des déplacements chimiques de tous les spectres des fractions est fait avec un algorithme créé sous Python et utilisant un traitement statistique par HCA (*hierarchical cluster analysis*). Le résultat est une carte de chaleur permettant de visualiser directement les métabolites individuels sur la carte bidimensionnelle résultant de l'HCA comme des «groupes de déplacement chimiques similaires" dans la série de fractions. Ensuite les ensemble de signaux liés à un métabolite sont comparés avec une base de donnée de métabolites secondaires (Hubert et al., 2014). Cette stratégie appelée « CARAMEL » (pour caractérisation des mélanges) a été conçue spécifiquement pour une première application dans la cosmétique où la caractérisation chimique de principes actifs naturels est soumise à l'augmentation de contraintes réglementaires (Hubert et al., 2015). Cependant cette méthodologie peut être également utilisée dans des matrice biologiques dans un but déréplicatif, comme par exemple des composés majoritaires de lichens (Oettl et al., 2014). Cette méthodologie présente plusieurs avantages comme :

- l'obtention d'une vision globale de la composition d'un extrait naturel (profilage RMN de tout l'extrait;
- l'identification rapide des composés majoritaires d'un extrait ;
- la découverte de structures moléculaires originales (focus sur clusters de signaux RMN inconnus) ;

- La recherche ciblée de molécules intéressantes (activité) et non désirées (toxicité) ;

Malgré l'utilisation fructueuse de la déréplication par RMN, d'une manière générale il reste encore des points qui doivent être améliorés :

- il ne s'agit que d'annotation de molécules, et non d'une identification formelle ;
- la configuration stéréochimique est le parent pauvre de ces méthodes à ce jour ;
- il est préférable que l'entité à dérépliquer soit dans le même solvant deutéré que les produits de la base de données.

Par conséquent, l'identification de la structure 3D complète des produits naturels inconnus n'est pas aisée et exige un profilage chimique vaste, obtenues par des expériences spectroscopiques multiples (principalement la SM, RMN 1D et 2D, dichroïsme circulaire).

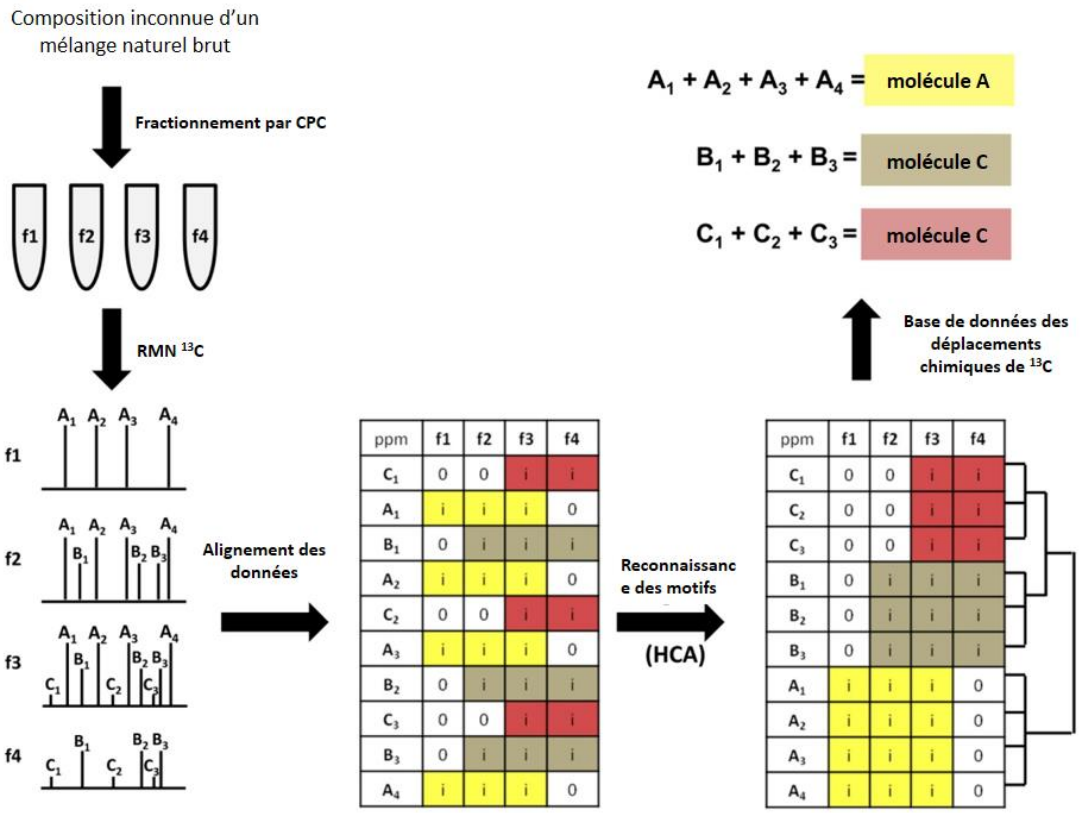


Figure 21. *Workflow* général de déréplication par RMN (Hubert et al., 2014).

2 La biodéréplication

2.1 Définition

Le concept de biodéréplication est inhérent de la notion d'économie et d'optimisation. Les approches par déréplication permettent aux chimistes des substances naturelles d'économiser le temps, l'argent et les efforts. Au-delà des limitations actuelles de la déréplication, la possibilité d'ajouter à cette déréplication la dimension biologique apporte un progrès dans cette course à l'efficacité. Nous définissons donc la biodéréplication comme l'approche dans laquelle des techniques sont employées pour repérer de façon rapide et précoce les produits (connus ou inconnus) biologiquement actifs dans un mélange complexe tel que les extraits naturels.

2.2 Méthodes

2.2.1 Bioautographie

La chromatographie en couche mince (CCM) est une technique chromatographique fréquemment utilisée pour les analyses préliminaires des produits naturels ou pour l'identification rapide des composés connus à l'intérieur de mélanges simplifié obtenus après le pré-fractionement d'un extrait brut (Hook et al., 1997; Tan et al., 2011). La CCM corrélée à l'activité biologique est appelé bioautographie. Les premiers exemples de bioautographie ont été décrits dans les années 1950 sur des composés antibactériens testés sur des souches de *Lactobacillus leichmannii* et *Streptococcus faecalis* (Johnson, 1954; Picken and Bauriedel, 1950) et des composés antifongiques utilisant *Aspergillus niger* (Wright et al., 1954). La CCM-bioautographie est simple, rapide, économique et peut être mise en place dans la plupart des laboratoires. Le principe est le suivant : une suspension microbienne, une solution d'enzyme ou une autre cible biologique dans un milieu approprié est appliquée sur une plaque CCM après migration. Après incubation, les zones d'inhibition de croissance ou d'activité peuvent être directement visibles, ou peuvent être visualisées après une étape de révélation impliquant un réactif chromogénique (Hostettmann et al., 2005; Potterat and Hamburger, 2013) (**Figure 22**). L'utilisation de cette technique a augmenté dans les deux décennies passées pour le screening d'extraits de plantes. D'ailleurs plusieurs essais pharmacologiques ont été

modifiés pour qu'ils puissent être exécutés sur des plaques de CCM, comme les tests antimicrobiens, antifongiques, antioxydants, l'inhibition de l'alpha et de la bêta-glucosidase, ou l'inhibition de l'activité anticholinestérase (Adhami Hamid-Reza et al., 2013). Malgré sa facilité d'utilisation, la bioautographie souffre évidemment de quelques limitations inhérentes : la plupart des essais biologiques ne sont pas compatibles avec les conditions prévalant sur une plaque de CCM. Par ailleurs, des données quantitatives peuvent être obtenues seulement pour un nombre limité de tests, comme ceux utilisant la détection de bioluminescence (Potterat and Hamburger, 2013). Un défaut de la CCM déploré pendant longtemps a été le manque de couplage avec des méthodes spectroscopiques telles que la spectrométrie de masse. Cependant ces derniers années quelques solutions techniques ont été proposées pour combiner la CCM et la SM (Le Pogam et al., 2017). Automatiser la technique de CCM-bioautographie (en adaptant la cible biologique) avec méthodes de détection comme la SM et la RMN peut être un outil rapide de déréplication pour les produits naturels (Adhami Hamid-Reza et al., 2013; Grzelak et al., 2016).

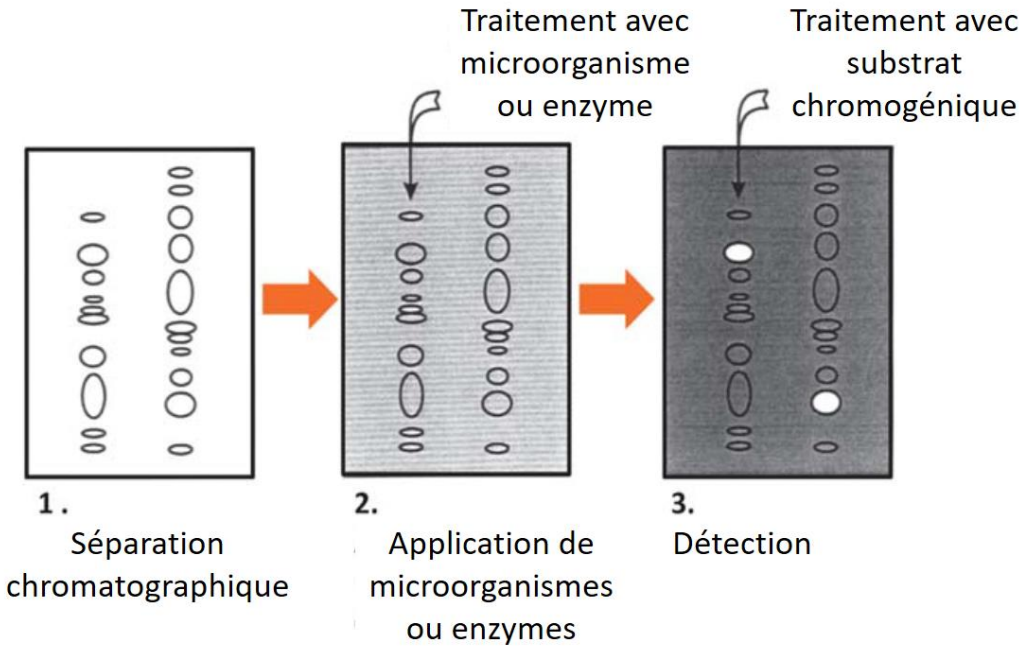


Figure 22. Principe du test de bioautographie sur CCM (Potterat and Hamburger, 2013).

2.2.2 Tests biologiques en ligne et récepteurs immobilisés

Quand une technique de séparation est associée directement et en temps réel avec un test biologique, il permet simultanément la séparation et la détection de composés bioactifs dans des mélanges complexes (Ingkaninan et al., 2000). Le développement d'essais post-colonne en ligne livrant des données de bioactivité pour des pics d'HPLC est donc une stratégie particulièrement intéressante et rapide (Potterat and Hamburger, 2013). De plus, si le système en ligne est relié avec d'autres techniques de détection comme le DAD ou la SM, les composés actifs peuvent être rapidement identifiés (Ingkaninan et al., 2000).

Le principe est le suivant : d'abord la séparation des produits d'un mélange par HPLC, suivi de l'ajout à l'éluat d'une solution de la protéine cible interagissant avec le(s) analyte(s) dans une première zone où commence une incubation rapide. Ensuite un ligand ou substrat est ajouté et réagit avec la cible dans une deuxième zone où continue l'incubation. Les produits de la réaction sont alors analysés en utilisant les détecteurs UV, SM ou de fluorescence (**Figure 23**). La détection par SM en parallèle aux analyses biologiques (en divisant le flux, mode *split*) permet d'avoir des informations sur la structure chimique du produit (Kool et al., 2011; Potterat and Hamburger, 2013).

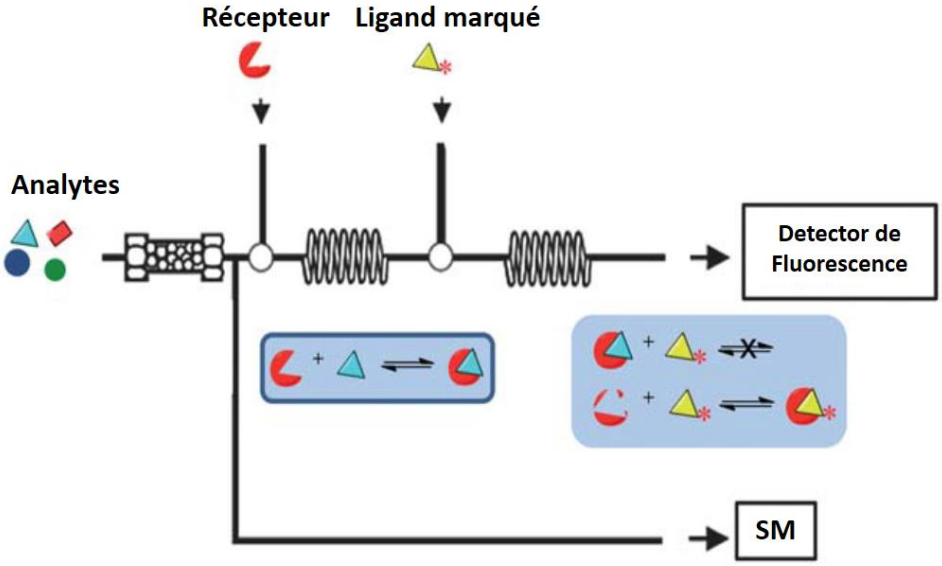


Figure 23. Principe des réactions biologiques en ligne (Potterat and Hamburger, 2013).

Les premières expériences avec cette approche datent des années 1990, avec des réactions post-colonne d'échange de ligand avec des composés organosulfurés, comme l'éthylène thiourée, la cystéine ou le glutathion avec le complexe non-fluorescent de calcéine-Pd^{II} (Irth et al., 1990). Ces expériences ont été développées principalement par Irth et ses collaborateurs à l'Université d'Amsterdam aux Pays-Bas (Oosterkamp et al., 1997a, 1997b). Ce groupe a aussi inventé le terme "screening de haute résolution" (HTS en anglais) pour décrire cette approche. De nos jours, une large variété d'essais biologiques applicables à une large gamme de cibles de protéines ont été développés (Shi et al., 2009).

De multiples approches similaires ont été proposées dans l'optique de biodéréplication d'extraits de plantes. Des exemples sont la détection d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Ingkaninan et al., 2000), la détection du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (De Kloe et al., 2011), la détection de récepteurs de liaisons à l'estrogène (Schobel et al., 2001), les inhibiteurs d'angiotensine (Van Elswijk et al., 2003), les inhibiteurs de la phosphodiestérase (Schenk et al., 2003), la détection du pouvoir antioxydant (DPPH, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Zhang et al., 2012). Malgré les avantages de cette approche, notamment une détection rapide de la molécule active et la facilité d'adapter les tests biologiques, la principale limite est le temps de réaction post-colonne. En effet, la réaction doit obligatoirement être incubée pendant un temps court pour limiter la diffusion affectant négativement la résolution (Potterat and Hamburger, 2013).

Une autre approche consiste à immobiliser des récepteurs sur une phase stationnaire, et l'utilisation de cette colonne comme outil de biochromatographie afin de détecter des ligands. Cette approche a été développée notamment par Wainer (Calleri et al., 2010; Maciuk et al., 2008; Moaddel and Wainer, 2009).

2.2.3 Tests en ligne découplés

Pour contourner cette limitation liée au temps d'incubation post-colonne, Irth et ses collaborateurs ont développé une configuration où les tests biologiques sont réalisés après la séparation mais de façon découplée dans le temps (Giera et al., 2009). Dans cette approche, le réactif biochimique requis pour l'essai est toujours ajouté en post-colonne de CLHP, mais l'éluent est fractionnée dans des microplaques de 96, 386 ou 1536 puits avant l'incubation avec la cible (Potterat and Hamburger, 2013) (**Figure 24**).

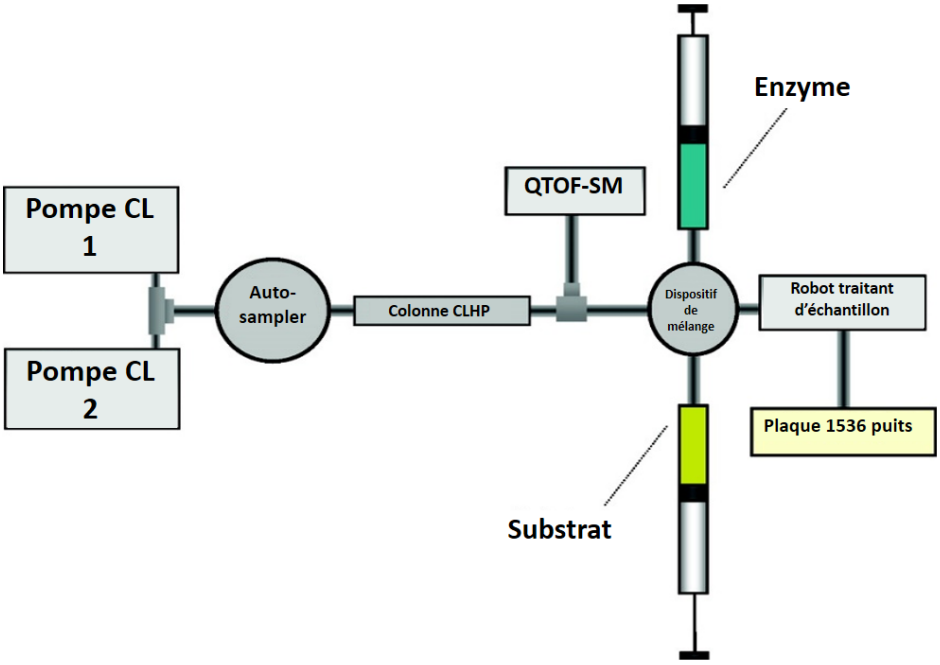


Figure 24. Configuration schématique de la détection en ligne découplée d'inhibiteurs d'enzyme (Giera et al., 2009).

Les avantages de cette méthode sont le traitement de séchage, les étapes de redissolution qui peuvent être contrôlées, le solvant étant adapté et identique pour tous les essais. En comparaison avec les tests en ligne, l'avantage essentiel de la configuration découplée consiste en ce qu'il n'y ait aucune limitation en ce qui concerne le temps d'incubation et ainsi aucune perte de la résolution (Giera et al., 2009; Potterat and Hamburger, 2013).

3 Application de la biodéréplication avec le test de liaison à l'hème

3.1 *Piper coruscans* Kunt (Piperaceae)

3.1.1 Taxonomie et distribution

Tableau 3. Classification taxonomique de l'espèce *Piper coruscans.*

***Piper coruscans* Kunt**	
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Sous-classe	Magnoliidae Novák ex Takht.
Sous-ordre	Magnolianae Takht.
Ordre	Piperales Bercht. & J. Presl
Famille	Piperaceae Giseke
Genre	*Piper* L.
Espèce	*Piper coruscans* Kunt

Synonymes : *Artanthe amazonica*, *A. coruscans*, *A. pseudochurumayu*, *Piper amazonicum*, *P. baryanum*, *P. coactaepilum*, *P. coruscans* var. *membranaceum*, *P. orenocanum*, *P. pseudochurumayu*, *P. pseudochurumayu* var. *membranaceum*, *P. santiaganum*, *P. tingens*, *P. wurdackii*, *Schilleria coruscans*, *Steffensia pseudochurumayu*.

Nom vulgaire : *Cordoncillo*.

Figure 25. A) Arbuste de l'espèce *Piper coruscans* (Photo prise par PG Vásquez-Ocmín dans la communauté de Lupuna-Zona II, Loreto, Pérou). B) Herbier de l'espèce *P. coruscans* collectée dans le département de Loreto au Pérou et déposé au Museum d'Histoire Naturel de Chicago (https://www.gbif.org/occurrence/1228325685).

La distribution de *P. coruscans* (**Figure 25**) est strictement limitée à l'Amérique : Bolivie, Brésil, Colombie, Costa Rica, Équateur, Guyane Française, Pérou et Venezuela. Au Pérou sa distribution est principalement amazonienne, dans les régions d'Amazonas, Loreto, Madre de Dios, Pasco (Tropicos, 2018, **Figure 26**).

Figure 26. Distribution et collectes de l'espèce *P. coruscans* (gbif, 2018b).

3.1.2 Utilisation traditionnelle contre le paludisme

Plusieurs espèces de la famille des Piperaceae sont très utilisées à des fins médicinales, comme c'est le cas de *Piper loretoanum* et *P. mediocre* contre la leishmaniose (Odonne et al., 2009) ainsi que *Peperomia nivalis* employé en cas des maladies stomacales (Vasquez-Ocmín et al., 2017). L'espèce *P. coruscans* est utilisée en Amazonie péruvienne pour combattre les fièvres tierces du paludisme. La préparation consiste à écraser 50g de parties aériennes dans 1 litre d'eau et de préparer une infusion. Cette préparation est prise comme eau de consommation quand la personne malade souffre de la fièvre (Vásquez-Ocmín et al., 2018).
Les études sur cette espèce jusqu'à présent se résument à une seule étude de 2004. Les auteurs ont utilisé le fractionnement bioguidé pour isoler les principaux produits antimycosiques, ce qui a permis d'isoler deux nouvelles cyclopentenediones, la coruscanone A et la coruscanone B (**Figure 27**). Les activités *in vitro* contre *Candida albicans* montrent une très bonne activité de la coruscanone A avec une IC_{50} à 0.78 µg/mL (Li et al., 2004). La deuxième publication date de 2010 et présente la synthèse de ces deux coruscanones ainsi que les principaux dérivés montrant des activités *in vitro* similaires aux deux produits d'origine (Shestak and Novikov, 2010).

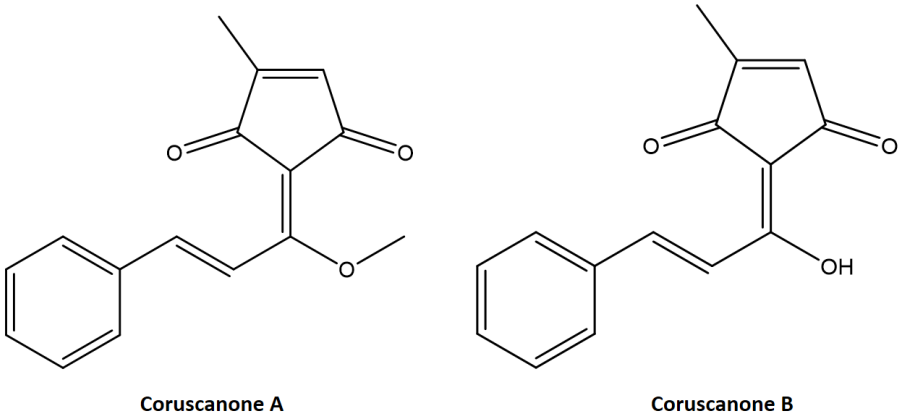


Figure 27. Structures de la coruscanone A et B isolé de *P. coruscans*.

Du fait de son utilisation traditionnelle et du faible nombre d'études sur cette plante, nous avons choisi *P. coruscans* comme matrice complexe pour la mise au point méthodologique du test de liaison à l'hème par SM.

3.2 Biodéréplication antiplasmodiale basée sur la liaison à l'hème, les réseaux moléculaires et la chromatographie de partage centrifuge.

3.2.1 Résumé

La recherche sur le paludisme reste obligatoire pour expliquer la chimie et la biologie du parasite *Plasmodium sp.* En dépit des inconvénients de la recherche sur les substances naturelles, cette dernière a démontré être encore maintenant un outil essentiel pour combattre le paludisme. Des stratégies de criblage intelligentes sont nécessaires pour accélérer ce processus. Nous proposons une méthode de biodéréplication combinant une approche de déréplication classique avec le principal mécanisme d'action des médicaments antipaludiques et en utilisant la spectrométrie de masse. La méthode regroupe un essai biomimétique de liaison à l'hème (la détection des adduits d'hème se fait par SM), les réseaux moléculaires pour une exploration des données et la CPC pour fractionner les extraits et isoler les composés. Cette méthode a été appliquée à la plante médicinale amazonienne *Piper coruscans* (Piperaceae). Douze composés ciblés ont été isolés, principalement des composés phénoliques expliquant l'activité biologique *in vitro* de l'extrait de *P. coruscans*.

3.2.2 Proposition d'article (décrit ci-dessous « article 5 »)

Format de la revue *Analytical Chemistry*

Antiplasmodial biodereplication based on heme binding, molecular networking and CPC chromatography.

Pedro G. Vásquez-Ocmín[†], Jean-François Gallard[‡], Anne-Cécile Van Baelen[†], Karine Leblanc[†], Sandrine Cojean[§], Elizabeth Mouray[‖], Philippe Grellier[‖], Carlos Amasifuén[⊥], Laurent Evanno[†], Mehdi Beniddir[†], Bruno Figadère[†], Alexandre Maciuk[*†].

[†]Equipe "Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

[‡]Institut de Chimie des Substances Naturelles CNRS UPR 2301, Université Paris-Saclay, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[§]Equipe "Chimiothérapie antiparasitaire" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

[‖] Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Universités, CP52, 57 Rue Cuvier, 75005 Paris, France

[⊥]Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental, Chachapoyas, Perú

*alexandre.maciuk@u-psud.fr

ABSTRACT:

Malaria research remains mandatory to explain the chemistry and biology of *Plasmodium* parasite. In spite of the drawbacks of natural products research, the latter have proven still recently to be one of the main tools to fight malaria. Smart screening strategies are necessary to hasten this process. We propose a biodereplication method combining the classical dereplication approach with the predominant mechanism of action of antimalarial drugs and using mass spectrometry. The method encompasses a biomimetic heme binding assay (heme adducts detection by MS), molecular networking for quick data mining and CPC for extract fractionation and compounds isolation. This method has been applied to the Amazonian medicinal plant *Piper coruscans* (Piperaceae). Twelve targeted compounds were isolated, principally phenolic compounds accounting for the *in vitro* biological activity of *P. coruscans* extract.

INTRODUCTION

Malaria is an infectious disease caused by four protozoan species of the genus *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale,* and *P. vivax*).[1] The most widespread and severe form disease is caused by *P. falciparum*, which transiently infects the liver before invading red blood cells of the mammalian host. Clinical manifestations occur during the erythrocytic stage and can include fever, chills, headache, muscular aching and weakness, vomiting, cough, diarrhea and abdominal pain, generalized convulsions, circulatory collapse and can be followed by coma and death if not treated. Initial symptoms, sometimes of mild intensity, may not be easy to recognize as being due to malaria.[2] Malaria is commonly associated with poverty, but is also a cause of poverty and a major hindrance to economic development. For decades compounds derived from chloroquine and now artemisinin have been used used in combination with other drugs to fight malaria.[3] Nevertheless, *Plasmodium*'s ever-growing resistance to these medicines continues to make it a global health problem.[4,5] A major factor that severely hinders the efforts to 'roll back malaria' is the emergence and spread of parasites resistant to affordable antimalarial agents [6]. Research of novel antimalarial molecules involves, in a general way, the screening of compounds obtained by medicinal or combinatorial chemistry or isolated from Nature, followed by improvement of these molecules by hemisynthesis to

enhance the biological activity. However bioguided isolation is ambiguous, because the mechanism of action is not known a *priori*, so complementary tests are needed. Given the complexity of natural extracts and owing to the considerable efforts of compounds isolation and identification made during the past decades, the combination of chemical and computational tools currently allow to "dereplicate" an extract whatever the origin (vegetal, marine organism, microbial, etc.) with the purpose to discard known, mildly active molecules [7]. Historically, the first definition of the term ''dereplication'' was given by Beutler et al. in (1990) as ''a process of quickly identifying known chemotypes".[8] Today one stunningly performant example of dereplication is molecular networking (MN), a computer-based approach allowing to visualize and organize tandem mass spectrometry datasets and to automate database search for metabolite identification within complex mixtures. [9] Such a tool relies on the observation that structurally similar metabolites share similar MS-MS fragmentation patterns.[10,11] Dereplication approaches *strictu senso* do not unequivocally identify compounds but annotate them as being identical to a known compound with a high probability. Such approaches also do not give any biological information. We propose the term "biodereplication", introduced in this work, as the early detection in a complex mixture of compounds responsible for the activity, before any isolation or formal identification.

Mechanism of action of quinoline drugs like chloroquine is due to the inhibition of the crystallization pathway of free heme, which is released inside the *Plasmodium* digestive vacuole (PDV) after hemoglobin proteolysis.[12] The PDV is a multiphasic mixture of neutral lipids in the form of nanospheres suspended in an aqueous solution of proteins with pH in the range 4.8−5.5[13–15], and is an acidic proteolytic compartment crucial for the metabolism of the parasite. In this vacuole, amino acids are transported, oxygen radicals are detoxified, drugs are accumulated, acidification is maintained and free iron is generated.[16] Due to the important roles of heme in elementary cellular processes of most organisms and especially in *Plasmodium*, heme metabolism is historically a major target for anti-parasitic drug, and is still considered as a promising target for new molecules.[17,18] The heme crystallization process is a pivotal point in understanding the mechanism(s) of action of the major quinoline antimalarial drugs[19], and crucial for the development of new drugs able to overcome parasite resistance.[20] Formation of π-π non-covalent bounds is a necessary requirement for the inhibition of heme crystallization by antimalarial drugs.[21] Muñoz-Durando *et al*[22] work was taken as starting point

with the aim to optimize the biological conditions and mimic the multiphasic and acidic conditions of PDV. Isolation of potentially active molecules guided by biodereplication on heme binding assay were isolated from an extract of *Piper coruscans* (Piperaceae).

EXPERIMENTAL SECTION

1. Heme-binding assay by MS.

Hemin and crude ethanolic extract were dissolved in DMSO at 5 mM and 10 mg/mL, respectively. Pure compounds were dissolved in DMSO at the concentration of 10 mM. Citric buffer saturated octanol (CBSO) was prepared by mixing 5 mL of citric acid 50 mM pH 5.2 and 15 mL of n-octanol (anhydrous, ≥99%) and letting it to settle at 23 °C for 30 min. Upper phase of CBSO was used. Auto sampler 1260 infinity G1367E 1260 Hip ALS (Agilent Technologies) was used to do the automatic mixing of aliquots in a 384 well. Incubation mixture was as follows: compound 5 µL + heme 5 µL + tween 20 (10 µM) 5 µL + organic phase of CBSO 85 µL. Samples were injected in infusion mode in a 6530 Accurate-Mass QToF LC/MS instrument (Agilent Technologies) with the following settings: positive ESI mode, standard 50-3200 mass range calibration, 2 GHz acquisition rate. Ionization source conditions were: drying gas temperature 325 °C, drying gas flow rate 11 L/min, nebulizer 35 psig, fragmentor 175 V, skimmer 65 V. Range of *m/z* was 200-1700. In the positive-ion mode, purine $C_5H_4N_4$ $[M + H]^+$ ion (*m/z* 121.050873) and the hexakis (1 H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazene $C_{18}H_{18}F_{24}N_3O_6P_3$ $[M+H]^+$ ion (*m/z* 922.009 798) were used as internal lock masses. Full scans were acquired at a resolution of 11 000 (at m/z 922).
On the same spectrum appears heme at *m/z* 616.16, adducts at *m/z* 616.16 + "X" and 2heme + "X"; heme + DMSO *at m/z* 694.19; heme dimers at *m/z* 1231.32 $(2heme – H)^+$; *m/z* 1253.30 $(2heme - 2H + Na)^+$, *m/z* 1267.26 $(2heme + {}^{35}Cl)^+$ and 1269.24 $(2heme + {}^{37}Cl)^+$. Chloroquine in aqueous mother solution at 5 mM (chloroquine diphosphate, Sigma-Aldrich) was used as positive control in the mixing. Artemisinin (Sigma-Aldrich) was used also as positive control. To obtain Fe(II)-heme from hemin (Fe(III)-heme), glutathione (50 mM in water) was mixed with hemin (5 mM in DMSO) in a ration 1:1 and let to incubate 40 min. This solution was used as heme solution as described above.

2. Visualization of adducts fragmentation by molecular networking (MN)

Ethanolic extract and heme (same conditions above) were mixed and injected using infusion mode for MSMS experiment. Three collision energies were used: 30, 50, and 70 eV. Ten most intense ions (Top 10) per cycle were selected. MSMS acquisition parameters were as follows: *m/z* range 100-1700, default charge of 1, minimum intensity of 5000 accounts, rate/time = 3 spectra/s, isolation width: Narrow (1.3 *m/z*). A list of compounds was generated by the "find by auto MSMS" algorithm of MassHunter software (Qualitative Analysis B.07.00, Agilent technologies). The mode "extract average MSMS spectrum" was used to sum up and average the results of the 3 collision energies. Exportation of generated spectra was made in MGF format using the option "entire data file". Information generated were uploaded onto the online platform GNPS (global natural product social network).[10] Parameters used for the algorithm were: precursor ion mass tolerance = 1; fragment ion mass tolerance = 0.3; min pairs cos = 0.7; minimum matched fragment ions = 3; minimum cluster size = 1. From the data a network was calculated measuring correlations and plotted using Cytoscape 3.5.1. Each *m/z* of adducts (heme + "X") was observed as an individual node in the same cluster, related to each other in agreement with the loss of a similar fragment (heme at *m/z* 616.16). An alkaloid extract from *Cinchona sp*. and eight antiplasmodial drugs (chloroquine, quinine, amodiaquine, ketoconazole, miconazole, mefloquine, praziquantel, sulfadoxine) were used as examples of visualization of adducts fragments by molecular networking. Methodology and conditions were the same as described above.

3. Collision induced dissociation of non-covalent binds

Dissociation in the collision chamber was caused by increasing kinetic energies from 0 to 32 eV. MSMS targeted mode, isolation width of *m/z* 1.3 and flow injections analyses (FIA) were used. MSMS parameters were the same as described above. Results were plotted and the sigmoidal regression curve could allow to calculate the energy necessary to dissociate 50 % of adducts (DV_{50}).[22]

4. Biological material

Leaves of *Piper coruscans* (Piperaceae) were collected in December 2016 in Lupuna (Zona II) village, in the province of Maynas, located in the region of Loreto, Peru (18M 0704173, UTM 9585656). The plant was identified by Dr. Carlos Amasifuén and deposited at the National Herbarium of the San Marcos University, Lima, Peru. Leaves dried and ground (600 g) were soaked 24 h twice in 5 L of ethanol 96%, filtrated and the extract evaporated under reduced pressure, below 40 °C.

5. Isolation of targeted compounds.

Molecules isolation were performed using centrifugal partition chromatography (CPC) (Sanki LLB-M, 200 ml capacity), preparative HPLC and LCMS. Liquid-liquid extraction was carried out on 60 g of ethanolic extract using cyclohexane (yielding 45 g, PCC), ethyl acetate (yielding 10g, PCA) and water (yielding 11g, PCAq). Targeted molecules were localized by means of LC-MS analysis in the cyclohexane and ethyl acetate extracts. CPC in descending mode was performed on 1.8 g of PCC using the biphasic solvents system heptane/ethyl acetate/butanol/methanol/water (20:10:10:30:30) determined by testing several biphasic systems and analyzing both phases by LCMS. Fractions of 0.5 mL were collected, analyzed by LCMS and grouped into 15 sub-fractions. Isolated compounds were aurentiacin, compound **1** (20 mg); strobopinin 7-methyl ether, **2** (18 mg); and 5-hydroxy-7-methoxy-6,8-dimethyl flavanone, **3** (7 mg). CPC in descending mode was performed from 8 g of PCA using the biphasic solvents system heptane/ethyl acetate/butanol/methanol/water (12:14:14:23:37) determined by testing several biphasic systems and analyzing both phases by LCMS, with similar conditions described above. Six sub-fractions were obtained, including PCA-2 (yielding 840 mg). A second CPC in descending mode was performed on 800 mg of PVA-2 with heptane/ethyl acetate/butanol/methanol/water (8:16:16:18:42), giving 13 sub-fractions. Preparative HPLC was performed on a Sunfire column C18, 4.6 x 150 mm – 5µm (Waters) as stationary phase and water (0.1 % formic acid)/acetonitrile (30 to 70 % in 20 minutes) as mobile phase. Eight compounds were isolated: desmethoxymatteucinol, **4** (1.2 mg)**;** 2', 4'-dihydroxy-6'-methoxy-3'-methylchalcone, **5** (0.8 mg)**;** cardamomin, **6** (3.7 mg); compound **7**

(0.7 mg); alpinetin, **9** (1.1 mg); 3-cinnamoyl-6-ethoxy-4-methyl-2*H*-pyran-2-one, **10** (1.3 mg); pinocembrin, **11** (2.6 mg)**;** dimethyl cryptostrobin, **12** (0.6 mg), *N*-Benzoyltyrarnine methyl ether, **13** (1.9 mg). Along with these targeted compounds one new untargeted compound was isolated: 1*H*-inden-1-one, **8** (3 mg).

Details of compounds identification and NMR Spectroscopic Data are given in supplementary information (see SI1-SI4).

6. Antiplasmodial activity

***Plasmodium falciparum* culture**

The chloroquine-sensitive 3D7 *P. falciparum* strain (clone of the NF54) and W2 chloroquine-resistant strains were obtained from Malaria French National Reference Center (CNR Paludisme, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris). The strains were maintained in O^+ human erythrocytes in albumin supplemented RPMI medium under continuous culture using the candle-jar method.[23] The parasites were synchronized to the ring stage by repeated sorbitol treatment.[24]

In vitro* antiplasmodial activity on *Plasmodium falciparum.

A 2.5% (V/V) erythrocytes suspension with 1 % parasitemia (number of infected red blood cells per 100 red blood cells) was incubated in duplicates with the compounds at concentrations ranging from 48.5 nM to 100 µM, obtained by serial dilution. After 44 h of incubation at 37 °C, the plates were subjected to 3 freeze-thaw cycles to achieve complete hemolysis. The parasite lysis suspension was diluted 1:5 in lysis buffer. *In vitro* susceptibility is expressed as the concentration inhibiting 50 % of the parasite's growth (IC_{50}). Parasite growth was determined by using SYBR® Green I, a dye with strong fluorescence enhancement upon contact with parasite DNA. Incorporation of SYBR® Green I (Applied Biosystems, France) in parasite DNA was measured using the Master epRealplex cycler® (Eppendorf, France) according to the following program to increase the SYBR® Green I incorporation: 90 °C (1 min), decrease to 10 °C over 5 min followed by fluorescence reading. Untreated infected and uninfected erythrocytes were used as controls and chloroquine diphosphate (Sigma, France) as reference drug.[25] IC_{50} was calculated by IC-estimator online software

(http://www.antimalarial-icestimator.net).

7. Cytotoxicity studies

Cellular cytotoxicity was evaluated using the AB943 primary human dermal fibroblast cell line maintained at 37 °C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Cells were seeded in 96-well plates (20,000 cells/mL) and incubated for 24 h, then treated with the drug for 72 h. After incubation, the cell growth medium was replaced by 100 µL RPMI 1640 containing 20% (v/v) Alamar Blue (Thermo-Fisher, France). Fluorescent viable cells were monitored after 5 h of incubation at 37 °C, at a wavelength of 530 nm for excitation and 590 nm for emission, in a FL600 luminescence spectrometer (Biotek, France). CC_{50}, corresponding to drug concentrations causing 50% of AB943 cell proliferation inhibition, were calculated from the drug concentration-response curves.[26]

8. *ADMET Prediction*

ChemSketch (ACD/Labs Products) software was used to screen all compounds in order to predict their lipophilicity. The input file were previously generated as SK2 files and prediction of logP were estimated.

RESULTS AND DISCUSSION

Heme (ferriprotoporphyrin IX - Fe(III)PPIX) is an ubiquitous and essential molecule which plays key biological roles in processes like oxygen transport, respiration, photosynthesis and drug detoxification.[27,28] Free heme is strong oxidizing agent and sequestration of heme into hemozoin (first through heme aggregates and then into actual crystals) is a suitable target for new antimalarial drugs, which has been referred to as the "Achilles heel of the parasite".[29,30] Different chemical and physical factors modulate hemozoin formation, such as the degree of hydrophobicity of native, surrounding alcohols and lipids in the digestive vacuole, their ability to solubilize heme aggregates or reduce surface tension. *In vitro* experiments showing also that increasing physical contact between heme aggregates by stirring increases this formation.[31]

First reports on the monitoring by MS of non-covalent complexes appeared in the literature in the early 1990s, with initial studies focusing on protein-ligand complexes quickly joined by studies in which protein-protein interactions were maintained.[32] Indeed ESI provides a rapid, sensitive and highly selective tool for probing non-covalent interactions.[33,34] Moreover it is a gentle ionization method, yielding no molecular fragmentation and allowing intact weakly bound complexes to be detected.[32] Noteworthy, collision-induced dissociation (CID) can be induced in the so-called "fragmentor" zone of Agilent instruments (or in the equivalent zone in instruments of other manufacturers), which is technically the atmospheric pressure/vacuum interface. Such CID can be performed on single MS instruments, but is not finely tunable. Provided the fragmentor voltage is kept at a low value, stable non-covalent complexes can be formed between Fe(III)-heme and antimalarial agents, *i.e.*, quinine, artemisinin and its derivatives dihydroartemisinin, α- and β-artemether, and arteether[12]. Binding strengths between drugs and Fe (III)-heme can also assessed in a relative mode. This approach has previously been shown to be useful in determining the structure-activity relationship of antimalarial agents, namely, terpene isonitriles and neocryptolepine derivatives.[35] So far this approach has mainly be used to assess the strength of π-π non-covalent binding.[22,36,37,37] In this work we "biodereplicated" an ethanolic extract, adressing the main mechanism of action of antimalarial drugs like quinoleins. We combined information generated by Q-ToF MS (non-covalent adducts identification) and MS-MS (analysis of the fragmentation pathway by MN) to determine potentially active compounds independently of their chemical structures.

