

Université de Liège
Faculté de Médecine
Centre Interdisciplinaire de Recherche du Médicament
Laboratoire de Pharmacognosie (Pr. M. Frédérick)
Université Catholique de Louvain
Faculté de Pharmacie et des Sciences Biomédicales
Louvain Drug Research Institute (Pr. J. Leclercq)



Étude des potentialités antiplasmodiales de plantes endémiques des Mascareignes: *Poupartia borbonica* Gmel., une nouvelle source de composés antimalariques prometteurs ?

Thèse défendue le 26 mars 2019

En vue de l'obtention du grade de **Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

Jury

Pr. Philippe Hubert, Université de Liège, Président

Pr. Isabelle Grondin, Université de la Réunion, Examineur

Pr. Caroline Stévigny, Université Libre de Bruxelles, Examineur

Pr. Géraldine Piel, Université de Liège, Examineur

Pr. Monique Tits, Université de Liège, Examineur

Pr. Marie-Pierre Hayette, Université de Liège, Examineur

Pr. Joëlle Quetin-Leclercq, Université Catholique de Louvain, Co-promoteur

Pr. Frédérick Michel, Université de Liège, Promoteur

Dr. De Tullio Pascal, Université de Liège, Secrétaire

À tous ces parents,
Qui ont perdu leurs enfants,
À cause d'une piqûre de moustique...

Table des matières

Remerciements	I
Résumé	VII
Abstract	IX
Liste des abréviations	XI
Liste des figures	XVII
Liste des tableaux (partie en anglais)	XXI
Liste des tableaux (partie en français)	XXI
Contexte de la rédaction	XXIII
Chapitre 1 : Introduction générale	1
1. La malaria	1
1.1 Une des plus vieilles maladies de l’humanité.....	1
1.2 Des progrès qui stagnent.....	6
1.3 Un parasite et un vecteur	9
2. Malaria cérébrale	16
2.1 Généralités	16
2.2 Traitements	19
3. Lutte contre le paludisme	20
3.1 Préventions.....	20
3.2 Traitements disponibles	23
3.3 Traitements menacés	29
4. Contexte et objectifs des travaux	31
Chapitre 2 : Étude préliminaire des plantes endémiques des Mascareignes	35

1. Avant-propos	35
2. La Réunion	36
2.1 Une île volcanique au milieu de l'océan.....	36
2.2 Climat	38
2.3 Une végétation à étages	38
3. Évaluation <i>in vitro</i> du potentiel antiplasmodial d'extraits de végétaux de la Réunion.....	45
3.1 Résumé de l'article et contributions personnelles à l'évaluation du potentiel antiplasmodial d'extraits de végétaux de la réunion	46
3.2 Publication.....	50
4. Avant-propos au chapitre 3 : commentaires sur le choix de la plante sélectionnée pour une étude approfondie	61
Chapitre 3: Contribution à l'étude du <i>Poupartia borbonica</i>	63
1. Avant-propos	63
2. <i>Poupartia borbonica</i> Gmel.	64
2.1 Une découverte riche en aventures.....	64
2.2 Une espèce en voie d'extinction	65
2.3 Aspects botaniques	66
2.4 Position taxonomique.....	69
2.5 Confusions.....	69
3. Résumé de l'article et contribution personnelle à l'étude du <i>P.borbonica</i>	71
3.1 Publication	75
4. Avant-propos au Chapitre 4 : Quels sont les défis à relever concernant les poupartones ?.....	103
Chapitre 4 : Toxicité des poupartones	105
1. Avant-propos	105

2. Résumé de l'article: « Toxicity of <i>Poupartia borbonica</i> Gmel. and their poisonous alkyl cyclohexenone derivatives»	106
3. « Toxicity of <i>Poupartia borbonica</i> Gmel. and their poisonous alkyl cyclohexenone derivatives»	108
3.1 Alkyl cyclohexenone from Anacardiaceae: an update	108
3.2 Material and methods	114
3.3 Results.....	116
3.4 Discussion	124
3.5 Conclusion	126
4. Avant-propos au Chapitre 5	127
Chapitre 5: nanovectorisation et poupartone B	129
1. Avant-propos	129
2. Nanovecteurs : principe et intérêt.....	130
3. Nanovecteurs et malaria	131
3.1 Liposomes.....	131
3.2 L'héparine.....	136
4. Résumé de l'article soumis: "Natural Compound-Containing Liposome for Target Activities toward artemisinin-resistant <i>Plasmodium falciparum</i> Isolate"	141
5. Natural Compound-Containing Liposome for Target Activities toward artemisinin-resistant <i>Plasmodium falciparum</i> Isolate."	144
5.1 Materials and methods	144
5.2 Results and discussion	148
5.3 Conclusion	156
Chapitre 6: Discussion générale, conclusions et perspectives	157
Chapitre 7: Bibliographie.....	167
Chapitre 8: Annexes	181

1. Publications en tant que premier auteur faisant l'objet de cette thèse	182
2. Travaux sur le <i>Poupartia borbonica</i> non discutés dans le cadre de ce mémoire.....	206
3. Autres publications en tant que premier auteur	208
4. Liste des posters.....	218
5. Liste des publications en tant que co-auteur	218

REMERCIEMENTS

Au terme de ce parcours doctoral, je souhaite exprimer ma reconnaissance envers les scientifiques, les professeurs, les collègues et amis qui y ont pris part. Leur contribution a été indispensable à la bonne conduite de cette aventure scientifique intense.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à mon promoteur, Monsieur le Professeur Michel Frédéric. Il m'a toujours accordé sa confiance, d'abord en me proposant l'étude phytochimique du *Poupartia borbonica*, domaine qui m'était alors méconnu, et ensuite, en m'assignant le poste d'assistante. Je le remercie de m'avoir permis de suivre mes idées et mes hypothèses, encourageant les essais, les nouvelles tentatives, même les plus insolites. Il a su parfaitement équilibrer les termes « encadrement » et « autonomie », m'offrant incontestablement son aide à chaque fois que j'en ai eu besoin et m'octroyant cette liberté scientifique, véritable moteur de mon travail. Son ouverture d'esprit, ses raisonnements rapides et logiques, ainsi que son indiscutable bienveillance font de lui un modèle scientifique difficile à égaler, mais tellement motivant ! Que cette thèse soit le témoin de ma profonde reconnaissance et de l'estime sincère que je lui porte.

Mes remerciements vont également à ma co-promotrice, Madame le Professeur Joëlle Quetin-Leclercq. Sa rigueur scientifique, ses remarques assurément pertinentes, et ses conseils toujours avisés font d'elle un conseiller de premier ordre. Sa curiosité scientifique, sa détermination, son travail acharné et ses qualités humaines sont un véritable exemple pour le chercheur que j'aspire à être.

Je témoigne ma gratitude à Madame le Professeur Géraldine Piel, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire pour la réalisation des liposomes. Ses connaissances approfondies des nanoparticules, ses conseils et ses remarques constructives ont été un élément clé pour l'aboutissement de cette thèse. Je la remercie sincèrement d'avoir accepté de prendre part à cette aventure et d'avoir eu foi en ce projet. Je remercie les Docteurs Tania Furst et Claudio Palazzo qui m'ont fait profiter de leurs expériences pour mener à bien mon projet.

Je tiens particulièrement à remercier Madame le Professeur Monique Tits pour ses conseils, son aide et sa gentillesse. Sa passion et ses connaissances très profondes des flavonoïdes ont été le point de départ de mes découvertes liées au *Poupartia borbonica*. Je remercie également Monsieur Jean-Noël Wauters et Monsieur Jean-Claude Van Heugen qui y ont également largement contribué.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de mon jury de soutenance de thèse, Madame le Professeur Caroline Stevigny et Madame le Professeur Isabelle Grondin, pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Merci à Monsieur le Professeur Philippe Hubert, pour ses nombreux conseils et ses encouragements lors des réunions du comité de thèse. Merci de me faire l'honneur de présider ce jury.

Permettez-moi de remercier Monsieur le Docteur Pascal de Tullio, pour avoir suivi ce travail depuis le début, pour ses conseils et particulièrement pour m'avoir fait comprendre qu'il était important en recherche de créer et de démontrer l'intérêt de modèle et d'outils. Les échanges que nous avons eus à ce sujet lors d'un congrès de métabolomique à Leiden m'ont encouragée à oser prendre des risques.

Je remercie chaleureusement Madame le Professeur Marie-Pierre Hayette, pour ses remarques pertinentes et le suivi de ce travail. Je la remercie de m'avoir fait bénéficier de ses grandes connaissances dans le domaine de la parasitologie.

Mes remerciements les plus sincères vont au Docteur Érik Maquoi, pour l'expertise scientifique qu'il m'a apportée. L'étude de la toxicité des poupartones n'aurait pas été possible sans lui. Je salue sa gentillesse, ainsi que la richesse de ses idées.

Permettez-moi de chaleureusement remercier le Docteur Hélène Pendeville, responsable de la plateforme « Zebrafish » du GIGA, pour le temps qu'elle a consacré à ma formation et les échanges amicaux que nous avons eus.

Je souhaite également témoigner ma gratitude aux Professeurs Gabriel Castillo et Marianne Fillet, pour la relecture de certaines parties de mon travail, pour leurs conseils, leurs encouragements et leur bienveillance. Merci pour ces moments « hors du temps » que nous avons passés ensemble.

Je remercie le Docteur Pierre Francotte, pour son aide et nos perspectives de collaboration.