In this work**,** a miniaturized and automated methodology was developed which improves the methodology described by Muñoz-Durango *et al*, 2012[22], to allow high-throughput screening format and reduce false positives. It mimics the pH (5.2) as well as the multiphasic conditions (aqueous-lipid interface) of the PDV.[29] In order to achieve this, three criteria had to be fulfilled: 1) the solution formed must have a pH similar to the PDV; 2) the solution must be homogeneous; 3) intensity of detected adducts must be equal or superior to those observed in basic conditions (heme dissolved in ammonia).[22] Given the insolubility of heme in acidic aqueous media, optimization of these conditions was not straightforward.[31] Recent reports suggest that hemozoin formation may occur at interfaces of aqueous and lipidic regions in the PDV.[30,38] Data from X-ray tomography of the digestive vacuole indicate that while lipid

nanospheres are important for hematin (heme crystals formed *in vitro* are similar to hemozoin but are called hematin) nucleation, crystal growth may occur in the aqueous phase.[39,40] The PDV biological lipids mixture being solid at room temperature (it is liquid at 37°C), n-octanol has been suggested as a more convenient biomimetic model than glycerides mixture.[41,42] N-octanol is an amphiphilic molecule with a hydrophobic aliphatic tail of medium length and a hydrophilic polar head which is smaller than the glycerol ester functional groups of mono- and diglyceride lipids.[43] Accordingly, solubility of water is lower in n-octanol than in a glycerides mixture, but it is still sufficient for hydrogen bond formation and hematin crystals formation.[38] On the other hand, the lower solubility of heme at low pH is due to the intermolecular hydrogen bonds between propionic residues. The formation of these bonds requires protonation of the carboxyl groups, which strongly increases at lower pH.[30] The lower the pH, the higher the amount of dimers but the lower the solubility. Citric buffer saturated octanol (CBSO) was found to properly solubilize heme.[29,44] Octanol mimics the lipid nanospheres, while solubilized citric buffer imitates the acidic environment of the parasite's digestive vacuole.[14,29] We used a modified CBSO for this work, bringing its pH to 5.2. We were then able to monitor by MS the formation of non-covalent adducts in an incubate of ethanolic extract of *P. coruscans*[25], heme and CBSO (**Figure 1**). Due to the peculiar nature of the solution composed by octanol, DMSO and water, parameters of the ionization source were optimized to allow evaporation, ionization and to decrease background noise. Temperature and gas flow were lightly increased compared to usual conditions, to 325 °C and 11 L/min, respectively. To ease the formation of micelle interface, we added a small concentration of detergent Tween 20, previously developed to initiate heme crystallization.[45]

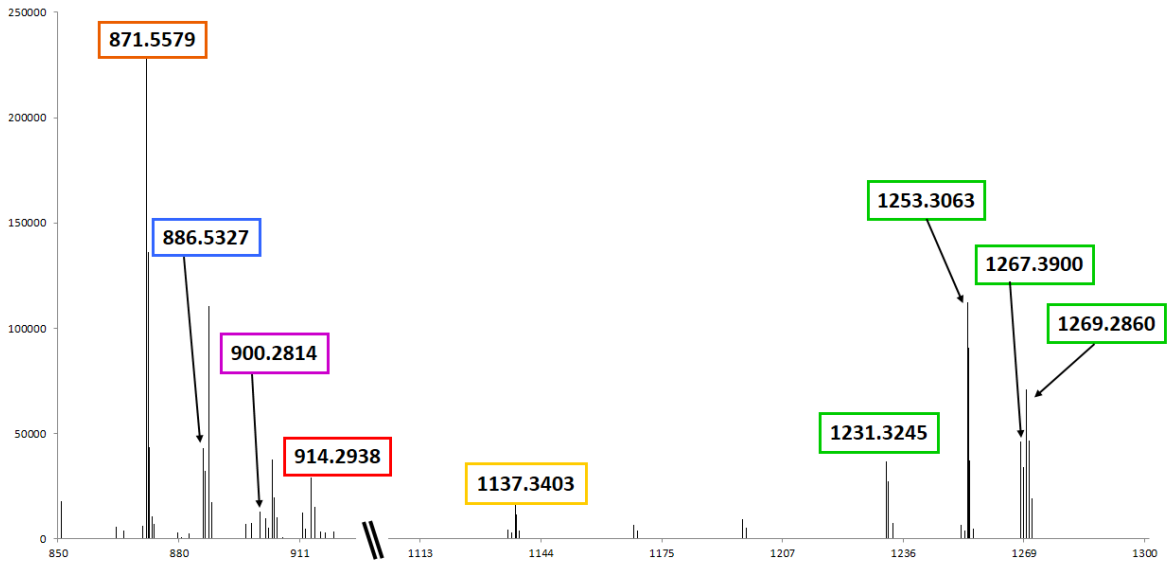


Figure 1. MS spectrum of *P. coruscans* extract incubated with the heme.

MS spectrum (**Figure 1**) showed apparent adducts formed by non-covalent binding of compounds within the ethanolic extract of *P. coruscans* incubated with heme-Fe(III) in an acidic medium. Deciphering such signals to detect adducts can be performed by several ways. The simplest way is to compare 1) the spectrum from the extract and 2) the spectrum of the mixture of extract with heme, and visually detect whether new ions of *m/z* > 616 (heme) appear in the second case. A program script could be designed to analyze data and automatically detect such discrepancies. Another way is to use a triple quadrupole instrument in precursor ion mode. If the second quadrupole is set to detect *m/z* 616, any adduct analyzed in the first quadrupole and able to produce heme as a fragment upon dissociation should be pointed out. Unfortunately, such instruments do not provide high *m/z* accuracy and are not able to give any information about the molecular formulas of unknown compounds. On the contrary, a Q-ToF instrument is providing high accuracy readings but is strictly speaking not able to work in precursor ion mode. Indeed, it needs to gather ions in a "pulse" before flight time measurement, and thus cancels the "separation in time" of precursor ions by the two first quadrupoles. Although a Q-ToF instrument is able to indicate at which time a target fragment ion is produced but is unable to indicate to which precursor it correlates. This limitation can be artificially minimized when running a chromatographic separation, but since

in our case the injection is in infusion mode, we cannot use the Q-ToF in precursor mode. We therefore propose to use the molecular networking approach to take advantage of Q-ToF instruments accuracy and still be able to automatically detect heme adducts. In such an approach, a network is computerized by the GNPS platform[10] to detect ions producing heme fragment upon dissociation. In such an analysis, parameters can be set up so as every species producing *m/z* 616 as a fragment is plotted as a node in a same network cluster. In order to validate the ability of this approach to detect heme adducts, preliminary experiments were carried with A) a mix of eight antimalarial drugs and B) an alkaloid extract from *Cinchona sp.* Nodes in a cluster are connected following their cosine values. Cosine value approaches 1 when fragmentations routes are very similar.[11] Every drug of the mix of antimalarial drugs was detected in the same cluster with a cosine value among 0.73 to 0.98. In the other hand, heme adduct cluster from alkaloid extract showed all known compounds detected by LCMS (see SI5). Cosine values was an average among 0.81 to 0.96, because these compounds belong to the same sub-family of quinoline alkaloids (**Figure 2**). In the same figure, for the *P. coruscans* extract, analysis by MN showed five *m/z* of interest: 914.254, 900.234, 886.227, 871.524, and 1137.721. Nodes within the cluster are connected with satisfactory cosine values in the range of 0.7 to 0.96.

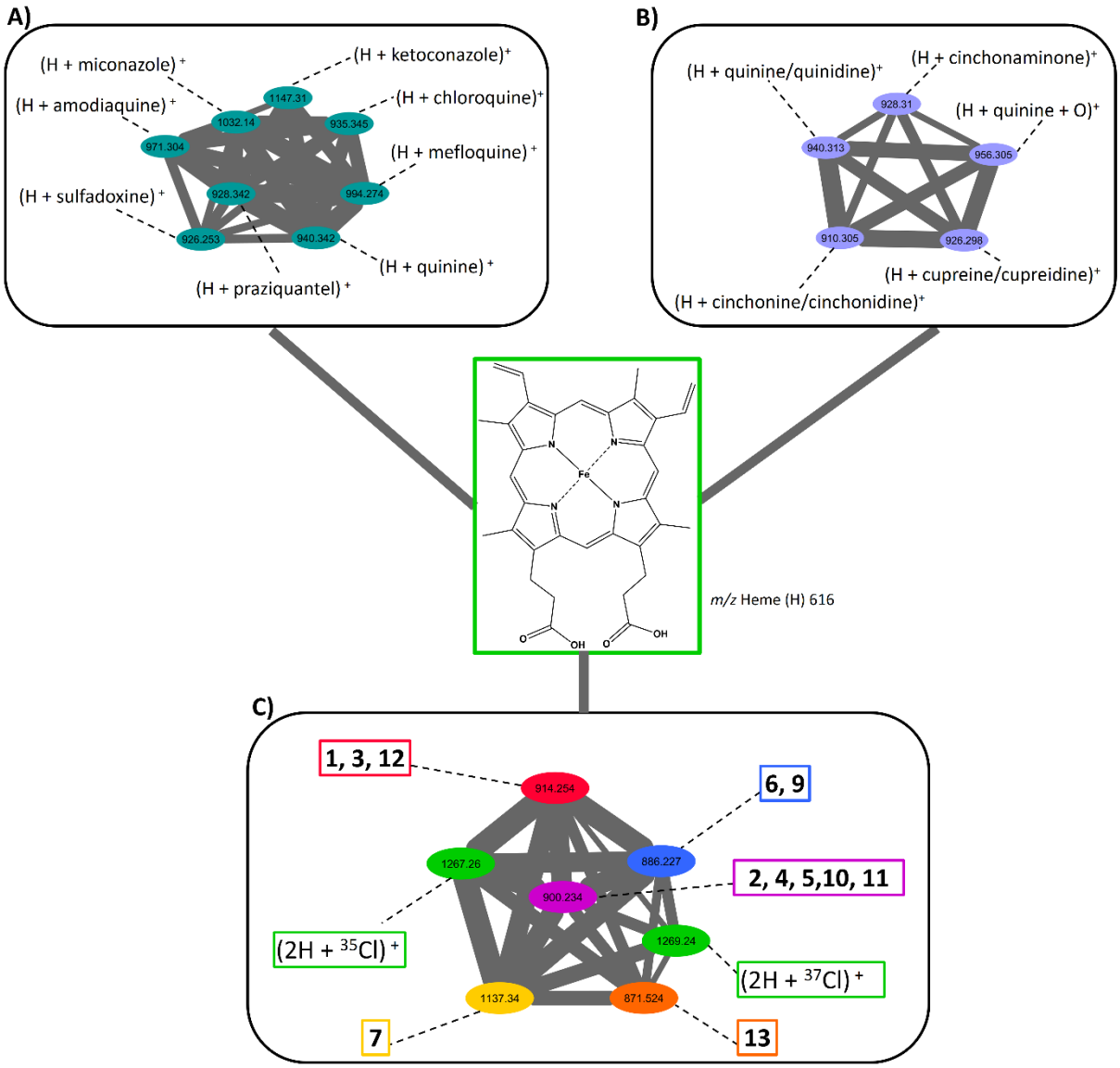


Figure 2. Visualization by molecular networking of heme adducts for : A) main antimalarial drugs chloroquine (*m/z* 935.345 [heme + 319]$^+$), quinine (*m/z* 940.342 [heme + 324]$^+$), amodiaquine (*m/z* 971.304 [heme + 355]$^+$), sulfadoxine (*m/z* 926.253 [heme + 310]$^+$), praziquantel (*m/z* 928.342 [heme + 312]$^+$), miconazole (*m/z* 1032.14 [heme + 416]$^+$), ketoconazole (*m/z* 1147.31 [heme + 531]$^+$), mefloquine (*m/z* 994.274 [heme + 378]$^+$); B) alkaloid extract from *Cinchona sp.* : cinchonine or cinchonidine (*m/z* 910.305 [heme + 294]$^+$), cupreine or cupreidine (*m/z* 926.298 [heme + 310]$^+$), cinchonaminone (*m/z* 928.31 [heme + 312]$^+$), quinine or quinidine (*m/z* 940.313 [heme + 324]$^+$), fragment of quinine (*m/z* 956.305 [heme + 340 + O]$^+$); C) *P. coruscans* ethanolic extract: in green heme dimers, in red (*m/z* 914.254 [heme + 298]$^+$), in purple (*m/z* 900.234 [heme + 284]$^+$), in blue (*m/z* 886.227[heme + 270]$^+$), orange (*m/z* 871.524 [heme + 255]$^+$), and yellow (*m/z* 1137.34 [heme + 521]$^+$).

Adduct at *m/z* 1137.34 (molecular formula $C_{32}H_{27}NO_6$) and 871.524 (molecular formula $C_{16}H_{17}NO_2$) corresponded to two minor compounds in the ethanolic extract at *m/z* 521.56 $(M+H)^+$ and *m/z* 256.25 $(M+H)^+$. Observed adducts at *m/z* 914.254 (molecular formula $C_{18}H_{18}O_4$), 900.234 (molecular formula $C_{17}H_{16}O_4$) and 886.227 (molecular formula $C_{16}H_{14}O_4$) were expected to correspond to native compounds in the extract at *m/z* 299, 285, and 271 respectively. Looking for these compounds in the LC-MS data revealed several isobaric species in the ethanolic extract (**Figure 3**). These isobaric species were distinguished by molecular networking principally in ethyl acetate extract (**Figure 4**), except for the non-polar compounds (**1**, **2**, and **3**). The molecular network also allows to determine that compounds 4, 5, 6, 9, 11, 12 are likely belonging to the same phytochemical family (*i.e.* flavonoids), whereas compounds **7**, **10** and **13** (alkamide) belong to different, less represented phytochemical families.

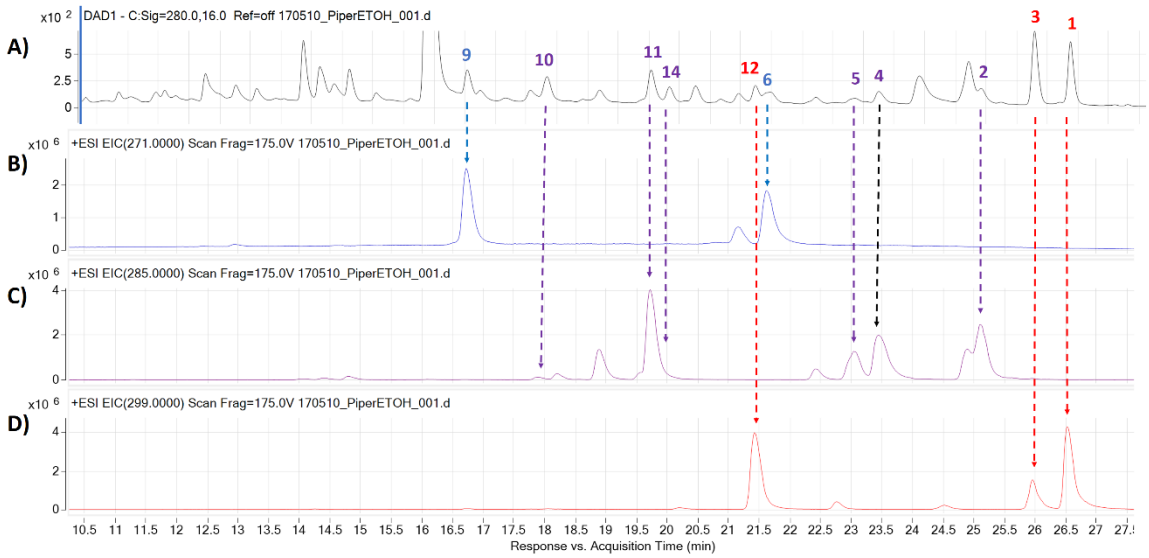


Figure 3. LC-DAD-MS analyses of ethanolic extract of *P. coruscans*. A) DAD spectrum at 280 nm showing compounds at *m/z* 271, 285 and 299. B) Extracted spectra showing occurrence of *m/z* 271. C) Extracted spectra showing occurrence of *m/z* 285. D Extracted spectra showing occurrence of *m/z* 299.

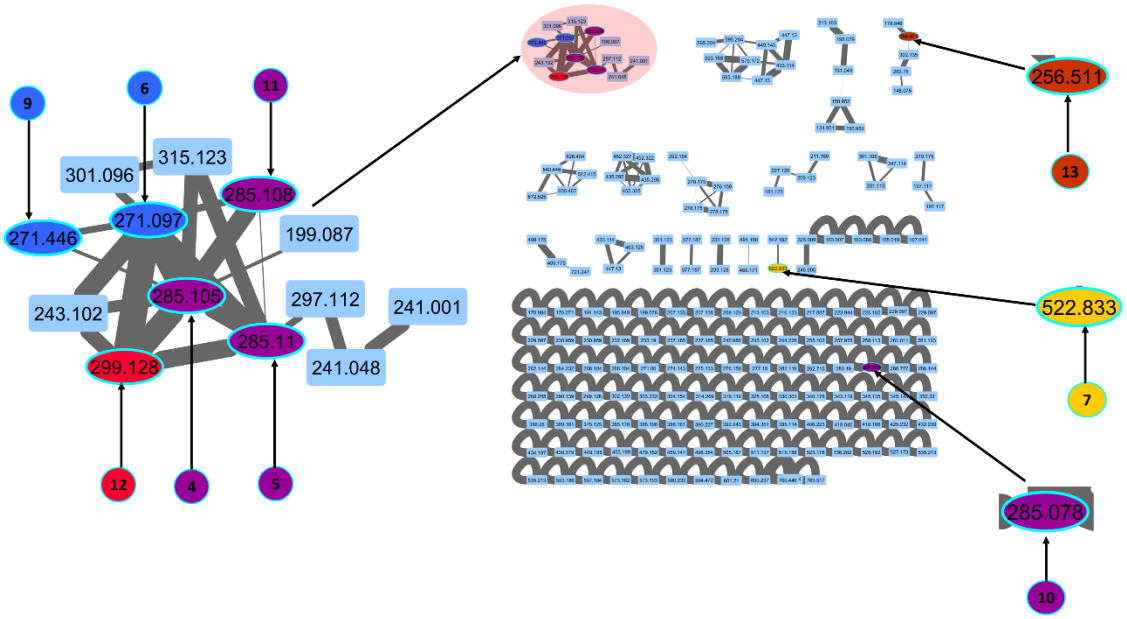


Figure 4. Network of ethyl acetate extract from *P. coruscans* showing targeted compounds at *m/z* 299, 285, 271, 256 and 522.

On MN clustering (**Figure 2**), adducts were represented by five nodes at *m/z* 914.254, 900.234, and 886.227. It was not possible to obtain several nodes of same *m/z* for the different isomers. Although recent developments have shown how to visualize by MN clustering isomers, this is possible if isomers have different retention time[46], as it is the case for the isomers detected on the LC-MS data (**Figure 4**). We do not know reports so far of dereplication by MN of extracts by direct injection. In our case, this is not possible due to the fact that injection is done by infusion mode, with all analytes being injected in the source simultaneously. Our aim in this work is the rapid visualization of non-covalent binds without chromatography separation. Also, we did not use a chromatographic column to avoid adducts dissociation during elution. Injection after rapid mixing and short incubation guarantees the persistence of non-covalent bounds even of low strength.

Once *m/z* of target compounds were identified, we performed a mass-guided isolation. We targeted these molecules by CPC using a mixture of five solvents specifically optimized for this purpose. The choice of a solvent systems is guided by the solubility of the analytes as well as the partition coefficient of the target analytes. In the preliminary optimization step, a rational selection of suitable stationary and mobile phases is essential.[47] This fivefold mixture of

solvents (heptane/ethyl acetate/butanol/methanol/water) was selected as it provided good factor of retention and selectivity for the targeted molecules, namely, a partition coefficient of nearly 1 for the targeted analytes and different from 1 for other analytes. Two solvents systems were designed, the first system suited to non-polar compounds with heptane/ethyl acetate/butanol/methanol/water (12:14:14:23:37) and another system suited to moderately polar compounds with heptane/ethyl acetate/butanol/methanol/water (8:16:16:18:42) by increasing proportions of ethyl acetate and butanol in the organic phase. Most non-polar compounds **1**, **2**, and **3**, were isolated using CPC chromatography showing in the CPC fractograms (See SI6). LC-MS analysis of both phases of several biphasic systems allowed to determine that the solvents system heptane/ethyl acetate/butanol/methanol/water (20:10:10:30:30) showed a satisfactory selectivity targeted on flavonoids compounds like flavanones or chalcones. This system is a variant from the Oka range in which hexane was replaced by heptane.[47] the use of this system allowed to obtain compound **1**, **2** and **3** in only one step (injection of ethyl acetate fraction in the CPC system, collection of pure compouds). Other compounds required a polishing step by preparative HPLC.

Compounds at *m/z* 521.56 $(M+H)^+$ and *m/z* 256.25 $(M+H)^+$ were identified as *("under process of structural elucidation"*) (**7**) and the known alkylamide (**13**), respectively. These two compounds were inactive against *P. falciparum* with IC_{50} of 49 and ≥ 100 µM, respectively. Compounds at *m/z* 299 (**1**, **3**, **12**), 285 (**2**, **4**, **10**, **11**, **15**) and 271 (**6**, **9**) were identified as the known molecules (**Figure 5**), which corresponded to flavonoids, except compound **10** (*"under process of structural elucidation"*). Compounds **2**-**4**, **9**, **11** and **12** are flavanones, compounds **1**, **5** and **6** are chalcones, and the structures of all of them were described previously in the literature.

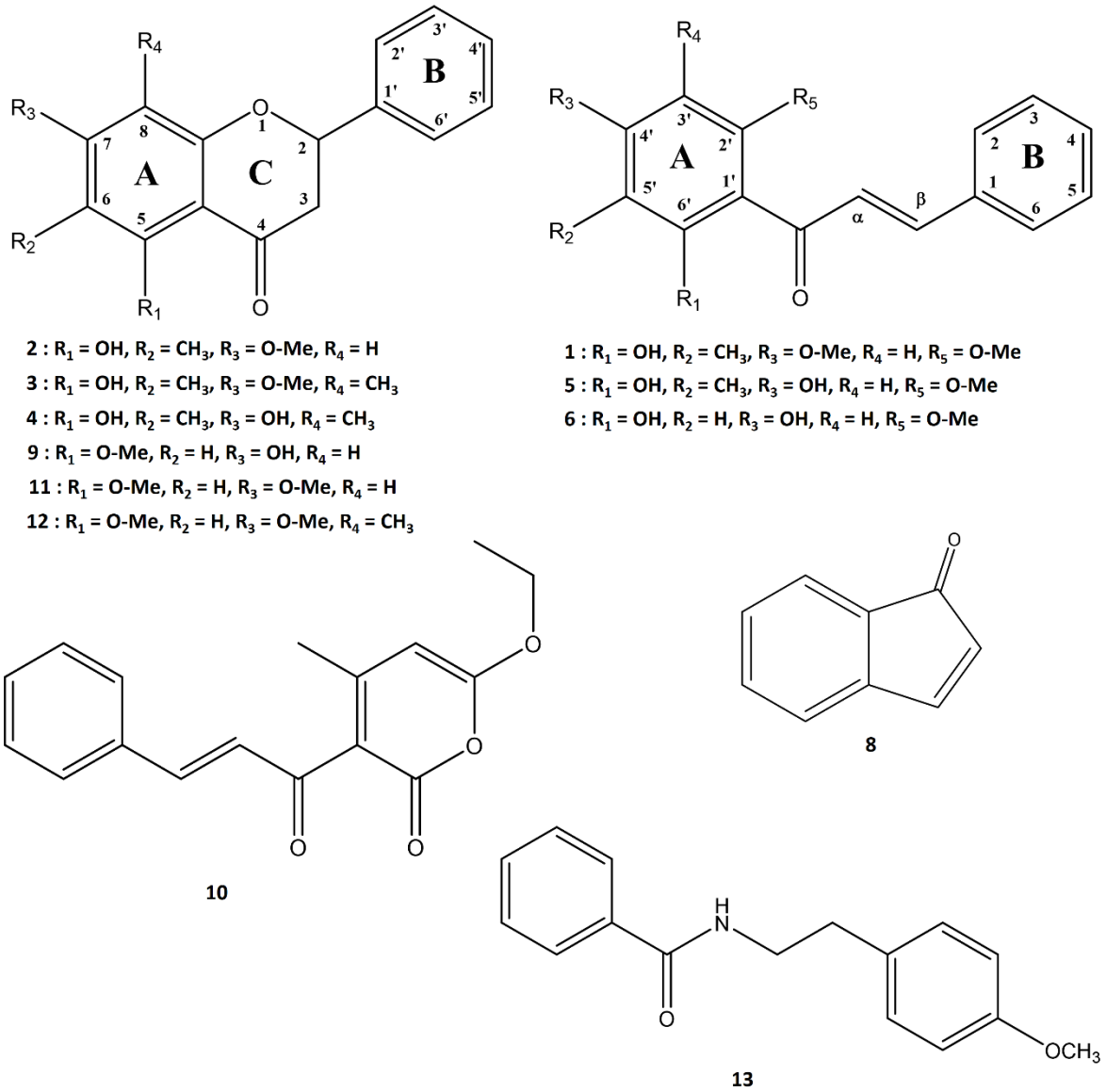


Figure 5. Structures isolated for *Piper coruscans* leaves.

Antiplasmodial activity of *P. coruscans* ethanolic extract was promising (IC_{50} = 1.36 µg/mL).[25] Chalcones **1** (aurentiacin) and **6** (cardamonin) showed the best antiplasmodial activity with IC_{50} = 2.25 and 5.5 µM, respectively. Aurentiacin **1** has the lowest cytotoxicity on fibroblasts and the highest selectivity index, suggesting it is the most interesting structure (**Table 1**). Considering their DV_{50} close to 5.15 and 5.60 eV, their antiplasmodial activity is probably not related to a heme binding mechanism, as other authors also suggested.[48] Cardamonin **6** was reported to have significant activity against *Trypanosoma brucei* (IC_{50} = 0.49 µg/mL), a parasite which is not relying on hemoglobin for its metabolism.[49] Studies also showed that cardamonin binds with high affinity to site II of HSA (human serum albumin).[50] Chalcones are abundant in

edible plants and are considered to be precursors of flavonoids and isoflavonoids. The presence of a double bond conjugated with the carbonyl is believed to be responsible for the biological activities of chalcones, as the removal of the double bound inactivates them.[51] The antimalarial activity of chalcones has a great interest. Several natural and synthetic chalcones have been described to possess antimalarial effect;[52] Their antimalarial activity is supposed to be a result of a Michael addition of cellular nucleophilic sites to the activated double bond.[53] Indeed, the Michael acceptor site of chalcones can readily form covalent bonds with the sulfhydryl of cysteines or other thiols to obtain a Michael adduct which may play an important role in biological activities of chalcones.[54] Covalent heme-chalcone adducts by Michael addition pathway have not been not reported so far. Nevertheless asymmetric Michael addition of nitroalkanes to chalcones was reported.[52] Licochalcone A is an example of a chalcone inhibiting *in vitro* growth of both chloroquine-sensitive (3D7) and chloroquine-resistant (Dd2) strains of *P. falciparum*. It was shown to have multiple targets in *P. falciparum* mitochondria. It inhibited ubiquinol cytochrome c reductase (bc1 complex) and succinate ubiquinone reductase (complex II).[48] It is known that chalcones bearing a -Cl group in position 4 of ring A, and -OCH_3 (position-3) and -allyloxy (position-4) on ring B are active against 3D7 *P. falciparum* with average values of IC_{50} of 2.5 µM.[55,56]

All isolated flavanones (**2**-**4**, **9**, **11**, **and 12**) showed a moderate antiplasmodial activity, ranging from 85 to 33 µM (**Table 1**). Flavanone **3** also is the most cytotoxic compound, which results in a low selectivity index. Their DV_{50} values were in accordance with this moderate activity, as these compounds would not bind or bind with low values ranging between 8 and 9 while chloroquine had a DV_{50} above 14.

1 **Table 1.** Antiplasmodial activity, cytotoxicity and dissociation voltage of compounds.

Family derivatives	Compounds	*m/z* $(M + H)^+$	3D7 sensitive strain SYBR green IC_{50} (µM)	AB943 Primary human dermal fibroblast IC_{50} (µM)	Selectivity index CC_{50}/IC_{50}	DV_{50} (eV)	cLogP (ACD/Chem Sketch)
chalcones	**1**	299	2.25	68.5	30.4	5.15	4.47 ± 0.56
	5	285	51	>100	1.9	5.93	4.08 ± 0.55
	6	271	5.5	58	10.5	5.60	3.62 ± 0.55
flavanones	**2**	285	60	>100	< 1	NA	4.57 ± 0.38
	3	299	33.2	23	< 1	NA	5.03 ± 0.38
	4	285	71	>100	1.4	NA	4.85 ± 0.38
	9	271	72	>100	1.4	8.40	3.71 ± 0.37
	11	285	78	>100	1.3	8.68	3.40 ± 0.78
	12	299	85	>100	1.2	7.68	3.86 ± 0.78
kavalactone	**10**	285	>100	>100	1	NA	
alkylamide	**13**	256	>100	>100	1	9.45	2.79 ± 0.42
indanone	**8**	131	>100	>100	1	NA	2.21 ± 0.44
cinnamic acid derivative	**7**	522	32.5	54		22.77	
Crude extract			1.36 ± 0.06 µg/ml	37.5 µg/ml			
	CQ	320	0.04 ± 3.25	NT		14.27	NT
	ART		0.004 ± 0.157	NT		15.93	NT

2 NT= not tested; NA= no adduct.

3

4 Antiplasmodial activity of compounds **3** and **7** is moderate and can be explained by the
5 cytotoxicity of these compounds. Compound **7** has a very high affinity with heme (DV_{50} = 22.77
6 eV), superior than chloroquine (14. 27 eV) and artemisinin (**Figure 6**).

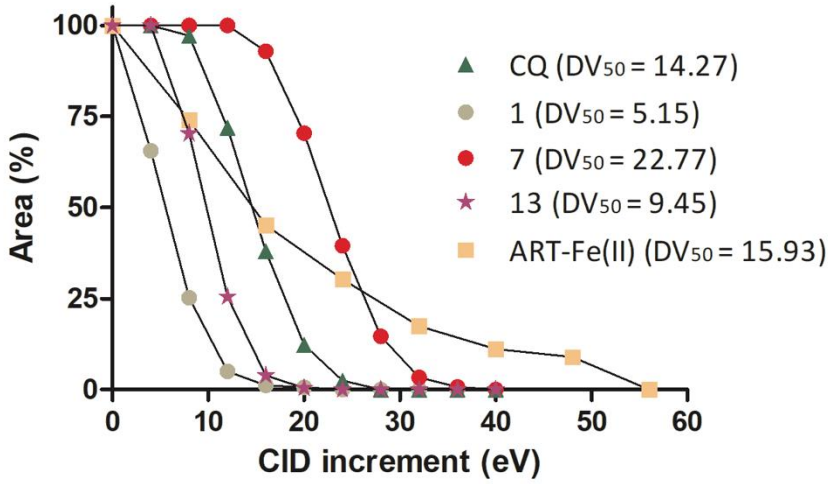


Figure 6. Dissociation curves for the more significant compounds isolated from *Piper coruscans* compared with chloroquine (CQ) and artemisinin (ART).

It should be highlighted that a non-covalent bis-adduct was observed for quinine [(2heme – H)+quinine]$^+$ at *m/z* 1556.539 (see SI8).[12] Docking studies on hemozoin-quinoline drugs also reported such sandwich adduct with quinine and chloroquine.[58] Nevertheless in our experiment, this adduct was not deconvoluted by molecular networking into a heme-binding compound. At last, we showed that under acidic and reductive conditions, several artemisinin-Fe(II) heme covalent adducts are detected at *m/z* 838, 898, 1180 (see SI7). The adduct at *m/z* 838 (heme + artemisinin –CH_2-COOH + H)$^+$ was shown to be of covalent nature by MSMS analyses, as it is reported in the literature.[59] Reductive activation of endoperoxide by Fe(II) heme produces the homolytic cleavage of the endoperoxide bond and the subsequent formation of artemisinin-heme adduct able to alkylate heme or other proteins.[22] The DV_{50} value of the artemisinin covalent adduct is similar of that of chloroquine but the profile of the stability curve is not sigmoidal. This may be due to the fact that in such case the observed effect is not a dissociation but an actual fragmentation with covalent bound breakage. Adducts at *m/z* 898 (heme + artemisinin)$^+$ and 1180 (heme + 2 artemisinin)$^+$ were identified as being covalent adducts as they would dissociate very quickly and have a $DV_{50} < 2$.

CONCLUSIONS

Crystallization of heme is the principal pathway used by *Plasmodium* to detoxify hemoglobin digestion by-products. Interruption of this process still remains of interest as it does not lead to resistance *per se*. Our biodereplication methodology contributes to the rapid and efficient detection of potentially antimalarial molecules in complex mixtures. In addition, this method does not require cultures of parasites and can be implemented in a high-throughput format. The direct infusion mode allows us to have the information of adducts from the extract in 3 minutes. The automatic mixing realized in the autosampler in a 384-well plates for the analyses MS and MSMS allows to process 384 extracts in less than 20 hours. Furthermore using a miniaturized format accounting for low reagents consumption. Molecular networking is a bold and efficient technique of visualizing the non-covalent binds in complex extracts. It can be applied to decipher raw data obtained by MSMS analyses. The approach has been applied to a *Piper* extract, pointing out chalcones as the main compounds responsible for the antiplasmodial activity. The biodereplication method allows a rapid, economic and robust technique to identify possible active compounds with the aim to economize time, money and effort.

ASSOCIATED CONTENT

(SI) Supporting Information

The Supporting Information will be available free.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author
*E-mail: alexandre.maciuk@u-psud.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Consejo de Ciencia y Tecnología del Perú (CONCYTEC) (Council for science and technology of Peru) (299 - 2014 -FONDECYT) for the Ph.D. scholarship (PGVO). We also appreciate the contribution of Alexander Fox (Université Paris Sud), Billy Cabanillas, Kémber Mejia, Elsa Rengifo (Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana), Jean-Marc Nuzillard and Agathe Martinez (Université de Reims Champagne-Ardenne).

REFERENCES

(1) Watts, K. R.; Tenney, K.; Crews, P. The Structural Diversity and Promise of Antiparasitic Marine Invertebrate-Derived Small Molecules. *Chem. Biotechnol. – Pharm. Biotechnol.* **2010**, *21* (6), 808–818.

(2) WHO. Malaria, Fact Sheet. 2016.

(3) Cui, L.; Su, X. Discovery, Mechanisms of Action and Combination Therapy of Artemisinin. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2009**, *7* (8), 999–1013.

(4) WHO. Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030. 2015.

(5) Cui, L.; Mharakurwa, S.; Ndiaye, D.; Rathod, P. K.; Rosenthal, P. J. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *93* (3 Suppl), 57–68.

(6) Olliaro, P. Drug Resistance Hampers Our Capacity to Roll Back Malaria. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41* (Supplement_4), S247–S257.

(7) Hubert, J.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H. Dereplication Strategies in Natural Product Research: How Many Tools and Methodologies behind the Same Concept? *Phytochem. Rev.* **2017**, *16* (1), 55–95.

(8) Beutler, J. A.; Alvarado, A. B.; Schaufelberger, D. E.; Andrews, P.; McCloud, T. G. Dereplication of Phorbol Bioactives: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53* (4), 867–874.

(9) Garg, N.; Kapono, C. A.; Lim, Y. W.; Koyama, N.; Vermeij, M. J. A.; Conrad, D.; Rohwer, F.; Dorrestein, P. C. Mass Spectral Similarity for Untargeted Metabolomics Data Analysis of Complex Mixtures. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *377* (Supplement C), 719–727.

(10) Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, C. M.; Liu, X.; Boudreau, P. D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; et al. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (9), 1686–1699.

(11) Wan, K. X.; Vidavsky, I.; Gross, M. L. Comparing Similar Spectra: From Similarity Index to Spectral Contrast Angle. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13* (1), 85–88.

(12) Pashynska, V. A.; Van den Heuvel, H.; Claeys, M.; Kosevich, M. V. Characterization of Noncovalent Complexes of Antimalarial Agents of the Artemisinin-Type and FE(III)-Heme by Electrospray Mass Spectrometry and Collisional Activation Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15* (8), 1181–1190.

(13) Gligorijevic, B.; Bennett, T.; McAllister, R.; Urbach, J. S.; Roepe, P. D. Spinning Disk Confocal Microscopy of Live, Intraerythrocytic Malarial Parasites. 2. Altered Vacuolar Volume Regulation in Drug Resistant Malaria. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45* (41), 12411–12423.

(14) Hayward, R.; Saliba, K. J.; Kirk, K. The pH of the Digestive Vacuole of *Plasmodium falciparum* Is Not Associated with Chloroquine Resistance. *J. Cell Sci.* **2006**, *119* (6), 1016.

(15) Wunderlich, J.; Rohrbach, P.; Dalton, J. P. The Malaria Digestive Vacuole. *Front. Biosci. Sch. Ed.* **2012**, *4*, 1424–1448.

(16) Olliaro, P. L.; Goldberg, D. E. The *Plasmodium* Digestive Vacuole: Metabolic Headquarters and Choice Drug Target. *Parasitol. Today* **1995**, *11* (8), 294–297.

(17) Wu, B.; Novelli, J.; Foster, J.; Vaisvila, R.; Conway, L.; Ingram, J.; Ganatra, M.; Rao, A. U.; Hamza, I.; Slatko, B. The Heme Biosynthetic Pathway of the Obligate Wolbachia Endosymbiont of *Brugia malayi* as a Potential Anti-Filarial Drug Target. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3* (7), e475.

(18) Oliveira, M. F.; d'Avila, J. C. P.; Tempone, A. J.; Correâ Soares, J. B. R.; Rumjanek, F. D.; Ferreira-Pereira, A.; Ferreira, S. T.; Oliveira, P. L. Inhibition of Heme Aggregation by Chloroquine Reduces Schistosoma Mansoni Infection. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190* (4), 843–852.

(19) Buller, R.; Peterson, M. L.; Almarsson, Ö.; Leiserowitz, L. Quinoline Binding Site on Malaria Pigment Crystal: A Rational Pathway for Antimalaria Drug Design. *Cryst. Growth Des.* **2002**, *2* (6), 553–562.

(20) Kappe, S. H. I.; Vaughan, A. M.; Boddey, J. A.; Cowman, A. F. That Was Then But This Is Now: Malaria Research in the Time of an Eradication Agenda. *Science* **2010**, *328* (5980), 862.

(21) Parapini, S.; Basilico, N.; Pasini, E.; Egan, T. J.; Olliaro, P.; Taramelli, D.; Monti, D. Standardization of the Physicochemical Parameters to Assess in Vitro the β-Hematin Inhibitory Activity of Antimalarial Drugs. *Exp. Parasitol.* **2000**, *96* (4), 249–256.

(22) Muñoz-Durango, K.; Maciuk, A.; Harfouche, A.; Torijano-Gutiérrez, S.; Jullian, J.-C.; Quintin, J.; Spelman, K.; Mouray, E.; Grellier, P.; Figadère, B. Detection, Characterization, and Screening of Heme-Binding Molecules by Mass Spectrometry for Malaria Drug Discovery. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (7), 3324–3329.

(23) Trager, W.; Jensen, J. B. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science* **1976**, *193* (4254), 673–675.

(24) Lambros, C.; Vanderberg, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. *J. Parasitol.* **1979**, *65* (3), 418–420.

(25) Vásquez-Ocmín, P.; Cojean, S.; Rengifo, E.; Suyyagh-Albouz, S.; Amasifuen Guerra, C. A.; Pomel, S.; Cabanillas, B.; Mejía, K.; Loiseau, P. M.; Figadère, B.; et al. Antiprotozoal Activity of Medicinal Plants Used by Iquitos-Nauta Road Communities in Loreto (Peru). *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *210*, 372–385.

(26) Bounaadja, L.; Schmitt, M.; Albrecht, S.; Mouray, E.; Tarnus, C.; Florent, I. Selective Inhibition of PfA-M1, over PfA-M17, by an Amino-Benzosuberone Derivative Blocks Malaria Parasites Development *in vitro* and *in vivo*. *Malar. J.* **2017**, *16* (1), 382.

(27) Ponka, P. Cell Biology of Heme. *Am. J. Med. Sci.* **1999**, *318* (4), 241–256.

(28) White, K. A.; Marletta, M. A. Nitric Oxide Synthase Is a Cytochrome P-450 Type Hemoprotein. *Biochemistry (Mosc.)* **1992**, *31* (29), 6627–6631.

(29) Olafson, K. N.; Rimer, J. D.; Vekilov, P. G. Growth of Large Hematin Crystals in Biomimetic Solutions. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14* (5), 2123–2127.