Un tout grand merci à mon mentor, ma collègue et amie, le Docteur Olivia Jansen pour m'avoir apporté son aide alors que je n'étais encore qu'étudiante. J'ai souhaité suivre ses traces, et je suis arrivée à Madagascar, au sein de l'équipe de « Jardin du monde ». Je ne savais pas encore à cette époque que cette aventure allait marquer le début d'une belle histoire. Merci Olivia ! Pour tes conseils, pour tout ce que tu m'as appris, pour les premières relectures de mes travaux. Merci d'avoir pris ce temps que tu n'avais pas, au prix de tes soirées et de tes weekends. Je tiens à saluer la qualité de ton travail, la profondeur de tes analyses scientifiques, ta vivacité d'esprit ainsi que ton intégrité. J'espère pouvoir un jour les égaler. Tes qualités humaines font de toi une personne unique et appréciée.

Je tiens à témoigner ma gratitude à la « Dream Team », mes collègues devenus mes ami(e)s. Je pense à Delphine et à Pauline qui m'ont supportée tout au long de ce parcours, acceptant de prendre plusieurs kilos afin de décompresser devant quelques pâtisseries. Merci Delphine, pour toute cette gentillesse sans mesure que tu accordes, merci de nous avoir rappelé, quand nous en avons besoin, ce que signifie être authentique. Tu es quelqu'un de formidable. Merci Pauline, pour cet humour douteux qui rejoint incontestablement le mien. Merci les filles pour tout ce réconfort, ces éclats de rire, votre douceur. Je remercie Amandine et Bérangère, pour leur aide, nos discussions, nos temps de midi animés. Je remercie également les nouveaux arrivants, Gilles, Alison et Olivier, des esprits vifs, bienveillants et motivés qui renforcent agréablement l'unité de notre équipe.

Merci aux anciens, notamment au Docteur Ewa Cieckiewicz, pour ses conseils en chromatographie sur colonne ouverte, ainsi que pour m'avoir initiée aux tâches d'assistantat.

Merci à Don Jethro pour nos conversations animées sur l'Afrique. Merci au Docteur Lasha Mskhiladze pour son amitié. Je salue également ces collègues, qui ont dû quitter leur famille pour des périodes plus ou moins longues afin de venir apprendre au laboratoire : Védaste, Paulin, Pascal, Théodora. J'ai admiré votre courage.

Je remercie chaleureusement l'artiste Timour Desdemoustier, qui a réalisé le dessin de couverture de cette thèse. Merci pour ton professionnalisme et pour la qualité de ton art. Merci à Nicolas Kindermans (Nico !) pour la conception graphique de la couverture et pour ta gentillesse, merci d'avoir accepté de m'aider, malgré les délais très courts.

Pour cette collaboration, source de nombreux travaux, je me dois de remercier l'équipe du LCSNSA de l'Université de la Réunion, sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. J'exprime également ma gratitude aux différents collecteurs de plantes, Mr. Fournel, Mr. Strasberg et Mr. Hermann.

Enfin, mais loin d'être les moins importants, je souhaite remercier ma famille pour leur incommensurable soutien.

Merci à mes parents, Alice et Philippe, qui m'ont transmis les valeurs qui me sont chères. J'ai toujours agi au mieux, pour qu'ils soient fiers de moi. Ils m'ont aimée, protégée et propulsée sur les chemins de l'Université. À mes beaux-parents, Alain et Nicole, qui m'ont tout simplement adoptée au sein de leur famille. Sur ce parcours universitaire, ils ont levé toutes les embuches. Je remercie particulièrement ma belle-mère, Nannie, pour l'aide logistique immense qu'elle nous a accordée. Je ne sais pas comment j'aurais réalisé ce travail sans elle. Je remercie également Yves, pour ses conseils et la relecture.

Merci à mon beau-frère, Fred, avec lequel je partage l'amour des sciences et qui m'a appris à relativiser. Merci à ma belle-sœur, Céline, qui représente toute la détermination et la force dont les femmes peuvent faire preuve. Sa combativité a été un véritable modèle. A leur petite Émelyne, dont le magnifique regard nous rappelle que le courage et la persévérance sont les acteurs de la réussite.

À mes garçons, Tom et Éliott, qui sont la preuve vivante que les beaux projets que sont la maternité et la réalisation d'un doctorat sont réalisables de manière conjointe avec un peu d'aide, et un peu (beaucoup... !) d'organisation. Merci à Nicolas, qui en plus de me soutenir durant tout ce parcours doctoral, a sacrifié ses passe-temps et sa carrière pour s'occuper de nos enfants, quand je devais me consacrer à mes recherches. Il n'y a pas de mots assez forts pour lui témoigner toute ma gratitude.

À Dominique Petit, mon amie et grand-mère de cœur de mon petit Tom. Que ton souvenir soit longtemps encore l'étoile qui me guide.

Outre l'aspect humain, je souhaite mettre en évidence les aides pécuniaires dont j'ai bénéficié et qui ont contribué à la bonne conduite de ces travaux : le FNRS, qui a financé ma première année de thèse, la Fondation Léon Frédéricq, qui m'a accordé un subside de fonctionnement, la Société Belge des Sciences Pharmaceutiques, pour les bourses de voyages qu'ils m'ont octroyées, ainsi que l'ULiège, pour les crédits de fonctionnements, les bourses de formation doctorales, ainsi que les bourses de participation à des congrès.

RÉSUMÉ

Ce travail de thèse a été mené dans l'optique de participer à la recherche de nouveaux antipaludiques provenant de plantes endémiques des Mascareignes.

La première partie de ce travail est consacrée au criblage antiplasmodial *in vitro* réalisé sur 64 plantes provenant de l'île de la Réunion. Ces plantes ont été sélectionnées selon plusieurs critères : leurs endémismes, leurs usages traditionnels, ainsi que leurs inscriptions à la Pharmacopée. L'objectif principal de cette partie du travail consistait à mettre en évidence les plantes présentant une activité antiplasmodiale prometteuse ($IC_{50} < 15\mu\text{g/mL}$). Parallèlement, le second objectif était de valoriser la flore locale. Plusieurs plantes se sont avérées être intéressantes : le *Casearia coriacea*, le *Poupartia borbonica* et le *Vernonia fimbrillifera* dont les IC_{50} sont inférieures à $10\mu\text{g/mL}$. Le *Poupartia borbonica* a été sélectionné en vue de réaliser des tests phytochimiques et pharmacologiques approfondis.

La deuxième partie du travail est consacrée à l'exploration phytochimique et pharmacologique de cette plante endémique. Un fractionnement bioguidé a été entrepris et a conduit à la mise en évidence de trois nouveaux composés, des dérivés d'alkylcyclohexenones, les poupartones A, B, et C. Ces trois molécules présentent une activité antiplasmodiale prometteuse ($IC_{50} < 2\mu\text{M}$). La poupartone majoritaire, la poupartone A, a été testée *in vivo* sur un modèle murin. Son potentiel antipaludique a été confirmé, puisqu'une dose de 15 mg/kg a permis une réduction de la parasitémie de presque 70%, 7 jours après l'infection. Cependant, une certaine toxicité a été observée.

La troisième partie de cette thèse a consisté à mettre en évidence des pistes quant aux mécanismes de toxicité liés aux poupartones. Des tests sur larves de Zebrafish exprimant une fluorescence vasculaire ou une fluorescence musculaire ont permis de mettre en évidence qu'une toxicité cardiaque semblait être une conséquence d'un mauvais état général. L'atteinte la plus rapide et la plus marquée, sur toutes larves confondues, était liée à une toxicité de contact importante. Des tests de toxicité cellulaire réalisés avec des techniques d'imagerie en temps réel sur deux lignées cellulaires ont mis en évidence une hétérogénéité d'action. Cependant, la poupartone B induit des modifications importantes de l'adhésion cellulaire, ainsi que des mécanismes de type apoptotique.

La dernière partie de ce travail a eu pour principal objectif de neutraliser cette toxicité périphérique en ciblant spécifiquement les globules rouges parasités par *P. falciparum*. Des liposomes contenant la poupartone B ont été réalisés, ceux-ci ont été entourés d'héparine, connue pour lier spécifiquement certaines protéines exprimées par les globules rouges infectés. Des tests réalisés sur larves de Zebrafish ont démontré une diminution de la toxicité, et les tests réalisés sur *P. falciparum* ont établi que l'activité était améliorée, même sur les *Plasmodium* partiellement résistants à l'artémisinine.

ABSTRACT

This thesis was conducted in the framework of the researching new antimalarials from endemic plants from Mascarene Islands.

The first part of this work is devoted to the *in vitro* antiplasmodial screening performed on 64 plants from Reunion Island. These plants were selected according to several criteria: their endemism, their traditional uses, as well as their inscriptions in the Pharmacopoeia. The main objective of this part of the work was to highlight the plants with promising antiplasmodial activity ($IC_{50} < 15 \mu\text{g} / \text{mL}$). In parallel, the second objective was to valorize the local flora. Several plants have proved to be of interest: *Casearia coriaceae*, *Poupartia borbonica* and *Vernonia fimbrillifera* with IC_{50} values below $10 \mu\text{g} / \text{mL}$. *Poupartia borbonica* has been selected for further phytochemical and pharmacological tests.

The second part of the work is devoted to the phytochemical and pharmacological exploration of *Poupartia borbonica*. A bioguided fractionation was undertaken and led to the isolation of three new compounds, the alkylcyclohexenone derivatives poupartones A, B and C. These three molecules showed promising antiplasmodial activity ($IC_{50} < 2 \mu\text{M}$). The most abundant poupartone, poupartone A, was tested *in vivo* on a murine model. Its antimalarial potential was confirmed, since a dose of $15 \text{ mg} / \text{kg}$ reduced parasitaemia by almost 70%, 7 days after infection. However, it was not devoid of toxicity.

The third part of this thesis consisted in highlighting some tracks about the mechanisms of toxicity related to poupartones. Tests on Zebrafish larvae expressing vascular fluorescence or muscular fluorescence revealed that cardiac toxicity appeared to be a consequence of several troubles. The most pronounced dysfunction was related to significant contact toxicity. Cellular toxicity tests carried out with real-time imaging techniques on two cell lines revealed heterogeneity of action. However, Poupartone B induced important modifications of cellular adhesion, as well as apoptotic-like mechanisms.

The last part of this work had the main objective of neutralizing this peripheral toxicity by specifically targeting *P. falciparum* parasitized red blood cells. Liposomes containing poupartone B have been realized. They have been coated with heparin, which is known to specifically bind some proteins expressed on the surface of infected red blood cells. Tests on Zebrafish larvae showed a decrease of toxicity, and tests on *P.falciparum* established that the activity was improved, even on a partially artemisinin-resistant *Plasmodium* strain.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

APT	Attached proton carbon
AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride
ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) diammonium salt
ACN	Acétonitrile
ACT	Artemisinin-based combination therapy
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIM	Action et Investissement pour combattre la Malaria
APC	Protéine C activée
ART	Artémisinine
ASE	Accelerated Solvent Extraction
AUC	Area Under the Curve
BIOMOL TCN	Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de MOLécules issues de la BIODiversité terrestre et marine de la zone Ouest de l'Océan Indien)
CC₅₀	Concentration inhibant 50% du métabolisme cellulaire
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD₃CN	Acétonitrile deutéré
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CHIKV	Chikungunya virus
CHO	Cholestérol
CHX	Cycloheximide
CIRM	Center for Interdisciplinary research on Medicines
CO₂	Dioxyde de Carbone
COSY	Correlated Spectroscopy
CPE	Cytopathic effect
CPS	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier

CSA	Chondrochondroïtine Sulfate A
CSP	Protéine Circumsporozoïte
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
D₂O	Eau deutérée
Da	Dalton
DAD	Diode Array Detector
DBL	Duffy-binding Like
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DFT	Density Functional Theory
DHA	Dihydroartémisinine
DHFR	Dihydrofolate Réductase
DHOD	Dihydroorotate déshydrogénase
DLS	Dynamic Light Scattering
DMDS	Diméthylsulfure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOTAP	(N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium méthyl-sulfate
DP4+	Modified Probabilitàty
EC₅₀	50% effective concentration
ECD	Electronic Circular Dichroism
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
EPO	Époxomicine
ESI	ElectroSpray Ionization
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Éthanol

FCS	Fetal Calf Serum
FEDER	Fond Européen de Développement Économique et Régional
FPIX	Ferriprotoporphyrine IX
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GAGs	Glycosaminoglycans
GC	Gas Chromatography
GFP	Green fluorescent protein
GTS	Stratégie Technique Globale
H₂O	Eau
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOAc	Acide acétique
hpf	Hour Post Fertilization
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSQC	Heteronuclear Single Quatum Coherence
Hz	Hertz
i.p	Intra péritonéale
i.v	Intra veineux
IC₅₀	Concentration Inhibitrice 50%
IR	Infra-Rouge
iRBC	infected Red Blood Cell
LC	Liquid Chromatography
LC₅₀	Half maximal Lethal exposure Concentration
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MeOH	Méthanol

MeOH-d₄	Méthanol deutéré
MID	Moustiquaires à Imprégnation Durable
MS	Mass Spectroscopy
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
NA	Non actif
nd	Non déterminé
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optical Density
ODD	Objectifs de Développement Durable
ODS	Octadécylsilane
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisation Non Gouvernementale
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p value	Probability value
p.o	Per os
PABA	Acide para-aminobenzoïque
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Polyéthylène glycol
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
pH	Potentiel Hydrogen
pLDH	Lactate Déshydrogénase parasitaire
ppm	Partie par million
pRBC	parazitised Reb Blood Cell
prep-HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance Préparative
r²	Coefficient de corrélation linéaire
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

RSA	Ring Stage Survival Assay
RSD	Relative Standard Deviation
RT	Room Temperature
SI	Selectivity Index
sp	Espèce (végétale)
SP	Sulfadoxine-Pyriméthamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TLC	Thin Layer Chromatography
TOCSY	TOTAL Correlated SpectroscopY
TOF	Time Of Flight
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TPI_n	Traitement Préventif Intermittent pour les Nourrissons
TROLOX	Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
UNESCO	Organisation des Nations Unies pour l'Éducation, la Science et la Culture
UV	Ultra-violet
vs	Versus
WHO	World Health Organization
WST	Tetrazolium salt
δ	Déplacement chimique
Δ	Double bond
ε	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : LA MAL'ARIA, PAR ERNEST HÉBERT (SALON DE 1850). FAMILLE ITALIENNE FUYANT L'ÉPIDÉMIE.....	2
FIGURE 2 : DÉMONSTRATION DE L'UTILISATION DE DDT SUR LA PEAU ET LES VÊTEMENTS PAR UN SOLDAT AMÉRICAIN.....	4
FIGURE 3 : DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DE 3 VECTEURS IMPORTANTS DE LA MALARIA EN EUROPE : ANOPHÈLES ATROPARVUS (ROUGE), ANOPHÈLES LABRANCHIAE (VERT), ET ANOPHÈLES SACHAROVI (MAUVE)	5
FIGURE 4 : LES 8 OBJECTIFS DU MILLÉNAIRE POUR LE DÉVELOPPEMENT, 2000 (UNICEF).	7
FIGURE 5 : LES 17 OBJECTIFS DE DÉVELOPPEMENT DURABLE, 2015 (ONU).	7
FIGURE 6 : EXTRAIT DE L'AVANT-PROPOS DU RAPPORT DE L'OMS EN 2018.....	8
FIGURE 7 : DISTRIBUTION GLOBALE (ROBINSON PROJECTION) DE VECTEURS DE LA MALARIA.....	10
FIGURE 8 : ANOPHÈLE.....	11
FIGURE 9 : RÉSISTANCE DES ANOPHÈLES AUX PYRÉTHRINOÏDES (OMS).....	12
FIGURE 10 : CYCLE DE VIE DU <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	14
FIGURE 11 : ORGANISATION DES PHASES ÉRYTHROCYTAIRES DE <i>P. FALCIPARUM</i> (MÉROZOÏTE (A), JEUNE ANNEAU (B), TROPHOZOÏTE INTERMÉDIAIRE (C) ET SCHIZONTE (D)).	15
FIGURE 12 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA CYTOADHÉRENCE ET DU PHÉNOMÈNE DE ROSETTING DANS UN CAPILLAIRE	17
FIGURE 13 : PHÉNOMÈNE D'ADHÉSION DES GLOBULES ROUGES PARASITÉS INDUISANT UNE RÉDUCTION DU FLUX MICROVASCULAIRE, UNE ACTIVATION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES, ACCENTUÉES PAR LA PRODUCTION DE MÉDIATEURS PRO-INFLAMMATOIRES.....	17
FIGURE 14 : PROTÉINES MEMBRANAIRES EXPRIMÉES PAR LES GLOBULES ROUGES PARASITÉS PAR LE <i>P. FALCIPARUM</i>	18
FIGURE 15 : ILLUSTRATION SCHÉMATIQUE DES PHÉNOMÈNES D'ADHÉSION DES GLOBULES ROUGES PARASITÉS ET ZOOM SUR LA STRUCTURE DE KNOB INCLUANT L'ANTIGÈNE <i>PfEMP1</i>	19
FIGURE 16 : LARVES D'ANOPHÈLE SE DÉVELOPPEMENT DANS DES GÎTES D'EAU STAGNANTE.	21
FIGURE 17 : MODÈLE DE L'INTERACTION DE LA CHLOROQUINE ET DE LA FPIX.	23
FIGURE 18 : STRUCTURES DE LA CHLOROQUINE, DE LA QUININE, DE LA LUMÉFANTRINE ET DE LA MÉFLOQUINE.	24
FIGURE 19 : STRUCTURES DE LA SULFADOXINE, DU PROGUANIL ET DE LA PYRIMÉTHAMINE	25
FIGURE 20 : SCHÉMA REPRÉSENTANT LA FORMATION DE BASES D'ADN À PARTIR DE L'ACIDE FOLIQUE. .	25
FIGURE 21 : STRUCTURE DE L'ATOVAQUONE.	26
FIGURE 22 : STRUCTURE DE LA PRIMAQUINE	27
FIGURE 23 : STRUCTURE DE LA DOXYCYCLINE.....	27
FIGURE 24 : STRUCTURE DE L'ARTÉMISININE.	27
FIGURE 25 : MODÈLE DU MÉCANISME D'ACTION DE L'ARTÉMISININE.....	28
FIGURE 26 : SITUATION GÉOGRAPHIQUE DE L'ÎLE DE LA RÉUNION.	36