(30) Ketchum, M. A.; Olafson, K. N.; Petrova, E. V.; Rimer, J. D.; Vekilov, P. G. Hematin Crystallization from Aqueous and Organic Solvents. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139* (12), 121911.

(31) Stiebler, R.; Hoang, A. N.; Egan, T. J.; Wright, D. W.; Oliveira, M. F. Increase on the Initial Soluble Heme Levels in Acidic Conditions Is an Important Mechanism for Spontaneous Heme Crystallization *in vitro*. *PLOS ONE* **2010**, *5* (9), e12694.

(32) Loo, J. A. Studying Noncovalent Protein Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16* (1), 1–23.

(33) Gupta, R.; Hamdan, S. M.; Dixon, N. E.; Sheil, M. M.; Beck, J. L. Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry to Study the Hydrophobic Interaction between the Ɛ and θ Subunits of DNA Polymerase III. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2004**, *13* (11), 2878–2887.

(34) Veenstra, T. D. Electrospray Ionization Mass Spectrometry in the Study of Biomolecular Non-Covalent Interactions. *Biophys. Chem.* **1999**, *79* (2), 63–79.

(35) Wright, A. D.; Wang, H.; Gurrath, M.; König, G. M.; Kocak, G.; Neumann, G.; Loria, P.; Foley, M.; Tilley, L. Inhibition of Heme Detoxification Processes Underlies the Antimalarial Activity of Terpene Isonitrile Compounds from Marine Sponges. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (6), 873–885.

(36) Ortiz, S.; Dali-Yahia, K.; Vasquez-Ocmin, P.; Grougnet, R.; Grellier, P.; Michel, S.; Maciuk, A.; Boutefnouchet, S. Heme-Binding Activity of Methoxyflavones from *Pentzia monodiana* Maire (Asteraceae). *Fitoterapia* **2017**, *118*, 1–5.

(37) Krieg, R.; Jortzik, E.; Goetz, A.-A.; Blandin, S.; Wittlin, S.; Elhabiri, M.; Rahbari, M.; Nuryyeva, S.; Voigt, K.; Dahse, H.-M.; et al. Arylmethylamino Steroids as Antiparasitic Agents. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14478.

(38) Vekilov, P. G.; Rimer, J. D.; Olafson, K. N.; Ketchum, M. A. Lipid or Aqueous Medium for Hematin Crystallization? *CrystEngComm* **2015**, *17* (41), 7790–7800.

(39) Kapishnikov, S.; Berthing, T.; Hviid, L.; Dierolf, M.; Menzel, A.; Pfeiffer, F.; Als-Nielsen, J.; Leiserowitz, L. Aligned Hemozoin Crystals in Curved Clusters in Malarial Red Blood Cells Revealed by Nanoprobe X-Ray Fe Fluorescence and Diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (28), 11184–11187.

(40) Kapishnikov, S.; Weiner, A.; Shimoni, E.; Guttmann, P.; Schneider, G.; Dahan-Pasternak, N.; Dzikowski, R.; Leiserowitz, L.; Elbaum, M. Oriented Nucleation of Hemozoin at the Digestive Vacuole Membrane in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (28), 11188–11193.

(41) Egan, T. J. Haemozoin Formation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *157* (2), 127–136.

(42) Egan, T. J. Recent Advances in Understanding the Mechanism of Hemozoin (Malaria Pigment) Formation. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (5), 1288–1299.

(43) Sangster, J. *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*; Wiley: England, 1997; Vol. 2.

(44) Olafson, K. N.; Ketchum, M. A.; Rimer, J. D.; Vekilov, P. G. Mechanisms of Hematin Crystallization and Inhibition by the Antimalarial Drug Chloroquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (16), 4946–4951.

(45) Huy, N. T.; Uyen, D. T.; Maeda, A.; Trang, D. T. X.; Oida, T.; Harada, S.; Kamei, K. Simple Colorimetric Inhibition Assay of Heme Crystallization for High-Throughput Screening of Antimalarial Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (1), 350–353.

(46) Olivon, F.; Grelier, G.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Touboul, D. MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal. Chem.* **2017**.

(47) Berthod, A. *Comprehensive Analytical Chemistry Volume XXXVIII: Countercurrent Chromatography - The Support-Free Liquid Stationary Phase*; Elsevier, 2002; Vol. 38.

(48) Mi-Ichi, F.; Miyadera, H.; Kobayashi, T.; Takamiya, S.; Waki, S.; Iwata, S.; Shibata, S.; Kita, K. Parasite Mitochondria as a Target of Chemotherapy: Inhibitory Effect of Licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* Respiratory Chain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1056* (1), 46–54.

(49) Xiao, H.; Rao Ravu, R.; Tekwani, B. L.; Li, W.; Liu, W.-B.; Jacob, M. R.; Khan, S. I.; Cai, X.; Peng, C.-Y.; Khan, I. A.; et al. Biological Evaluation of Phytoconstituents from *Polygonum hydropiper*. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31* (17), 2053–2057.

(50) He, W.; Li, Y.; Liu, J.; Hu, Z.; Chen, X. Specific Interaction of Chalcone-Protein: Cardamonin Binding Site II on the Human Serum Albumin Molecule. *Biopolymers* **2005**, *79* (1), 48–57.

(51) Dhar, D. N. *The Chemistry of Chalcones and Related Compounds*; Wiley: New York, 1981.

(52) Zhuang, C.; Zhang, W.; Sheng, C.; Zhang, W.; Xing, C.; Miao, Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (12), 7762–7810.

(53) Ram, V. J.; Saxena, A. S.; Srivastava, S.; Chandra, S. Oxygenated Chalcones and Bischalcones as Potential Antimalarial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (19), 2159–2161.

(54) Gan, F.-F.; Kaminska, K. K.; Yang, H.; Liew, C.-Y.; Leow, P.-C.; So, C.-L.; Tu, L. N.; Roy, A.; Yap, C.-W.; Kang, T.-S.; et al. Identification of Michael Acceptor-Centric Pharmacophores with Substituents That Yield Strong Thioredoxin Reductase Inhibitory Character Correlated to Antiproliferative Activity. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19* (11), 1149–1165.

(55) Sharma, N.; Mohanakrishnan, D.; Sharma, U. K.; Kumar, R.; Richa; Sinha, A. K.; Sahal, D. Design, Economical Synthesis and Antiplasmodial Evaluation of Vanillin Derived Allylated Chalcones and Their Marked Synergism with Artemisinin against Chloroquine Resistant Strains of *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *79*, 350–368.

(56) Singh, P.; Anand, A.; Kumar, V. Recent Developments in Biological Activities of Chalcones: A Mini Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 758–777.

(57) Lobo, L.; Cabral, L. I. L.; Sena, M. I.; Guerreiro, B.; Rodrigues, A. S.; de Andrade-Neto, V. F.; Cristiano, M. L. S.; Nogueira, F. New Endoperoxides Highly Active *in vivo* and *in vitro* against Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **2018**, *17*, 145.

(58) Weissbuch, I.; Leiserowitz, L. Interplay Between Malaria, Crystalline Hemozoin Formation, and Antimalarial Drug Action and Design. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (11), 4899–4914.

(59) Robert, A.; Coppel, Y.; Meunier, B. NMR Characterization of Covalent Adducts Obtained by Alkylation of Heme with the Antimalarial Drug Artemisinin. *Protag. Chem. Helmut Sigel* **2002**, *339*, 488–496.

Supporting Information

Antiplasmodial biodereplication based on heme binding, molecular networking and CPC chromatography.

Pedro G. Vásquez-Ocmín[†], Jean-François Gallard[‡], Anne-Cécile Van Baelen[†], Karine Leblanc[†], Sandrine Cojean[§], Elizabeth Mouray[‖], Philippe Grellier[‖], Carlos Amasifuén[⊥], Laurent Evanno[†], Mehdi Beniddir[†], Bruno Figadère[†], Alexandre Maciuk[†*].

[†]Equipe "Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

[‡]Institut de Chimie des Substances Naturelles CNRS UPR 2301, Université Paris-Saclay, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[§]Equipe "Chimiothérapie antiparasitaire" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

[‖] Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Universités, CP52, 57 Rue Cuvier, 75005 Paris, France

[⊥]Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental, Chachapoyas, Perú

*alexandre.maciuk@u-psud.fr

Table of Content

1. Experimental SI1
2. NMR proton of known compounds isolated for *Piper coruscans* SI2
3. NMR 1D and 2D of new compounds isolated for *P. coruscans* SI3
4. NMR Spectroscopic data for the isolated compounds SI4
5. LC-HRMS for alkaloid extract from *Cinchona sp.* SI5
6. CPC-Factograms of cyclohexane extract from *Piper coruscans* SI6
7. HRMS ESI (+) of artemisinin with heme-Fe (II) SI7
8. HRMS ESI (+) of antimalarial drugs with heme SI8
9. Structures of antimalarial drugs SI9
10. Structures of compounds from *Cinchona sp.* SI10

1. Experimental

Materials

Antimalarial drugs were acquired from Sigma-Aldrich (France): chloroquine diphosphate salt, quinine chloride, amodiaquine dihydrochloride dehydrate, miconazole nitrate salt, ketoconazole, sulfadoxine ≥ 95 % (TLC), praziquantel, mefloquine hydrochloride.

Extraction of alkaloid extract from *Cinchona sp.* (Rubiaceae) was carried in December 2014 in the Pharmacognosy laboratory at the Paris-Sud University.

Preparation of solution for the heme test was obtained with tween 20 (Sigma Aldrich), citric acid, ACS reagent, ≥99.5% (Sigma Aldrich), n-octanol for analysis (Carlo ERBA reagents, France). Solvents used for the compounds isolation were, formic acid 98% - 100% for LC-MS LiChropur® (Sigma Aldrich), water Milli-Q, acetonitrile for LCMS, methanol for LCMS. Isolation of compounds by CPC chromatography was carried out using n-Heptane for analyses, ethyl acetate (VWR chemical), n-butanol for analyses (EMSURE® ACS,ISO), methanol for analyses (EMSURE® ACS,ISO), water milli-Q. NMR of compounds was carried in deutered solvents ($CDCl_3$, CD_3CN or MeOD).

Known compound were identified based on literature spectral data. Aurentiacin (**1**)[1] ; strobopinin 7-methyl ether (**2**)[2]; 5-hydroxy-7-methoxy-6,8-dimethyl flavanone (**3**)[3]; desmethoxymatteucinol (**4**)[4]; 2', 4'-dihydroxy-6'-methoxy-3'-methylchalcone, (**5**)[5]; cardamomin, (**6**)[6]; 1*H*-inden-1-one (**8**)[12,13], alpinetin, (**9**)[7]; Pinocembrin, (**11**)[8]; dimethyl cryptostrobin, (**12**)[9]; *N*-Benzoyltyrarnine methyl ether, (**13**)[10,11].

Analyses

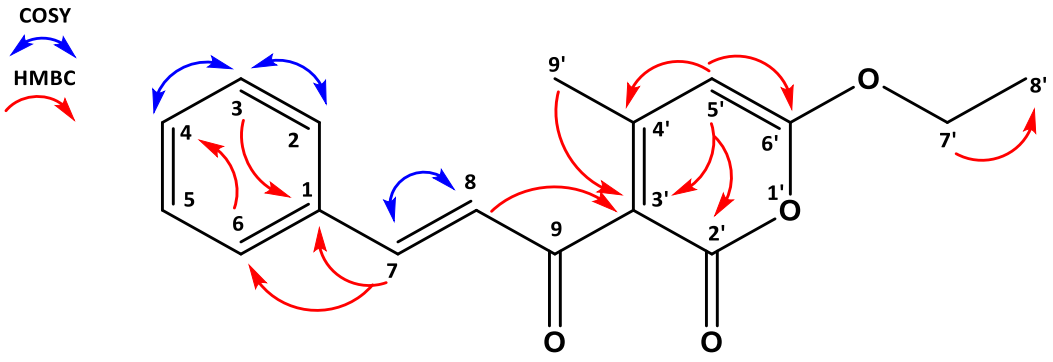
$[\alpha]_D$ analyses were carried used Atago™ Polarimetre Polax-2L carried at λ = 589 to 16 °C of temperature. All compounds were yellow pale. For **2**, $[\alpha]_D$ + 7.02 (c 0.02 in MeOH); for **3**, $[\alpha]_D$ + 3.34 (c 0.01 in MeOH); **4**; $[\alpha]_D$ + 3.51 (c 0.01 in MeOH); for **9**, $[\alpha]_D$ + 7.38 (c 0.02 in MeOH); for **11**, $[\alpha]_D$ + 7.02 (c 0.02 in MeOH); and for **12**, $[\alpha]_D$ + 10.03 (c 0.03 in MeOH). Positive (+) HRMS $[M + H]^+$ was performed in 6530 Accurate-Mass QToF LC/MS instrument (Agilent Technologies). (+) HRMS $[M + H]^+$ for **1** *m/z* 299.1228 (calcd for $C_{18}H_{18}O_4$ 298.3153); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **2** *m/z* 285.1109 (calcd for $C_{17}H_{16}O_4$ 284.1063); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **3** *m/z* 299.1274 (calcd for $C_{18}H_{18}O_4$ 298.1253); (+) HRMS $[M + H]^+$

for **4** *m/z* 285.1101 (calcd for $C_{17}H_{16}O_4$ 284.1115); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **5** *m/z* 285.1101 (calcd for $C_{17}H_{16}O_4$ 284.1115); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **6** *m/z* 271.0943 (calcd for $C_{16}H_{14}O_4$ 271.0930); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **7** *m/z* 522.882 (calcd for $C_{32}H_{27}NO_6$ 522.5680); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **8** *m/z* 131.0476 (calcd for C_9H_6O 131.0478); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **9** *m/z* 271.4951 (calcd for $C_{16}H_{14}O_4$ 271.4958); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **10** *m/z* 285.1109 (calcd for $C_{17}H_{16}O_4$ 285.1108); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **11** *m/z* 285.1088 (calcd for $C_{17}H_{16}O_4$ 284.1117); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **12** *m/z* 299.1270 (calcd for $C_{18}H_{18}O_4$ 298.1271); (+) HRMS $[M + H]^+$ for **13** *m/z* 256.1334 (calcd for $C_{16}H_{17}NO_2$ 255.1342).

NMR analyses was performed in NMR Avance Bruker 500 MHz and 600 MHz CryoProbe for **7**. Results were carried on Bruker TopSpin Software/NMR Data Analysis.

NMR analyses of compound 10 (3-cinnamoyl-6-ethoxy-4-methyl-2*H*-pyran-2-one): Compound was obtained as a yellow, amorphous powder; UV (MeOH) λmax (log ε) 280 nm. (+) HREIMS indicated a [M + H]+ ion peak at *m/z* 285.1109, consistent with the molecular formula $C_{17}H_{16}O_4$, corresponding to a double-bond equivalent (DBE) value of 10. Analysis of ^{1}HNMR and ^{13}C NMR spectra (CD_3OD) resulted to the identification of two aromatic rings (cinnamoyl and pyranone moieties). The ^{13}C NMR spectrum showed 17 signals for two carbonyls, four sp^2 quaternary carbons, eight sp^2 methines, one methyl and one ethoxy group (SI4). In the^{1}HNMR spectrum, characteristic protons of an α, β insatured ketone were observed at δ_H 6.77 (1H, d, *J* = 15.9) and 6.23 (1H, d, *J* = 15.93), typical signals of a cinnamoyl moiety, corroborated by COSY. Methine proton is observed at δ_H 3.80 (1H, s) on the pyranone cycle. For the ethoxy group, the methylene proton at δ_H 4.19, (2H, m) correlated in COSY with methyl proton at δ_H 1.27 (3H, t, *J* = 7.1). In addition, the methylene correlated in HMBC with aromatic quaternary carbon C-6' at δ_C 151.3. Location of the quaternary sp^2 carbone at C-3' in pyranone cycle was evidenced by HMBC J^3 correlations of H-5', 3H-9' and H-8 (cinnamoyl moiety). Connexion between the pyranone and cinnamoyl moieties was also corroborated by J^4 correlations of H-9' and H5' with carbonyl at C-9 (δ_C 200.8). Therefore, the location of the carbonyl at C-2' in pyranone cycle was evidenced by HMBC J^4 correlations of H-5', H-9' and long-range connectivity (J^5) with H-7'.

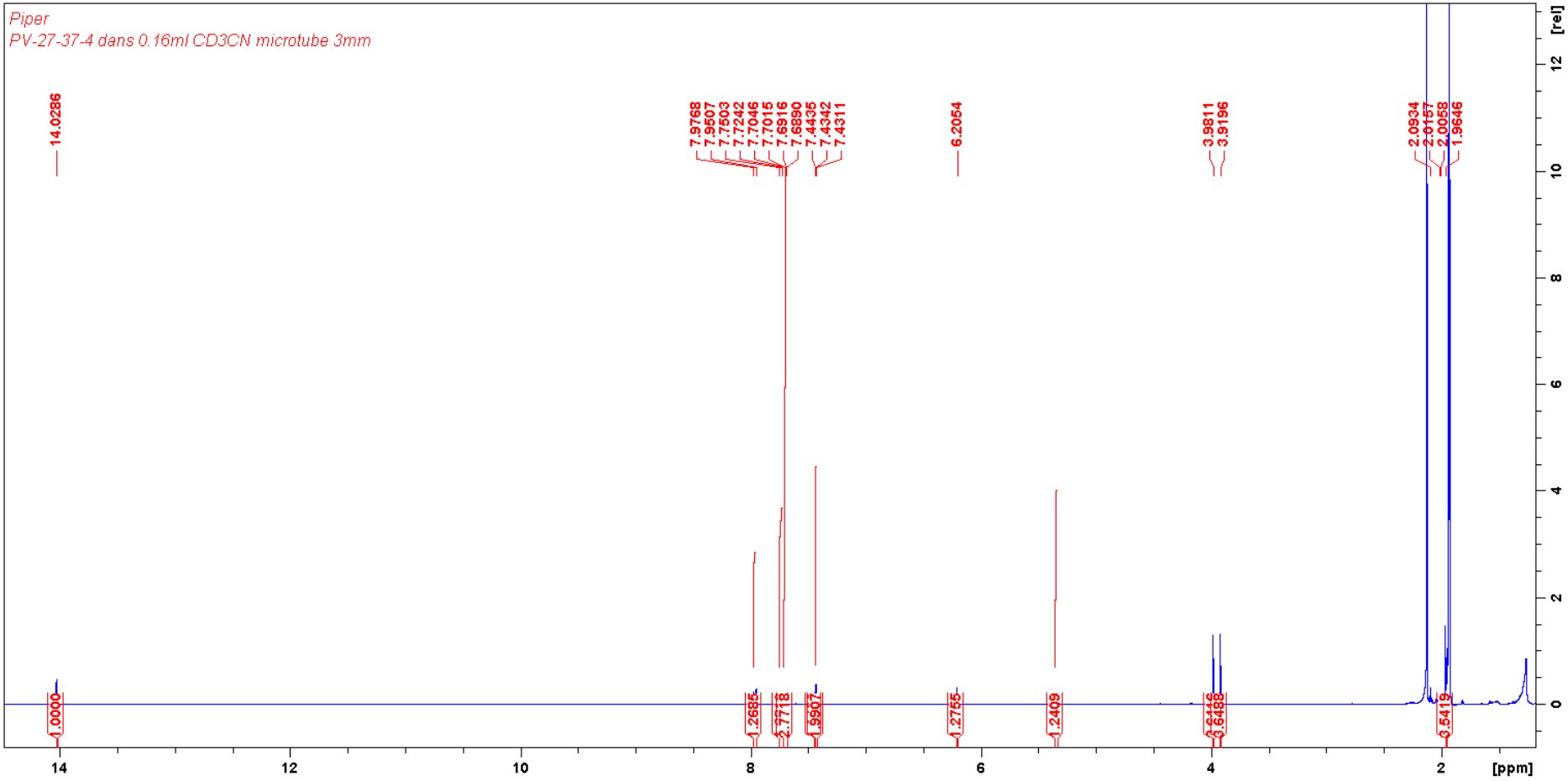
The methyl 9' at δ_H 1.97 (3H, s) and the ethoxy moiety were observed in *para* and *ortho* in the pyranone cycle respectively.



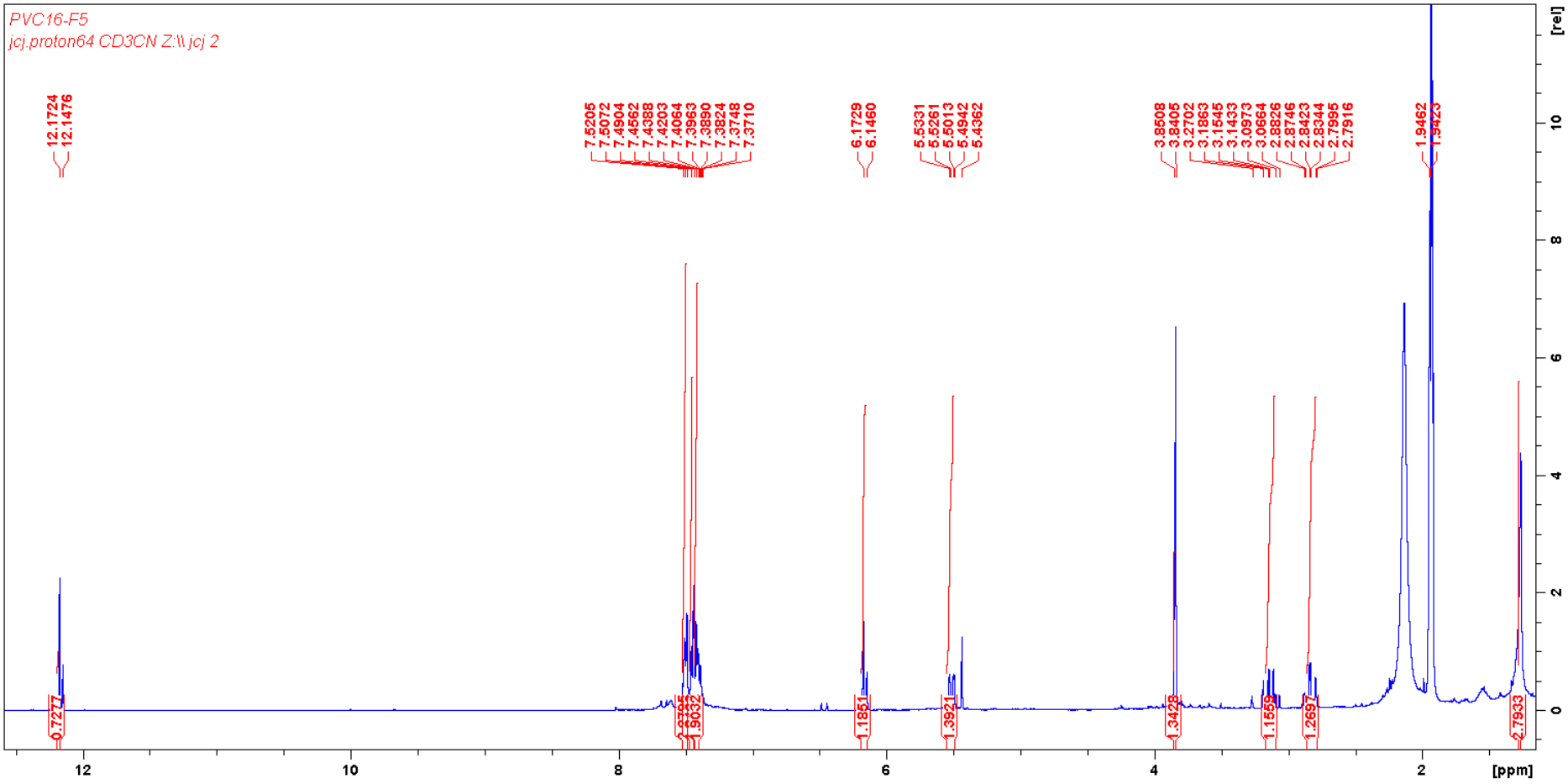
Selected COSY (bleu arrows) and HMBC (red arrows) correlations for compounds 10.

2. NMR proton for known compounds isolated

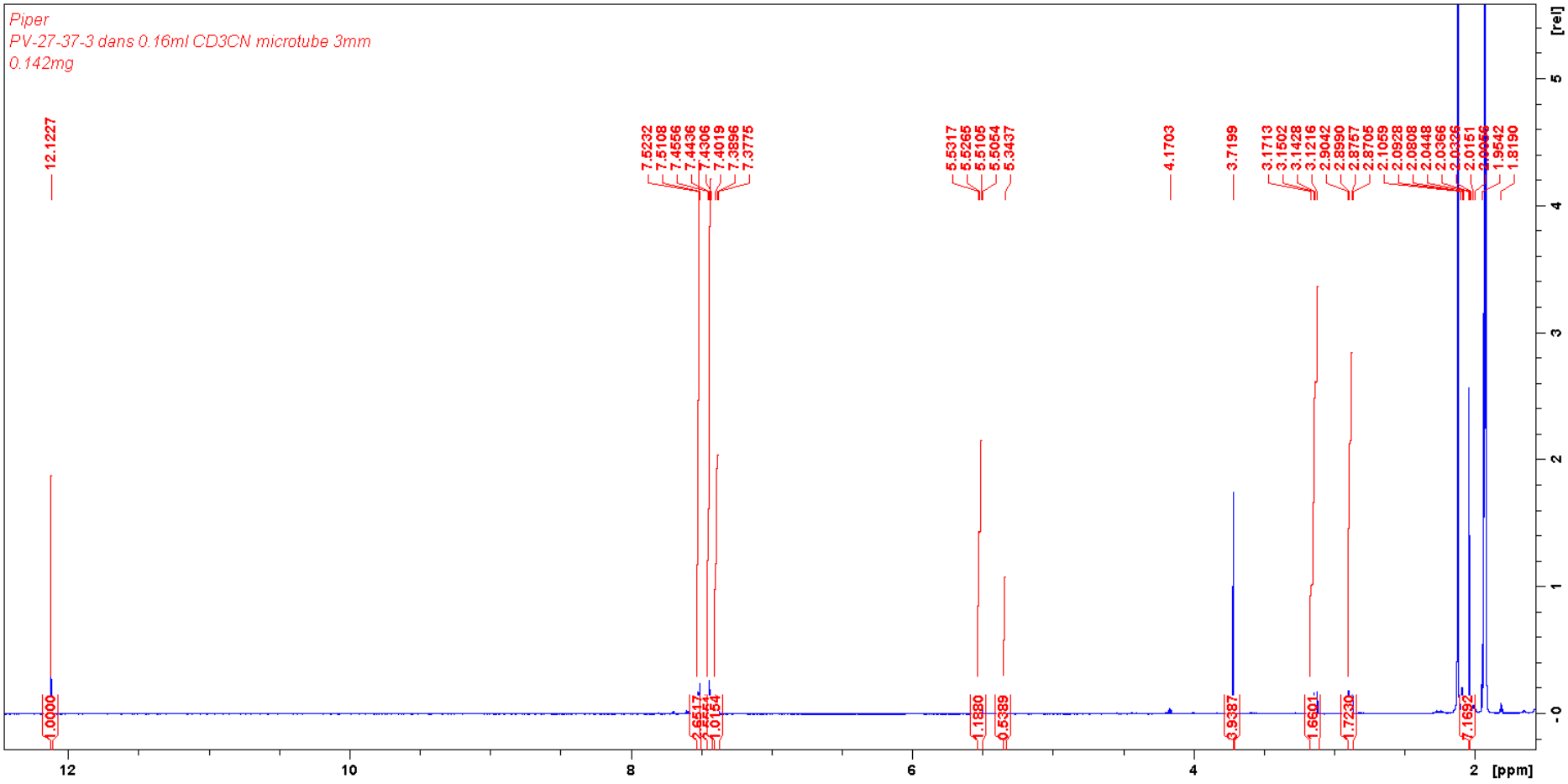
NMR proton for compound **1** in CD_3CN



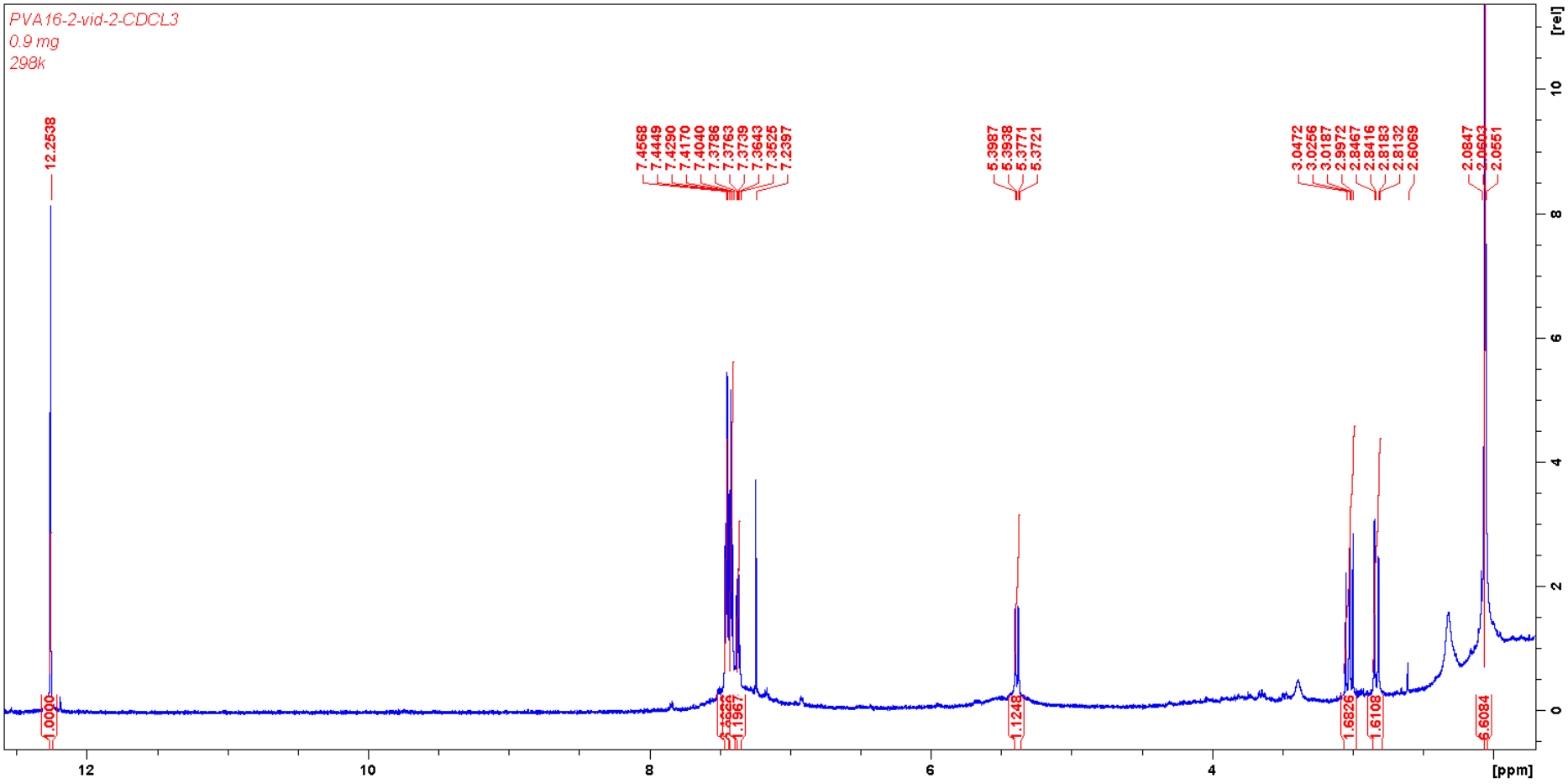
NMR proton for compound **2** in CD_3CN



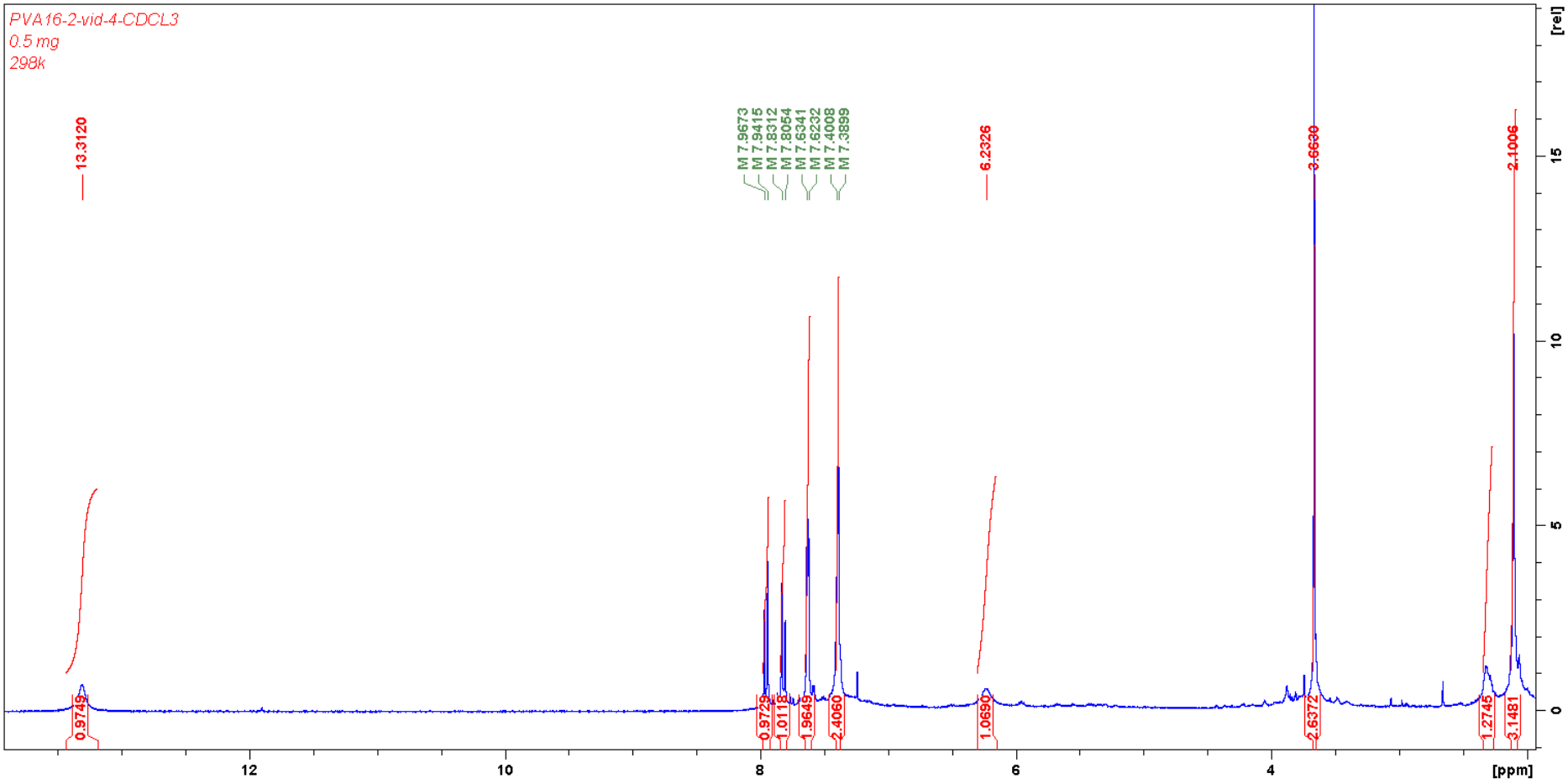
NMR proton for compound **3** in CD_3CN



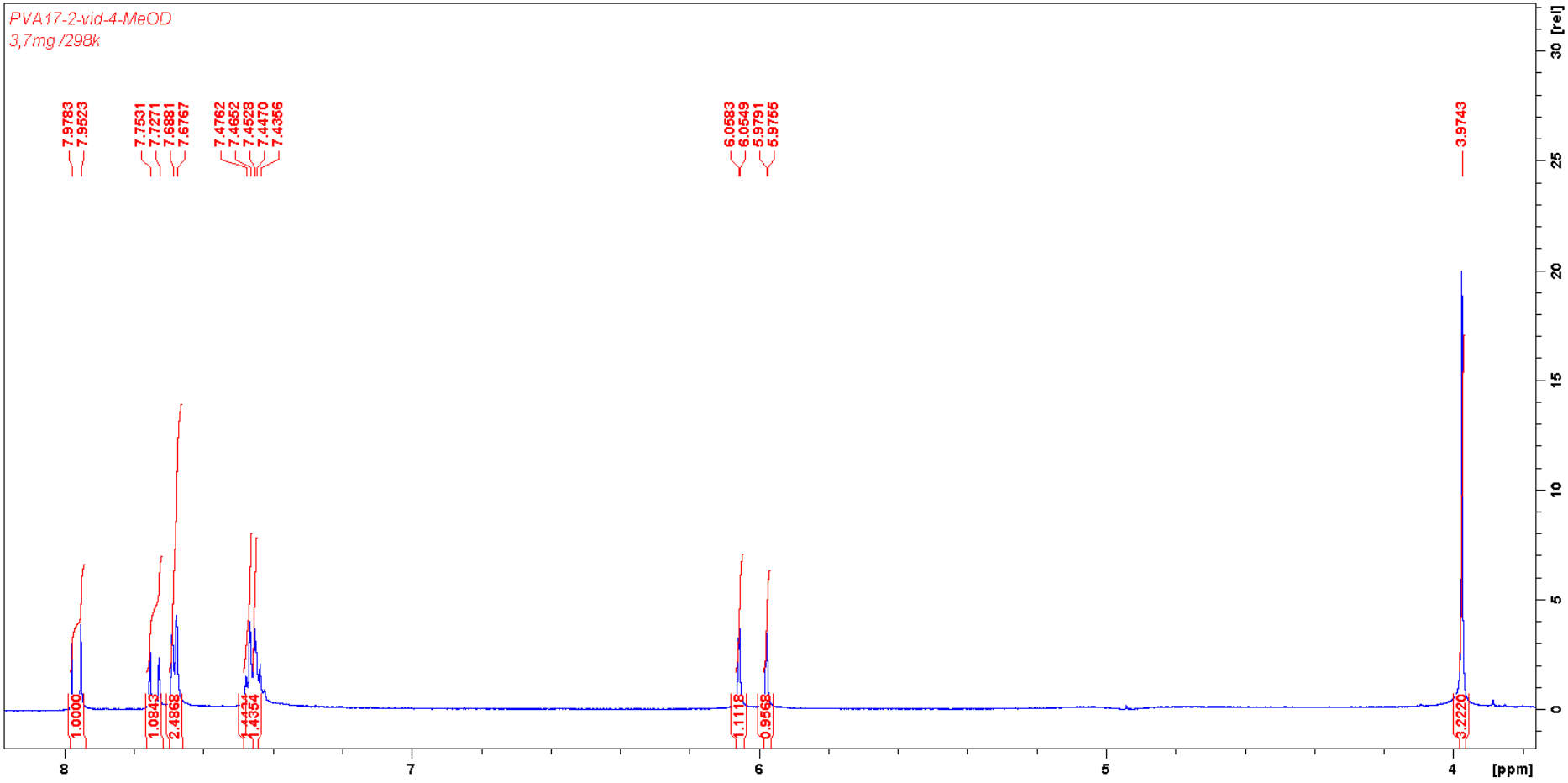
NMR proton for compound **4** in $CDCl_3$



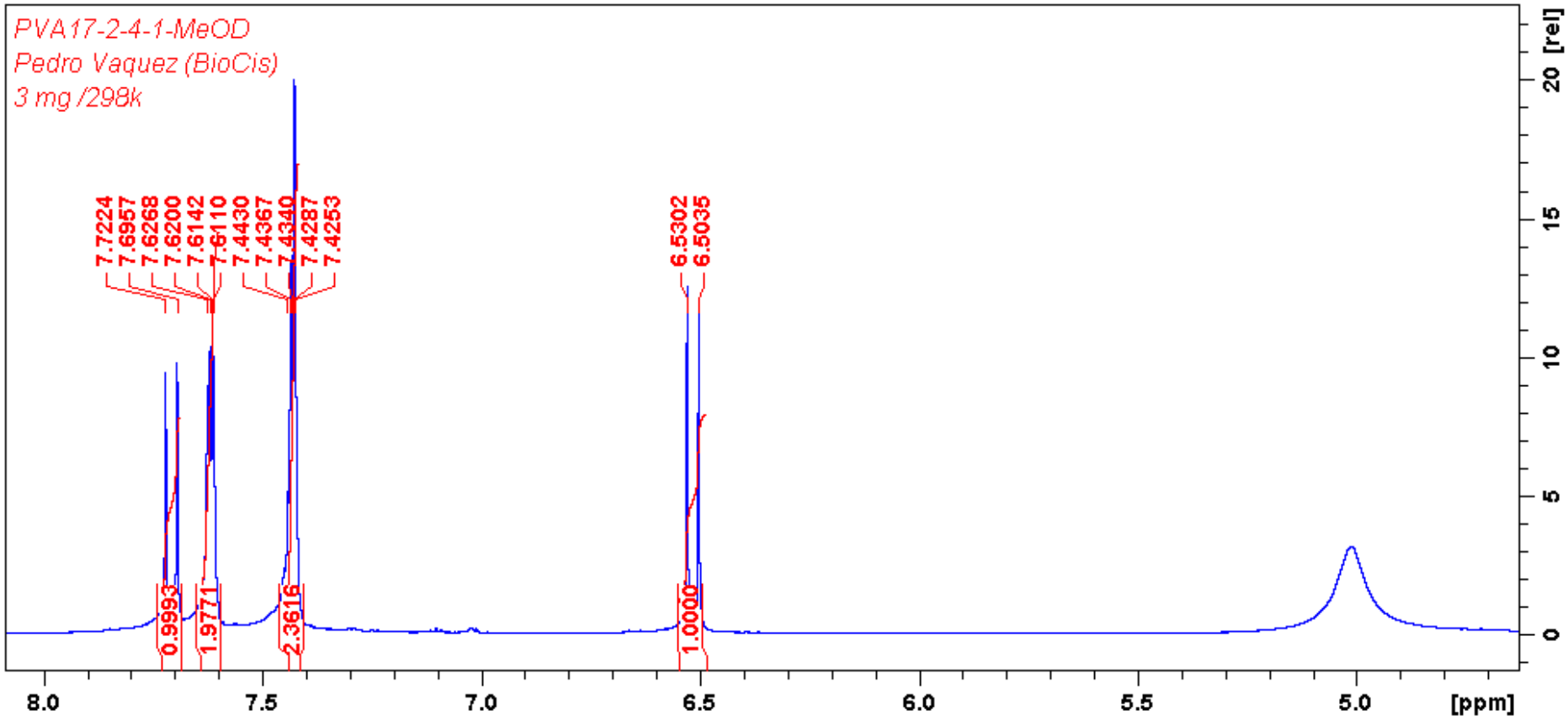
NMR proton for compound **5** in $CDCl_3$