FIGURE 27 : PITON DE NEIGES (A), PITON DE LA FOURNAISE (B), CIRQUES DE SALAZIE (C) ET CIRQUE DE CIALOS (D).	37
FIGURE 28 : MOYENNE ANNUELLE DES CUMULS PLUVIOMÉTRIQUES, METEO-FRANCE.	38
FIGURE 29 : CARTE MONDIALE REPRENANT LES 34 « POINTS CHAUDS » DE LA BIODIVERSITÉ.....	39
FIGURE 30 : PYRAMIDE DES HABITATS ET MILIEUX NATURELS.	40
FIGURE 31 : INDIVIDU (<i>POUPARTIA BORBONICA</i>) ANCRÉ DANS LA PAROI BASALTIQUE.	42
FIGURE 32 : TAMARIN DES HAUTS	43
FIGURE 33 : PICTURES OF <i>POUPARTIA BORBONICA</i> (A) (©MICHEL FRÉDÉRICH), <i>CASEARIA CORIACEAE</i> (B) (©J-M SARRAILH) AND <i>VERNONIA FIMBRILLIFERA</i> (C).	49
FIGURE 34 : PHILIBERT COMMERSON (1727-1773).....	64
FIGURE 35 : INVASION PAR LA LIANE À PAPILLON (A), ÉCORÇAGE (B), IMPACT DE L'AMÉNAGEMENT (C) 65	
FIGURE 36 : CARTE DE DISTRIBUTION DES POPULATIONS DE <i>P. BORBONICA</i> J.F.GMEL SUR L'ÎLE DE LA RÉUNION.	66
FIGURE 37 : TRONC DU <i>P. BORBONICA</i>	67
FIGURE 38 : FEUILLES JUVÉNILES (A), FEUILLES DE TRANSITION (B) ET FEUILLES ADULTES (C) DE <i>POUPARTIA BORBONICA</i>	67
FIGURE 39 : FEUILLE JUVÉNILE (A) ET FEUILLE ADULTE (B) DE <i>P. BORBONICA</i>	67
FIGURE 40 : RAMEAU AVEC INFLORESCENCES (A) ET FLEUR FEMELLE (B) DE <i>P. BORBONICA</i>	68
FIGURE 41 : FRUITS IMMATURES (A) ET FRUITS MATURES (B) DE <i>P. BORBONICA</i>	69
FIGURE 42 : COMPARAISON ENTRE <i>POUPARTIA BORBONICA</i> (A) ET <i>ZANTHOXYLUM HETEROPHYLLUM</i> (B).	70
FIGURE 43 : PROFIL HPLC DES FLAVONOÏDES ET ACIDE PHÉNOL DE L'EXTRAIT MeOH DU <i>P. BORBONICA</i> (EN ORANGE : LA 3'-O-HYDROXYSULFONYLQUERCÉTINE, EN BLEU : L'ACIDE ELLAGIQUE, EN VERT : L'ISOQUERCITRIN, EN ROSE : L'HYPEROSIDE.....	71
FIGURE 44 : PROFIL CCM DES EXTRAITS À L'ACÉTATE D'ÉTHYLE (1), AU DICHLOROMÉTHANE (2), AINSI QU'À L'HEXANE (3) AVEC UNE PHASE MOBILE COMPOSÉE D'HEXANE, D'ACÉTATE D'ÉTHYLE ET D'ACIDE ACÉTIQUE (14/6/0.3). LA RÉVÉLATION A ÉTÉ RÉALISÉE AVEC DE LA VANILLINE SULFURIQUE.	72
FIGURE 45 : PROFIL HPLC DE L'EXTRAIT À L'ACÉTATE D'ÉTHYLE (A), DE LA FRACTION E (B), AINSI QUE DE LA FRACTION G (C) (COLONNE RP SELECT B, PHASE MOBILE COMPOSÉE DE MÉTHANOL ET D'ACIDE FORMIQUE 0.1%, MODE GRADIENT).	73
FIGURE 46 : CHROMATOGRAMS OF MeOH EXTRACT (A) CONTAINING THE 3'-O-HYDROXYSULFONYLQUERCÉTIN (FRAMED IN RED) SUBMITTED TO PREP HPLC (B) GENERATING QUERCÉTIN AFTER REMOVING TFA UNDER VACUUM (C) AS OBSERVED COMPARED TO REFERENCE (D).....	82
FIGURE 47 : STRUCTURE OF 3'-O-HYDROXYSULFONYLQUERCÉTIN	83

FIGURE 48 : TLC OF THE EIGHT FRACTIONATIONS OBTAINED AFTER THE FRACTIONATION OF THE ETOAC EXTRACT, ELUTED WITH N-HEXANE/ETOAC/HOAC (14:6:0.3) AND SPRAYED WITH VANILLIN-SULFURIC ACID REAGENT	85
FIGURE 49 : HPLC PROFILES OF ETOAC EXTRACT, FRACTIONS E AND G (A), ELUTED WITH FORMIC ACID 0.1% IN H ₂ O AND MeOH (40: 60 TO 0:100 IN 30 MIN) ON A RP-18 SUPPORT, AND TLC PROFILES OF POUPARTONE A, B AND C AFTER THE PURIFICATION OF FRACTIONS E AND G (B), ELUTED WITH N-HEXANE/ETOAC/HOAC (14:6:0.3) AND SPRAYED WITH VANILLIN-SULFURIC ACID REAGENT.	86
FIGURE 50 : STRUCTURES OF COMPOUNDS 1-3	87
FIGURE 51 : GC-EI-MS SPECTRUM OBTAINED AFTER THE DMDS DERIVATIZATION PROCEDURE ON POUPARTONE A.	88
FIGURE 52 : KEY CORRELATIONS OBSERVED IN THE HMBC () AND COSY () NMR SPECTRA OF COMPOUNDS 1-3	90
FIGURE 53 : ¹ H NMR SPECTRUM AND ¹³ C APT SPECTRUM OF POUPARTONE A (COMPOUND 1)	92
FIGURE 54 : ¹ H NMR SPECTRUM AND ¹³ C APT SPECTRUM OF POUPARTONE B (COMPOUND 2).	94
FIGURE 55 : ¹ H NMR SPECTRUM AND ¹³ C APT SPECTRUM OF POUPARTONE C (COMPOUND 3).	96
FIGURE 56 : DIAGRAM OF THE MOST STABLE CONFIGURATIONS OF THE FOUR ISOMERS OF COMPOUND 1	97
FIGURE 57 : <i>IN VIVO</i> PARASITEMIA INHIBITION IN MICE INFECTED BY <i>PLASMODIUM BERGHEI</i> AND TREATED INTRAPERITONEALLY WITH 15 MG/KG/D OF COMPOUND 1.....	100
FIGURE 58 : COMPOSÉS DÉCRITS COMME ÉTANT ANTIPARASITAIRES (A), NON-ANTIPARASITAIRES (NA), TOXIQUES SUR MODÈLE CELLULAIRE (T) OU NON TOXIQUES SUR MODÈLE CELLULAIRE (NT).	107
FIGURE 59 : STRUCTURE OF URUSHIOL.	109
FIGURE 60 : STRUCTURES OF COMPOUNDS DESCRIBED IN TABLE 7.	113
FIGURE 61 : MDA-MB-231 CELLS EXPOSED TO 0.5 TO 2.5 µG/ML OF POUPARTONE B AFTER 48 HOURS OF INCUBATION (CONTROL DOXORUBICIN AT 2 µM)	117
FIGURE 62 : A375 CELLS EXPOSED TO 0.5 TO 2.5 µG/ML OF POUPARTONE B AFTER 48 HOURS OF INCUBATION (CONTROL DOXORUBICIN AT 2 µM)	118
FIGURE 63 : OBSERVATION OF REFRACTIONS PHENOMENON AND BLEBS AT T=0, 90 MIN, 5 HOURS, 6 HOURS ½, AND 8 HOURS , WITH 2.5µG/ML OF POUPARTONE B ON A375 CELLS.....	119
FIGURE 64 : OBSERVATION OF TRANSIENT VACUOLIZATION AFTER 40 HOURS (A), 44 HOURS (B) AND 45 HOURS (C) OF 1µ/ML OF DRUG EXPOSURE	119
FIGURE 65 : RELATIVE CONFLUENCY AND RELATIVE NUCLEAR DENSITY OF MDA-MB-231 AND A375 CELLS EXPOSED TO DIFFERENT CONCENTRATION OF POUPARTONE B (0-2.5 µG/ML) ACCORDING TO TIME	120
FIGURE 66 : A375 CELLS EXPOSED TO 2.5 µG/ ML OF POUPARTONE B AT 0H, 5H, 12H, AND 24H INCUBATION TIME, NUCLEAR CONDENSATION IS SHOWN BY ARROWS	121

FIGURE 67 : EFFECT OF POUPARTONE B EXPOSURE ON VASCULAR TRANSGENIC ZEBRAFISH EMBRYOS-LARVAS FLI-GFP. (A) INTERSOMITIC VESSELS, (B) DORSAL AORTA AND CARDINAL VEIN, COMPARED TO UNTREATED LARVA AT 72 HOURS POST-FERTILIZATION.	122
FIGURE 68 : EFFECT OF POUPARTONE B EXPOSURE ON MUSCULAR TRANSGENIC ZEBRAFISH EMBRYO LARVAS MYLZ-MCHERRY. (A) MYOTOMES, (B) NOTOCHORD.	123
FIGURE 69 : EFFECT OF POUPARTONE B EXPOSURE ON THE TAIL OF ZEBRAFISH EMBRYOS-LARVAS AT 5 μ G/ML (A), AND 10 μ G/ML (B) COMPARED TO CONTROL (C) 72 HOURS POST FERTILIZATION. .	123
FIGURE 70 : DANS LA DÉFENSE DES CELLULES VÉGÉTALES CONTRE UN AGENT PATHOGÈNE FONGIQUE, DES EXOSOMES CONTENANT DE L'ARN SONT ADMINISTRÉS AUX CELLULES FONGIQUES ENVAHISSANTES. ILS SONT ENCAPSULÉS DANS DES EXOSOMES QUI S'ASSEMBLENT DANS DES CORPS MULTIVÉSICULAIRES (MVB) ET SONT SÉCRÉTÉS.	131
FIGURE 71 : REPRÉSENTATION D'UN LIPOSOME	132
FIGURE 72 : LIPOSOME DE PREMIÈRE GÉNÉRATION	132
FIGURE 73 : LIPOSOME DE DEUXIÈME GÉNÉRATION, CONTENANT DES PEG	134
FIGURE 74 : LIPOSOME DE TROISIÈME GÉNÉRATION, CONTENANT DES LIGANDS.....	134
FIGURE 75 : SCHÉMA D'UN LIPOSOME CONTENANT DEUX PRINCIPES ACTIFS, DES PEG, ET DES ANTICORPS	136
FIGURE 76 : DISACCHARIDES FORMANT L'HÉPARINE : DISACCHARIDE TRISULFATÉ PRINCIPALE (A), DISACCHARIDE MOINS ABONDANT (B).	136
FIGURE 77 : PROFILS PHARMACOCINÉTIQUES DE LA DOXORUBICINE DANS DIVERSES FORMULATIONS APRÈS INJECTION I.V SUR SOURIS.....	138
FIGURE 78 : TECHNIQUE DE FLUORESCENCE MICROSCOPIQUE SUR SANG DE SOURIS INFECTÉES PAR <i>P. YOELII</i> . L'HÉPARINE CIBLE SPÉCIFIQUEMENT LES GLOBULES ROUGES PARASITÉS.	139
FIGURE 80 : ACCURACY PROFILE OBTAINED CONSIDERING A LINEAR REGRESSION FOR POUPARTONE B; PLAIN LINE: RELATIVE BIAS, DASHED LINES: B-EXPECTATION TOLERANCE LIMITS, DOTTED LINES: ACCEPTANCE LIMITS, AND DOTS: RELATIVE BACK-CALCULATED CONCENTRATIONS.	150
FIGURE 81 : SURVIVAL RATE OF PARASITES IN THE RSA TEST (%), WITH TREATMENT DOSE OF 2.6 μ M OF POUPARTONE B AND LIPOSOMES CONTAINING 2.6 μ M OF POUPARTONE B WITH HEPARIN.....	154
FIGURE 82 : SURVIVAL (%) OF THE ZEBRAFISH AT 48 AND 72H EXPOSED TO THE CONTROL (DMSO 0.01%, IN BLUE), THE LIPOSOMES CONTAINING HEPARIN WITHOUT POUPARTONE B (EMPTY LIPOSOME, IN RED), A CONCENTRATION RANGE (1 TO 15 μ G/ML) OF POUPARTONE B (1-15 μ G/ML, IN BLUE) AND LIPOSOMES CONTAINING THE SAME QUANTITY OF POUPARTONE B WITH HEPARIN (1-15 μ G/ML, IN RED)	155

LISTE DES TABLEAUX (PARTIE EN ANGLAIS)

TABLE 1 : <i>IN VITRO</i> IC ₅₀ VALUES AGAINST <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> 3D7 STRAIN OF THE MOST ACTIVE PLANT EXTRACTS.....	57
TABLE 2 : ANTIPLASMODIAL ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF <i>P. BORBONICA</i> LEAVES AGAINST <i>P. FALCIPARUM</i>	80
TABLE 3 : NMR DATA OF COMPOUND 1 (Δ IN PPM, MULTIPLICITY (J IN HZ) AND HMBC CORRELATIONS).....	91
TABLE 4 : NMR DATA OF COMPOUND 2 (Δ IN PPM, MULTIPLICITY (J IN HZ) AND HMBC CORRELATIONS).....	93
TABLE 5 : NMR DATA OF COMPOUND 3 (Δ IN PPM, MULTIPLICITY (J IN HZ) AND HMBC CORRELATIONS).....	95
TABLE 6 : ANTIPLASMODIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF COMPOUNDS 1-3 AND EtOAc EXTRACT	98
TABLE 7 : PLANTS CONTAINING ALKYL CYCLOHEXNONE DERIVATIVES, THEIR STRUCTURES, THEIR BIOACTIVITIES AND/OR TOXICITIES. IN BLUE: ANTIPLASMODIAL AND NO-CYTOTOXIC COMPOUNDS ON CELL(S) INVESTIGATED, IN GREY: ANTIBACTERIAL AND NO CYTOTOXIC COMPOUNDS ON HEALTHY CELL(S) INVESTIGATED (STRUCTURES ARE IN FIG. 59).	110
TABLE 8 : PRE-VALIDATION RESULTS (K= NUMBER OF SERIES; N= NUMBER OF REPLICATES PER SERIES).	149
TABLE 9 : ANTIPLASMODIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF POUPARTONE B, EMPTY LIPOSOMES, AND LIPOSOMES CONTAINING POUPARTONE B WITH OR WITHOUT HEPARIN. NA = NON-ACTIVE. NT = NOT TREATED	152

LISTE DES TABLEAUX (PARTIE EN FRANÇAIS)

TABLEAU 1 : ESPÈCES, FAMILLE, NOMS VERNACULAIRES ET USAGES TRADITIONNELS DE CERTAINES PLANTES ÉTUDIÉES.	46
TABLEAU 2 : ACTIVITÉS ANTIPLASMODIALES DES PLANTES LES PLUS PROMETTEUSES, LES TROIS PLUS INTÉRESSANTES ONT UNE IC ₅₀ PROCHES DE 5 μ G/ML	48
TABLEAU 3 : RÉSUMÉ DES IC ₅₀ OBTENUES AVEC LES LIPOSOMES HÉPARINÉS CONTENANT LA POUPARTONE B ET LES NON HÉPARINÉS CONTENANT LA POUPARTONE B, SUR <i>P. FALCIPARUM</i> ET CELLULES HELA	142

CONTEXTE DE LA RÉDACTION

Tout au long de ce travail de thèse, le pronom « nous » sera utilisé. N’y voyez pas un accord sylleptique remplaçant ma personne, mais bien une façon de remercier l’ensemble des chercheurs et des techniciens qui se sont impliqués scientifiquement et humainement dans cette aventure.

Ce travail se divise en plusieurs parties, correspondant principalement aux articles qui en sont le fruit. La plupart des journaux scientifiques internationaux n’acceptent plus que la langue de Shakespeare, devenue incontournable, afin de rendre les résultats accessibles au plus grand nombre. C’est dans cette optique que les principaux résultats de cette thèse ont été exprimés en anglais. Bien que ceux-ci soient présentés sous la forme d’articles publiés (ou soumis), il ne s’agit pas d’un « copier-coller » de leur forme initiale. Les introductions ont été simplifiées/supprimées en vue d’éviter les redondances avec les introductions principales présentées aux chapitres correspondants, et les résultats ont été enrichis avec des illustrations du travail, non disponibles dans la publication initiale (schémas, photographies, graphiques,...). Une note en bas de page associée à cet ajout permettra aux lecteurs de les différencier de la publication originale. Le but de ces quelques modifications est de rendre la lecture plus légère, tout en constituant un ensemble cohérent.

Ce mémoire est composé de quatre parties principales. La première est consacrée au large screening antiplasmodial mené sur quelques espèces endémiques de l’île de la Réunion, ayant permis de mettre en évidence une plante intéressante, le *Poupartia borbonica*, sur laquelle se focalise la seconde partie du travail. La troisième partie concerne les molécules isolées de cette plante et leur toxicité et la dernière partie est dédiée à la réalisation de liposomes destinés à masquer cette toxicité et à exacerber l’effet antiplasmodial de ces molécules.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LA MALARIA

1.1 UNE DES PLUS VIEILLES MALADIES DE L'HUMANITÉ

Depuis plus de 2500 ans, l'idée que les fièvres étaient liées aux miasmes provenant des marécages a persisté, ce qui est d'ailleurs à l'origine du nom **malaria** (de l'italien *mal'aria*, « mauvais air ») ou encore **paludisme** (du latin *paludis*, « marais »). La malaria est une maladie connue depuis des millénaires, comme en témoignent les traces du passé qui font référence à sa symptomatologie, telles que des documents chinois (2700 ans ACN), des tablettes d'argile découvertes en Mésopotamie (2000 ans ACN), des papyrus égyptiens (1570 ans ACN), ainsi que des textes hindous datant du 6^{ème} siècle ACN.¹ Des preuves scientifiques de sa présence en 3200 et 1340 ACN ont été mises en évidence lors de la découverte d'antigènes de la malaria dans des momies égyptiennes. La malaria est probablement arrivée en Europe via la vallée du Nil pendant la période du néolithique (4000-3000 ACN) et est restée endémique pendant plus de 2000 ans.

Cinq siècles avant notre ère, Hippocrate avait attribué dans son « *Traité des eaux, des airs et des lieux* », l'origine des fièvres aux exhalaisons des marais. Au 4^{ème} siècle ACN, les Grecs ont constaté également un lien entre les individus exposés aux zones marécageuses et le développement de fièvres périodiques.

Cette notion de marécage vecteur de maladie est bien affirmée sous le règne de Louis XIV. C'est à cette période qu'apparaît le terme de « miasmes », espèce d'émanation qui se répand dans l'air en causant maladies et épidémies. À cette époque, l'**opium** était utilisé pour soulager les symptômes.² Les Italiens mentionnent alors une maladie de l'air : *mal'aria*, « mauvais air ». En ce milieu de 17^{ème} siècle, des traitements étaient proposés en vain, tantôt agressifs, tels que des dérivés d'arsenic, tantôt moindres, tels que des tisanes de centaurée. Lavements, purges et saignées étaient pratique courante, afin d'évacuer le « principe morbifique » du corps du patient.