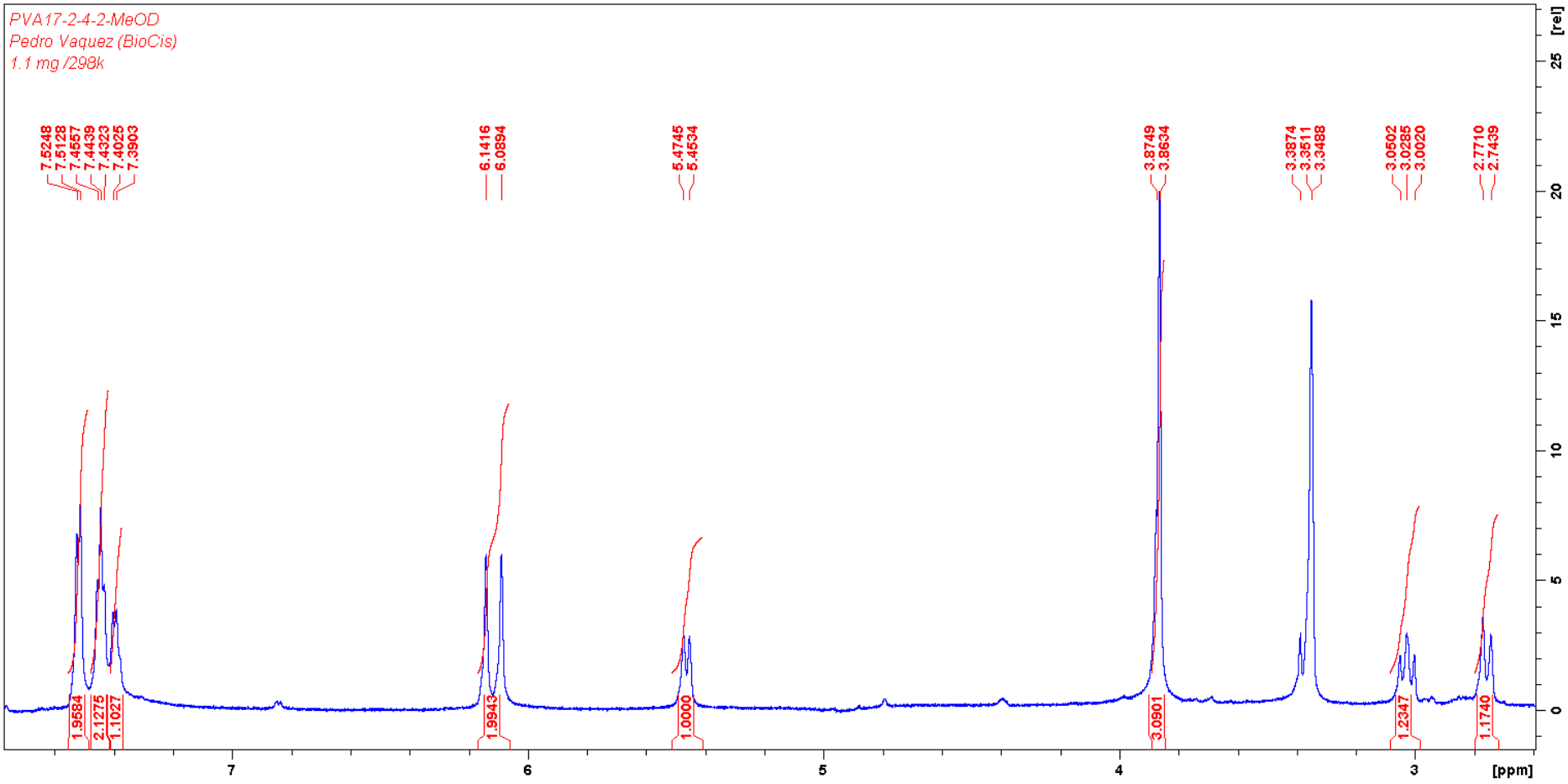
NMR proton for compound **6** in $CDCl_3$



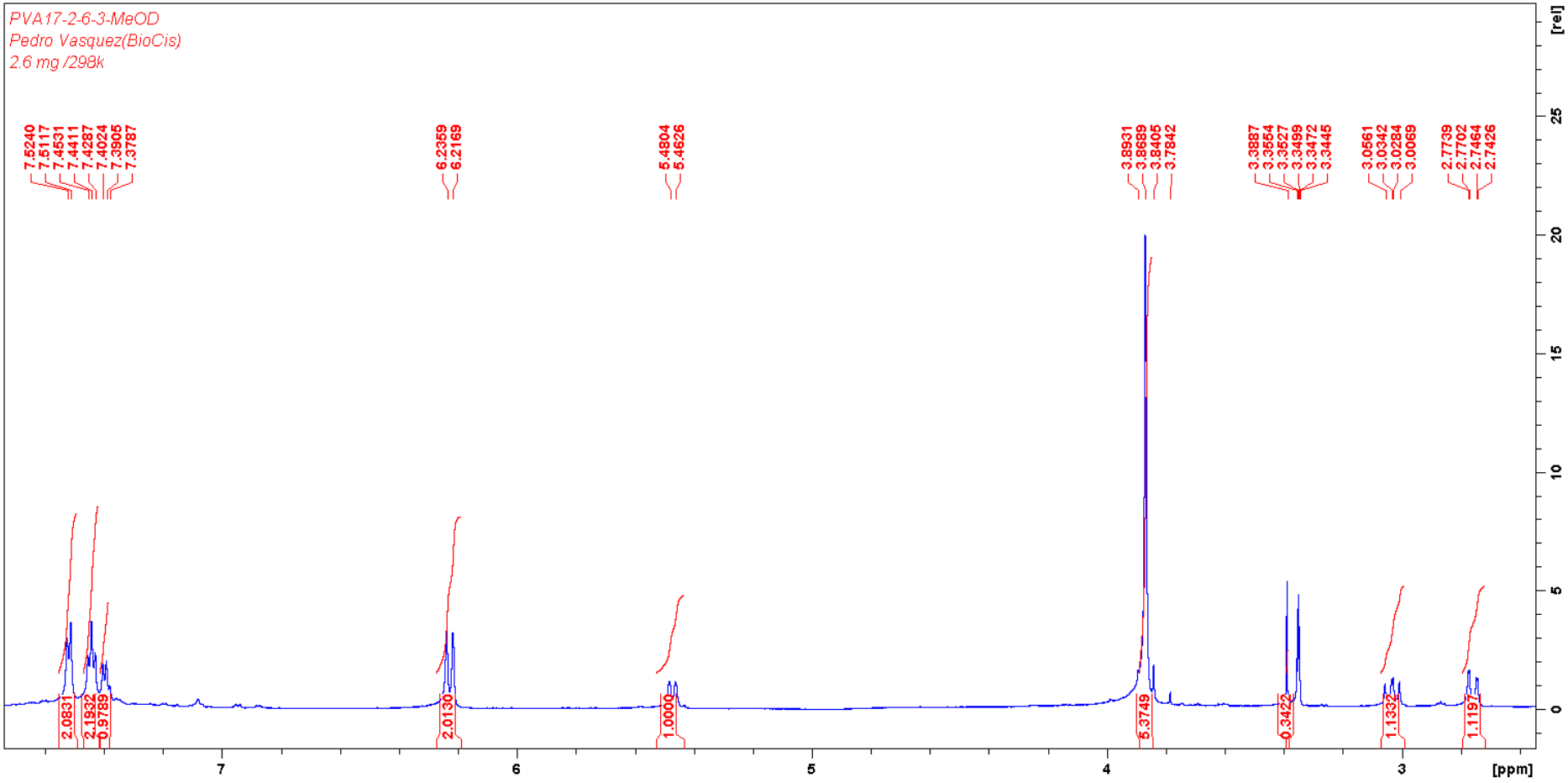
NMR proton for compound **8** in CD_3OD



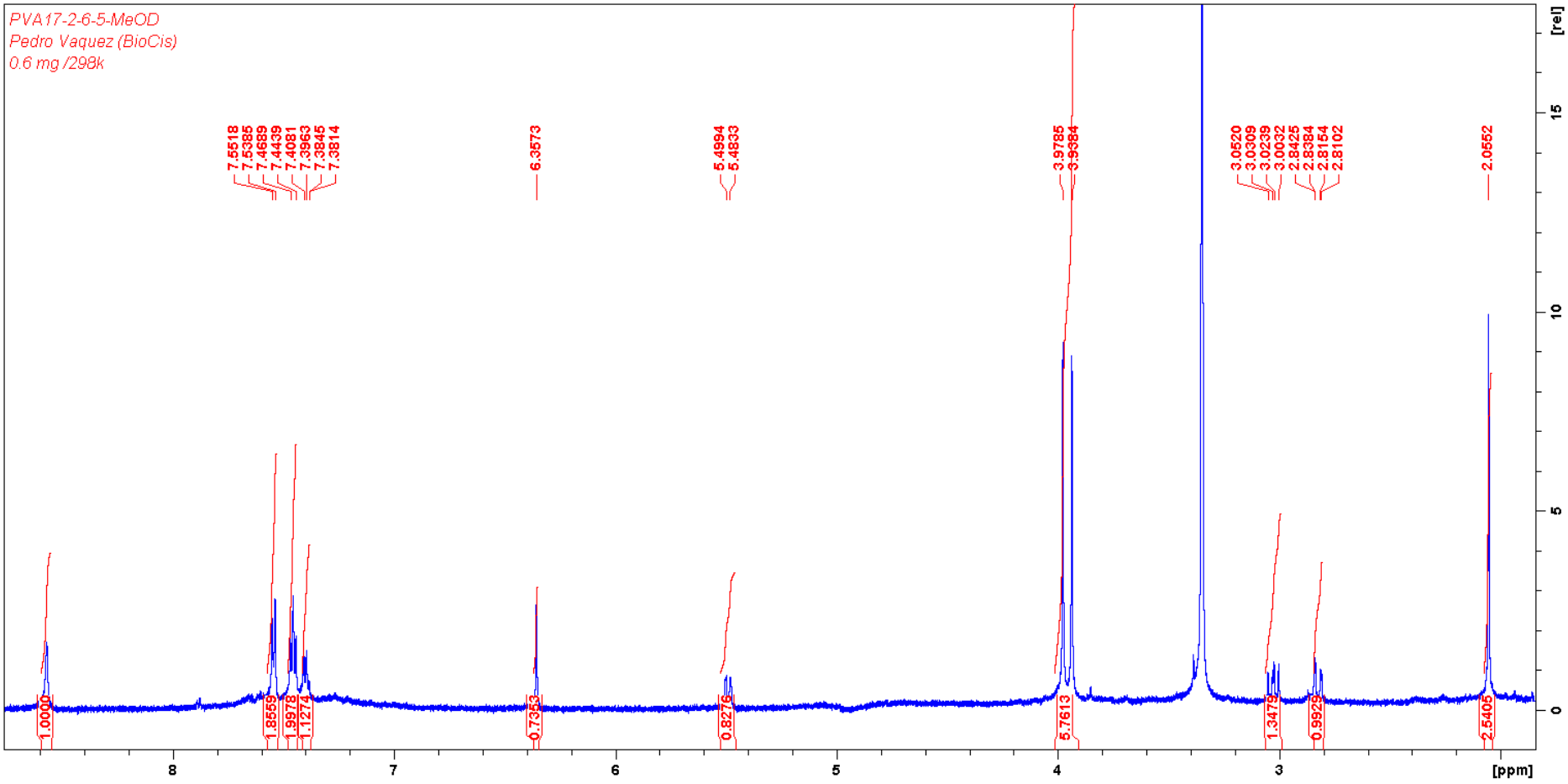
NMR proton for compound **9** in CD_3OD



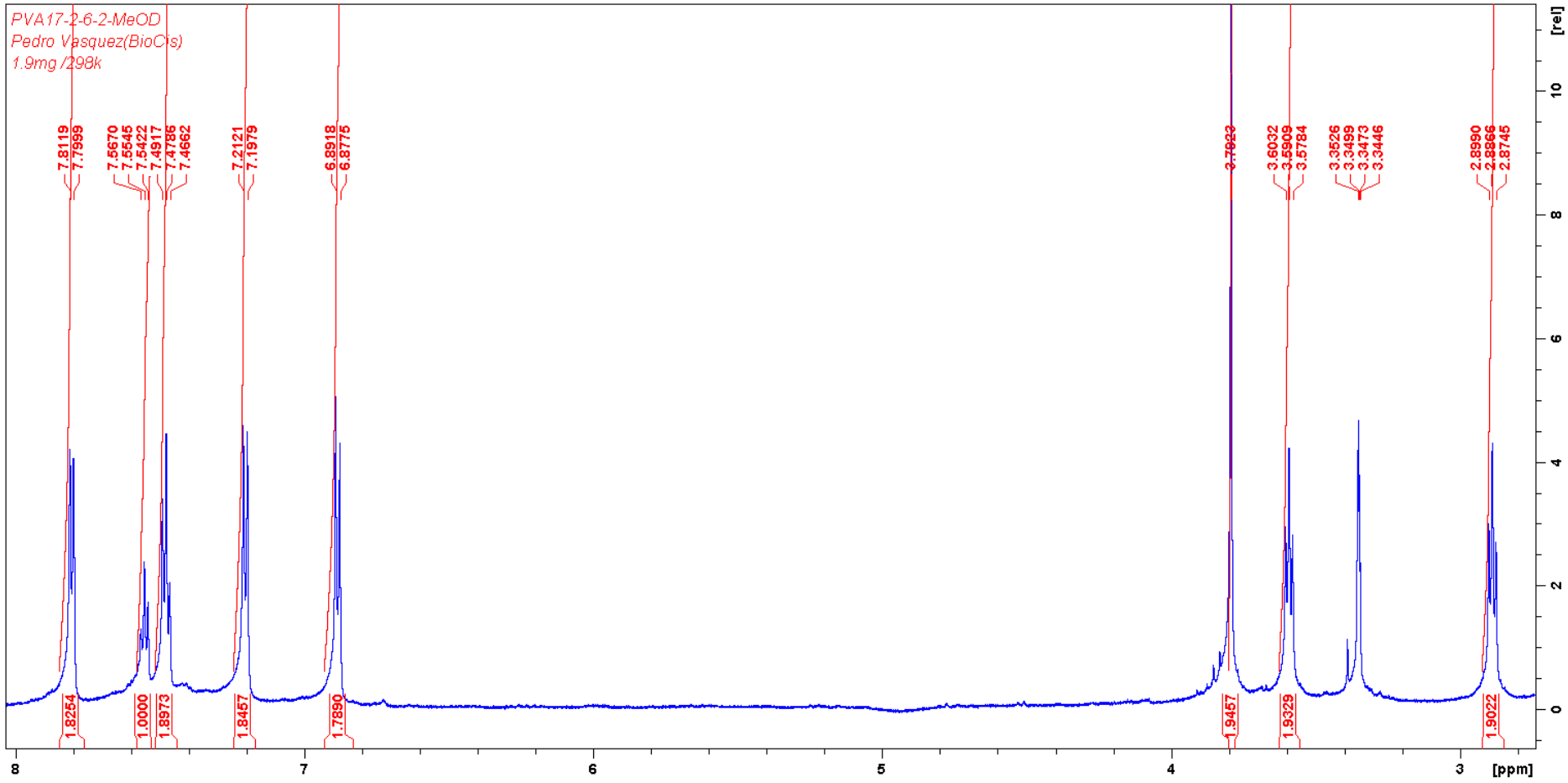
NMR proton for compound **11** in CD_3OD