En 1640, Barnabé de Cobo, jésuite procureur de la province du Pérou, introduit en Europe une plante utilisée comme fébrifuge en médecine traditionnelle par

les populations indigènes : le « kina-kina », le quinquina. Son nom scientifique, *Cinchona pubescens*, lui a été octroyé par le botaniste Linné, en hommage à la Comtesse Anna del Chinchón, épouse du vice-roi du Pérou, qui fut probablement guérie de la malaria grâce à cette écorce, en 1638. L'écorce de quinquina, connue également sous le nom de « poudre de la comtesse » a été largement utilisée et a permis de guérir de nombreux malades, tels que Charles II Stuart, et le fils de Louis XIV qui en 1678 contracta une fièvre extrêmement rebelle lors de l'assainissement des marais de Versailles, ainsi que le roi lui-même. Le roi Soleil, qui portait un intérêt tout particulier à la Pharmacopée, fit publier un document sur les vertus des remèdes à base de quinquina par son Apothicaire Royal.

En 1820, deux pharmaciens français, Pelletier et Caventou, isolèrent la quinine, principe actif de l'écorce de quinquina. Au milieu du 19^{ème} siècle, la malaria était dispersée mondialement, ce fléau était au cœur des préoccupations des foyers, qui fuyaient les épidémies (fig. 1).



FIGURE 1 : La mal'aria, par Ernest Hébert (Salon de 1850). Famille italienne fuyant l'épidémie.

En 1880, Charles Laveran identifia la cause de cette pathologie : un parasite sanguin, le *Plasmodium*, qu'il observa dans du sang frais. Cinq ans plus tard, Camillo Golgi observa des formes asexuées sanguines. En 1890, Patrick Manson émit l'hypothèse de la transmission du parasite par un vecteur. Cette hypothèse fut confirmée par Ronald Ross, qui identifia des *Plasmodium* dans des estomacs

de moustique.³ Afin de compléter le cycle de vie du parasite, les scientifiques ont dû déterminer les étapes de transmission du *Plasmodium*. Même si le stade sanguin avait été identifié comme responsable (et à juste titre) des accès de fièvre, il fallut attendre 1947 pour que Henry Chortt et Cyril Granham démontrent la phase hépatique, complétant ainsi le cycle. Parallèlement sont apparus les premiers médicaments synthétiques, tels que la chloroquine, synthétisée pour la première fois en 1934, et nommée résochine, par H. Andersag de la société Bayer. Considérée comme trop toxique, des dérivés ont été synthétisés, tels que la sontochine, en 1936. Cependant, lors de la seconde guerre mondiale, l'approvisionnement en quinine a été compromis, suite à la prise de Java par les Japonais. Les chercheurs britanniques, américains et australiens ont donc entrepris de coopérer dans le but de développer de nouveaux antipaludiques de synthèse et testent alors plus de seize mille composés, dont la résochine, considérée une seconde fois comme trop toxique. La sotonchine était parallèlement testée à Tunis. Les alliés, au vu des résultats de ces essais, ont décidé de poursuivre les travaux sur la résochine, alors renommée chloroquine. En 1946, les essais cliniques réalisés par les américains ont démontré le puissant potentiel antimalarique de la chloroquine.⁴ Elle a été un des antipaludiques les plus efficaces et les plus utilisés lors du siècle dernier et était d'ailleurs le principal médicament préconisé en 1955, lorsque l'OMS a lancé un programme d'éradication mondiale de la malaria.

L'essor économique de l'Europe au début du 20^{ème} siècle a initié le déclin de la transmission de la malaria. Les marécages ont été drainés afin de rendre les terres propices à l'agriculture, les zones urbaines ont été agrandies, les conditions sanitaires et les soins de santé ont été améliorés. Tous ces facteurs ont été de véritables freins au développement palustre. Les traitements médicamenteux ainsi que la pulvérisation d'insecticides (fig. 2) ont encore réduit la prévalence de la maladie, conduisant à l'élimination de la malaria en Europe en 1978.



FIGURE 2 : Démonstration de l'utilisation de DDT sur la peau et les vêtements par un soldat américain. Source : Public Health Image Library, CDC.

Cependant, fin des années 1970, l'OMS abandonne son programme suite au développement de souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine, ainsi qu'à l'apparition de moustiques résistants au DDT. En effet, la première détection de résistance à la chloroquine a été référencée en 1957 en Asie, et s'est rapidement étendue dans plusieurs régions du monde, compromettant son efficacité. La malaria n'est pas mondialement éradiquée, c'est un échec.

En 1976, Trager et Jensen⁵ mettent au point un protocole afin de maintenir des parasites en culture *in vitro*, ce qui a permis de tester leur sensibilité face aux agents thérapeutiques. Ce protocole est toujours utilisé aujourd'hui afin de rechercher de nouvelles molécules actives. Cette année-là marque également une grande avancée : la structure chimique de l'artémisinine, découverte par l'équipe du professeur Youyou Tu, est obtenue. Cette molécule sera la base du développement de dérivés semi-synthétiques : l'artémether et l'artésunate en 1987 et la dihydroartémisinine en 1992. Début des années 1980, des combinaisons de molécules ont été préconisées : un dérivé de l'artémisinine, afin de réduire la charge parasitaire rapidement, couplé à un partenaire qui élimine les parasites restants. Naissent ainsi les « Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine », les CTA, recommandées par l'OMS.

Une intensification des efforts pour lutter contre le paludisme est observée entre 2000 et 2014 et permet de réduire drastiquement le nombre de décès liés à la malaria.

En Europe, certains cas de malaria « autochtone » sont importés par des voyageurs ou des immigrants. Le dépistage rapide, l'accès aux traitements et le nombre d'anophèles compétents pour transmettre le parasite rendent la transmission autochtone très rare. Cependant, bien que le nombre de moustiques soit drastiquement diminué, ceux-ci ne sont pas complètement éradiqués, ce que l'on dénomme « anophélisme exempt de malaria » (fig.3). Les changements climatiques pourraient favoriser la prolifération de ces vecteurs capables de transmettre le parasite. En effet, la température est un paramètre déterminant pour leur survie et leur développement. L'afflux massif de réfugiés et de migrants provenant de zones endémiques pourrait constituer un réservoir facilitant la transmission.⁶

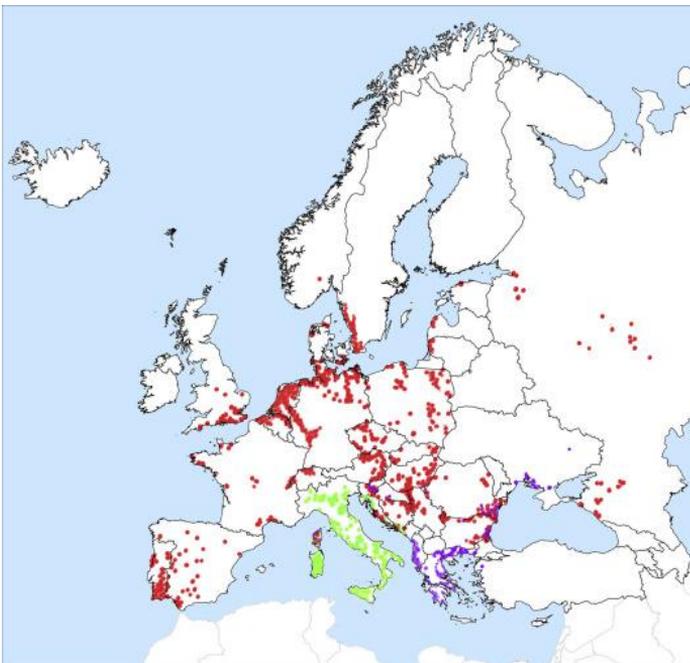


FIGURE 3 : Distribution géographique de 3 vecteurs importants de la malaria en Europe : Anophèles atroparvus (rouge), Anophèles labranchiae (vert), et Anophèles sacharovi (mauve).⁶

Malgré le fait que cette maladie soit connue depuis des lustres, 300 à 500 millions de personnes sont toujours exposées, entraînant un problème majeur de santé publique dans les pays du Sud. En 2016, 91% des décès liés au paludisme sont survenus en Afrique.⁷ L'accès aux soins, aux médicaments de qualité et aux informations liées à la prévention font défaut dans les pays les plus touchés. Le

lien entre paludisme et pauvreté n'est plus à établir. Cela constitue à la fois une cause et une conséquence de la précarité des populations concernées.

1.2 DES PROGRÈS QUI STAGNENT

Selon le World Malaria Report de 2011,⁸ la période de 2000 à 2010 a été marquée par une réduction de 25% de la mortalité liée au paludisme, grâce aux moustiquaires imprégnées d'insecticides, à un diagnostic plus efficace, ainsi qu'à une disponibilité accrue des traitements recommandés (thérapies Combinées à base d'Artémisinine). La lutte s'est intensifiée et a permis une diminution considérable du taux de mortalité. En 2013, le rapport annuel de l'OMS⁹ traduit des progrès en termes d'investissements financiers et (donc) de vies sauvées. Le Directeur à l'OMS du Programme mondial de lutte antipaludique à cette période, le Dr Robert Newman, exprimait cependant ses craintes : « Les progrès remarquables accomplis contre le paludisme sont encore fragiles (...) Au cours des 10 à 15 prochaines années, le monde aura besoin d'outils et de techniques innovantes, ainsi que d'approches stratégiques pour pérenniser et accélérer les progrès ». Ses craintes étaient fondées, après cette période de franc succès, les progrès ralentissaient...

Malheureusement, l'aide allouée à la lutte contre le paludisme décline. Il est en effet difficile de mesurer son efficacité de manière probante. De plus, les progrès obtenus font que cette menace n'est plus considérée comme une « priorité ». Le passage des « Objectifs du Millénaire »¹⁰ (fig.4) aux « Objectifs de Développement Durable »¹¹ (ODD) dans l'Horizon 2030 (fig.5) constitue également un élément majeur quant à la diminution de l'aide internationale verticale. Les objectifs ne s'adressent plus uniquement aux Pays en Voie de Développement, mais à tous. Trois dimensions sont prises en compte : les dimensions sociales, économiques et environnementales.¹² Ce changement de paradigme entraîne un remodelage de la distribution des ressources financières. L'aide est priorisée en fonction de l'efficacité qu'elle va engendrer et non de la nécessité. Malheureusement, les résultats des campagnes de lutte contre le paludisme sont difficilement évaluables à court terme...



FIGURE 4 : Les 8 objectifs du millénaire pour le développement, 2000 (UNICEF).

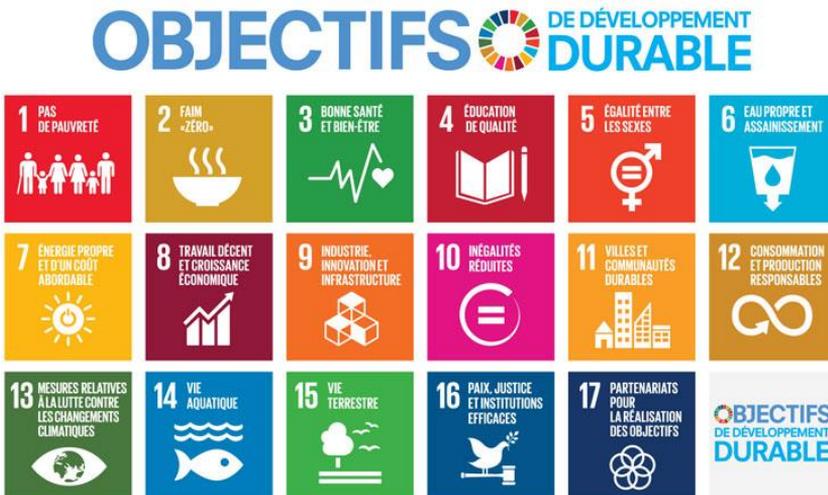


FIGURE 5 : Les 17 objectifs de développement durable, 2015 (ONU).

Le paludisme s’inscrit dans un des 37 sous-objectifs de l’Objectif 3, « Bonne Santé et Bien-être ». Malgré le fait que les ODD des Nations Unies ont pour but de ne laisser personne de côté, une étude financée par la Fondation Bill & Melinda Gates estime qu’un faible pourcentage de ces sous-objectifs sera atteint. Ses auteurs soulignent des inégalités élevées : les pays à revenus élevés atteindraient 38% des buts fixés, contre seulement 3% pour ceux à faibles revenus...¹³

Et comme une piqûre de rappel, le dernier rapport de l’OMS dénombre plus de 219 millions de cas dans 91 pays en 2017, soit 3 millions de plus qu’en 2016 qui nous ramenait déjà au niveau de 2012. En effet, 445 000 personnes avaient perdu la vie, soit

7000 de plus qu’en 2015, principalement des enfants de moins de 5 ans. Pour la première fois depuis une décennie, la mortalité ne s’affaiblit pas, mais augmente. Cependant, des progrès ici et là nous permettent de nous appuyer sur une note positive. En 2017, certains pays se sont rapprochés de l’objectif de l’élimination du paludisme, tels que l’Inde, l’Éthiopie, le Pakistan et le Rwanda.

Cependant, le rapport de 2018 traduit un message sans ambiguïté : les pays les plus sévèrement touchés enregistrent une hausse de cas, et le niveau d’investissement dans la lutte contre le paludisme reste insuffisant (fig.6). En effet, le financement de la lutte stagne avec 2.7 milliards de dollars d’investissement en 2016 (moins de la moitié de ce qui est nécessaire pour atteindre les cibles mondiales d’ici à 2030), péniblement rehaussé à 3.1 milliards de dollars en 2017.¹⁴⁻¹⁵

Il est difficile face à ces sommes d’évaluer ce qu’elles représentent. À titre informatif, l’organisation de la coupe du monde de football en Russie (2018) a nécessité un capital de 10 milliards d’euros, soit un peu plus de 11 milliards de



FIGURE 6 : Extrait de l’Avant-propos du rapport de l’OMS en 2018.

dollars. Les budgets alloués à la seule construction du stade de la coupe du monde de football qui se tiendra au Qatar en 2022 s'élèvent à 8-10 milliards de dollars.

Cette insuffisance financière dans la lutte contre la malaria crée des déficiences fondamentales en termes de prévention et de médicaments, indispensables pour sauver des vies... Cependant, le nombre de décès lié au paludisme ne devrait-il pas justifier à lui seul un financement à n'importe quel prix ?

1.3 UN PARASITE ET UN VECTEUR

1.3.1 ANOPHÈLE

○ RÉPARTITION

Suite aux nombreuses recherches effectuées, le vecteur du paludisme a été mis en évidence en 1898 par Amico Bignami et Giovanni Battista Grassi¹: le moustique *Anophèle* (Famille : *Culicidae*). L'anophèle, du grec « anôphèles » qui signifie « nuisibles », sévit sur les 5 continents. Cependant, seules certaines espèces sont capables de transmettre la malaria. Il existe plus de 400 espèces d'*Anophèles*, dont une trentaine représente des vecteurs importants du *Plasmodium* (fig. 7). Parmi elles, l'*Anophèle gambiae* est l'espèce la plus présente en Afrique.¹⁶

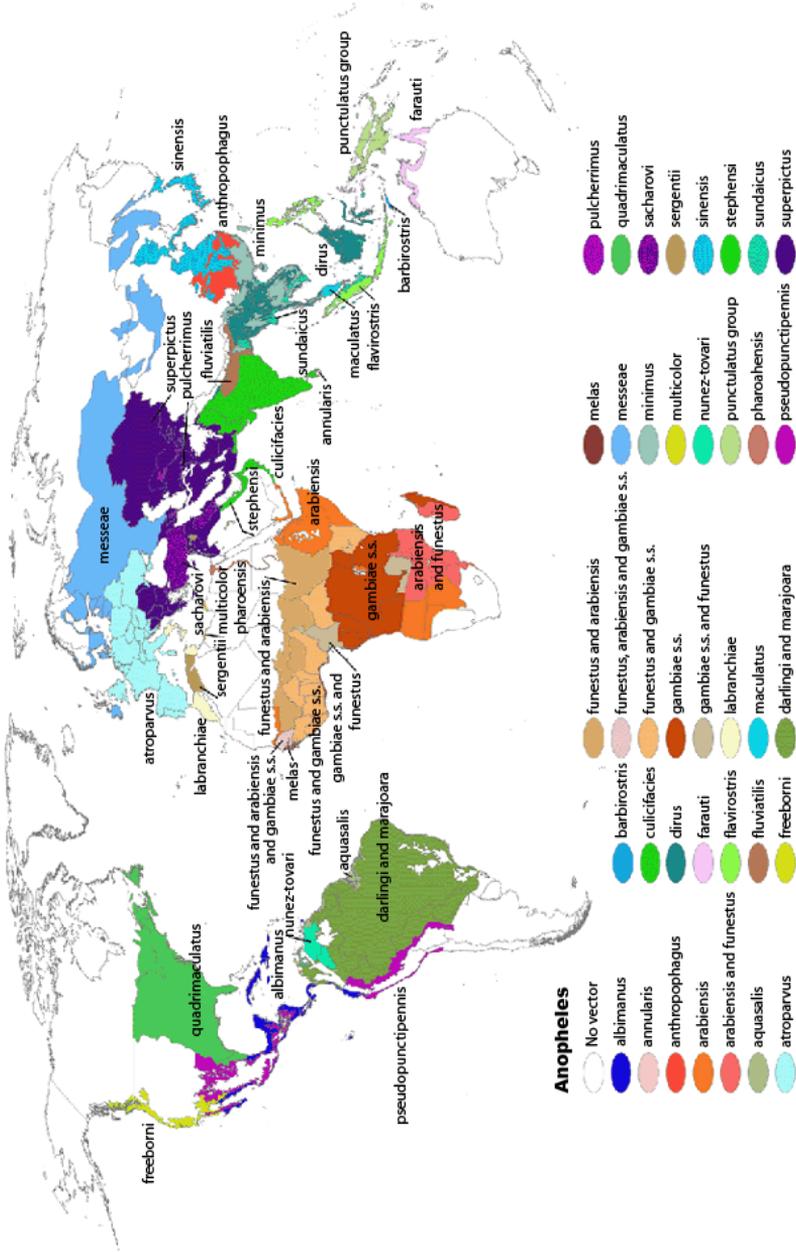


FIGURE 7 : Distribution globale (Robinson projection) de vecteurs de la malaria.¹⁶

○ UN VECTEUR QUI PIQUE AU MOINS DEUX FOIS

Seule la femelle Anophèle (fig. 8) pique, puisque ce repas sanguin est nécessaire à la maturation de ses œufs, qu'elle pond dans l'eau. Les flaques d'eau de faible profondeur, comme celles laissées par les traces de sabots d'animaux qui abondent lors de la saison des pluies, constituent une zone de choix pour la ponte. C'est en prélevant du sang sur un hôte parasité que ce moustique ingère des formes sexuées du parasite. L'œuf produit traverse la paroi de l'estomac du vecteur. Des milliers de formes asexuées du parasite migrent et envahissent les glandes salivaires du moustique. Il transmet alors le *Plasmodium* à d'autres hôtes, lors d'un autre repas sanguin. Les femelles peuvent vivre entre 2 et 6



semaines, au cours desquelles elles peuvent pondre 150 œufs tous les 2 à 3 jours. Les piqûres ont lieu principalement le soir et la nuit, car c'est à ce moment que la sensibilité olfactive des moustiques augmente.¹⁷ Elle baisse pendant la journée, lorsqu'ils dorment.