NMR proton for compound **12** in CD_3OD

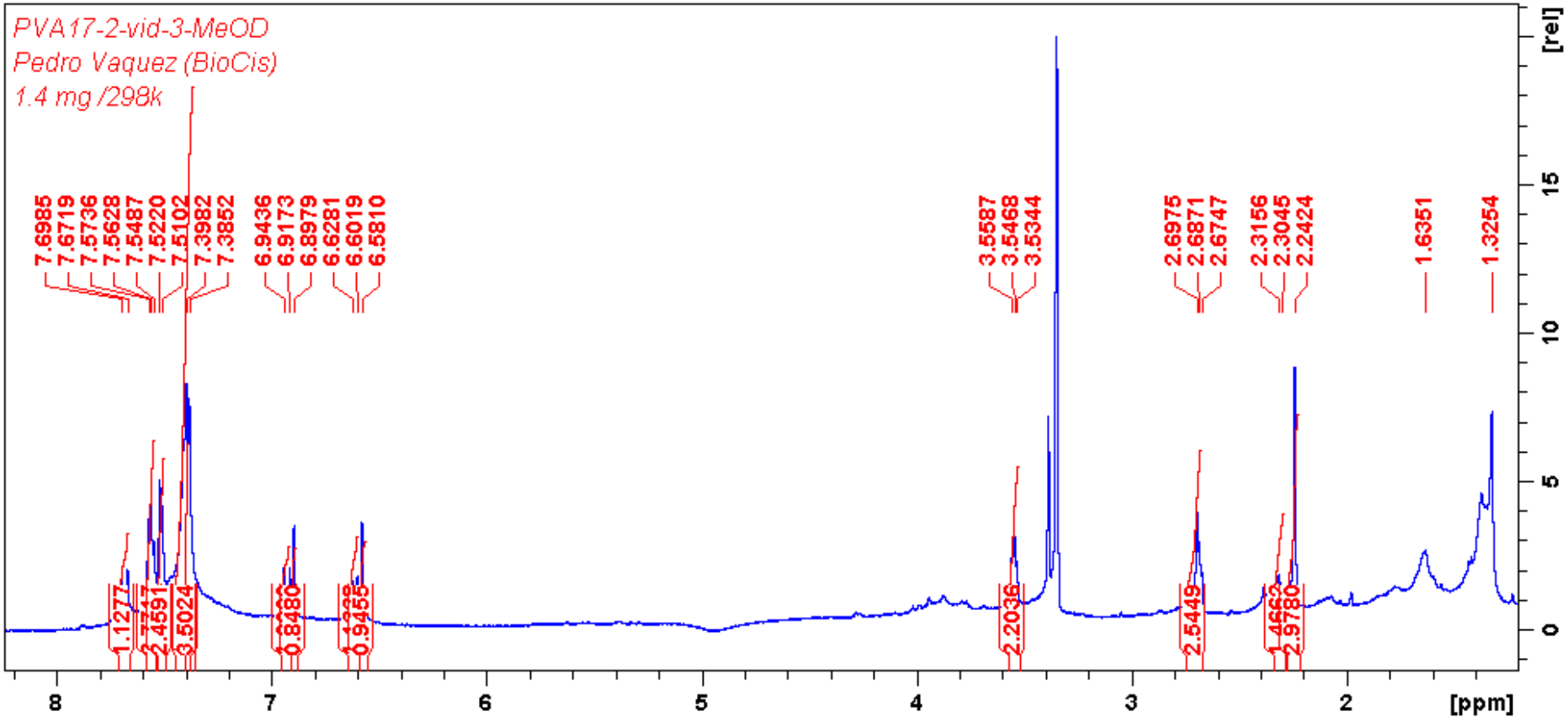


NMR proton for compound **13** in CD_3OD

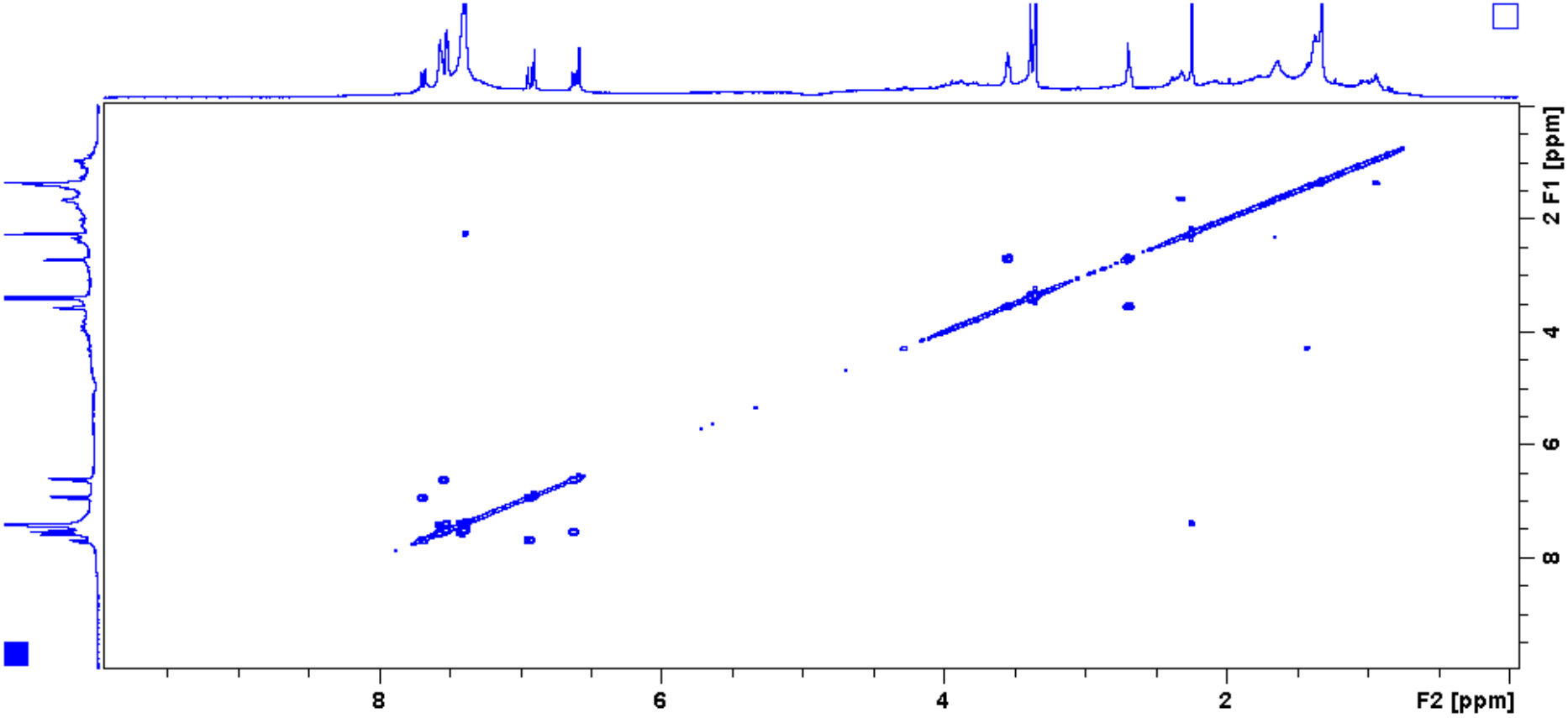


3. NMR 1D and 2D of new compounds isolated for P. coruscans

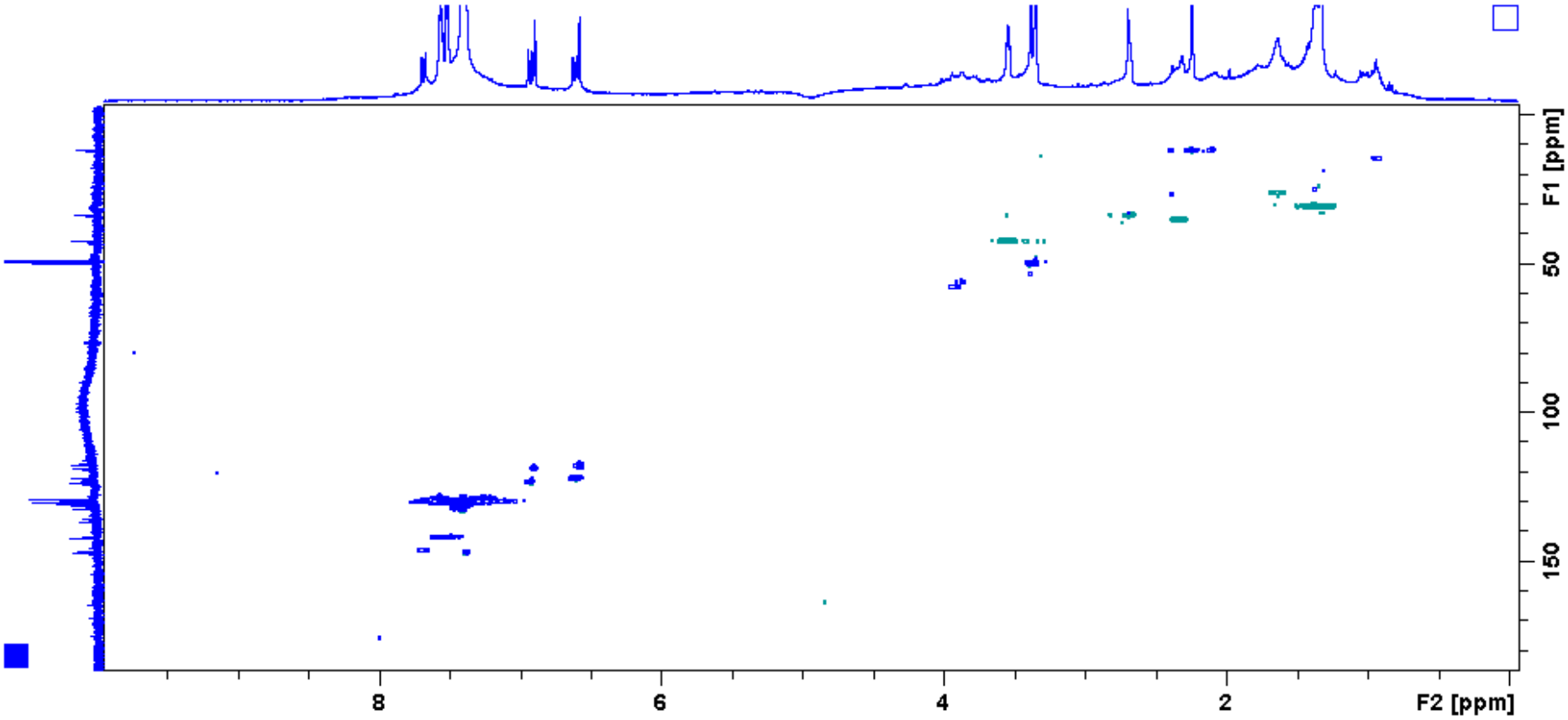
NMR proton of compound **7** in CD_3OD



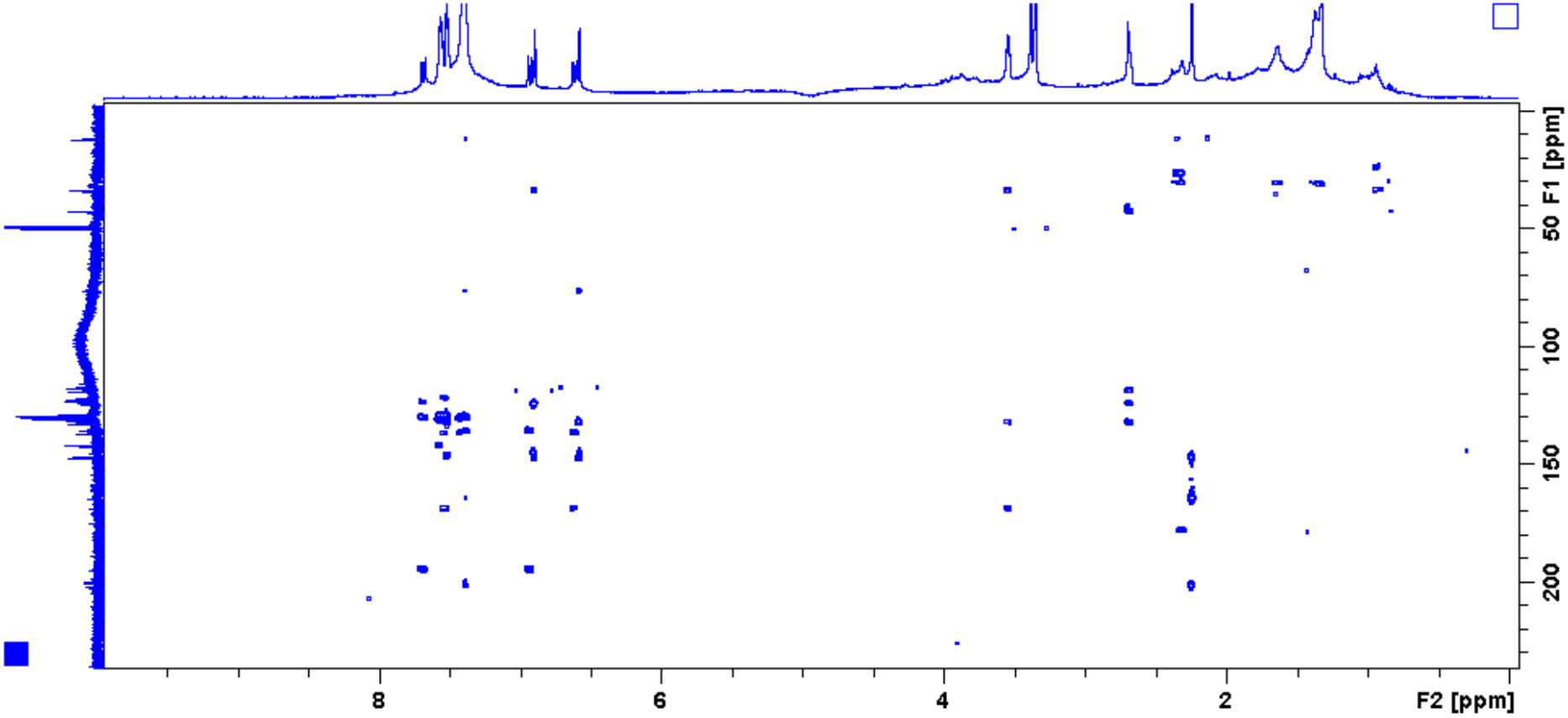
COSY analyses of compound **7**



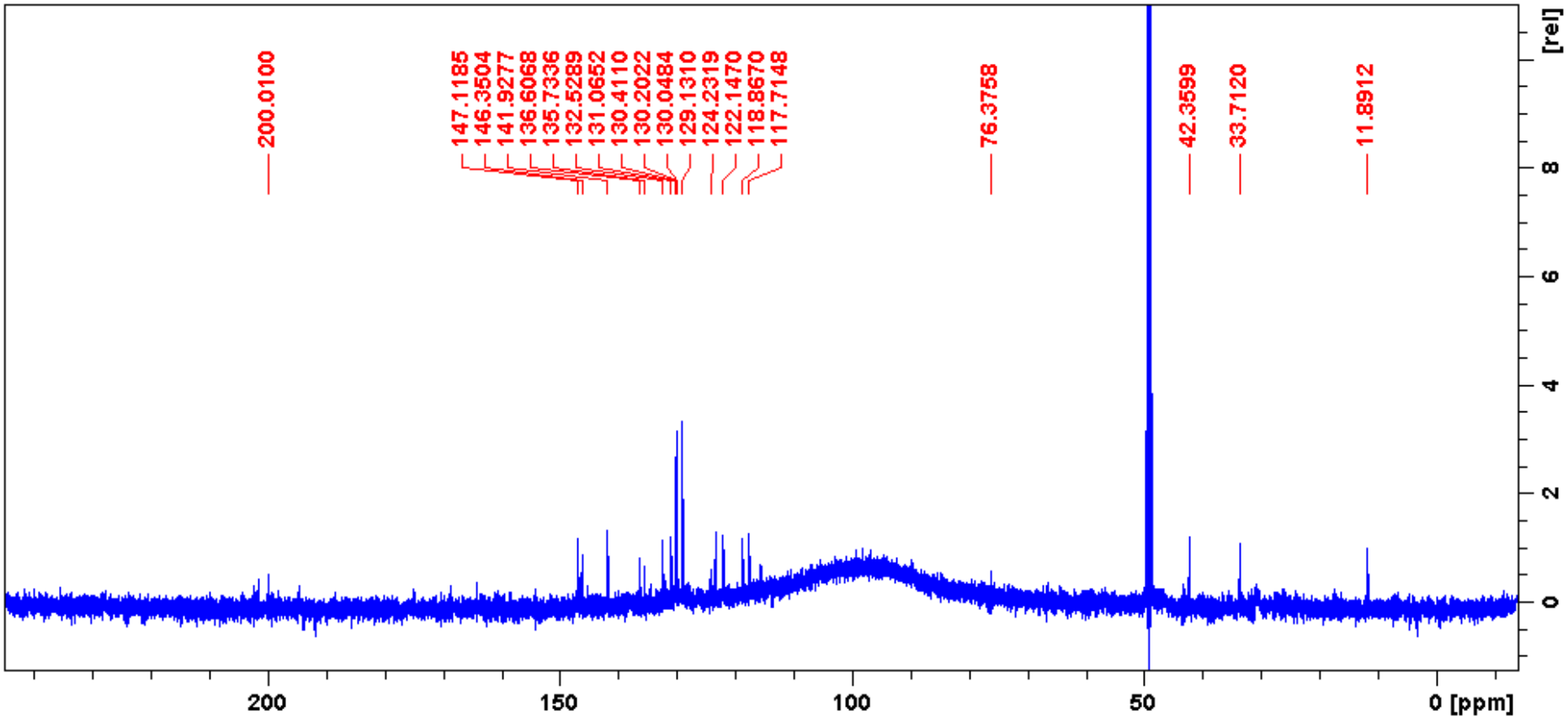
HSQC analyses of compound **7**



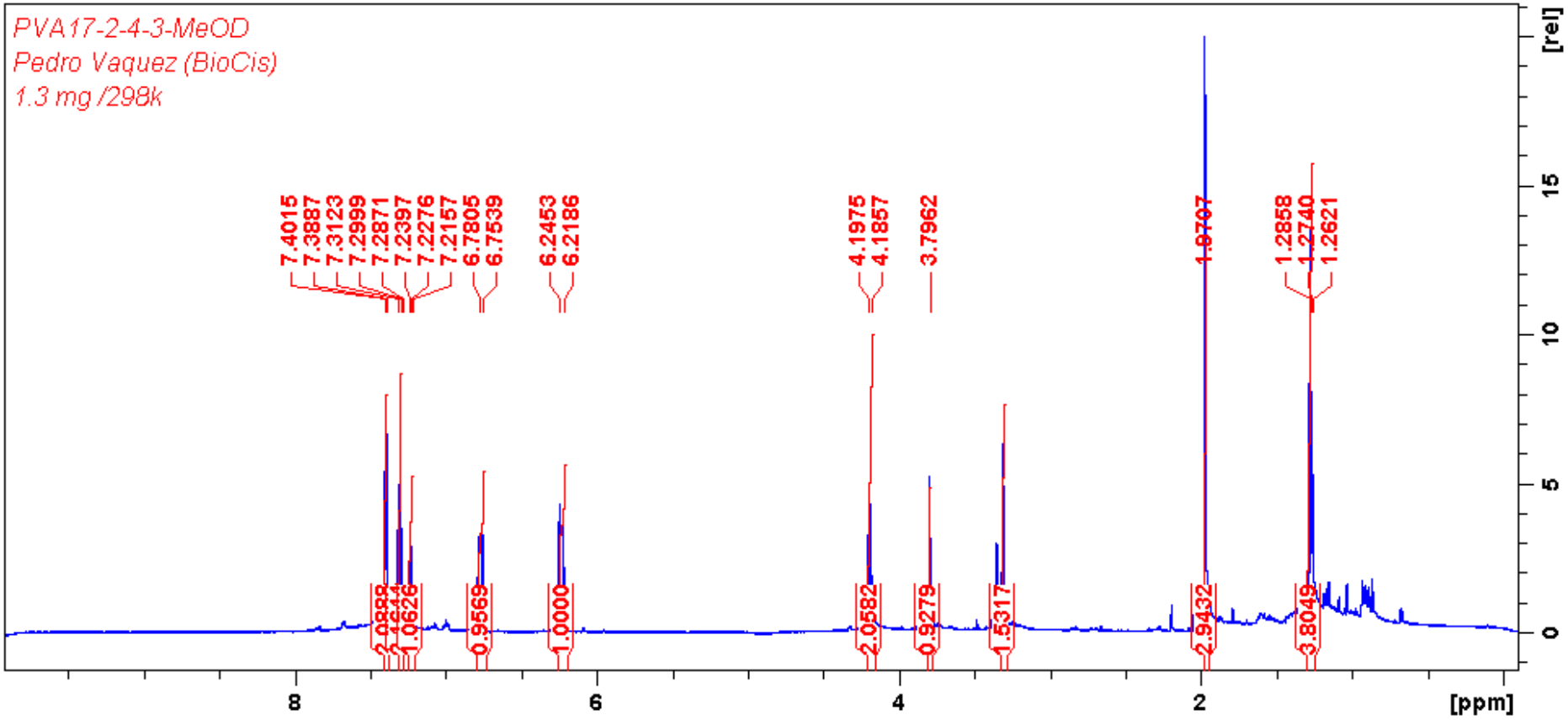
HMBC analyses of compound **7**



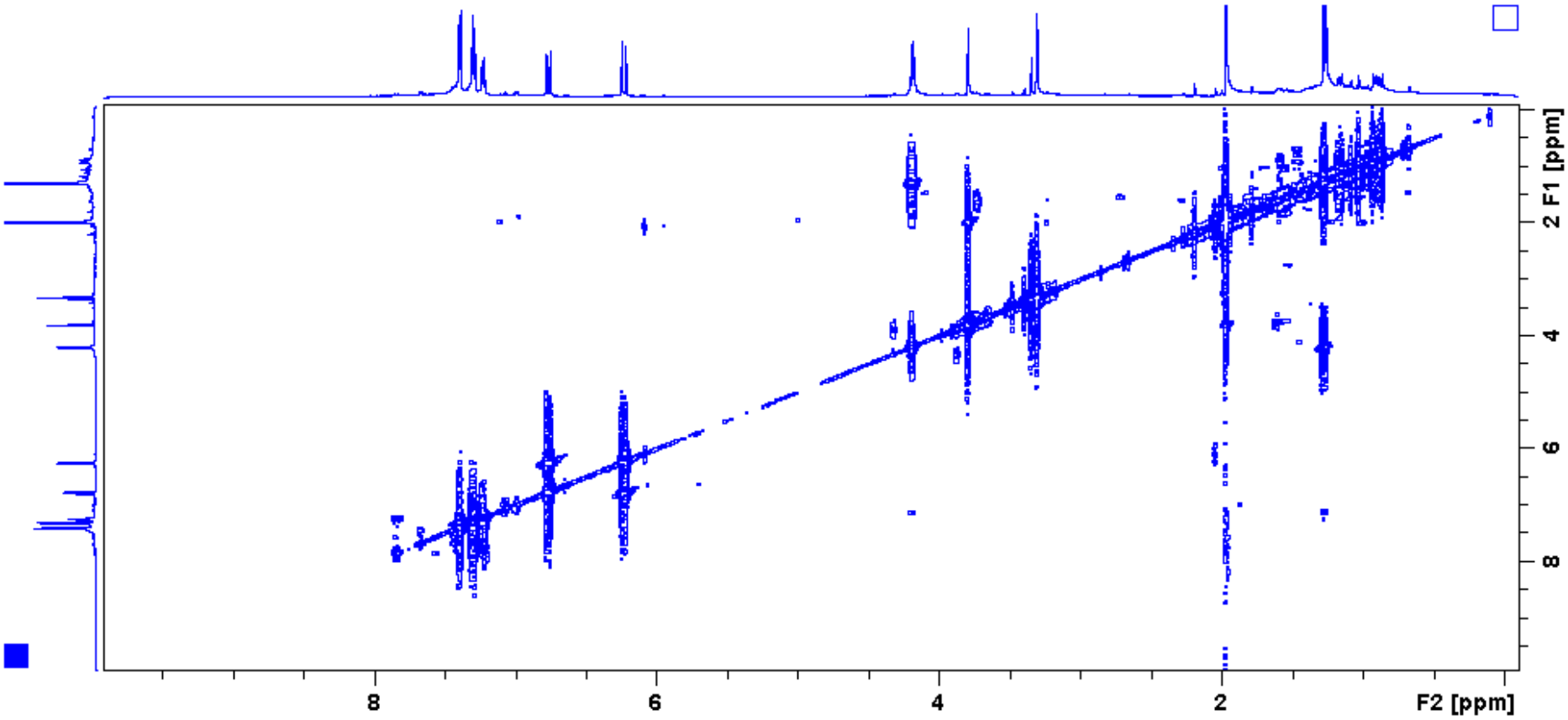
NMR carbon of compound **7**



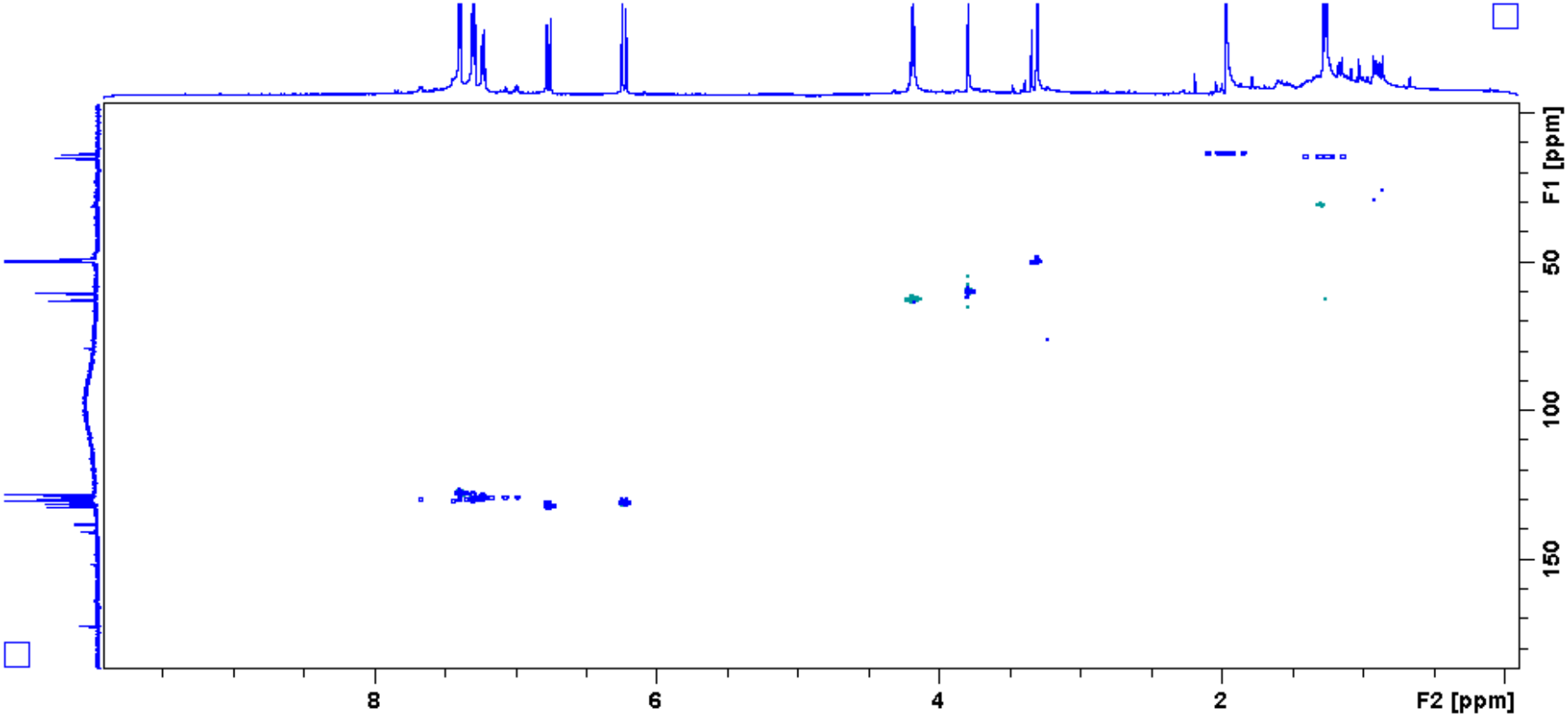
NMR proton of compound **10** in CD_3OD



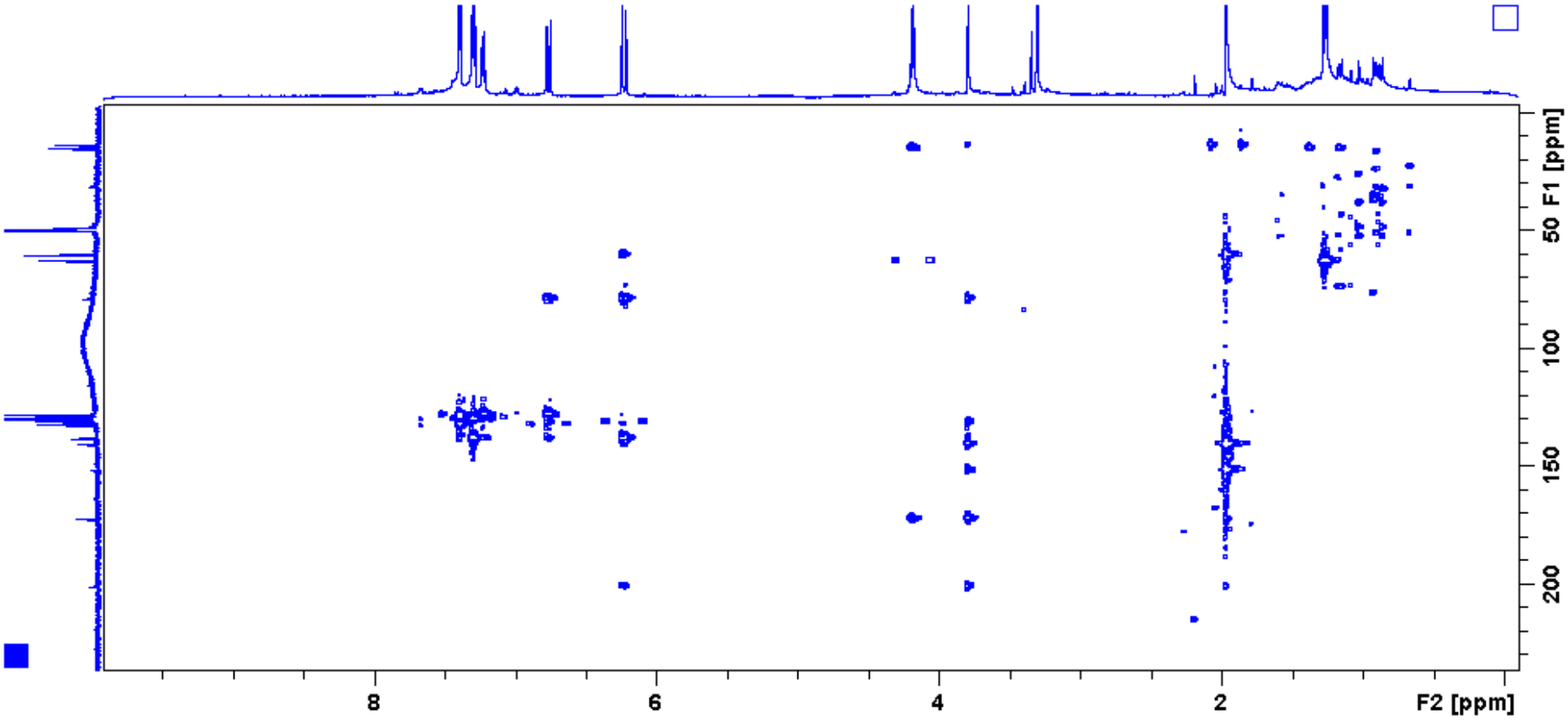
COSY analyses of compound **10**



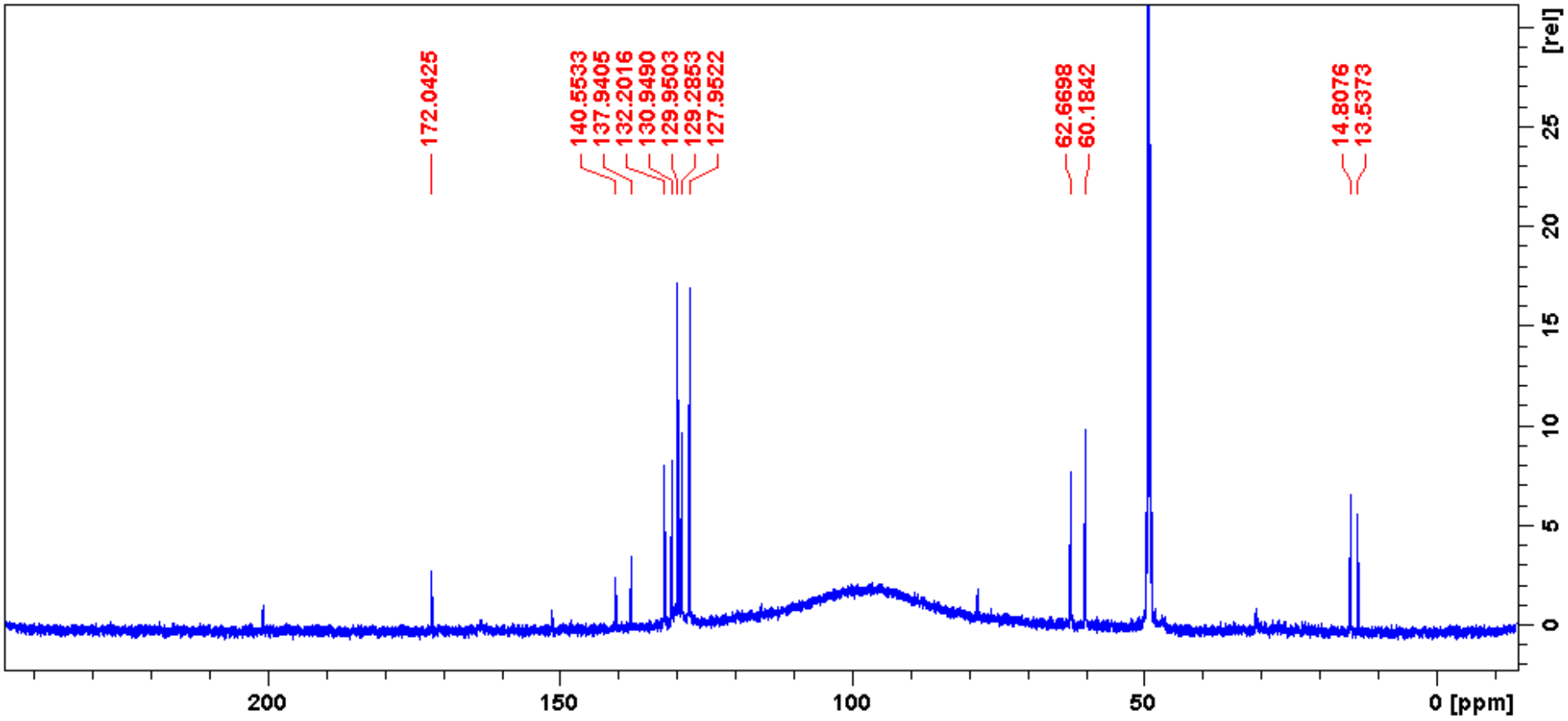
HSQC analyses of compound **10**



HMBC analyses of compound **10**



NMR proton of compound **10**



1 **4.** NMR Spectroscopic data for the isolated compound

2 NMR Spectroscopic data for the flavanones **2**-**4**, **8**, **11** and **12**.

Pos	**2** (CD_3CN)		**3** (CD_3CN)		**4** ($CDCl_3$)		**9** (CD_3OD)		**11** (CD_3OD)		**12** (CD_3OD)	
	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C
1												
2	5.51, dd (*2.8, 12.7*)	80.2	5.52, dd (*3.1, 12.7*)	79.6	5.39, dd (2.9, *12.9*)	78.9	5.46, dd (*2.4, 12.6*)	80.5	5.47, dd (*1.9, 13.0*)	80.4	5.49, dd (2.3, *12.6*)	80.2
3	a)3.14, dd (*12.7, 17.2*) b)2.83, dd (*3.2, 17.1*)	43.6	a)3.15, dd (*12.7, 17.1*) b)2.89, dd (*3.1, 17.1*)	43.7	b)3.02, dd (*13.0, 17.1*) a)2.83, dd (*3.1, 17.0*)	43.7	a)3.02, dd *(13.0, 16.4)* b)2.76, dd (*2.3, 16.3*)	46.6	a)3.03, dd (*13.0, 16.6)* b)2.76, dd (*2.2, 16.6*)	46.5	a)3.03, dd (*12.7, 16.9,*) b)2.83, dd (*2.5, 16.3*)	46.8
4		197.7		199.1		196.6		191.9		191.9		192.9
4a		103.7		105.9		103.1		106.1		106.7		106.4
5		161.2		160.0		159.4		164.6		163.9		166.0
6		106.2		111.8		102.4	6.14, s	94.6	6.23, d (*1.8*)	94.0	6.36, s	90.0
7		166.8		166.2		161.1		167.2		168.4		162.4
8	6.17, s	91.9		110.5		103.2	6.09, s	97.4	6.24, d (*1.8*)	95.1		107.2
8a		162.5		159.0		157.8		166.5		166.8		159.5?
1'		140.0		140.1		139.0		140.9		140.5		141.1
2'	7.51, d (*6.8*)	127.4	7.52, d (*7.4*)	127.3	7.45, d (*7.1*)	126.1	7.52, d (*7.2*)	127.4	7.51, d (*7.3*)	127.4	7.55, d (*7.9*)	127.3
3'	7.44, t (*7.2*)	129.7	7.44, t (*7.5*)	129.7	7.42, dd (*7.5*)	129.0	7.44, t (*7.0*)	129.8	7.44, t (*7.4*)	129.8	7.46, t (*7.5)*	130.0
4'	7.39, t (*7.1*)	129.7	7.39, t (*7.3*)	129.6	7.36, dd (*7.1*)	128.6	7.40, t (*7.3*)	129.6	7.39, t (*7.1*)	129.7	7.40, t (*7.1*)	129.7
5'	7.44, t (*7.2*)	129.7	7.44, t (7.5)	129.7	7.42, dd (*7.5*)	129.0	7.44, t (*7.0*)	129.8	7.44, t (*7.4*)	129.8	7.46, t (*7.5*)	130.0
6'	7.51, d (*6.7*)	127.4	7.52, d (*7.4*)	127.3	7.45, d (*7.1*)	126.1	7.52, d (*7.2*)	127.4	7.51, d (*7.3*)	127.4	7.55, d (*7.9*)	127.3
O-CH3	3.84, s	7)56.9	7)3.72, s	60.8			5)3.86, s	56.4	5) 3.869, s 7) 3.867, s	56.5 56.5	5)3.98, s 7)3.94, s	-56.5 -56.4
OH	12.17, s		5)12.12		5)12.25, s							
CH_3	1.94, s	6)7.1	6)2.04, s 8)2.04, s	8.6 8.1	6)2.060, s 8)2.055, s	6)7.2 8)7.7					2.06, s	8)8.2

3

1 NMR spectroscopic data for **1**, **5** and **6**.

Position	**1** (CD_3CN)		**5** ($CDCl_3$)		**6** ($CDCl_3$)	
	δ_H, mult. (*J* in Hz)[a]	δ_C[a]	δ_H, mult. (*J* in Hz)[b]	δ_C[b]	δ_H, mult. (*J* in Hz)[c]	δ_C[c]
1		135.4		135.3		137.3
2	7.70, dd (*1.9, 7.8*)	128.4	7.63, d (*6.5)*	128.5	7.68, d (*6.3)*	129.6
3	7.43, m	130.2	7.40 m	129.0	7.45, m	131.5
4	7.44, m	129.0	7.40 m	130.3	7.47, m	130.3
5	7.43, m	130.2	7.40 m	129.0	7.45, m	131.5
6	7.70, m	128.4	7.63, d (*6.5)*	128.5	7.68, d (*6.3)*	129.6
α	7.97, d (*15.6*)	128.0	7.95, d (*15.5)*	126.4	7.96, d (*15.6)*	129.3
β	7.74, d (*15.6*)	141.6	7.82, d (*15.5)*	143.2	7.74, d (*15.6)*	143.2
9		193.1		194.2		193.1
1'		105.8		109.7		107.0
2'		163.8		162.5		169.1
3'		104.9		110.2	5.98, d (*2.2)*	97.4
4'		164.1		160.7		167.1
5'	6.21, s	87.2	6.23, s	99.8	6.06, d (*2.0)*	92.8
6'		161.6		161.4		165.1
O-CH3	4)3.92, s 6)3.99, s	-55.6 -55.9	6')3.66, s	62.3	6')3.97, s	56.7
OH	2')14.03	163.8	2')OH 4')OH	162.5 160.7	2')OH 4')OH	169.1 167.1
CH_3	3')1.96, s	6.5	2.1, s	8.1	-	

2

3

1 NMR spectroscopic data for **10**

Position	**10** (CD_3OD)	
	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C
1		137.8
2	7.40, d (*7.7*)	127.9
3	7.30, dd (*7.7, 7.4*)	129.9
4	7.23, t (*7.4, 7.1*)	129.2
5	7.30, dd (*7.7, 7.4*)	129.9
6	7.40, dd (*7.7*)	127.9
7	6.77, d (*15.9*)	132.1
8	6.23, d (*15.9*)	130.9
9		200.8
2'		171.9
3'		78.6
4'		140.4
5'	3.80, s	60.0
6'		151.3
7'	4.19, m	62.5
8'	1.27, t (*7.1*)	14.9
9'	1.97; s	13.5

2

3

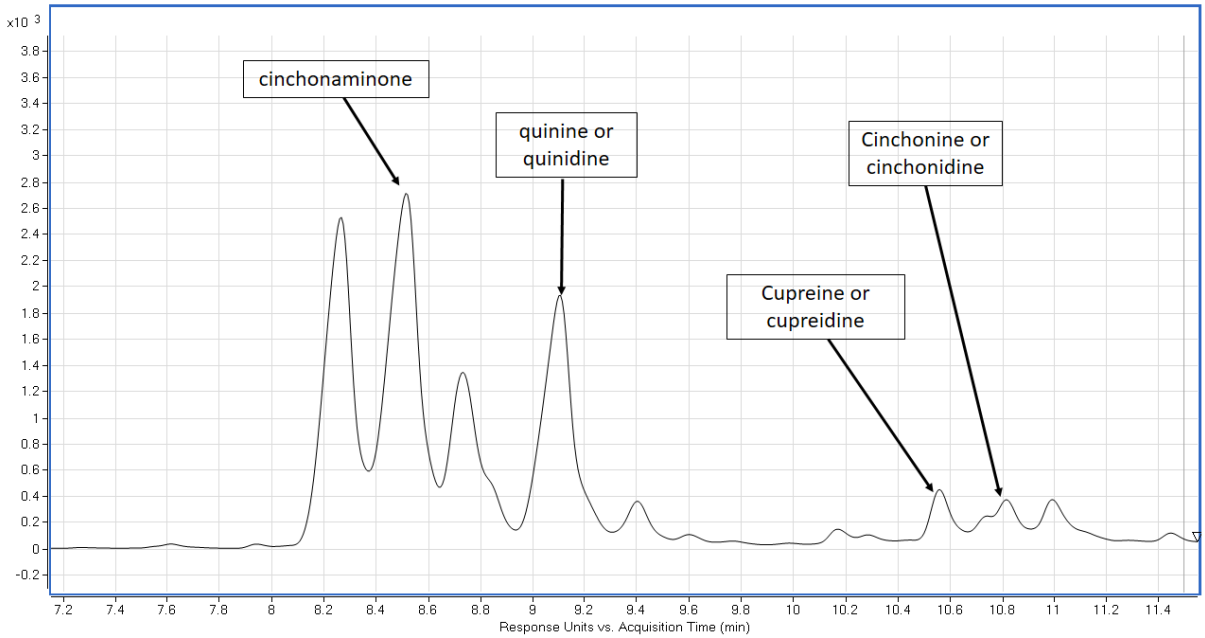
NMR spectroscopic data for **13**

Position	**13** (CD_3OD)	
	δ_H, mult. (*J* in Hz)	δ_C
1		170.5
2		136.1
3	7.81, d (*7.2*)	128.5
4	7.48, t (*7.6*)	129.8
5	7.55, dd (7.3, *7.4*)	132.9
6	7.48, dd (*7.6*)	129.8
7	7.81, d (*7.2*)	128.5
8	NH	
9	3.59, t (*7.4*)	43.2
10	2.89, t (*7.3*)	36.0
11		132.9
12	7.21, d (*8.5*)	131.1
13	6.88, d (*8.6*)	115.2
14		160.0
15	6.88, d (*8.6*)	115.2
16	7.21, d (*8.5*)	131.1
O-CH3	14)3.79, s	55.8

NMR spectroscopic data for **8**

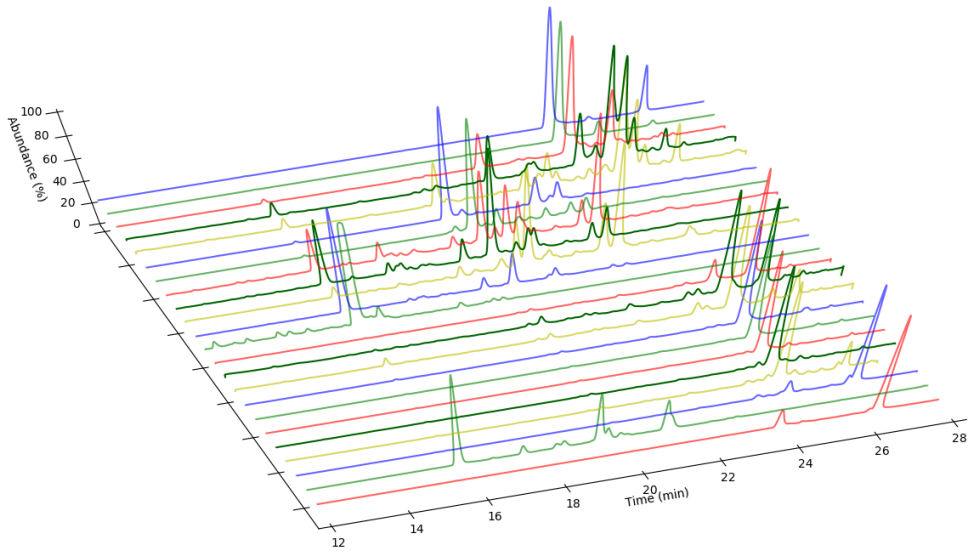
Position	**8** (CD_3OD)	
	δ_H, mult. (*J* in Hz)[a]	δ_C[a]
1		170.7
2	6.52, d (*16.0*)	119.6
3	7.71, d (*16.0*)	146.6
4		136.1
5	7.62, dd (*7.6, 4.1*)	129.5
6	7.43, dd (*4.8, 1.6*)	130.3
7	7.62, dd (*7.6, 4.1*)	129.5
8	7.43, dd (*5.18*)	131.7
9		136.1

5. HPLC-DAD (280 nm) of alkaloid extract from *Cinchona sp.*

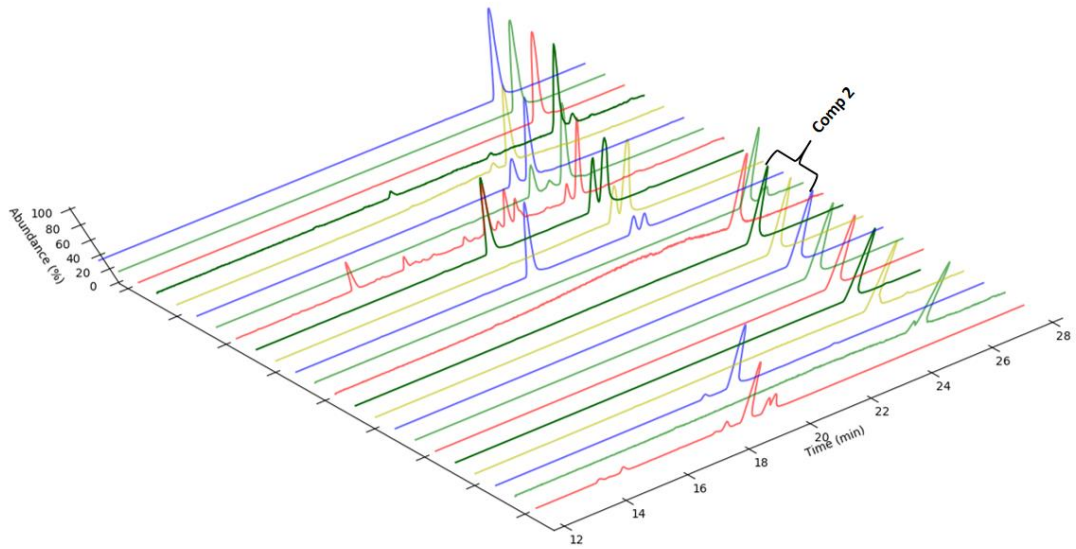


6. CPC-fractograms of cyclohexane extract from *Piper coruscans*

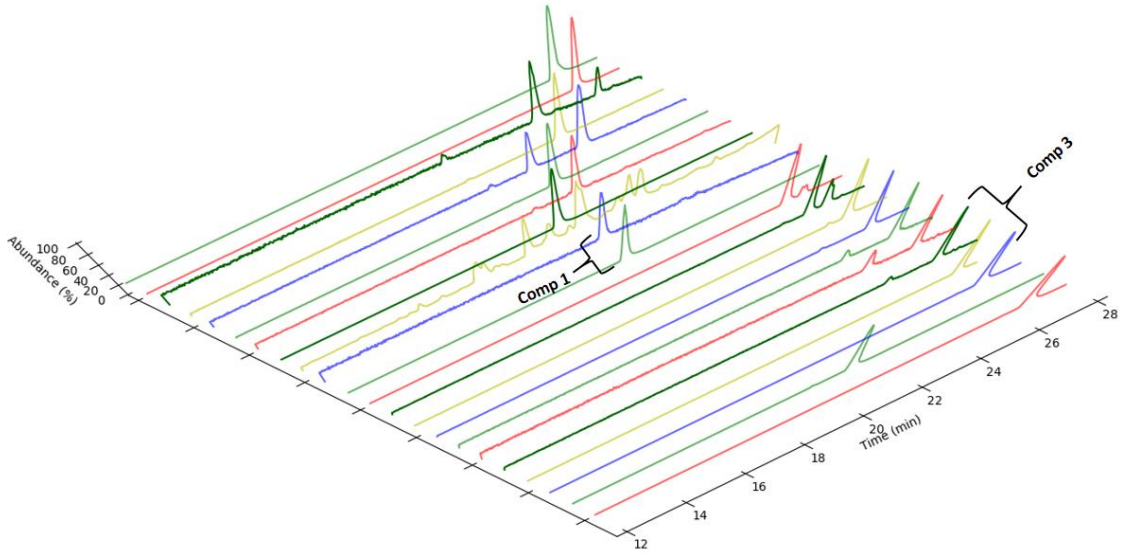
CPC-fractogram displayed of DAD at 280 nm



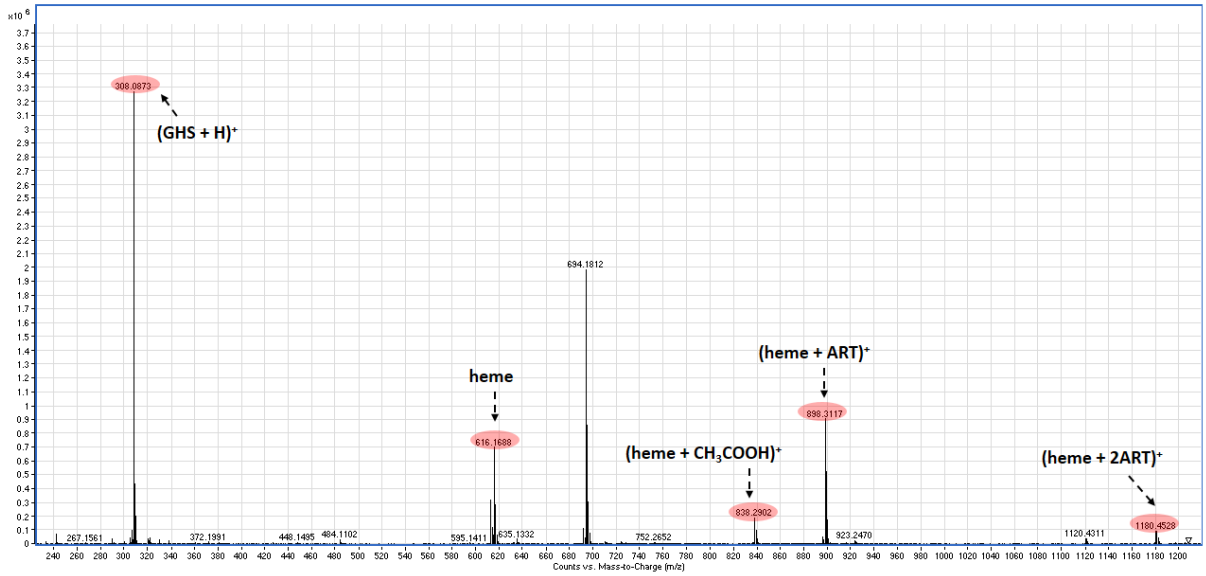
CPC-fractogram displayed of extracted-ion chromatogram (EIC) at *m/z* 285



CPC-fractogram displayed of extracted-ion chromatogram (EIC) at *m/z* 299

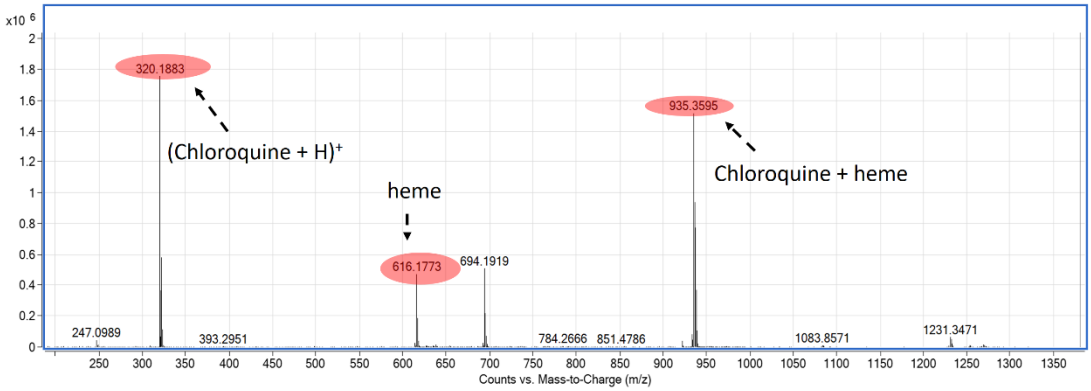


7. HRMS ESI (+) of artemisinin with heme-Fe (II)

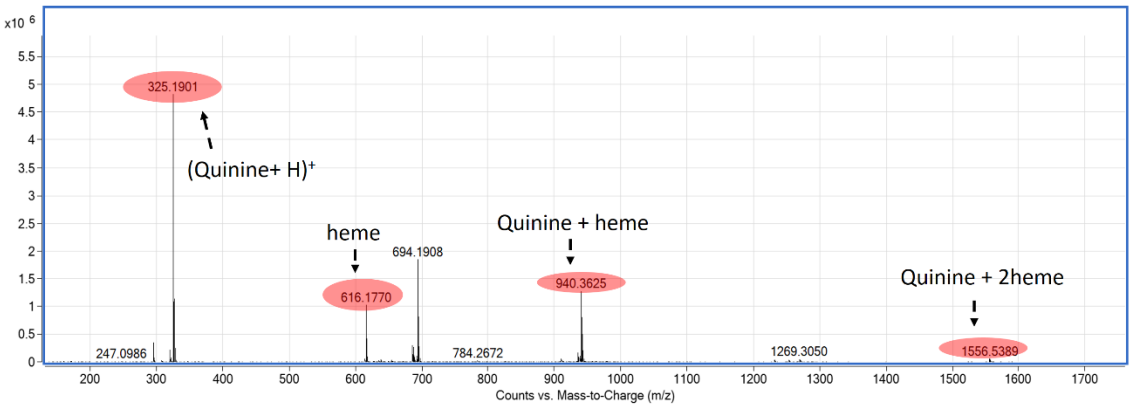


8. HRMS ESI (+) of antimalarial drugs with heme

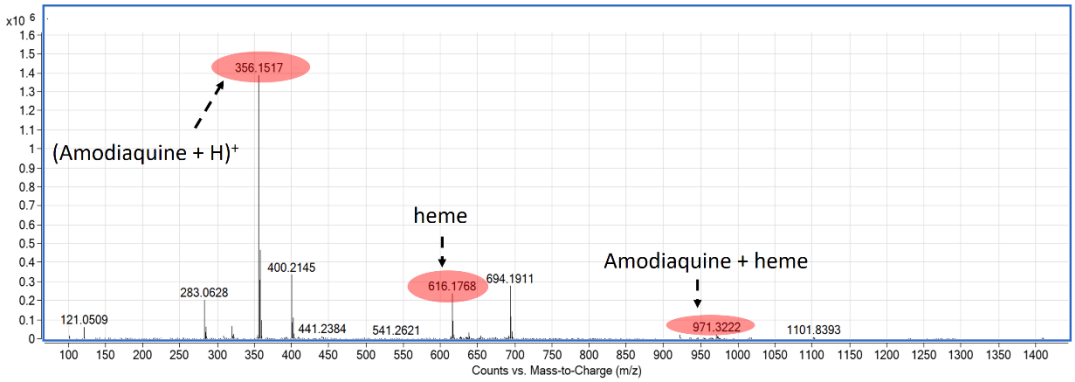
Spectrum ESI (+) of chloroquine diphosphate with heme



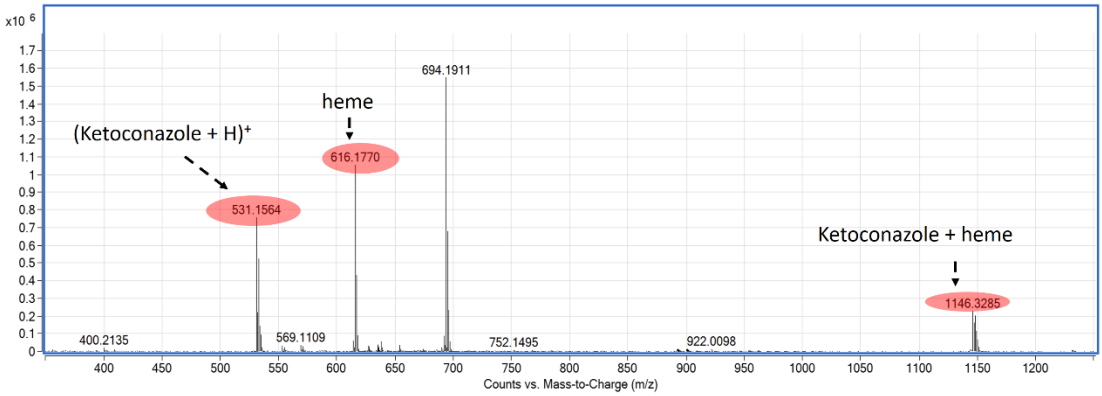
Spectrum ESI (+) of quinine with heme



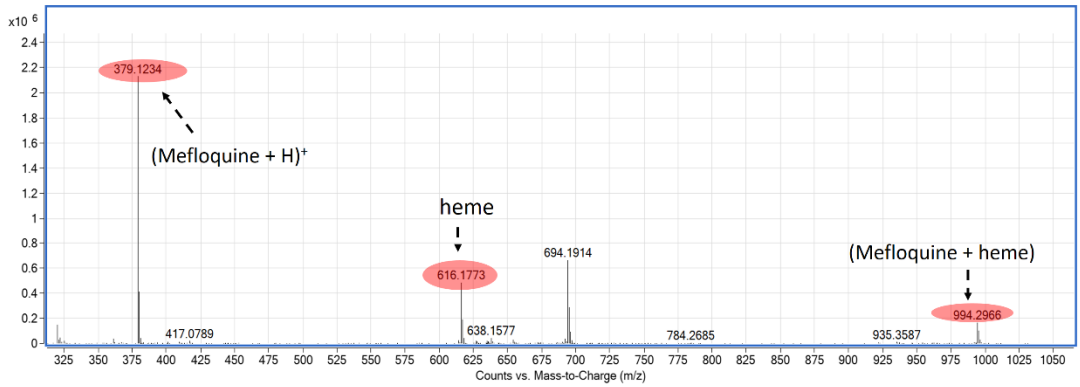
Spectrum ESI (+) of amodiaquine with heme



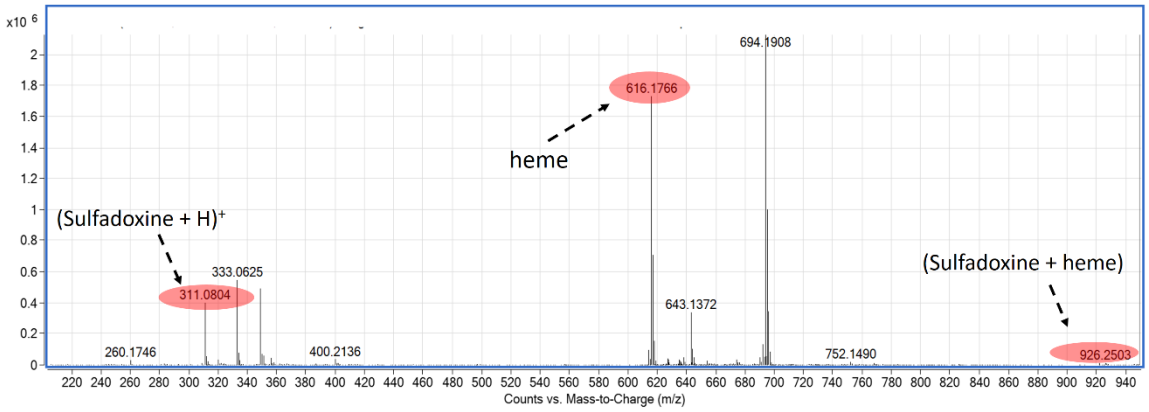
Spectrum ESI (+) of ketoconazole with heme



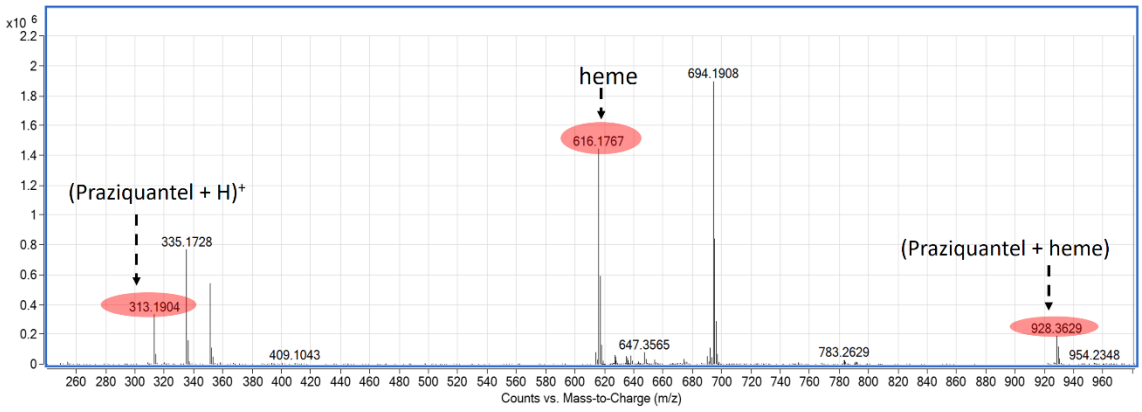
Spectrum ESI (+) of mefloquine with heme



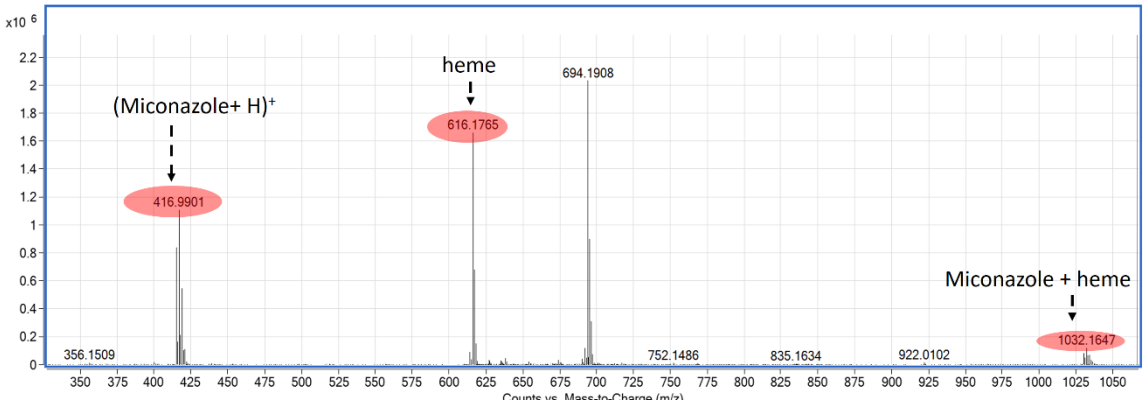
Spectrum ESI (+) of sulfadoxine with heme



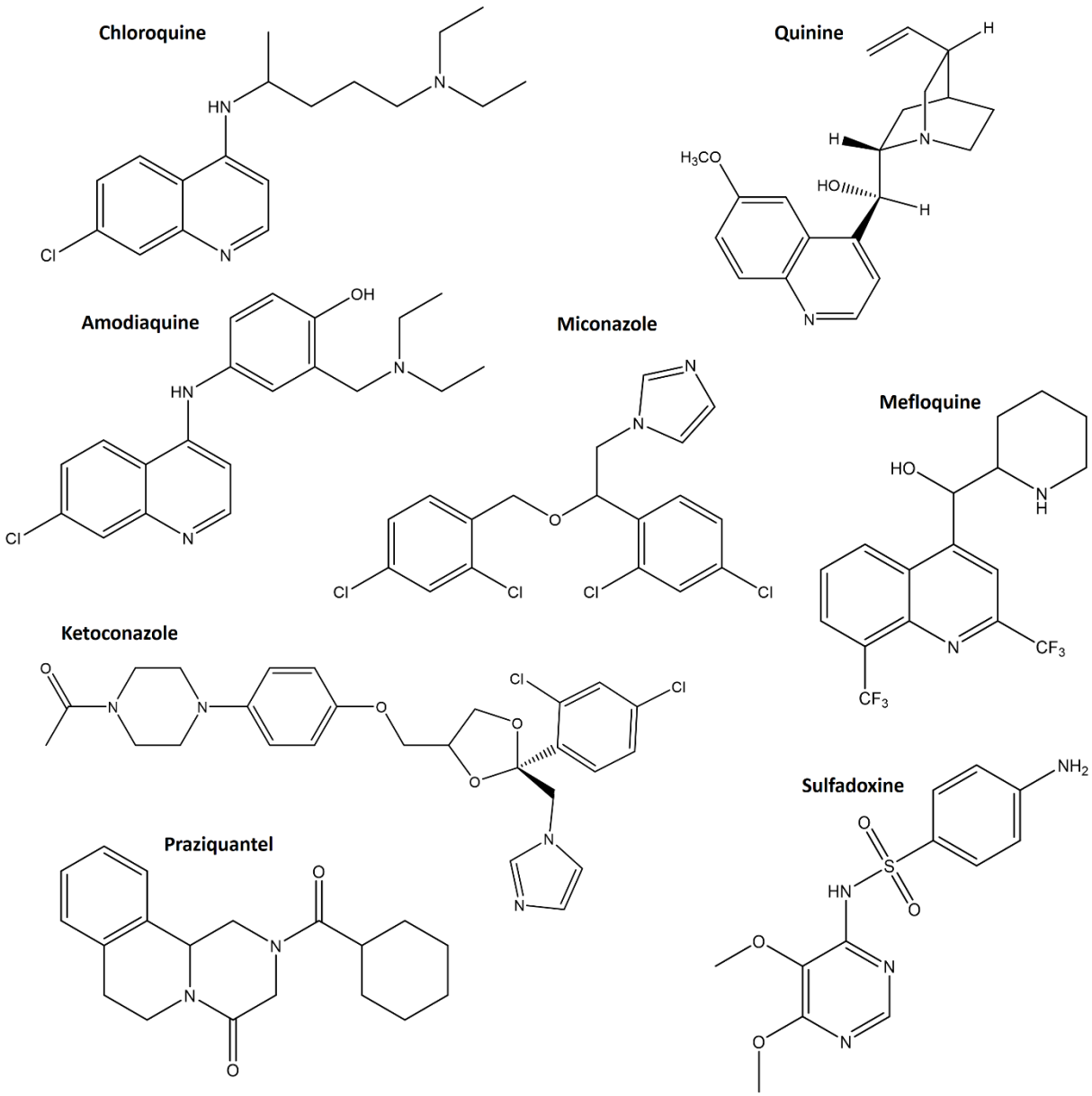
Spectrum ESI (+) of praziquantel with heme



Spectrum ESI (+) of miconazole with heme

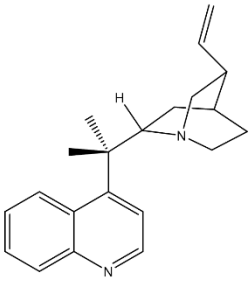


9. Structures of antimalarial drugs

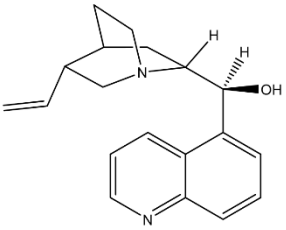


10. Structures of compounds from *Cinchona sp.*

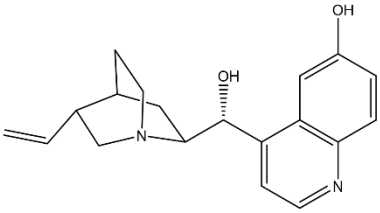
cinchonidine



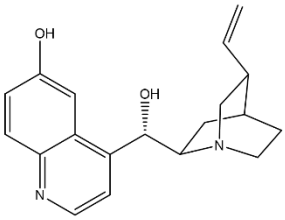
cinchonine



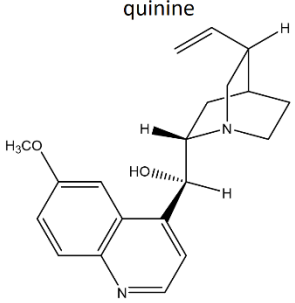
cupreine



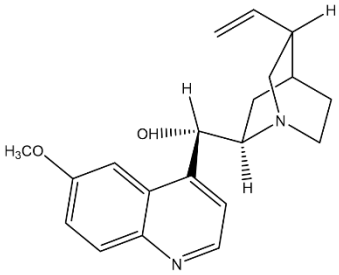
cupreidine



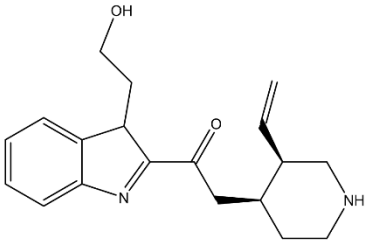
quinine



quinidine



cinchonaminone



Bibliography

(1) Adityachaudhury, N.; Das, A. K.; Choudhury, A.; Daskanungo, P. L. Aurentiacin, a New Chalcone from *Didymocarpus aurentiaca*. *Phytochemistry* **1976**, *15* (1), 229–230.

(2) Wollenweber, E.; Dietz, V. H.; Schilling, G.; Favre-Bonvin, J.; Smith, D. M. Flavonoids from Chemotypes of the Goldback Fern, *Pityrogramma triangularis*. *Phytochemistry* **1985**, *24* (5), 965–971.

(3) P., P.; Díaz, D.; C., T. A.; Joseph-Nathan, P. A Chromene an Isoprenylated Methyl Hydroxybenzoate and a C-Methyl Flavanone from the Bark of *Piper hostmannianum*. *Phytochemistry* **1987**, *26* (3), 809–811.

(4) Basnet, P.; Kadota, S.; Shimizu, M.; Xu, H.-X.; Namba, T. 2'-Hydroxymatteucinol, a New C-Methyl Flavanone Derivative from *Matteccia orientalis*; Potent Hypoglycemic Activity in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Rat. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1993**, *41* (10), 1790–1795.

(5) Resurreccion-Magno, M. H. C.; Villaseñor, I. M.; Harada, N.; Monde, K. Antihyperglycaemic Flavonoids from *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. and Perry. *Phytother. Res.* **2005**, *19* (3), 246–251.

(6) Xiao, H.; Rao Ravu, R.; Tekwani, B. L.; Li, W.; Liu, W.-B.; Jacob, M. R.; Khan, S. I.; Cai, X.; Peng, C.-Y.; Khan, I. A.; et al. Biological Evaluation of Phytoconstituents from *Polygonum hydropiper*. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31* (17), 2053–2057.

(7) Itokawa, H.; Morita, M.; Mihashi, S. Phenolic Compounds from the Rhizomes of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry* **1981**, *20* (11), 2503–2506.

(8) Bick, I.; Brown, R.; Hillis, W. Three Flavanones from Leaves of *Eucalyptus sieberi*. *Aust. J. Chem.* **1972**, *25* (2), 449–451.

(9) Mayer, R. A *β*-Hydroxychalcone from *Leptospermum scoparium*. *Planta Med* **2007**, *59* (3), 269–271.

(10) Niu, X. M.; Li, S. H.; Peng, L. Y.; Lin, Z. W.; Rao, G. X.; Sun, H. D. Constituents from *Limonia crenulata*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2001**, *3* (4), 299–311.

(11) Chatterjee, A.; Chakrabarty, M.; Kundu, A. Constituents of *Pleiospermium alatum*: Alatamide and N-Benzoyltyramine Methyl Ether. *Aust. J. Chem.* **1975**, *28* (2), 457–460.

(12) Di Iorio, N.; Filippini, G.; Mazzanti, A.; Righi, P.; Bencivenni, G. Controlling the C(sp3)–C(sp2) Axial Conformation in the Enantioselective Friedel–Crafts-Type Alkylation of β-Naphthols with Inden-1-Ones. *Org. Lett.* **2017**, *19* (24), 6692–6695.

(13) Szmant, H. H.; Nanjundiah, R. Thiol-Olefin Cooxidation Reaction. 6. A New Convenient Route to 1-Substituted Indenes. Indenone as Dienophile in Diels-Alder Reactions. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (9), 1835–1837.

3.2.3 Commentaires et discussions

L'article présenté dans ce chapitre de thèse décrit le développement d'une méthode efficace et rapide de sélection par SM-QTOF de composés potentiellement actifs sur *Plasmodium* (biodéréplication). Des caractéristiques clés ont été définies auparavant, comme : le choix d'un milieu acide (pH 5.2) mimant la vacuole digestive du parasite, la rapidité des résultats et la reproductibilité de la méthode. Suite à l'application de ces trois paramètres, d'autres ont été ajoutés comme une intensité acceptable des adduits par MS et MSMS et la visualisation rapide des adduits en réseaux moléculaires.

Cette méthode a été appliquée à la plante amazonienne *Piper coruscans,* traditionnellement utilisée comme antipaludique. Grâce à cette méthode, nous avons identifié deux chalcones (composés **1** et **6** dans l'article 5), déjà connues dans la littérature, comme les responsables de l'activité biologique. Cependant une troisième chalcone (composés **5** dans l'article 5) a été identifiée sans activité biologique mais se liant à l'hème. Des essais de *docking* sur ces trois molécules sont en cours afin d'approfondir la compréhension des mécanismes de liaison à l'hème.

En résumé nous présentons un *workflow* rapide et efficace pour détecter les molécules responsables de l'activité biologique antiplasmodiale d'un échantillon, qu'elles soient nouvelles ou non. Cette méthodologie est plus rapide que le fractionnement bioguidé classique utilisé en chimie des substances naturelles et peut aussi être couplée à des méthodologies de déréplication comme le réseau moléculaire (en utilisant la séparation chromatographique) ou la RMN.

3.2.4 Automatisation par réseaux moléculaires

Depuis peu, l'approche des réseaux moléculaires est utilisée de plus en plus fréquemment dans les laboratoires de chimie de substances naturelles autour du monde. Les améliorations de la plateforme GNPS et les ajouts des nouvelles molécules témoins dans la base de données augmentent le nombre d'utilisateurs. Cette approche est très puissante pour l'annotation des molécules, en particuliers celle détectées dans les processus de déréplication.

Dans le but d'automatiser notre *workflow* du test hème, nous avons utilisé cette approche de manière originale dans le but de visualiser des adduits dans un réseau moléculaire. Jusqu'à

présent ce genre d'approche, dans le but de trouver des adduits induits et sans étape chromatographique, n'était pas encore utilisé. Les paramètres SMSM ont dû être optimisés dans ce but, comme les énergies de collision (eV), le voltage du fragmenteur et les paramètres de sélection automatique des ions précurseurs. Afin de valider cette approche, deux mélanges simplifiés ont été utilisés de manière indépendante : un mélange des 8 principaux médicaments antipaludiques et un extrait d'alcaloïdes totaux de *Cinchona sp.* Les résultats ont été prometteurs, permettant d'observer tous les adduits attendus, liés dans un seul *cluster* partageant un fragment en commun, celui de l'hème *m/z* 616. Finalement nous avons utilisé ce workflow avec l'extrait éthanolique complexe de *Piper coruscans* obtenant la visualisation des adduits à l'hème et en minimisant les faux positifs. Cependant certains adduits observés par SM simple comme les composés antipaludiques se liant avec le dimère d'hème (par exemple pour la quinine *m/z* 1556) ou le dimère de l'hème seul, n'ont pas été visualisé sur le réseau moléculaire lors de l'analyse SMSM. Cela peut être expliqué par le fait que ces dimères sont fragiles et se fragmentent de façon précoce lors de leur entrée dans la source avant de commencer le processus SMSM.

3.2.5 Isolement ciblé par CPC

Lors du processus d'extraction liquide-liquide à partir de l'extrait éthanolique de *Piper coruscans* avec le cyclohexane et l'acétate d'éthyle nous nous sommes rendus en compte le partage des composés dans les deux phases de solvants n'était pas assez satisfaisant. Cela peut s'expliquer par le fait que les composés présents dans l'extrait ont des coefficients de partage (Kd) proche de 1 dans ces systèmes biphasiques. Comme cette caractéristique est précisément recherchée pour une bonne séparation en chromatographie à contre-courant en phase liquide, nous avons donc décidé d'utiliser la CPC comme méthode de fractionnement pour les extraits cyclohexane et acétate d'éthyle. En nous guidant par des analyses par CLHP pour suivre le partage des masses-cibles, nous avons déterminé un mélange biphasique de cinq solvants présentant une bonne sélectivité pour ces produits.

Pour le fractionnement de l'extrait cyclohexane, nous avons pu isoler en une seule étape 3 produits appartenant à la famille des flavonoïdes (composés **1**, **2** et **3** dans l'article 5). En conséquence le mélange de solvants heptane/acétate d'éthyle/butanol/méthanol/eau

(20:10:10:30:30) est satisfaisant pour l'isolement des flavonoïdes du sous-type flavanones et chalcones dans des extrais bruts. D'autre part, pour l'extrait acétate d'éthyle la CPC a été utilisée en deux fois pour avoir une meilleure séparation des composés. Néanmoins une dernière phase de séparations par HPLC préparative a été nécessaire pour isoler 10 produits supplémentaires (composés **4**-**13** dans l'article 5).

Conclusions du Chapitre 3

Pendant longtemps le test d'inhibition de cristallisation de l'hème, nommé à tort test de polymérisation et monitoré essentiellement par spectrophotométrie, a été utilisé comme un moyen de vérification *in vitro* du mécanisme d'action de certains produits actifs antiplasmodiaux. Le développement d'une méthodologie de biodéréplication par spectrométrie de masse et mimant la vacuole digestive du *Plasmodium* a été mise au point pendant cette thèse. Cette méthodologie permet d'identifier de manière rapide et précise des composés ciblant l'hème et de guider leur isolement (article 5, page 196).

Cependant plusieurs paramètres restent à croiser et à améliorer :

1) La corrélation test hème activité biologique : un ou plusieurs produits peuvent être actifs par un autre mécanisme d'action sans se lier à l'hème. À l'inverse, des faux positifs, c'est-à-dire des produits se liant à l'hème mais s'avérant inactifs, peuvent être isolés.

2) l'intégration du réseau moléculaire pour la déréplication structurale : avec le temps, le nombre de molécules décrites dans la base de données GNPS devrait augmenter et permettre d'annoter un grand nombre de molécules connues.

3) La comparaison avec d'autres méthodologies de biodéréplication. Lors de cette thèse, le test hème a été comparé à une approche en ligne découplée testée au sein du laboratoire (voir schéma dans **Annexe 5,** page 298). Pour cela, les produits d'intérêt dans l'extrait brut ont été identifiés dans un chromatogramme obtenu à l'échelle analytique (CLHP-DAD-MS), puis tous les pics montrant une résolution assez satisfaisante ont été collectés dans une plaque 96 puits. Les puits ont été mis à sécher sous un courant d'azote et les produits de chaque puit ont été mélangés avec l'hème comme décrit dans l'article 5. Les résultats montrent que les produits sont à concentration trop faible pour former les adduits, même si les produits ont été visualisés dans le spectre SM. Donc l'injection directe reste le meilleur moyen d'injection du mélange extrait-hème même si la source d'ionisation peut supprimer des adduits ou montrer des faux positifs.

Lors de cette thèse nous avons aussi appliqué cette méthode de déréplication à des extraits d'insecte, notamment *Pyrrhocoris apterus* (Pyrrhocoridae) collecté au mois de septembre 2015 à Massy, Île de France (500 g). L'extrait méthanolique (13 g) a été identifié comme le responsable de sa forte activité antiplasmodiale (IC_{50} = 80 ng/mL). Cet extrait a

montré la formation d'un seul adduit avec le test hème (*m/z* 1028), correspondant à la liaison de l'hème avec un produit à *m/z* 413 (**voir Annexe 6**, page 299). Suite à deux étapes chromatographiques de colonnes flash, une sous-fraction (12 mg) a été identifiée comme la responsable de cette l'activité biologique (IC_{50} = 10 ng/mL) et contenant par ailleurs le produit à *m/z* 413. Le produit a été ré-purifié donnant 2 mg de produit final d'apparence propre. Néanmoins les analyses RMN montrent que ce produit n'est pas assez propre pour l'élucidation structurale totale du produit (**voir Annexe** 7, page 300). Du fait de la complexité du spectre, nous avons réussi à identifier un produit majoritaire probablement de type cyclopeptididique. Dans le but de ré-isoler le produit actif, une deuxième collecte de matériel biologique a été faite en janvier 2018 à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris Sud (55 g). Les analyses CLHP-MS montrent que le produit d'intérêt ne se trouve pas dans l'extrait brut ni dans l'extrait méthanolique. L'absence du produit d'intérêt peut s'expliquer par deux hypothèses : 1) comme dans les plantes ou n'importe quel organisme, les conditions climatiques, le site de collecte, la saison, etc… peut changer la production de métabolites spécialisés ; 2) il peut s'agir d'une molécule de communication ou de défense sécrété par *P. apterus* suite à un stress biotique ou abiotique ponctuel ; 3) le produit identifié peut être produit par un ou plusieurs microorganisme saprophyte (bactérie, champignon) lié au lot d'insectes de la première collecte.

Conclusions finales et Perspectives

Lors de ce travail de thèse nous avons produit comme un des principaux résultats un recensement des plantes médicinales antiprotozoaires utilisées au Pérou et dans une grande partie de l'Amazonie en Amérique du Sud. Dans ce tableau nous pouvons remarquer que plus de 17 % des plantes n'ont jamais été rapportées comme des plantes médicinales dans la littérature. À partir de cette liste de plantes des futurs travaux de recherche pourront être envisagés. Néanmoins nous avons aussi remarqué que les résultats biologiques de certaines plantes n'ont pas été reproduits lors d'une deuxième vérification *in vitro* sur la même souche de *Plasmodium* dans un autre laboratoire.

Un autre point clé de cette thèse a été le développement une méthode de biodéréplication à visée antiplasmodiale basée sur la liaison à l'hème. Cette méthode a été illustrée par l'isolement de produits actifs de la plante *Piper coruscans*. Nous avons néanmoins remarqué une liaison de l'hème avec certaines molécules de la plante n'ayant pas d'activité antiplasmodiale. Étant donné que l'hème est une structure présente dans de nombreuses fonctions biologiques et de pathologies, il se pourrait que l'interaction de molécules avec l'hème se traduise par d'autres effets, bénéfiques ou délétères pour l'organisme.

Le postulat de mécanisme d'action des molécules antipaludéennes ne peut se réduire à la seule interaction avec l'hème. Dans le cas de l'artémisinine, où la formation d'adduits avec l'hème a été formellement démontrée, d'autres cibles ont été mises en évidence. L'exploration de ces autres cibles passe entre autre par la conception de sondes fluorescentes à partir de l'artémisinine. Nous avons contribué à l'établissement des caractéristiques physicochimiques de trois sondes d'artémisinine, en plus de leur caractérisation chimique concernant leur liaison à l'hème.

Le *workflow* utilisé pour cette biodéréplication peut aussi être envisagé pour d'autres maladies. Par exemple nous avons réalisé des essais préliminaires de biodéréplication à visée leishmanicide basée sur le mécanisme d'action principal de l'amphotéricine B (formation de pores dans la membrane parasitaire suite à une liaison à l'ergostérol). Le principe de cette méthode est basé sur l'identification de molécules d'un extrait complexe pouvant se lier à l'ergosterol. Dans un premier temps l'adduit amphotéricine B - ergostérol doit être visualisé

par SM-ESI, en injection directe à une concentration équimolaire basse. Le caractère apolaire de l'ergostérol est une difficulté supplémentaire puisqu'il n'est pas détecté en mode ESI (positif) (voir **Annexe 8** et **Annexe 9,** pages 304 et 305). Les essais préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence d'adduit amphotéricine B – ergostérol. Le mode d'ionisation APCI a également été essayé, sans résultats. Il est par ailleurs *a priori* moins adapté à l'identification d'adduits car il s'agit d'une méthode d'ionisation plus forte que l'electronébuliseur.

Il reste plusieurs points à explorer pour évaluer la faisabilité de cette approche par SM. Par exemple, envisager une modification de l'ergosterol pour le rendre plus polaire et ionisable en SM ou essayer un autre mode d'ionisation, par exemple le MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*), dans lequel la matrice contiendrait à la fois l'extrait et l'ergostérol. Un développement pourrait être la transposition d'un test de criblage basé sur une interaction mais suivi par RMN.

Bibliographie

Accardo, A., Laurent, S.A.-L., Mazarguil, H., Meyer, M., Robert, A., Meunier, B., 2007. Interaction of iron(II)-heme and artemisinin with a peptide mimic of *Plasmodium falciparum* HRP-II. Spec. Issue Mem. Edw. Stiefel 101, 1739–1747. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.04.016

Ademolue, T.W., Awandare, G.A., 2018. Evaluating antidisease immunity to malaria and implications for vaccine design. Immunology 153, 423–434. https://doi.org/10.1111/imm.12877

Adhami Hamid-Reza, Scherer Uta, Kaehlig Hanspeter, Hettich Timm, Schlotterbeck Götz, Reich Eike, Krenn Liselotte, 2013. Combination of Bioautography with HPTLC–MS/NMR: A Fast identification of acetylcholinesterase inhibitors from Galbanum. Phytochem. Anal. 24, 395–400. https://doi.org/10.1002/pca.2422

Aditya, P., Egan, E., Duraisingh, M., 2015. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. Curr. Opin. Hematol. 22, 220–226. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000135

Aebersold, R., 2003. A mass spectrometric journey into protein and proteome research. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14, 685–695. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00289-7

Aerts, C., Sunyoto, T., Tediosi, F., Sicuri, E., 2017. Are public-private partnerships the solution to tackle neglected tropical diseases? A systematic review of the literature. Health Policy 121, 745–754. https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2017.05.005

Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V.C., Roussi, F., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., 2016. Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS fragmentation for natural products dereplication. Anal. Chem. 88, 3317–3323. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04804

Altamirano-Enciso, A.J., Marzochi, M.C.A., Moreira, J.S., Schubach, A.O., Marzochi, K.B.F., 2003. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. Hist Cienc Saude-Manguinhos 10, 853–882. http://dx.doi.org/10.1590/S0104-59702003000300004

Bai, H., Gelman, D.B., Palli, S.R., 2010. Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Pest Manag. Sci. 66, 936–943. https://doi.org/10.1002/ps.1962

Baker, D.A., 2010. Malaria gametocytogenesis. Mol. Biochem. Parasitol. 172, 57–65. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019

Bandeira, N., 2007. Spectral networks: a new approach to de *novo* discovery of protein sequences and posttranslational modifications. BioTechniques 42, 687–695. https://doi.org/10.2144/000112487

Bandeira, N., Tsur, D., Frank, A., Pevzner, P.A., 2007. Protein identification by spectral networks analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 6140. https://doi.org/10.1073/pnas.0701130104

Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., Goldberg, D.E., 2002. Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 990–995. https://doi.org/10.1073/pnas.022630099

Barrett, M.P., Croft, S.L., 2012. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. Br. Med. Bull. 104, 175–196. https://doi.org/10.1093/bmb/lds031.

Bendrat, K., Berger, B.J., Cerami, A., 1995. Haem polymerization in malaria. Nature 378, 138. https://doi.org/10.1038/378138a0

Bent, S., 2008. Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation: Grand Rounds at University of California, San Francisco Medical Center. J. Gen. Intern. Med. 23, 854–859. https://doi.org/10.1007/s11606-008-0632-y

Berg, J., Timoczko, J., Stryer, L., 2002. Biochemistry. New York.

Berim, A., Gang, D.R., 2016. Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. Phytochem. Rev. 15, 363–390. https://doi.org/10.1007/s11101-015-9426-0

Beutler, J.A., Alvarado, A.B., Schaufelberger, D.E., Andrews, P., McCloud, T.G., 1990. Dereplication of phorbol bioactives: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. J. Nat. Prod. 53, 867–874. https://doi.org/10.1021/np50070a014

Bhatt, S., Weiss, D.J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K.E., Moyes, C.L., Henry, A., Eckhoff, P.A., Wenger, E.A., Briët, O., Penny, M.A., Smith, T.A., Bennett, A., Yukich, J., Eisele, T.P., Griffin, J.T., Fergus, C.A., Lynch, M., Lindgren, F., Cohen, J.M., Murray, C.L.J., Smith, D.L., Hay, S.I., Cibulskis, R.E., Gething, P.W., 2015. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature 526, 207. https://doi.org/10.1038/nature15535

Bilia, A.R., Lazari, D., Messori, L., Taglioli, V., Temperini, C., Vincieri, F.F., 2002. Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin: Its application to *Artemisia annua* constituents. Life Sci. 70, 769–778. https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01447-3

Bitzer, J., Köpcke, B., Stadler, M., Hellwig, V., Ju, Y.-M., Seip, S., Henkel, T., 2007. Accelerated dereplication of natural products, supported by reference libraries. Chim. Int. J. Chem. 61, 332–338. https://doi.org/10.2533/chimia.2007.332

Blasco, B., Leroy, D., Fidock, D.A., 2017. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. Nat. Med. 23, 917. https://doi.org/10.1038/nm.4381

Bohlmann, F., Zdero, C., 1978. New sesquiterpenes and acetylenes from *Athanasia* and *Pentzia* species. Phytochemistry 17, 1595–1599. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94650-8

Bohlmann, F., Zdero, C., 1972. Zwei neue sesquiterpen-lactone aus lidbeckia pectinata berg. und pentzia elegans DC. Tetrahedron Lett. 13, 621–624. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)84393-8

Böröczky Katalin, Laatsch Hartmut, Wagner-Döbler Irene, Stritzke Katja, Schulz Stefan, 2006. Cluster analysis as selection and dereplication tool for the identification of new natural

compounds from large sample sets. Chem. Biodivers. 3, 622–634. https://doi.org/10.1002/cbdv.200690065

Böttcher Thomas, Sieber Stephan A., 2008. β-Lactones as privileged structures for the active-site labeling of versatile bacterial enzyme classes. Angew. Chem. Int. Ed. 47, 4600–4603. https://doi.org/10.1002/anie.200705768

Bruneton, J., 2016. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 5th ed. Lavoisier, Paris.

Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V., Priotto, G., 2017. Human African trypanosomiasis. The Lancet 390, 2397–2409. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6

Bussmann, R.W., Douglas, S., 2014. Two decades of ethnobotanical research in southern Ecuador and northern Peru. Ethnobiol. Conserv. 1–50. http://dx.doi.org/10.15451/ec2014-6-3.2-1-50

Butykai, A., Orbán, A., Kocsis, V., Szaller, D., Bordács, S., Tátrai-Szekeres, E., Kiss, L.F., Bóta, A., Vértessy, B.G., Zelles, T., Kézsmárki, I., 2013. Malaria pigment crystals as magnetic micro-rotors: key for high-sensitivity diagnosis. Sci. Rep. 3, 1431. https://doi.org/doi: 10.1038/srep01431.

Cabieses, F., 1993. Apuntes de Medicina Tradicional: la racionalizacion de lo irracional, 1. AB, Lima-Perú.

Calleri, E., Ceruti, S., Cristalli, G., Martini, C., Temporini, C., Parravicini, C., Volpini, R., Daniele, S., Caccialanza, G., Lecca, D., Lambertucci, C., Trincavelli, M.L., Marucci, G., Wainer, I.W., Ranghino, G., Fantucci, P., Abbracchio, M.P., Massolini, G., 2010. Frontal affinity chromatography−Mass Spectrometry useful for characterization of new ligands for GPR17 receptor. J. Med. Chem. 53, 3489–3501. https://doi.org/10.1021/jm901691y

Carnevale Neto, F., Pilon, A.C., Selegato, D.M., Freire, R.T., Gu, H., Raftery, D., Lopes, N.P., Castro-Gamboa, I., 2016. Dereplication of natural products using GC-TOF Mass Spectrometry: Improved metabolite identification by spectral deconvolution ratio analysis. Front. Mol. Biosci. 3, 59. https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00059

CDC, 2018. Malaria.

CDC, 2013. Parasites - Leishmaniasis: Epidemiology & Risk Factors.

CDC, 2012. Parasites - African Trypanosomiasis: Epidemiology & Risk Factors.

Chakravarty, J., Sundar, S., 2010. Drug Resistance in Leishmaniasis. J. Glob. Infect. Dis. 2, 167–176. https://doi.org/10.4103/0974-777X.62887

Chatelain, E., 2014. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. J. Biomol. Screen. 20, 22–35. https://doi.org/10.1177/1087057114550585

Chen Fan, Gülbakan Basri, Weidmann Simon, Fagerer Stephan R., Ibáñez Alfredo J., Zenobi Renato, 2015. Applying mass spectrometry to study non-covalent biomolecule complexes. Mass Spectrom. Rev. 35, 48–70. https://doi.org/10.1002/mas.21462

Chen, H.-W., Wei, B.-J., He, X.-H., Liu, Y., Wang, J., 2015. Chemical components and cardiovascular activities of *Valeriana spp*. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015, 11. http://dx.doi.org/10.1155/2015/947619

Choi, A.M., Alam, J., 1996. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15, 9–19. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.15.1.8679227

Chugh, M., Sundararaman, V., Kumar, S., Reddy, V.S., Siddiqui, W.A., Stuart, K.D., Malhotra, P., 2013. Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 5392. https://doi.org/10.1073/pnas.1218412110

Clary, D., Orr, B., 1997. Optical, Electric and Magnetic Properties of Molecules: A Review of the Work of A.D. Buckingham, 1st Edition. ed. Elsevier, Amsterdam.

Clos, L.J., Jofre, M.F., Ellinger, J.J., Westler, W.M., Markley, J.L., 2013. NMRbot: Python scripts enable high-throughput data collection on current Bruker BioSpin NMR spectrometers. Metabolomics 9, 558–563. https://doi.org/10.1007/s11306-012-0490-9

Clyde, D.F., 1974. Treatment of drug-resistant malaria in man. Bull. World Health Organ. 50, 243–249.

Cook, G.C., Zumla, A., 2003. Manson's Tropical Diseases, Twenty-first. ed. Elsevier, London.

Crosnier, C., Bustamante, L.Y., Bartholdson, S.J., Bei, A.K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D.P., Duraisingh, M.T., Rayner, J.C., Wright, G.J., 2011. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. Nature 480, 534. https://doi.org/10.1038/nature10606.

De Kloe, G.E., Kool, J., van Elk, R., van Muijlwijk-Koezen, J.E., Smit, A.B., Lingeman, H., Irth, H., Niessen, W.M.A., de Esch, I.J.P., 2011. Online parallel fragment screening and rapid hit exploration for nicotinic acetylcholine receptors. MedChemComm 2, 590–595. https://doi.org/10.1039/C1MD00031D

de Vries, H.J.C., Reedijk, S.H., Schallig, H.D.F.H., 2015. Cutaneous Leishmaniasis: Recent developments in diagnosis and management. Am. J. Clin. Dermatol. 16, 99–109. https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z

De-la-Cruz, H., Vilcapoma, G., Zevallos, P.A., 2007. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. J. Ethnopharmacol. 111, 284–294. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.018

Desmarchelier, C., Gurni, A., Ciccia, G., Giulietti, A.M., 1996. Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). J. Ethnopharmacol. 52, 45–51. https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01390-6

Didwania, N., Shadab, M., Sabur, A., Ali, N., 2017. Alternative to chemotherapy—The unmet demand against Leishmaniasis. Front. Immunol. 8, 1779. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01779

DNDi, 2017. Drugs for Neglected Diseases Initiave: about Chagas Disease.

Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N.J., 2009. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. N. Engl. J. Med. 361, 455–467. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859

Du, X., Zeisel, S.H., 2013. Spectral deconvolution for Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based metabolomics: Current status and future perspectives. Comput. Struct. Biotechnol. J. 4. https://doi.org/10.5936/csbj.201301013

Dufour, D.L., 1990. Use of tropical rainforests by native Amazonians. BioScience 40, 652–659. https://doi.org/10.2307/1311432

Ecker, A., Lehane, A.M., Clain, J., Fidock, D.A., 2012. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. Trends Parasitol. 28, 504–514. https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.002

Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., van Goethem, I.D.A., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., Krishna, S., 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. Nature 424, 957. https://doi.org/10.1038/nature01813

Egan, T.J., 2008. Haemozoin formation. Mol. Biochem. Parasitol. 157, 127–136. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.005

Eggleson, K.K., Duffin, K.L., Goldberg, D.E., 1999. Identification and Characterization of Falcilysin, a Metallopeptidase Involved in Hemoglobin Catabolism within the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem. 274, 32411–32417. https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32411

Engwerda, C.R., Minigo, G., Amante, F.H., McCarthy, J.S., 2012. Experimentally induced blood stage malaria infection as a tool for clinical research. Trends Parasitol. 28, 515–521. https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.09.001

Estevez, Y., Castillo, D., Pisango, M.T., Arevalo, J., Rojas, R., Alban, J., Deharo, E., Bourdy, G., Sauvain, M., 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. J. Ethnopharmacol. 114, 254–259. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.007.

Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S., Casati, P., 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front. Plant Sci. 3, 222. https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222

Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., Whitehouse, C., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 246, 64. https://doi.org/10.1126/science.2675315

Fenn, J.B., 2003. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel Lecture). Angew. Chem. Int. Ed. 42, 3871–3894. https://doi.org/10.1002/anie.200300605

Ferrer, J.-L., Austin, M.B., Stewart, C., Noel, J.P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Struct. Biol. 46, 356–370. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.009

Fink, T., Reymond, J.-L., 2007. Virtual exploration of the chemical universe up to 11 atoms of C, N, O, F: Assembly of 26.4 Million structures (110.9 Million Stereoisomers) and analysis for new ring systems, stereochemistry, physicochemical properties, compound classes, and drug discovery. J. Chem. Inf. Model. 47, 342–353. https://doi.org/10.1021/ci600423u

Fitch, C.D., 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. Life Sci. 74, 1957–1972. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.003

Fitch, C.D., Cai, G., Chen, Y.-F., Shoemaker, J.D., 1999. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. 1454, 31–37. https://doi.org/10.1016/S0925-4439(99)00017-4

Flannery, E.L., Chatterjee, A.K., Winzeler, E.A., 2013. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. Nat. Rev. Microbiol. 11, 849. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3138

Foley, M., Tilley, L., 1998. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. Pharmacol. Ther. 79, 55–87. https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00012-6

Fong, K.Y., Wright, D.W., 2013. Hemozoin and antimalarial drug discovery. Future Med. Chem. 5, 1437–1450. https://doi.org/10.4155/fmc.13.113

Fox, A.E., Alcover, C., Evanno, L., Maciuk, A., Litaudon, M., Duplais, C., Bernadat, G., Gallard, J.-F., Jullian, J.-C., Mouray, E., Grellier, P., Loiseau, P.M., Pomel, S., Poupon, E., Champy, P., Beniddir, M.A., 2017. Revisiting previously investigated plants: A Molecular Networking-Based study of *Geissospermum laeve*. J. Nat. Prod. 80, 1007–1014. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01013

Francis, S.E., Sullivan, D.J., Goldberg, and D.E., 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Annu. Rev. Microbiol. 51, 97–123. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.97

Frisvad, J.C., 1989. The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. Bot. J. Linn. Soc. 99, 81–95. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1989.tb00393.x

Fulton, J.., Flewett, T.., 1956. The relation of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium knowlesi* to their respective red-cell hosts. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 50, 150–156. https://doi.org/10.1016/0035-9203(56)90076-1

Gaudencio, S.P., Pereira, F., 2015. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. Nat. Prod. Rep. 32, 779–810. https://doi.org/10.1039/C4NP00134F

gbif, 2018a. *Pentzia monodiana* Maire.

gbif, 2018b. gbif.org.

Ghidelli-Disse, S., Lafuente-Monasterio, M.J., Waterson, D., Witty, M., Younis, Y., Paquet, T., Street, L.J., Chibale, K., Gamo-Benito, F.J., Bantscheff, M., Drewes, G., 2014. Identification of *Plasmodium* PI4 kinase as target of MMV390048 by chemoproteomics. Malar. J. 13, P38. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-S1-P38

Ghorbani, M., Farhoudi, R., 2018. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? Drug Des. Devel. Ther. 12, 25–40. https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521

Giera, M., Heus, F., Janssen, L., Kool, J., Lingeman, H., Irth, H., 2009. Microfractionation revisited: A 1536 well high resolution screening assay. Anal. Chem. 81, 5460–5466. https://doi.org/10.1021/ac900622b

Gligorijevic, B., Bennett, T., McAllister, R., Urbach, J.S., Roepe, P.D., 2006. Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 2. Altered vacuolar

volume regulation in drug resistant malaria. Biochemistry 45, 12411–12423. https://doi.org/10.1021/bi0610348

Goldberg, D.E., 2005. Hemoglobin degradation. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 295, 275–291. https://doi.org/10.1007/3-540-29088-5_11

Goldberg, D.E., Slater, A.F., Cerami, A., Henderson, G.B., 1990. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 2931. https://doi.org/10.1073/pnas.87.8.2931

Grzelak, E.M., Hwang, C., Cai, G., Nam, J.-W., Choules, M.P., Gao, W., Lankin, D.C., McAlpine, J.B., Mulugeta, S.G., Napolitano, J.G., Suh, J.-W., Yang, S.H., Cheng, J., Lee, H., Kim, J.-Y., Cho, S.-H., Pauli, G.F., Franzblau, S.G., Jaki, B.U., 2016. Bioautography with TLC-MS/NMR for rapid discovery of anti-tuberculosis lead compounds from natural sources. ACS Infect. Dis. 2, 294–301. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00150

Gu Jian-Qiao, Wang Yuehong, Franzblau Scott G., Montenegro Gloria, Timmermann Barbara N., 2005. Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS. Phytochem. Anal. 17, 102–106. https://doi.org/10.1002/pca.892

Hadjittofis, E., Das, S.C., Zhang, G.G.Z., Heng, J.Y.Y., 2017. Chapter 8 - Interfacial Phenomena, in: Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition). Academic Press, Boston, pp. 225–252. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00008-X

Han, X., Aslanian, A., Yates, J.R., 2008. Mass Spectrometry for proteomics. Curr. Opin. Chem. Biol. 12, 483–490. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024

Hanka, L.J., Kuentzel, S.L., Martin, D.G., Wiley, P.F., Neil, G.L., 1978. Detection and Assay of Antitumor Antibiotics, in: Carter, S.K., Umezawa, H., Douros, J., Sakurai, Y. (Eds.), Antitumor Antibiotics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 69–76. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81219-4_7

Hansen, M.E., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., 2005. X-Hitting: An algorithm for novelty detection and dereplication by UV spectra of complex mixtures of natural products. Anal. Chem. 77, 6805–6817. https://doi.org/10.1021/ac040191e

Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M., 2006. Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. J. Ethnopharmacol. 107, 157–160. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.035

Hempelmann, E., Motta, C., Hughes, R., Ward, S.A., Bray, P.G., 2003. *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? Trends Parasitol. 19, 23–26. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00011-9

Hensley, P., 1996. Defining the structure and stability of macromolecular assemblies in solution: the re-emergence of analytical ultracentrifugation as a practical tool. Structure 4, 367–373. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00042-1

Hilton, G.R., Benesch, J.L.P., 2012. Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry. J. R. Soc. Interface 9, 801. https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0823

Hira, P.R., Husein, S.F., 1979. Some transfusion-induced parasitic infections in Zambia. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 23, 436–444.

Hoang, A.N., Ncokazi, K.K., de Villiers, K.A., Wright, D.W., Egan, T.J., 2010. Crystallization of synthetic haemozoin ([small beta]-haematin) nucleated at the surface of lipid particles. Dalton Trans. 39, 1235–1244. https://doi.org/10.1039/B914359A

Hobza, P., Muller-Dethlefs, K., 2009. Non-Covalent Interactions, Theoretical and Computational Chemistry Series. The Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781847559906

Hoffman, R., 2004. Organic Chemistry, Second Edition. ed. Wiley, New Jersey.

Hofstadler, S.A., Sannes-Lowery, K.A., 2007. Interrogation of Noncovalent Complexes by ESI-MS: A Powerful Platform for High Throughput Drug Discovery, in: Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Wiley-Blackwell, pp. 321–338. https://doi.org/10.1002/9783527610907.ch10

Hofstadler, S.A., Sannes-Lowery, K.A., 2006. Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 585. http://dx.doi.org/10.1038/nrd2083

Hook, D.J., Pack, E.J., Yacobucci, J.J., Guss, J., 1997. Approaches to automating the dereplication of bioactive natural products—The key step in high throughput screening of bioactive materials from natural sources. J. Biomol. Screen. 2, 145–152. https://doi.org/10.1177/108705719700200304

Hostettmann, K., Marston, A., Wolfender, J.-L., 2005. Strategy in the search for new lead compounds and drugs from plants. Chimia 59, 291–294.

Hotez, P.J., Alvarado, M., Basáñez, M.-G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S.J., Brown, A.S., Buckle, G., Budke, C.M., Carabin, H., Coffeng, L.E., Fèvre, E.M., Fürst, T., Halasa, Y.A., Jasrasaria, R., Johns, N.E., Keiser, J., King, C.H., Lozano, R., Murdoch, M.E., O'Hanlon, S., Pion, S.D.S., Pullan, R.L., Ramaiah, K.D., Roberts, T., Shepard, D.S., Smith, J.L., Stolk, W.A., Undurraga, E.A., Utzinger, J., Wang, M., Murray, C.J.L., Naghavi, M., 2014. The global burden of disease study 2010: Interpretation and implications for the neglected tropical diseases. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e2865. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865

House, J.E., House, K.A., 2016. Chapter 4 - Ionic Bonding, Crystals, and Intermolecular Forces, in: Descriptive Inorganic Chemistry (Third Edition). Academic Press, Boston, pp. 47–66. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804697-5.00004-X

Hubert, J., Chollet, S., Purson, S., Reynaud, R., Harakat, D., Martinez, A., Nuzillard, J.-M., Renault, J.-H., 2015. Exploiting the complementarity between dereplication and domputer-assisted structure elucidation for the chemical profiling of natural cosmetic ingredients: *Tephrosia purpurea* as a case study. J. Nat. Prod. 78, 1609–1617. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00174

Hubert, J., Nuzillard, J.-M., Purson, S., Hamzaoui, M., Borie, N., Reynaud, R., Renault, J.-H., 2014. Identification of natural metabolites in mixture: A pattern recognition strategy based on 13C NMR. Anal. Chem. 86, 2955–2962. https://doi.org/10.1021/ac403223f

Hubert, J., Nuzillard, J.-M., Renault, J.-H., 2017. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? Phytochem. Rev. 16, 55–95. https://doi.org/10.1007/s11101-015-9448-7

Hunter, C.A., Lawson, K.R., Perkins, J., Urch, C.J., 2001. Aromatic interactions. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 651–669. https://doi.org/10.1039/B008495F

Hunter, C.A., Sanders, J.K.M., 1990. The nature of .pi.-.pi. interactions. J. Am. Chem. Soc. 112, 5525–5534. https://doi.org/10.1021/ja00170a016

Huskey, S.-E.W., Zhu, C., Fredenhagen, A., Kühnöl, J., Luneau, A., Jian, Z., Yang, Z., Miao, Z., Yang, F., Jain, J.P., Sunkara, G., Mangold, J.B., Stein, D.S., 2016. KAE609 (Cipargamin), a enw Spiroindolone agent for the treatment of malaria: Evaluation of the absorption, distribution, metabolism, and excretion of a single oral 300-mg dose of [^{14}C]KAE609 in healthy male Subjects. Drug Metab. Dispos. 44, 672. https://doi.org/10.1124/dmd.115.069187

Huy, N.T., Chi, P.L., Nagai, J., Dang, T.N., Mbanefo, E.C., Ahmed, A.M., Long, N.P., Thoa, L.T.B., Hung, L.P., Titouna, A., Kamei, K., Ueda, H., Hirayama, K., 2017. High-Throughput Screening and prediction model building for novel hemozoin inhibitors using physicochemical properties. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e01607-16. https://doi.org/10.1128/AAC.01607-16

Ingkaninan, K., de Best, C.M., van der Heijden, R., Hofte, A.J.P., Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Greef, J., Verpoorte, R., 2000. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. J. Chromatogr. A 872, 61–73. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01292-3

Irth, H., Lamoree, M., de Jong, G.J., Brinkman, U.A.T., Frei, R.W., Kornfeldt, R.A., Persson, L., 1990. Determination of d-myo-1,2,6-inositol trisphosphate by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with post-column ligand exchange and fluorescence detection. J. Chromatogr. A 499, 617–625. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)97006-7

Ishida, T., Doi, M., Ueda, H., Inoue, M., Scheldrick, G.M., 1988. Specific ring stacking interaction on the tryptophan-7-methylguanine system: comparative crystallographic studies of indole derivatives-7-methylguanine base, nucleoside, and nucleotide complexes. J. Am. Chem. Soc. 110, 2286–2294. https://doi.org/10.1021/ja00215a046

Ishizuka, I., Yamakawa, T., 1985. Chapter 2 - Glycoglycerolipids, in: Wiegandt, H. (Ed.), New Comprehensive Biochemistry. Elsevier, pp. 101–197. https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60021-6

Ismail, H.M., Barton, V., Phanchana, M., Charoensutthivarakul, S., Wong, M.H.L., Hemingway, J., Biagini, G.A., O'Neill, P.M., Ward, S.A., 2016. Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 2080. https://doi.org/10.1073/pnas.1600459113

Ismail, H.M., O'Neill, P.M., Hong, D.W., Finn, R.D., Henderson, C.J., Wright, A.T., Cravatt, B.F., Hemingway, J., Paine, M.J.I., 2013. Pyrethroid activity-based probes for profiling cytochrome P450 activities associated with insecticide interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 19766. https://doi.org/10.1073/pnas.1320185110

Israelachvili, J., 2011. Intermolecular and Surface Forces, Third Edition. ed. Elsevier, Santa Barbara, California, USA.

Jiménez-Díaz, M.B., Ebert, D., Salinas, Y., Pradhan, A., Lehane, A.M., Myrand-Lapierre, M.-E., O'Loughlin, K.G., Shackleford, D.M., Justino de Almeida, M., Carrillo, A.K., Clark, J.A., Dennis, A.S.M., Diep, J., Deng, X., Duffy, S., Endsley, A.N., Fedewa, G., Guiguemde, W.A., Gómez, M.G., Holbrook, G., Horst, J., Kim, C.C., Liu, J., Lee, M.C.S., Matheny, A., Martínez, M.S., Miller, G., Rodríguez-Alejandre, A., Sanz, L., Sigal, M., Spillman, N.J., Stein, P.D., Wang, Z., Zhu, F., Waterson, D., Knapp, S., Shelat, A., Avery, V.M., Fidock, D.A., Gamo, F.-J., Charman, S.A., Mirsalis, J.C., Ma, H., Ferrer, S., Kirk, K., Angulo-Barturen, I., Kyle, D.E., DeRisi, J.L., Floyd, D.M., Guy, R.K., 2014. (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, E5455. https://doi.org/10.1073/pnas.1414221111

Johnson, J., 1954. Purification and analysis of 4-aminopteroylglutamic acid-2-C14 (aminopterin) by chromatography and bioautography. Anal. Chem. 26, 1856–1856. https://doi.org/10.1021/ac60095a602

Jovel, E.M., Cabanillas, J., Towers, G.H.N., 1996. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Mestizo people of Suni Miraño, Loreto, Peru. J. Ethnopharmacol. 53, 149–156. https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01437-7

Kamppinen, M., 1988. Espiritus incorporados: therapeutic plants and animals in the Amazonian Mestizo folklore. J. Ethnobiol. 8, 141–148.

Kapishnikov, S., Berthing, T., Hviid, L., Dierolf, M., Menzel, A., Pfeiffer, F., Als-Nielsen, J., Leiserowitz, L., 2012a. Aligned hemozoin crystals in curved clusters in malarial red blood cells revealed by nanoprobe X-ray Fe fluorescence and diffraction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 11184–11187. https://doi.org/10.1073/pnas.1118134109

Kapishnikov, S., Grolimund, D., Schneider, G., Pereiro, E., McNally, J.G., Als-Nielsen, J., Leiserowitz, L., 2017. Unraveling heme detoxification in the malaria parasite by in situ correlative X-ray fluorescence microscopy and soft X-ray tomography. Sci. Rep. 7, 7610. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06650-w

Kapishnikov, S., Weiner, A., Shimoni, E., Guttmann, P., Schneider, G., Dahan-Pasternak, N., Dzikowski, R., Leiserowitz, L., Elbaum, M., 2012b. Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 11188–11193. https://doi.org/10.1073/pnas.1118120109

Kapishnikov, S., Weiner, A., Shimoni, E., Schneider, G., Elbaum, M., Leiserowitz, L., 2013. Digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*-Infected erythrocytes: relevance to templated nucleation of hemozoin. Langmuir 29, 14595–14602. https://doi.org/10.1021/la402545c

Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal. Chem. 60, 2299–2301. https://doi.org/10.1021/ac00171a028

Kessl, J.J., Ha, K.H., Merritt, A.K., Lange, B.B., Hill, P., Meunier, B., Meshnick, S.R., Trumpower, B.L., 2005. Cytochrome b Mutations That Modify the Ubiquinol-binding pocket of the Cytochrome bc1 complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 280, 17142–17148. https://doi.org/10.1074/jbc.M500388200

Ketchum, M.A., Olafson, K.N., Petrova, E.V., Rimer, J.D., Vekilov, P.G., 2013. Hematin crystallization from aqueous and organic solvents. J. Chem. Phys. 139, 121911. https://doi.org/10.1063/1.4816106

Koirala, N., Thuan, N.H., Ghimire, G.P., Thang, D.V., Sohng, J.K., 2016. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. Enzyme Microb. Technol. 86, 103–116. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.003

Kolář, M., Kubař, T., Hobza, P., 2011. On the role of London dispersion forces in biomolecular structure determination. J. Phys. Chem. B 115, 8038–8046. https://doi.org/10.1021/jp202878d

Kool, J., Giera, M., Irth, H., Niessen, W.M.A., 2011. Advances in mass spectrometry-based post-column bioaffinity profiling of mixtures. Anal. Bioanal. Chem. 399, 2655–2668. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4406-0

Krugliak, M., Zhang, J., Ginsburg, H., 2002. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. Mol. Biochem. Parasitol. 119, 249–256. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00427-3

Kuhlmann, F.M., Fleckenstein, J.M., 2017. 157 - Antiparasitic Agents A2 - Cohen, Jonathan, in: Powderly, W.G., Opal, S.M. (Eds.), Infectious Diseases (Fourth Edition). Elsevier, pp. 1345-1372.e2. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00157-X

Kujawska, M., Pardo-de-Santayana, M., 2015. Management of medicinally useful plants by European migrants in South America. J. Ethnopharmacol. 172, 347–355. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.037

Kushner, D.S., Verano, J.W., Titelbaum, A.R., 2018. Trepanation procedures/outcomes: Comparison of Prehistoric Peru with other ancient, medieval, and American civil war cranial surgery. World Neurosurg. 114, 245–251. https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.03.143

Kvist, L.P., Christensen, S.B., Rasmussen, H.B., Mejia, K., Gonzalez, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. J. Ethnopharmacol. 106, 390–402. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.020.

Laird, S.A., 2002. Biodiversity and Traditional Knowledge. Equitable Partnership in Practice. Earthscan Publ, London (UK) and Sterling, VA, USA.

Lakey, J.H., Raggett, E.M., 1998. Measuring protein-protein interactions. Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 119–123. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80019-5

Larsen, T.O., Franzyk, H., Jensen, S.R., 1999. UV-Guided isolation of Verrucines A and B, novel quinazolines from *Penicillium verrucosum* structurally related to Anacine from *Penicillium aurantiogriseum*. J. Nat. Prod. 62, 1578–1580. https://doi.org/10.1021/np990251p

Larsen, T.O., Frydenvang, K., Christian Frisvad, J., 2000. UV-guided screening of benzodiazepine producing species in *Penicillium*. Biochem. Syst. Ecol. 28, 881–886. https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00126-X

Larsen, T.O., Frydenvang, K., Frisvad, J.C., Christophersen, C., 1998. UV-Guided isolation of Alantrypinone, a novel *Penicillium* alkaloid. J. Nat. Prod. 61, 1154–1157. https://doi.org/10.1021/np980056v

Larsen, T.O., Petersen, B.O., Duus, J.Ø., Sørensen, D., Frisvad, J.C., Hansen, M.E., 2005. Discovery of new natural products by application of X-hitting, a novel algorithm for automated comparison of full UV spectra, combined with structural determination by NMR spectroscopy. J. Nat. Prod. 68, 871–874. https://doi.org/10.1021/np040248s

Le Pogam, P., Pillot, A., Lohezic-Le Devehat, F., Le Lamer, A.-C., Legouin, B., Gadea, A., Sauvager, A., Ertz, D., Boustie, J., 2017. Mass spectrometry as a versatile ancillary technique for the rapid in situ identification of lichen metabolites directly from TLC plates. The Lichenologist 49, 507–520. https://doi.org/10.1017/S0024282917000433

Lenaerts, M., 2006. Substances, relationships and the omnipresence of the body: an overview of Ashéninka ethnomedicine (Western Amazonia). J. Ethnobiol. Ethnomedicine 2, 49–49. https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-49

Lewis, W.H., 2000. Sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon: Ecology, ethnomedicine and bioactivity. J. Nat. Prod. 63, 1596–1597. https://doi.org/10.1021/np000740l

Li, J., Zhou, B., 2010. Biological actions of Artemisinin: Insights from medicinal chemistry studies. Molecules 15, 1378–97. https://doi.org/10.3390/molecules15031378

Li, M., Pu, Y., Yoo, C.G., Ragauskas, A.J., 2016. The occurrence of tricin and its derivatives in plants. Green Chem. 18, 1439–1454. https://doi.org/10.1039/C5GC03062E

Li, X.-C., Ferreira, D., Jacob, M.R., Zhang, Q., Khan, S.I., ElSohly, H.N., Nagle, D.G., Smillie, T.J., Khan, I.A., Walker, L.A., Clark, A.M., 2004. Antifungal cyclopentenediones from *Piper coruscans*. J. Am. Chem. Soc. 126, 6872–6873. https://doi.org/10.1021/ja048081c

Li, Y., Revalde, J.L., Reid, G., Paxton, J.W., 2010. Interactions of dietary phytochemicals with ABC transporters: possible implications for drug disposition and multidrug resistance in cancer. Drug Metab. Rev. 42, 590–611. https://doi.org/10.3109/03602531003758690

Liebman, K.A., Pinto, J., Valle, J., Palomino, M., Vizcaino, L., Brogdon, W., Lenhart, A., 2015. Novel mutations on the ace-1 gene of the malaria vector *Anopheles albimanus* provide evidence for balancing selection in an area of high insecticide resistance in Peru. Malar. J. 14, 74. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0599-1

Lindner, A.K., Priotto, G., 2010. The unknown risk of vertical transmission in sleeping sickness - a literature review. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e783. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000783

Lock, O., Perez, E., Villar, M., Flores, D., Rojas, R., 2016. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. Nat. Prod. Commun. 11, 315–337.

Loo, J.A., 1997. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev. 16, 1–23. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1997)16:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-L

Loria, P., Miller, S., Foley, M., Tilley, L., 1999. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. Biochem. J. 339, 363–370. https://doi.org/10.1042/bj3390363

Luna, L.E., 1984. The healing practices of a peruvian shaman. J. Ethnopharmacol. 11, 123–133. https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90035-7

Luna, L.E., Amaringo, P., 1991. Ayahuasca Visions, North Atlantic Books. ed. Berkeley, CA.

Maciuk, A., Moaddel, R., Haginaka, J., Wainer, I.W., 2008. Screening of tobacco smoke condensate for nicotinic acetylcholine receptor ligands using cellular membrane affinity chromatography columns and missing peak chromatography. RDPA 2007 48, 238–246. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.024

Magee, A.R., Manning, J.C., 2010. Two new species of Asteraceae (tribe Anthemideae, subtribe Pentziinae) from the Cape Floristic Region of South Africa. South Afr. J. Bot. 76, 279–284. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.11.004

Magee, A.R., Tilney, P.M., 2012. A taxonomic revision of *Pentzia* (Asteraceae, Anthemideae) I: the *P. incana* group in southern Africa, including the description of the new species *P. oppositifolia* Magee. South Afr. J. Bot. 79, 148–158. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.10.003

Marcoux, J., Robinson, C.V., 2013. Twenty years of gas phase structural biology. Structure 21, 1541–1550. https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.002

Marino, R.J., Gonzales-Portillo, M., 2000. Preconquest Peruvian neurosurgeons: a study of Inca and pre-Columbian trephination and the art of medicine in ancient Peru. Neurosurgery 47, 940–950. https://doi.org/10.1097/00006123-200108000-00045

Martinez, C.R., Iverson, B.L., 2012. Rethinking the term “pi-stacking.” Chem. Sci. 3, 2191–2201. https://doi.org/10.1039/C2SC20045G

Mather, M.W., Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M., Cooley, J.W., McIntosh, M.T., Daldal, F., Vaidya, A.B., 2005. Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug Atovaquone using a bacterial system. J. Biol. Chem. 280, 27458–27465. https://doi.org/10.1074/jbc.M502319200

McCall, L.-I., McKerrow, J.H., 2014. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. Trends Parasitol. 30, 342–349. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.05.001.

McNamara, C.W., Lee, M.C.S., Lim, C.S., Lim, S.H., Roland, J., Nagle, A., Simon, O., Yeung, B.K.S., Chatterjee, A.K., McCormack, S.L., Manary, M.J., Zeeman, A.-M., Dechering, K.J., Kumar, T.R.S., Henrich, P.P., Gagaring, K., Ibanez, M., Kato, N., Kuhen, K.L., Fischli, C., Rottmann, M., Plouffe, D.M., Bursulaya, B., Meister, S., Rameh, L., Trappe, J., Haasen, D., Timmerman, M., Sauerwein, R.W., Suwanarusk, R., Russell, B., Renia, L., Nosten, F., Tully, D.C., Kocken, C.H.M., Glynne, R.J., Bodenreider, C., Fidock, D.A., Diagana, T.T., Winzeler, E.A., 2013. Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria. Nature 504, 248. https://doi.org/10.1038/nature12782

Meshnick, S.R., Tsang, T.W., Lin, F.B., Pan, H.Z., Chang, C.N., Kuypers, F., Chiu, D., Lubin, B., 1989. Activated oxygen mediates the antimalarial activity of qinghaosu. Prog. Clin. Biol. Res. 313, 95–104.

Mharakurwa, S., Kumwenda, T., Mkulama, M.A.P., Musapa, M., Chishimba, S., Shiff, C.J., Sullivan, D.J., Thuma, P.E., Liu, K., Agre, P., 2011. Malaria antifolate resistance with contrasting *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (DHFR) polymorphisms in

humans and *Anopheles* mosquitoes. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 18796. https://doi.org/10.1073/pnas.1116162108

Miller, L., Good, M., Milon, G., 1994. Malaria pathogenesis. Science 264, 1878. https://doi.org/10.1126/science.8009217

Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F., McGinniss, M.H., 1976. The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks - the Duffy blood group genotype, FyFy. N. Engl. J. Med. 295, 302–304. https://doi.org/10.1056/NEJM197608052950602

Ministerio de Salud del Perú, 2017a. Mapa de Leishmaniosis por distritos Perú 2017*.

Ministerio de Salud del Perú, 2017b. Boletín Epidemiológico del Perú, Volumen 26 - SE 40.

Ministerio de Salud del Perú, 2016a. Casos de malaria por departamentos Perú 2016*.

Ministerio de Salud del Perú, 2016b. Boletín epidemiológico del Perú 2016: Ministerio de salud del Perú, Lima-Perú.

Ministerio de Salud del Perú, 2015. Situación epidemiológica de la leishmaniasis en el Perú, I semestre 2015 (SE 26).

Mitchell, S.N., Kakani, E.G., South, A., Howell, P.I., Waterhouse, R.M., Catteruccia, F., 2015. Evolution of sexual traits influencing vectorial capacity in anopheline mosquitoes. Science 347, 985–988. https://doi.org/10.1126/science.1259435

Mittermeier, R.A., Myers, N., Mittermeier, C.G., 2002. Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. J. Mammal. 83, 630–633. https://doi.org/10.1644/1545-1542(2002)083<0630:>2.0.CO;2

Moaddel, R., Wainer, I.W., 2009. The preparation and development of cellular membrane affinity chromatography columns. Nat. Protoc. 4, 197–205. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.225

Mömer, M., 1971. Le métissage dans l'histoire de l'Amérique latine, Fayard. ed. Paris.

Monigatti, M., Bussmann, R.W., Weckerle, C.S., 2013. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. J. Ethnopharmacol. 145, 450–464. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.066

Müller, I.B., Hyde, J.E., 2010. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. Future Microbiol. 5, 1857–1873. https://doi.org/10.2217/fmb.10.136

Muñoz-Durango, K., Maciuk, A., Harfouche, A., Torijano-Gutiérrez, S., Jullian, J.-C., Quintin, J., Spelman, K., Mouray, E., Grellier, P., Figadère, B., 2012. Detection, characterization, and screening of heme-binding molecules by mass spectrometry for malaria drug discovery. Anal. Chem. 84, 3324–3329. https://doi.org/10.1021/ac300065t

Nagasundaram, N., Priya Doss, G., Chakraborty, C., V., K., D., T.K., V., B., R., S., Lu, A., Ge, Z., Zhu, H., 2016. Mechanism of artemisinin resistance for malaria PfATP6 L263 mutations and discovering potential antimalarials: An integrated computational approach. Sci. Rep. 6, 30106. https://doi.org/10.1038/srep30106

Nakatani, K., Ishikawa, H., Aono, S., Mizutani, Y., 2014. Identification of essential histidine residues involved in heme binding and hemozoin formation in heme detoxification

protein from *Plasmodium falciparum*. Sci. Rep. 4, 6137. https://doi.org/10.1038/srep06137

Nakato, H., Vivancos, R., Hunter, P.R., 2007. A systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of atovaquone proguanil (Malarone) for chemoprophylaxis against malaria. J. Antimicrob. Chemother. 60, 929–936. https://doi.org/10.1093/jac/dkm337

Neafsey, D.E., Waterhouse, R.M., Abai, M.R., Aganezov, S.S., Alekseyev, M.A., Allen, J.E., Amon, J., Arcà, B., Arensburger, P., Artemov, G., Assour, L.A., Basseri, H., Berlin, A., Birren, B.W., Blandin, S.A., Brockman, A.I., Burkot, T.R., Burt, A., Chan, C.S., Chauve, C., Chiu, J.C., Christensen, M., Costantini, C., Davidson, V.L.M., Deligianni, E., Dottorini, T., Dritsou, V., Gabriel, S.B., Guelbeogo, W.M., Hall, A.B., Han, M.V., Hlaing, T., Hughes, D.S.T., Jenkins, A.M., Jiang, X., Jungreis, I., Kakani, E.G., Kamali, M., Kemppainen, P., Kennedy, R.C., Kirmitzoglou, I.K., Koekemoer, L.L., Laban, N., Langridge, N., Lawniczak, M.K.N., Lirakis, M., Lobo, N.F., Lowy, E., MacCallum, R.M., Mao, C., Maslen, G., Mbogo, C., McCarthy, J., Michel, K., Mitchell, S.N., Moore, W., Murphy, K.A., Naumenko, A.N., Nolan, T., Novoa, E.M., O'Loughlin, S., Oringanje, C., Oshaghi, M.A., Pakpour, N., Papathanos, P.A., Peery, A.N., Povelones, M., Prakash, A., Price, D.P., Rajaraman, A., Reimer, L.J., Rinker, D.C., Rokas, A., Russell, T.L., Sagnon, N., Sharakhova, M.V., Shea, T., Simão, F.A., Simard, F., Slotman, M.A., Somboon, P., Stegniy, V., Struchiner, C.J., Thomas, G.W.C., Tojo, M., Topalis, P., Tubio, J.M.C., Unger, M.F., Vontas, J., Walton, C., Wilding, C.S., Willis, J.H., Wu, Y.-C., Yan, G., Zdobnov, E.M., Zhou, X., Catteruccia, F., Christophides, G.K., Collins, F.H., Cornman, R.S., Crisanti, A., Donnelly, M.J., Emrich, S.J., Fontaine, M.C., Gelbart, W., Hahn, M.W., Hansen, I.A., Howell, P.I., Kafatos, F.C., Kellis, M., Lawson, D., Louis, C., Luckhart, S., Muskavitch, M.A.T., Ribeiro, J.M., Riehle, M.A., Sharakhov, I.V., Tu, Z., Zwiebel, L.J., Besansky, N.J., 2015. Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. Science 347. https://doi.org/10.1126/science.1258522

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. J. Nat. Prod. 79, 629–661. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055

Nielsen, K.F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J.C., Larsen, T.O., 2011. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. J. Nat. Prod. 74, 2338–2348. https://doi.org/10.1021/np200254t

Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr. 74, 418–425. https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418

Niphakis, M.J., Cravatt, B.F., 2014. Enzyme inhibitor discovery by activity-based protein profiling. Annu. Rev. Biochem. 83, 341–377. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035708

Nobel Prize.org, 2015. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015.

Nothias-Scaglia, L.-F., Pannecouque, C., Renucci, F., Delang, L., Neyts, J., Roussi, F., Costa, J., Leyssen, P., Litaudon, M., Paolini, J., 2015. Antiviral activity of diterpene esters on Chikungunya virus and HIV replication. J. Nat. Prod. 78, 1277–1283. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00073

Nzila, A., Ward, S.A., Marsh, K., Sims, P.F., Hyde, J.E., 2005a. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. Trends Parasitol. 21, 292–298. https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.04.002

Nzila, A., Ward, S.A., Marsh, K., Sims, P.F.G., Hyde, J.E., 2005b. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to *Plasmodium*. Trends Parasitol. 21, 334–339. https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.05.008

Odonne, G., Bourdy, G., Castillo, D., Estevez, Y., Lancha-Tangoa, A., Alban-Castillo, J., Deharo, E., Rojas, R., Stien, D., Sauvain, M., 2009. Ta'ta', Huayani: Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. J. Ethnopharmacol. 126, 149–158. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.015

Odonne, G., Herbette, G., Eparvier, V., Bourdy, G., Rojas, R., Sauvain, M., Stien, D., 2011. Antileishmanial sesquiterpene lactones from Pseudelephantopus spicatus, a traditional remedy from the Chayahuita Amerindians (Peru). Part III. J. Ethnopharmacol. 137, 875–879. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.008

Odonne, G., Valadeau, C., Alban-Castillo, J., Stien, D., Sauvain, M., Bourdy, G., 2013. Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Paranapura basin (Peruvian Amazon). J. Ethnopharmacol. 146, 127–153. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.014

Oettl, S.K., Hubert, J., Nuzillard, J.-M., Stuppner, H., Renault, J.-H., Rollinger, J.M., 2014. Dereplication of depsides from the lichen Pseudevernia furfuracea by centrifugal partition chromatography combined to 13C nuclear magnetic resonance pattern recognition. Anal. Chim. Acta 846, 60–67. https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.009

Olafson, K.N., Ketchum, M.A., Rimer, J.D., Vekilov, P.G., 2015a. Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 4946–4951. https://doi.org/10.1073/pnas.1501023112

Olafson, K.N., Ketchum, M.A., Rimer, J.D., Vekilov, P.G., 2015b. Molecular mechanisms of hematin crystallization from organic solvent. Cryst. Growth Des. 15, 5535–5542. https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01157

Olafson, K.N., Nguyen, T.Q., Rimer, J.D., Vekilov, P.G., 2017. Antimalarials inhibit hematin crystallization by unique drug–surface site interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 7531–7536. https://doi.org/10.1073/pnas.1700125114

Olafson, K.N., Rimer, J.D., Vekilov, P.G., 2014. Growth of large hematin crystals in biomimetic solutions. Cryst. Growth Des. 14, 2123–2127. https://doi.org/10.1021/cg5002682

Olliaro, P.L., Goldberg, D.E., 1995. The *Plasmodium* digestive vacuole: Metabolic headquarters and choice Drug target. Parasitol. Today 11, 294–297. https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80042-5

O'Neill, P.M., Barton, V.E., Ward, S.A., 2010. The Molecular mechanism of action of artemisinin-the debate continues. Molecules 15. https://doi.org/10.3390/molecules15031705

Oosterkamp, A.J., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Greef, J., 1997a. Theoretical concepts of on-line liquid chromatographic- biochemical detection systems II. Detection systems

based on labelled affinity proteins. J. Chromatogr. A 787, 37–46. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)89244-8

Oosterkamp, A.J., Irth, H., Villaverde Herraiz, M.T., Tjaden, U.R., van der Greef, J., 1997b. Theoretical concepts of on-line liquid chromatographic-biochemical detection systems I. Detection systems based on labelled ligands. J. Chromatogr. A 787, 27–35. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00646-8

Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar, A.D., Madsen, S.K., 2000. The structure of malaria pigment [beta]-haematin. Nature 404, 307–310. https://doi.org/10.1038/35005132

Pauling, L., 1931. The nature of the chemical bond. II. The one-electron bond and the three-electron bond. J. Am. Chem. Soc. 53, 3225–3237. https://doi.org/10.1021/ja01360a004

Pearson, R.D., Sousa, A.Q., 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 22, 1–13. https://doi.org/10.1093/clinids/22.1.1

Peters, W., 1989. Malaria: Principles and practice of malariology (vols 1 and 2). Parasitol. Today 5, 304. https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90026-4

Phillips, M., Burrows, J., Christine, M., van Huijsduijnen, R., Van Voorhis, W., Timothy, W., 2017. Malaria. Nat. Rev. Dis. Primer 3, 17051. https://doi.org/doi:10.1038/nrdp.2017.50

Phillips, O., Gentry, A.H., 1993. The useful plants of Tambopata, Peru: I. Statistical hypotheses tests with a new quantitative technique. Econ. Bot. 47, 15–32. https://doi.org/10.1007/BF02862203

Picken, J., Bauriedel, W., 1950. Comparative bioautography of vitamin B12 and related growth factors using *Euglena gracilis* and *Lactobacillus leichmannii*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N 75, 511–515.

Pisciotta, J.M., Coppens, I., Tripathi, A.K., Scholl, P.F., Shuman, J., Bajad, S., Shulaev, V., Sullivan, D.J., 2007. The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. Biochem. J. 402, 197–204. https://doi.org/10.1042/BJ20060986

Plowe, C.V., 2009. The evolution of drug-resistant malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103, S11–S14. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.11.002

Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G.T. (Eds.), 2017. Chapter 4 - Biophysical Principles, in: Cell Biology (Third Edition). Elsevier, pp. 53–62. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34126-4.00004-9

Potterat, O., Hamburger, M., 2013. Concepts and technologies for tracking bioactive compounds in natural product extracts: generation of libraries, and hyphenation of analytical processes with bioassays. Nat. Prod. Rep. 30, 546–564. https://doi.org/10.1039/C3NP20094A

Pudlo, M., Allart-Simon, I., Tinant, B., Gerard, S., Sapi, J., 2012. First domino radical cyclisation/Smiles rearrangement combination. Chem. Commun. 48, 2442–2444. https://doi.org/10.1039/C2CC15670A

Remarque, E.J., Faber, B.W., Kocken, C.H.M., Thomas, A.W., 2008. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. Trends Parasitol. 24, 74–84. https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.002

Rengifo, E., 2007. Las ramas floridas del bosque, experiencias en el manejo de plantas medicinales amazónicas. Intituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, Iquitos.

Riffet, V., 2014. Interactions non-covalentes et propriétés physico-chimiques de petits systèmes biologiques : approches théoriques. Ecole polytechnique, Université Paris-Saclay, Palaiseau.

Robert, A., Benoit-Vical, F., Claparols, C., Meunier, B., 2005. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 13676. https://doi.org/10.1073/pnas.0500972102

Robert, A., Cazelles, J., Meunier, B., 2001. Characterization of the Alkylation Product of Heme by the Antimalarial Drug Artemisinin. Angew. Chem. Int. Ed. 40, 1954–1957. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010518)40:10<1954::AID-ANIE1954>3.0.CO;2-9

Robert, A., Meunier, B., 1997. Characterization of the First Covalent Adduct between Artemisinin and a Heme Model. J. Am. Chem. Soc. 119, 5968–5969. https://doi.org/10.1021/ja970412g

Rocco, F., 2003. Quinine, malaria and the quest for a cure that changed the world. Harper Perennial, New York.

Rocha, G., Martins, A., Gama, G., Brandão, F., Atouguia, J., 2004. Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. The Lancet 363, 247. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15345-7

Roepe, P.D., 2011. PfCRT mediated drug transport in malarial parasites. Biochemistry 50, 163–171. https://doi.org/10.1021/bi101638n

Rono, M.K., Whitten, M.M.A., Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E.A., Marois, E., 2010. The major yolk protein Vitellogenin interferes with the anti-*Plasmodium* response in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. PLOS Biol. 8, e1000434. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000434

Rosenthal, P.J., Sijwali, P.S., Singh, A., Shenai, B.R., 2002. Cysteine proteases of malaria parasites: Targets for chemotherapy. Curr. Pharm. Des. 8, 1659–1672. https://doi.org/10.2174/1381612023394197

Roy, K., Kar, S., Das, R.N., 2015. Chapter 1 - Background of QSAR and Historical Developments, in: Roy, K., Kar, S., Das, R.N. (Eds.), Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment. Academic Press, Boston, pp. 1–46. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801505-6.00001-6

Rudzinska, M., Trager, W., 1957. Intracellular phagotrophy by malaria parasites: an electron microscope study of *Plasmodium lophurae*. J. Protozool. 4, 190–199. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1957.tb02507.x

Salick, J., 1989. Ecological bases of Amuesha agriculture, Peruvian Upper Amazon. Adv Ecom Bot 7, 189–212.

Sandlin, R.D., Fong, K.Y., Wicht, K.J., Carrell, H.M., Egan, T.J., Wright, D.W., 2014. Identification of β-hematin inhibitors in a high-throughput screening effort reveals scaffolds with in vitro antimalarial activity. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist 4, 316–325. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.08.002

Savoia, D., 2015. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J. Infect. Dev. Ctries. 9. https://doi.org/10.3855/jidc.6833

Schenk, T., Breel, G.J., Koevoets, P., van Den Berg, S., Hogenboom, A.C., Irth, H., Tjaden, U.R., van Der Greef, J., 2003. Screening of natural products extracts for the presence of phosphodiesterase inhibitors using liquid chromatography coupled online to parallel biochemical detection and chemical characterization. J. Biomol. Screen. 8, 421–429. https://doi.org/10.1177/1087057103255973

Schenone, M., Dančík, V., Wagner, B.K., Clemons, P.A., 2013. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. Nat. Chem. Biol. 9, 232. https://doi.org/10.1038/nchembio.1199.

Schmidt, N., 2003. Histoire du métissage, de La Martinière. ed. Paris.

Schobel, U., Frenay, M., Van Elswijk, D.A., McAndrews, J.M., Long, K.R., Olson, L.M., Bobzin, S.C., Irth, H., 2001. High resolution screening of plant natural product extracts for estrogen receptor a and f3 binding activity using an online HPLC-MS Biochemical detection system. J. Biomol. Screen. 6, 291–303. https://doi.org/10.1177/108705710100600503

Senon, G.E., 1998. L'indispensable de chimie organique, BREG. ed. Paris.

SFE, 2018. L'ethnopharmacologie.

Shanmugam Kirubakaran, Holmquist Lina, Steele Megan, Stuchbury Grant, Berbaum Katrin, Schulz Oliver, Benavente García Obdulio, Castillo Julián, Burnell Jim, Garcia Rivas Vernon, Dobson Geoff, Münch Gerald, 2008. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. Mol. Nutr. Food Res. 52, 427–438. https://doi.org/10.1002/mnfr.200700180

Shestak, O.P., Novikov, V.L., 2010. Synthesis of coruscanones A and B, metabolites of *Piper coruscans*, and related compounds. Russ. Chem. Bull. 59, 81–90. https://doi.org/10.1007/s11172-010-0048-9

Shi, S.-Y., Zhang, Y.-P., Jiang, X.-Y., Chen, X.-Q., Huang, K.-L., Zhou, H.-H., Jiang, X.-Y., 2009. Coupling HPLC to on-line, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures. TrAC Trends Anal. Chem. 28, 865–877. https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.009

Smith David L., Zhang Zhongqi, 1994. Probing noncovalent structural features of proteins by mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev. 13, 411–429. https://doi.org/10.1002/mas.1280130503

Sparkman, O.D., Penton, Z.E., Kitson, F.G., 2011. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: Chapter 1 - Introduction and History, in: Sparkman, O.D., Penton, Z.E., Kitson, F.G. (Eds.), Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Second Edition).

Academic Press, Amsterdam, pp. 2–13. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373628-4.00001-0

Speers, A.E., Cravatt, B.F., 2004. Profiling enzyme activities *In vivo* using click chemistry methods. Chem. Biol. 11, 535–546. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.012

Spillman, N.J., Kirk, K., 2015. The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 5, 149–162. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.07.001

Srinivasan, P., Beatty, W.L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J.K., Tyler, J.S., Narum, D.L., Pierce, S.K., Boothroyd, J.C., Haynes, J.D., Miller, L.H., 2011. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 13275–13280. https://doi.org/10.1073/pnas.1110303108

Staines, H.M., Krishna, S., 2012. Treatment and Prevention of Malaria - Antimalarial Drug Chemistry, Action and Use. Springer, Basel.

Sullivan, D.J., Gluzman, I.Y., Goldberg, D.E., 1996. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. Science 271, 219. https://doi.org/10.1126/science.271.5246.219

Sundar, S., 2002. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop. Med. Int. Health 6, 849–854. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00778.x

Suresh, N., Haldar, K., 2018. Mechanisms of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. • Anti-Infect. New Technol. 42, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.06.003

Swerdlow, J., Johnson, L., 2000. Nature et Médecine: Les plantes qui guérissent. National Geographic.

Tamayo Herrera, J., 2013. Nuevo Compendio de la Historia del Perú. Universidad Ricardo Palma, Lima-Perú.

Tan, P.J., Ong, C.Y., Danial, A., Yusof, H.M., Neoh, B.K., Lee, H.B., 2011. Cyclic Tetrapyrrolic Photosensitisers from the leaves of *Phaeanthus ophthalmicus*. Chem. Cent. J. 5, 32–32. https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-32

Tekwani, B.L., Walker, L.A., 2005. Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro beta-hematin formation assay. Comb. Chem. High Throughput Screen. 8, 63–79. https://doi.org/10.2174/1386207053328101

Tropicos, 2018. Tropicos.org.

Tuon, F.F., Neto, V.A., Amato, V.S., 2008. Leishmania: Origin, evolution and future since the Precambrian. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 54, 158–166. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00455.x

Vallières, C., Avery, S.V., 2017. The candidate antimalarial drug MMV665909 causes oxygen-dependent mRNA mistranslation and synergizes with quinoline-derived antimalarials. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e00459-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00459-17

Van Elswijk, D.A., Diefenbach, O., van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Greef, J., 2003. Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography–biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. 19th Montreux Symp. Liq. Chromatogr. - Mass Spectrom. Supercrit. Fluid Chromatogr. - Mass Spectrom. Capill. Electrophor. - Mass Spectrom. Tandem Mass Spectrom. 1020, 45–58. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.055

Van Wyk, B.-E., de Wet, H., Van Heerden, F.R., 2008. An ethnobotanical survey of medicinal plants in the southeastern Karoo, South Africa. South Afr. J. Bot. 74, 696–704. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.05.001

Vásquez-Ocmín, P., Cojean, S., Rengifo, E., Suyyagh-Albouz, S., Amasifuen Guerra, C.A., Pomel, S., Cabanillas, B., Mejía, K., Loiseau, P.M., Figadère, B., Maciuk, A., 2018. Antiprotozoal activity of medicinal plants used by Iquitos-Nauta road communities in Loreto (Peru). J. Ethnopharmacol. 210, 372–385. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.039

Vasquez-Ocmín, P., Haddad, M., Gadea, A., Jullian, V., Castillo, D., Paloque, L., Cerapio, J.P., Bourdy, G., Sauvain, M., 2017. A new phthalide derivative from *Peperomia nivalis*. Nat. Prod. Res. 31, 138–142. https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1219857

Vekilov, P.G., Rimer, J.D., Olafson, K.N., Ketchum, M.A., 2015. Lipid or aqueous medium for hematin crystallization? CrystEngComm 17, 7790–7800. https://doi.org/10.1039/C5CE01178G

Visentin, M., Zhao, R., Goldman, I.D., 2012. The Antifolates. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 26, 629–ix. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.02.002

Volz, J.C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J.K., Lim, N.T.Y., Whitehead, L.W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D., Nebl, T., Marapana, D., Triglia, T., Wong, W., Rogers, K.L., Cowman, A.F., 2016. Essential role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA complex during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. Cell Host Microbe 20, 60–71. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.004

Wakelin, L.P., 1986. Polyfunctional DNA intercalating agents. Med. Res. Rev. 6, 275–340. https://doi.org/10.1002/med.2610060303

Walle, T., 2007. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption. Mol. Pharm. 4, 826–832. https://doi.org/10.1021/mp700071d

Walther, M., Fischer, B.M., Uhd Jepsen, P., 2003. Noncovalent intermolecular forces in polycrystalline and amorphous saccharides in the far infrared. Chem. Phys. 288, 261–268. https://doi.org/10.1016/S0301-0104(03)00031-4

Wan, K.X., Vidavsky, I., Gross, M.L., 2002. Comparing similar spectra: from similarity index to spectral contrast angle. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 13, 85–88. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00327-0

Wang, J., Zhang, C.-J., Chia, W.N., Loh, C.C.Y., Li, Z., Lee, Y.M., He, Y., Yuan, L.-X., Lim, T.K., Liu, M., Liew, C.X., Lee, Y.Q., Zhang, J., Lu, N., Lim, C.T., Hua, Z.-C., Liu, B., Shen, H.-M., Tan, K.S.W., Lin, Q., 2015. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. Nat. Commun. 6, 10111. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10111

Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapono, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P, C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Linington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nat. Biotechnol. 34, 828. https://doi.org/doi: 10.1038/nbt.3597

Wang, S., Tian, Y., Wang, M., Wang, M., Sun, G., Sun, X., 2018. Advanced activity-based protein profiling application strategies for drug development. Front. Pharmacol. 9, 353. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00353

Warhurst, D.C., Craig, J.C., Adagu, I.S., Meyer, D.J., Lee, S.Y., 2003. The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the cinchona alkaloids. Malar. J. 2, 26. https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-26

Warsame Marian, Olumese Peter, Mendis Kamini, 2010. Role of medicines in malaria control and elimination. Drug Dev. Res. 71, 4–11. https://doi.org/10.1002/ddr.20343

Waters, A.P., 2016. Epigenetic roulette in blood stream *Plasmodium*: Gambling on sex. PLOS Pathog. 12, e1005353. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005353

Watson, T.J., Sparkman, D.O., 2007. Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation, Fourth Edition. ed. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England.

Weiss, P., 1943. Epidemiología y clínica de las leishmaniosis tegumentarias en el Perú. Rev Perú Med Exp Salud Publica 2, 39.

Wells, T.N.C., van Huijsduijnen, R.H., Van Voorhis, W.C., 2015. Malaria medicines: a glass half full? Nat. Rev. Drug Discov. 14, 424. https://doi.org/10.1038/nrd4573

Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., Yang, B., 2017. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1398, 120–129. https://doi.org/10.1111/nyas.13350

Wezel, A., Ohl, J., 2005. Does remoteness from urban centres Influence plant diversity in homegardens and swidden fields?: A case study from the Matsiguenka in the Amazonian rain forest of Peru. Agrofor. Syst. 65, 241–251. https://doi.org/10.1007/s10457-005-3649-9

White, N.J., Pukrittayakamee, S., Phyo, A.P., Rueangweerayut, R., Nosten, F., Jittamala, P., Jeeyapant, A., Jain, J.P., Lefèvre, G., Li, R., Magnusson, B., Diagana, T.T., Leong, F.J., 2014. Spiroindolone KAE609 for *Falciparum* and *Vivax* Malaria. N. Engl. J. Med. 371, 403–410. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315860

WHO, 2018a. Leishmaniasis: Epidemiological situation.

WHO, 2018b. Paludisme: Traitement du paludisme.

WHO, 2017a. Neglected tropical diseases.

WHO, 2017b. Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil).

WHO, 2017c. Maladie de Chagas (trypanosomiase américaine).

WHO, 2017d. World malaria report 2017, World Health Organization. ed. Luxembourg.

WHO, 2015. Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030.

Willems, L.I., Overkleeft, H.S., van Kasteren, S.I., 2014. Current developments in activity-based protein profiling. Bioconjug. Chem. 25, 1181–1191. https://doi.org/10.1021/bc500208y

Williams, R.B., O'Neil-Johnson, M., Williams, A.J., Wheeler, P., Pol, R., Moser, A., 2015. Dereplication of natural products using minimal NMR data inputs. Org. Biomol. Chem. 13, 9957–9962. https://doi.org/10.1039/C5OB01713K

Wohlert, J., Edholm, O., 2004. The range and shielding of dipole-dipole interactions in phospholipid bilayers. Biophys. J. 87, 2433–2445. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.044222

Wright, L.D., Cresson, E.L., Driscoll, C.A., 1954. Bioautography of biotin and certain related compounds. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N 86, 480–483. https://doi.org/10.3181/00379727-86-21140

Wudtiwai, B., Sripanidkulchai, B., Kongtawelert, P., Banjerdpongchai, R., 2011. Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol 4, 52–52. https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-52

Wunderlich, J., Rohrbach, P., Dalton, J.P., 2012. The malaria digestive vacuole. Front. Biosci. Sch. Ed. 4, 1424–1448.

Yang, J.Y., Sanchez, L.M., Rath, C.M., Liu, X., Boudreau, P.D., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., de Felicio, R., Fenner, A., Wong, W.R., Linington, R.G., Zhang, L., Debonsi, H.M., Gerwick, W.H., Dorrestein, P.C., 2013. Molecular Networking as a dereplication strategy. J. Nat. Prod. 76, 1686–1699. https://doi.org/10.1021/np400413s

Zdero, C., Bohlmann, F., 1990. Glaucolides, fulvenoguaianolides and other sesquiterpene lactones from *Pentzia* species. Phytochemistry 29, 189–194. https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)89035-8

Zeeman, A.-M., van Amsterdam, S.M., McNamara, C.W., Voorberg-van der Wel, A., Klooster, E.J., van den Berg, A., Remarque, E.J., Plouffe, D.M., van Gemert, G.-J., Luty, A., Sauerwein, R., Gagaring, K., Borboa, R., Chen, Z., Kuhen, K., Glynne, R.J., Chatterjee, A.K., Nagle, A., Roland, J., Winzeler, E.A., Leroy, D., Campo, B., Diagana, T.T., Yeung, B.K.S., Thomas, A.W., Kocken, C.H.M., 2014. KAI407, a Potent Non-8-aminoquinoline compound that kills *Plasmodium* cynomolgi early dormant liver stage parasites *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 1586–1595. https://doi.org/10.1128/AAC.01927-13

Zenonos, Z.A., Dummler, S.K., Müller-Sienerth, N., Chen, J., Preiser, P.R., Rayner, J.C., Wright, G.J., 2015. Basigin is a druggable target for host-oriented antimalarial interventions. J. Exp. Med. 212, 1145–1151. https://doi.org/10.1084/jem.20150032

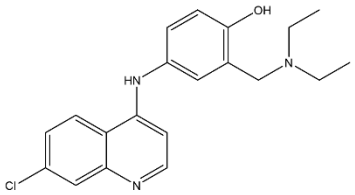
Zhang, Y.-P., Shi, S.-Y., Xiong, X., Chen, X.-Q., Peng, M.-J., 2012. Comparative evaluation of three methods based on high-performance liquid chromatography analysis combined with a 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay for the rapid screening of antioxidants from *Pueraria lobata* flowers. Anal. Bioanal. Chem. 402, 2965–2976. https://doi.org/10.1007/s00216-012-5722-3

Zhu, H., Song, Y., Wang, Yuji, Zhao, M., Ren, Y., Wang, Yaonan, Zhao, S., Wu, J., Peng, S., 2016. Design, synthesis and evaluation of a novel π–π stacking nano-intercalator as an anti-tumor agent. MedChemComm 7, 247–257. https://doi.org/10.1039/C5MD00507H

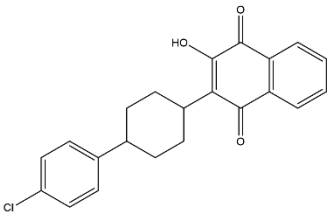
Zou, B., Nagle, A., Chatterjee, A.K., Leong, S.Y., Tan, L.J., Sim, W.L.S., Mishra, P., Guntapalli, P., Tully, D.C., Lakshminarayana, S.B., Lim, C.S., Tan, Y.C., Abas, S.N., Bodenreider, C., Kuhen, K.L., Gagaring, K., Borboa, R., Chang, J., Li, C., Hollenbeck, T., Tuntland, T., Zeeman, A.-M., Kocken, C.H.M., McNamara, C., Kato, N., Winzeler, E.A., Yeung, B.K.S., Diagana, T.T., Smith, P.W., Roland, J., 2014. Lead optimization of imidazopyrazines: A new class of antimalarial with activity on *Plasmodium* liver stages. ACS Med. Chem. Lett. 5, 947–950. https://doi.org/10.1021/ml500244m

ANNEXES

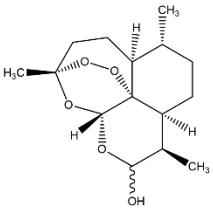
Annexe 1. Structure des médicaments antipaludiques cités dans cette thèse



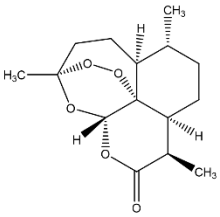
Amodiaquine



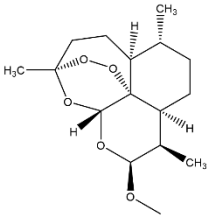
Atovaquone



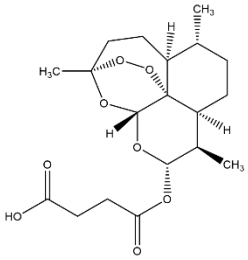
Dihydroartémisinine



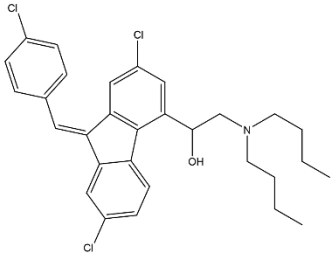
Artémisinine



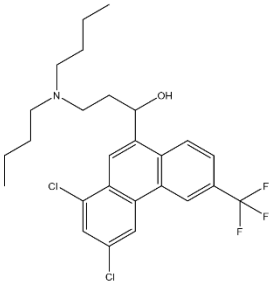
Artémether



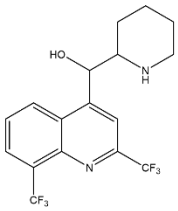
Artésunate



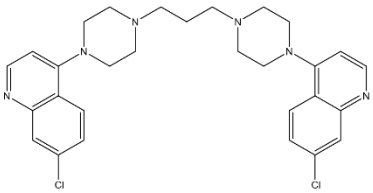
Luméfantrine



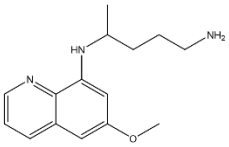
Halofantrine



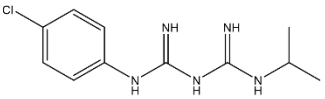
Mefloquine



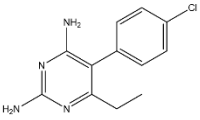
Pipéraquine



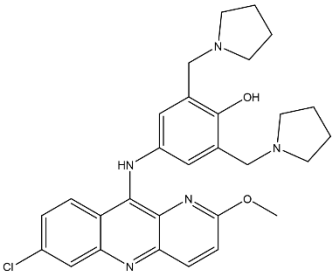
Primaquine



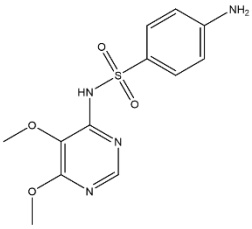
Proguanil



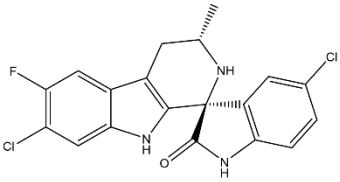
Pyriméthamine



Pyronaridine

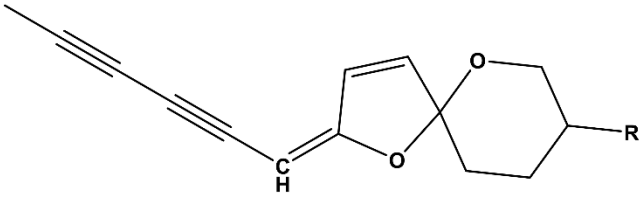


Sulfadoxine

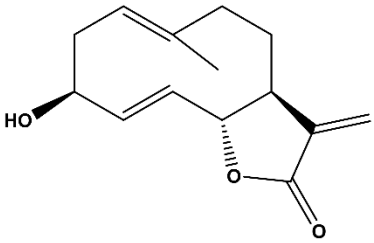


Cipargamin

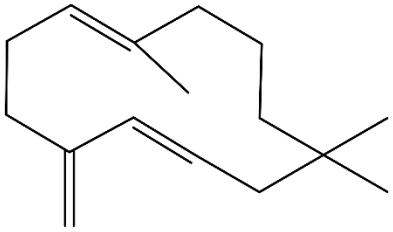
Annexe 2. Types de structures isolés de *Pentzia monodiana*



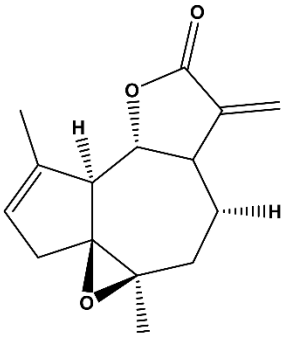
Spiroketal énol éther



Sesquiterpène du type germacranolide

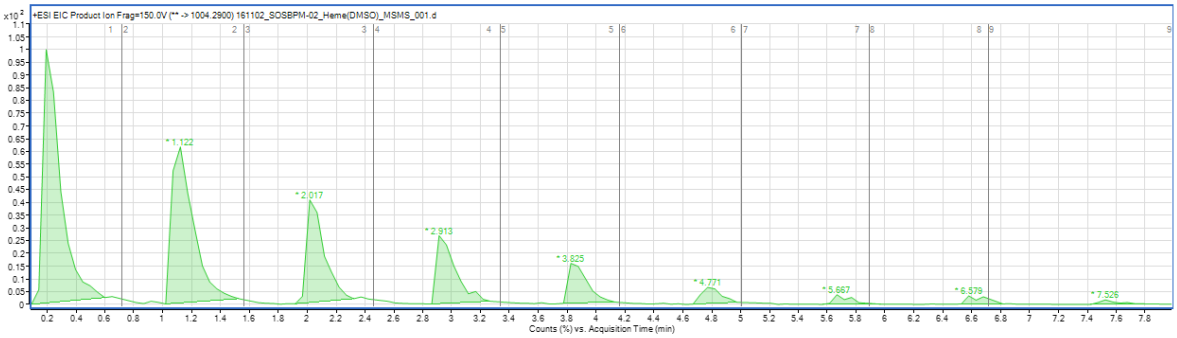


Sesquiterpène du type γ-humulène



Sesquiterpène du type guaianolide

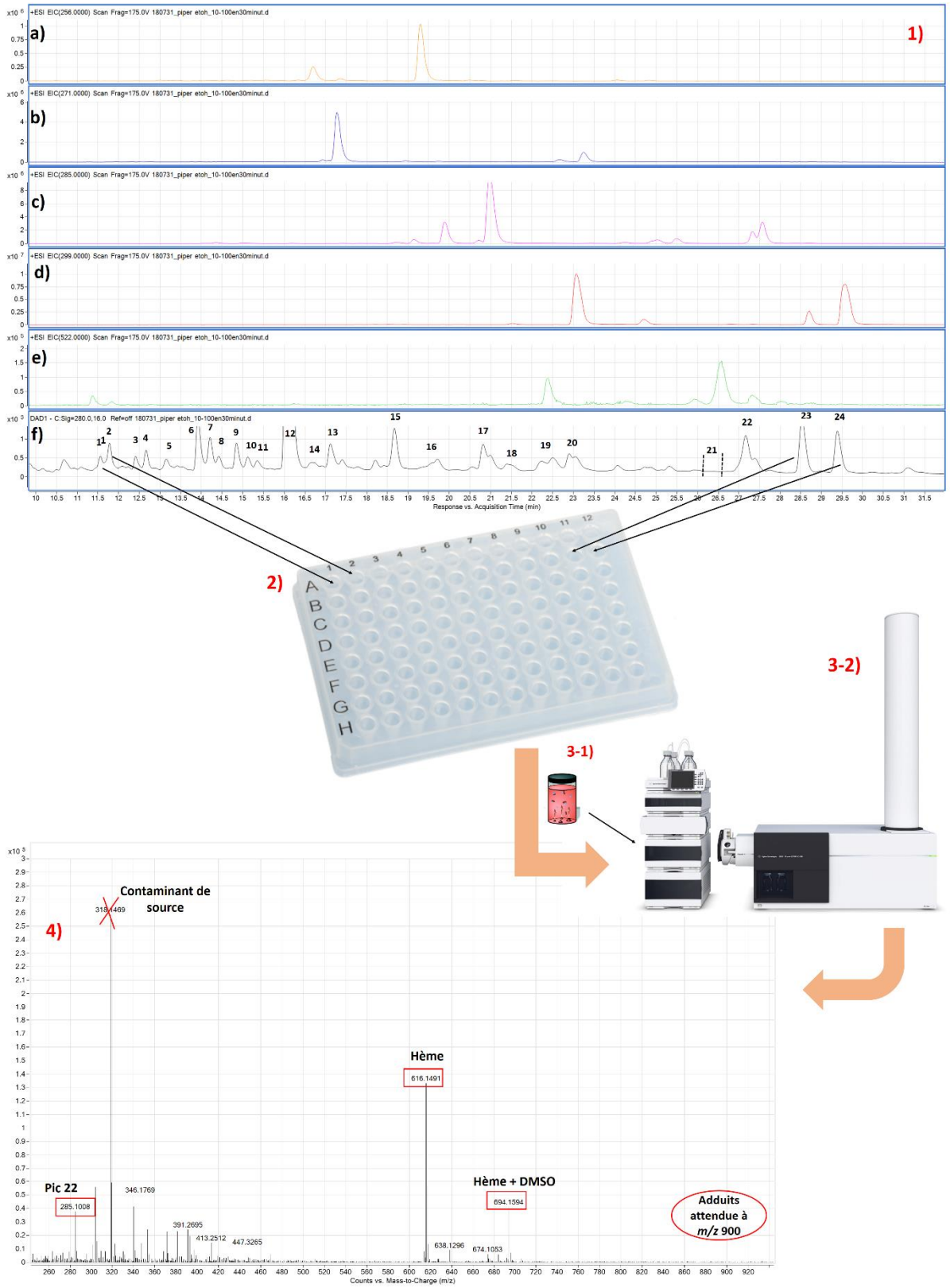
Annexe 3. Spectre MSMS en format FIA (*flow injection analyses*) pour le composé **8** isolé de *Pentzia monodiana*



Annexe 4. Résultats d'activités *in vitro* des alcaloïdes synthétiques dérivés du 3-(2'-aryl-*N*-methyl acetamido) indolin-2-ones

Codes	Souche sensible 3D7 de *P. falciparum* (IC_{50}, µM)	Classement d'activité (bio-activité)	Test Hème (DV_{50}, eV)	Classement d'activité (test hème)
SGIS2011	0,05 ± 0,02	2	3.469	5
SGIS2012	0,65 ± 0,26	5	3.845	3
SGIS2013	0.02 ± 0.01	1	4.292	1
SGIS2014	0,1 ± 0,03	3	3.791	4
SGIS2015	0,13 ± 0,03	4	4.283	2
SGIS2116	> 1	6	3.397	6
Chloroquine	0.02 ±			

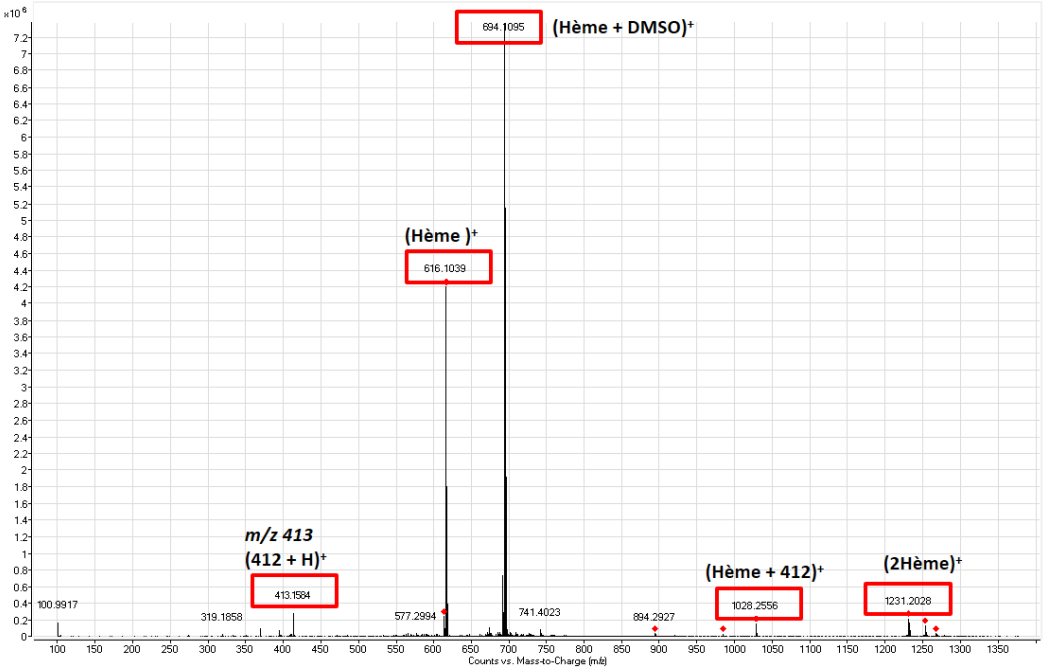
Annexe 5. Schéma du test en ligne découplé pour l'extrait de *Piper coruscans*



1) LC-MS-DAD de l'extrait éthanolique de *Piper coruscans* [colonne Sunfire C18, 4.6 x 150 mm – 5µm (Waters), phase mobile eau (0.1 % d'acide formique)/acétonitrile (30 à 70 % en 30 minutes)] ; a) EIC (*extracted-ion chromatogram*) a *m/z* 256 ; b) EIC a *m/z* 271 ; c) EIC a *m/z* 285 ; d)

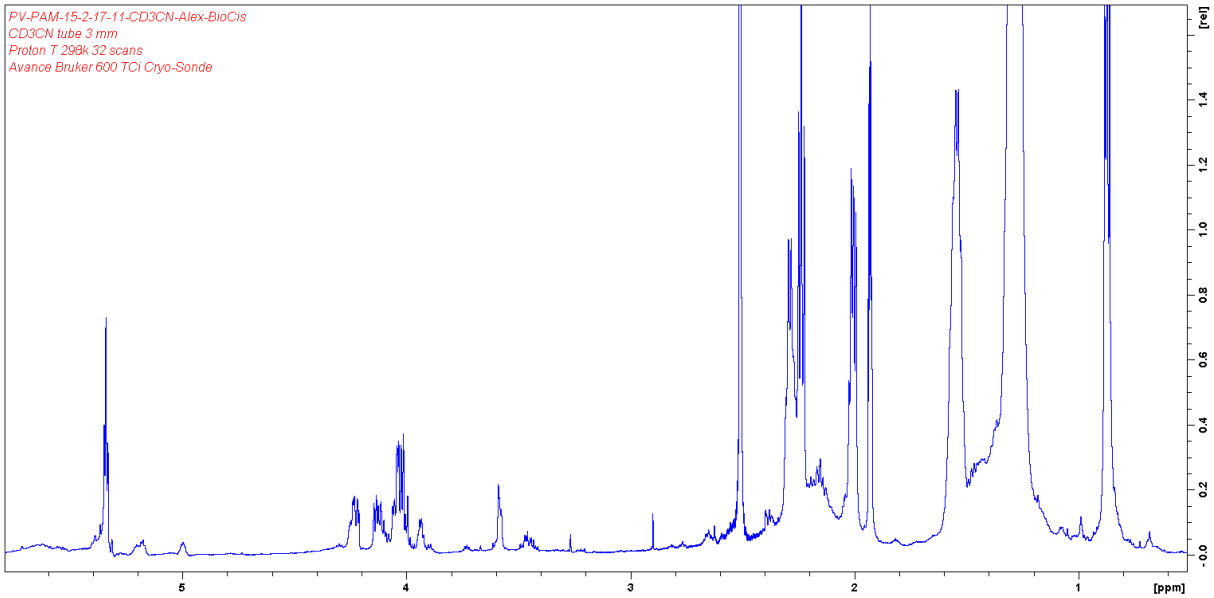
EIC a *m/z* 299 ; e) EIC a *m/z* 522 ; f) DAD a 280 nm. 2) Collecte par HPLC-analytique de pics sélectionnés dans une plaque de 96 puits. 3-1) Mélange automatique des fractions collectés avec l'hème, CBSO et tween 20 dans les conditions acides décris dans l'article **5** ; 3-2) Injection directe dans le MS/Q-TOF. 4) Spectre MS du puits 24.

Annexe 6. Test hème avec la fraction PAM15-17-11 (*Pyrrhocoris apterus*) + hème en conditions acides

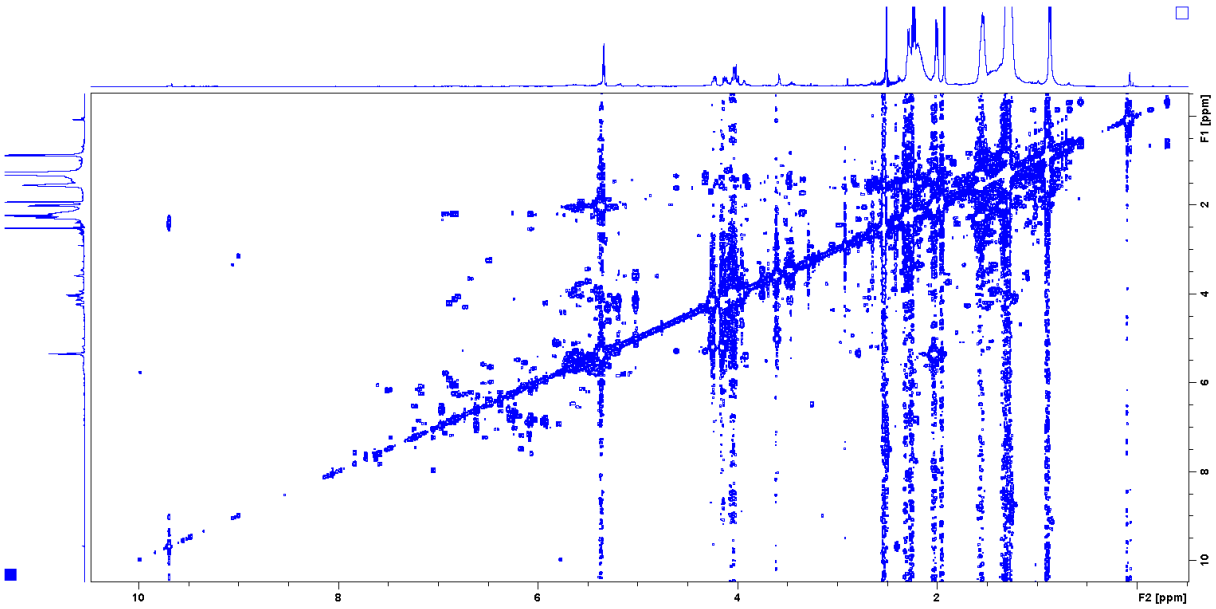


Annexe 7. Spectres RMN du produit isolé de *Pyrrhocoris apterus*

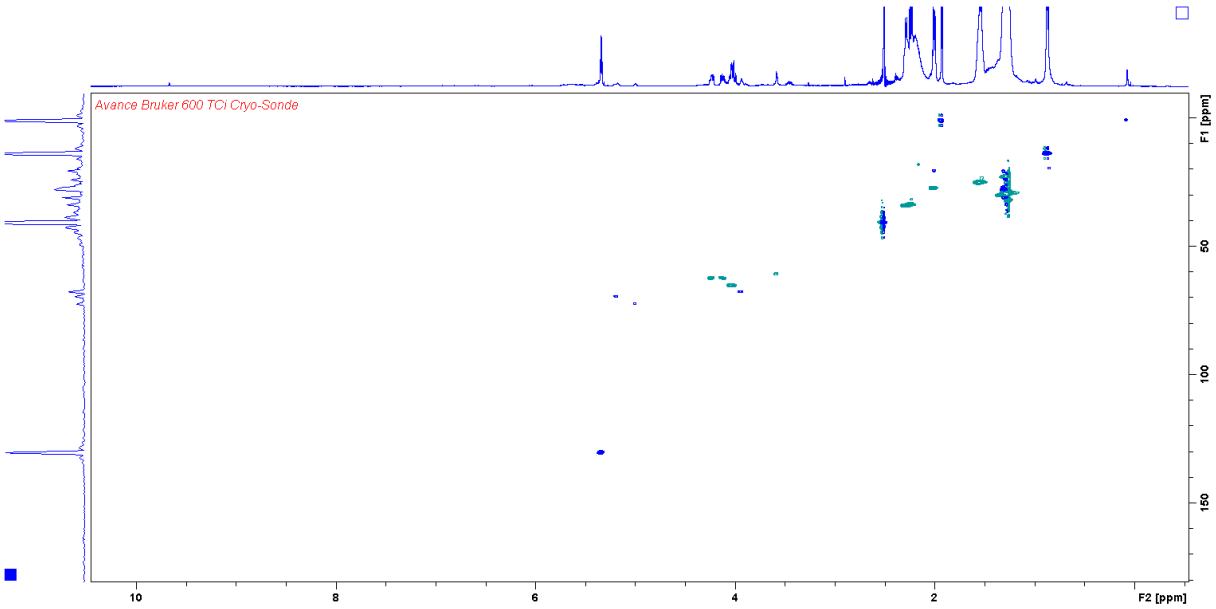
Spectre proton dans CD3CN



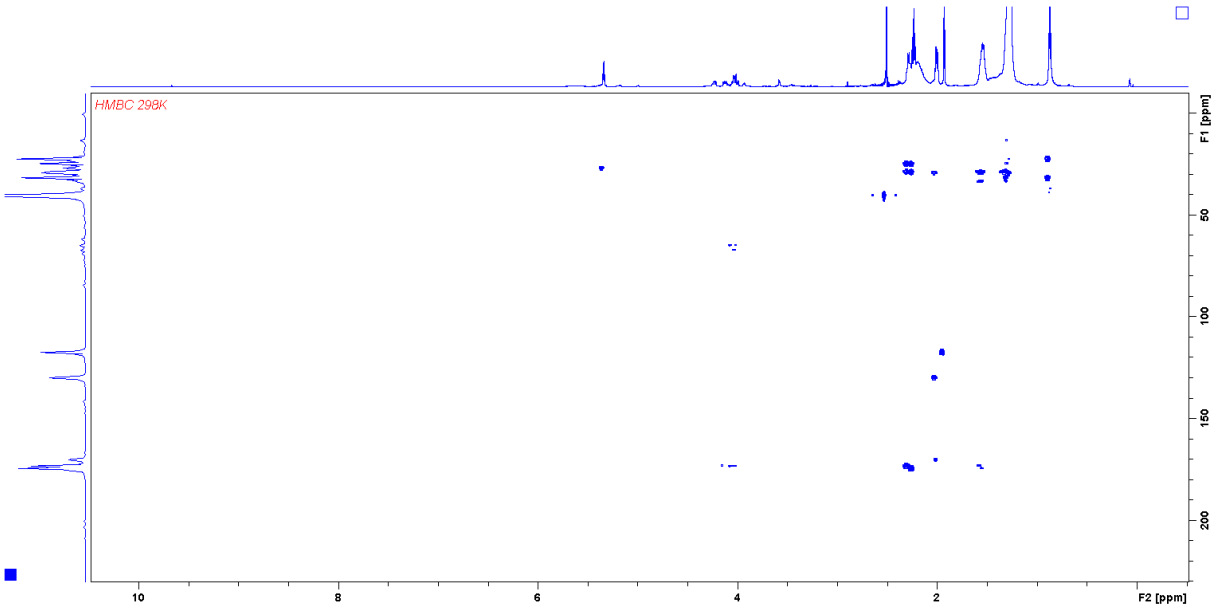
Spectre COSY



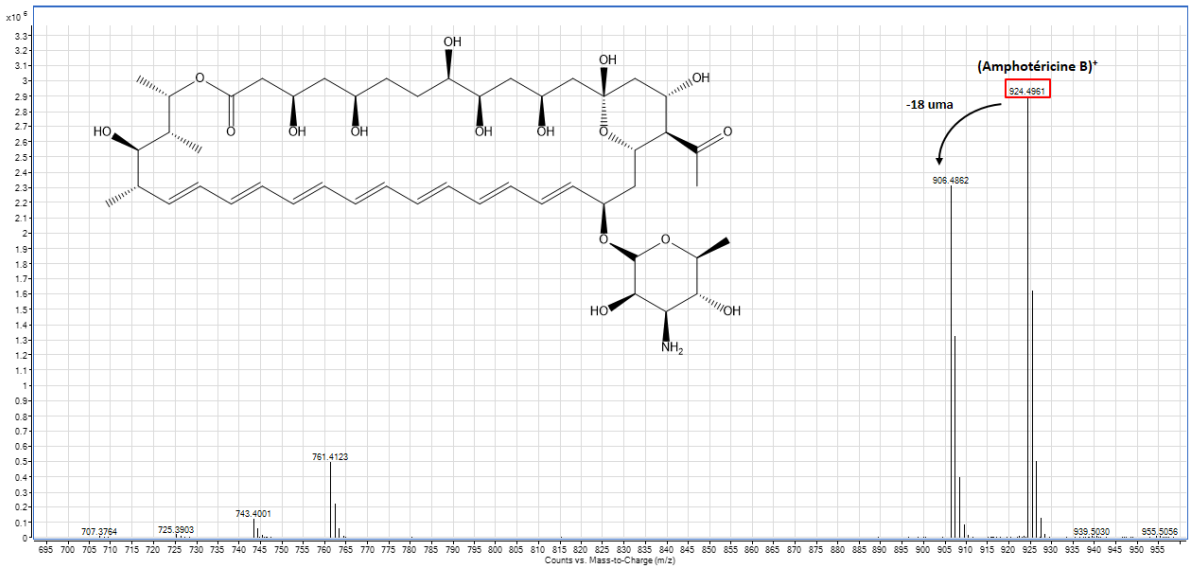
Spectre HSQC



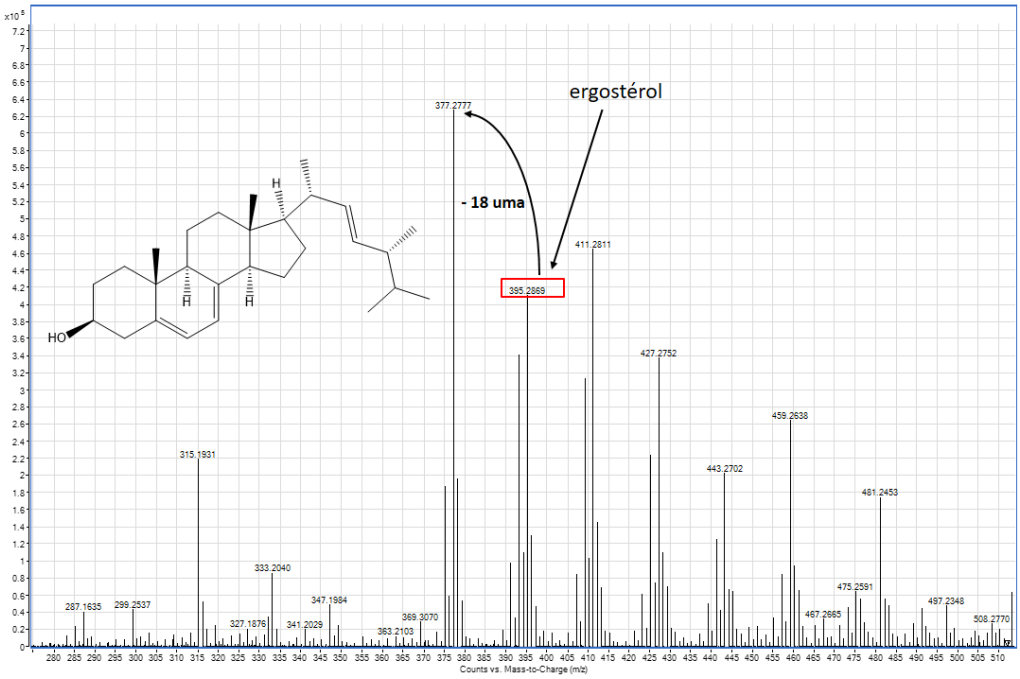
Spectre HMBC



Annexe 8. Spectre SM-ESI (+) de l'amphotéricine B



Annexe 9. Spectre SM-ESI (+) de l'ergostérol



université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Titre : Recherche des molécules antiparasitaires à l'interface de l'ethnopharmacologie, des sciences analytiques et de la biologie.

Mots clés : Médecine traditionnelle, spectrométrie de masse, hème, paludisme.

Résumé : Cette thèse est développée en 3 chapitres. Le premier chapitre décrit un travail d'ethnopharmacologie dans deux communautés de métis de l'Amazonie péruvienne. Les résultats montrent un inventaire de 46 plantes regroupées en fonction de leurs utilisations et préparations traditionnelles. Les activités *in vitro* contre trois parasites (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei gambiense*) et leur cytotoxicité sont rapportées. Parmi toutes ces plantes *Grias neuberthii* (Lecythidaceae) et *Costus curvibracteatus* (Costaceae) ont montré une forte activité antiparasitaire, associé à une forte cytotoxicité pour *C. curvibracteatus*.
Le deuxième chapitre décrit l'exploration, par spectrométrie de masse (SM) dans un milieu biomimétique reproduisant la vacuole digestive de *Plasmodium* (VDP), des liaisons intermoléculaires formé entre l'hème et des ligands. Les résultats pour des ligands de la famille des méthoxyflavones suggèrent qu'il n'existe pas de relation positive entre la stabilité de la liaison à l'hème et l'activité biologique contre deux souches de *P. falciparum* (3D7 et W2). Une corrélation est suggérée entre la présence d'une substitution méthoxylé en R_5 de la flavone, la liaison à l'hème et l'hydrophobicité (cLogP). Cette relation peut s'expliquer en partie par l'influence des liaisons hydrogène avec le du groupe carbonyle.
Des analyses d'arrimage moléculaire ont été aussi développées dans le but de comprendre les forces électrostatiques impliquées dans cette liaison. Le même type d'étude a été appliqué à des sondes fluorescentes originales dérivées de l'artémisinine (ART). La stabilité évaluée par CID montre des similitudes de comportement vis-à-vis de l'hème entre une des sondes et l'ART. La stabilité de trois sondes en différentes conditions mimant la biologie de *Plasmodium* a été évaluée.
Le troisième chapitre détaille le développement d'une méthode de biodéréplication d'extraits bruts, en utilisant la méthodologie de liaison à l'hème par SM. La plante *Piper coruscans* (Piperaceae) a été utilisée pour l'application. La visualisation des adduits formés par SM a été faite de manière rapide par l'intermédiaire de réseaux moléculaires L'isolement des produits ciblés a été faite avec la chromatographie de partage liquide et chromatographie liquide préparative en un ou deux étapes. Treize molécules ont été isolées dont dix produits déjà connus dans la littérature : six flavanones, trois chalcones, un alkylamide; une indanone isolée pour la première fois comme produit naturel, et deux produits naturels nouveaux : une kavalactone et un dérivé de l'acide cinnamique. Parmi toutes ces molécules, une chalcone valide l'activité biologique de la plante et montre une liaison intermédiaire avec l'hème.

Title : Reseach of antiparasitic molecules to interface of ethnopharmacology, analytical sciences and biology.

Keywords : Traditional medicine, masse spectrometry, heme, malaria.

Abstract : This work is developed in 3 chapters. The first chapter described an ethopharmacological work in two Mestizos communities from Peruvian Amazonia. Results showed an inventory of 46 plants grouped according to their uses and traditional preparations. *In vitro* activities on three parasites (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei gambiense*) and theirs cytotoxicity were reported. Among all these plants *Grias neuberthii* (Lecythidaceae) and *Costus curvibracteatus* (Costaceae) showed a strong antiparasitic activity, associated with a strong cytotoxicity for *C. curvibracteatus*.
The second chapter described the exploration, by mass spectrometry (MS) in a biomimetic environment mimic the digestive vacuole of *Plasmodium* (DVP), the intermolecular bonds between the heme and the ligands. Results for ligands of the methoxyflavones family suggested that there is no positive relation between the stability of the heme-binding and the biological activity on two *P. falciparum* strains (3D7 and W2). A correlation was suggested between the presence of a methoxy substitution in R_5 of the flavone, the heme-binding and the hydrophobicity (cLogP). This relation could be partially explain by the hydrogen bonds influence of the
Docking analyses were developed to understand the electrostatic forces involved in the binding. Same kind of study was applied on original fluorescent probes of artemisinin derivatives (ART). Stability, evaluated by CID, showed behavior similarities with heme, between one of these probes and ART. Stability of three probes in different conditions, mimicking Plasmodium biology was evaluated.
The third chapter presented a biodereplicative method development of crude extracts, using heme-binding methodology by MS. The plant *Piper coruscans* (Piperaceae) was selected for this application. MSMS adducts visualization was performed by molecular networking. Targeted products were isolated by centrifugal partition chromatography or preparative liquid chromatography, in one or two steps. Thirteen molecules were isolated, including ten already known products: six flavanones, three chalcones, one alkylamide, one indanone isolated for the first time like a natural product and two new coumpounds: one kavalactone and one cinnamic acid derivative. Among all these molecules, a chalcone validated the biological activity of the plant and showed an intermolecular bound with heme.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

connections of carbonyl group with it.