FIGURE 8 : Anophèle.¹⁵⁶

○ UN MOUSTIQUE QUI FAIT DE LA RÉSISTANCE

Selon l'OMS,¹⁸ les insecticides, tels que le N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET), ainsi que les moustiquaires imprégnées restent les meilleurs moyens de lutter contre ce dangereux vecteur. Barrières physiques et chimiques, elles ont permis de diminuer le nombre de cas de malaria. Cette lutte anti-vectorielle est dépendante des pyréthrinoïdes, insecticides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires. Cependant, de plus en plus de résistances sont constatées. Les régions d'Afrique subsaharienne sont préoccupantes, car le niveau de transmission de la maladie est très élevé et les résistances aux insecticides augmentent (fig. 9).

Reported pyrethroid resistance status of malaria vectors measured with insecticide bioassays, 2010–2016 Data are from standard WHO insecticide susceptibility or Centers for Disease Control and Prevention (CDC) bottle bioassays. Where multiple insecticide classes or types, mosquito species or time points were tested, the most recent resistance status is shown. Sources: *National malaria control programme reports, African Network for Vector Resistance, Liverpool School of Tropical Medicine, Malaria Atlas Project, US President's Malaria Initiative and scientific publications*

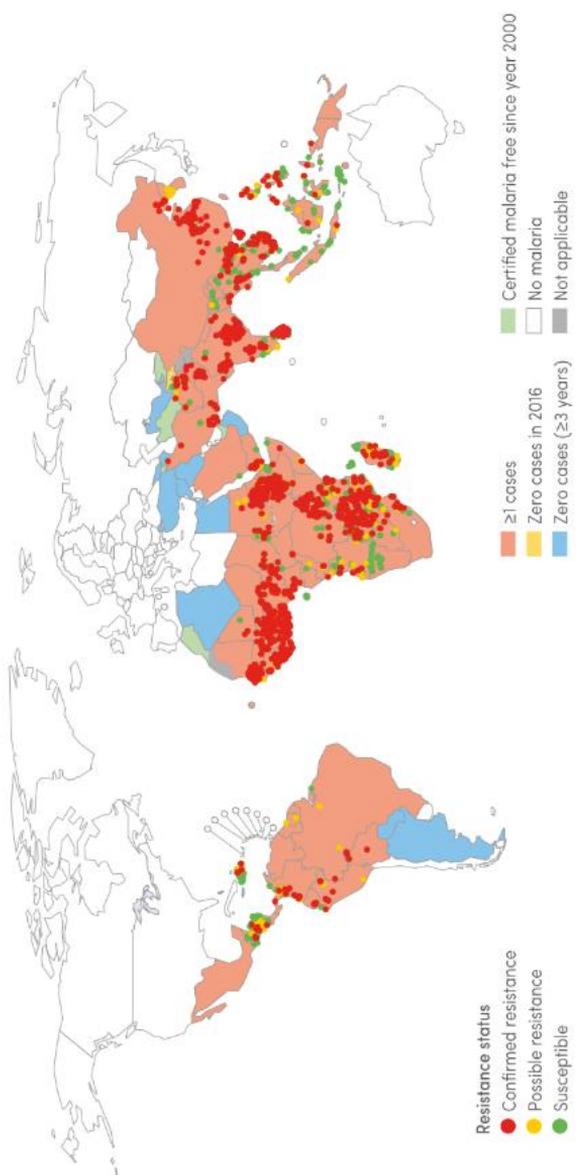


FIGURE 9 : Résistance des anophèles aux pyréthrinoïdes (OMS)

1.3.2 LE PARASITE

Le paludisme est causé par un protozoaire de l'embranchement des *Apicomplexa*, de la classe des *Haemosporidea*, de l'ordre des *Haemosporida*, de la famille du genre *Plasmodiidae*, du genre *Plasmodium*. Il existe plus d'une centaine d'espèces, capables de parasiter de multiples animaux (reptiles, oiseaux, mammifères). Les infections humaines sont causées principalement par 5 différentes espèces de *Plasmodium* : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, ainsi que *P. knowlesi*, principale cause de malaria en Malaisie. En Afrique subsaharienne, *P. falciparum* est le parasite le plus prévalent (concerne 99% des cas en 2016). *P. vivax* prédomine dans les régions d'Amérique (64% des cas), dans les régions de méditerranée orientale et dans les régions d'Asie du Sud-Est (40% des cas).⁷ Les infections à *P. falciparum*, mais également à *P. knowlesi*,¹⁹ s'ils ne sont pas traités rapidement (dans un délai de 24h), peuvent évoluer vers une affection sévère, souvent mortelle.

○ CYCLE DE VIE DU *PLASMODIUM*

Le *Plasmodium* se développe en alternant une reproduction asexuée, qui a lieu chez l'homme et une reproduction sexuée, qui s'effectue au sein du moustique. Chez l'homme, deux phases prédominent : la phase hépatique et la phase érythrocytaire.

Lorsqu'un moustique infecté pique, il injecte le parasite à l'homme sous forme de **sporozoïtes** qui vont migrer rapidement vers le foie. Dans les cellules hépatiques, ils vont se diviser afin de former des **schizontes**. L'éclatement de la cellule va libérer des centaines de **mérozoïtes** dans le sang. À ce stade, *P. vivax* et *P. ovale*, responsables de rechutes tardives, peuvent former des **hypnozoïtes**, formes dormantes localisées au niveau des **hépatocytes**. Arrivés dans les globules rouges, les mérozoïtes vont former une sorte d'anneau, appelés **trophozoïtes**. Ces trophozoïtes vont maturer et former des **schizontes**, qui contiendront à leur tour de nombreux **mérozoïtes**. Ces derniers seront libérés dans la circulation sanguine lors de l'éclatement du globule rouge, et vont pouvoir infecter d'autres hématies. Au bout de plusieurs cycles (dont la durée varie en fonction des espèces, 48h pour *P. falciparum*), des **gamétocytes** seront formés et se transformeront en **gamètes sexués**. Ils seront alors transmis au moustique, hôte définitif, lors d'une piqûre. Ces **gamètes sexués** engendreront

un **zygote** lors de la fécondation. Celui-ci va se différencier en **oocyte** dans l'estomac du vecteur. Les **sporozoïtes** produits vont migrer vers les glandes salivaires du moustique, et seront injectés lors d'une prochaine piqûre (fig. 10).

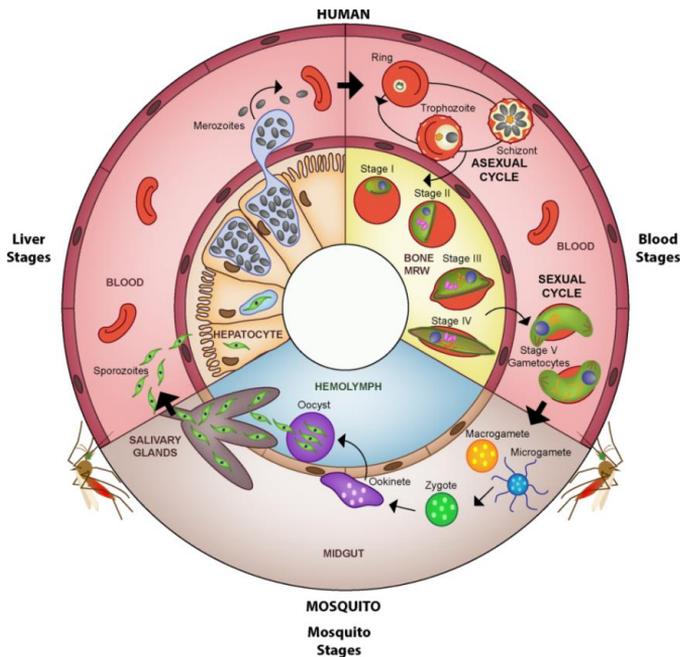


FIGURE 10 : Cycle de vie du *Plasmodium falciparum*.²⁰

○ ZOOM SUR LE STADE ÉRYTHROCYTAIRE

La phase érythrocytaire (fig. 11) est responsable des symptômes observés chez les personnes infectées. L'éclatement des globules rouges permet d'expliquer les fièvres intermittentes. D'autres symptômes moins spécifiques, tels que des frissons, des céphalées, des nausées et des douleurs musculaires peuvent être observés. Cette partie du cycle, lors d'une infection par *P.falciparum*, peut engendrer des complications mortelles : anémies sévères, troubles neurologiques (**neuropaludisme**) et/ou détresse respiratoire. Ce stade érythrocytaire est reproductible *in vitro*, selon les méthodes qui ont été décrites par Trager et Jensen en 1976, ce qui permet la réalisation de tests antiplasmodiaux en vue de sélectionner de nouveaux agents actifs sur cette partie du cycle.

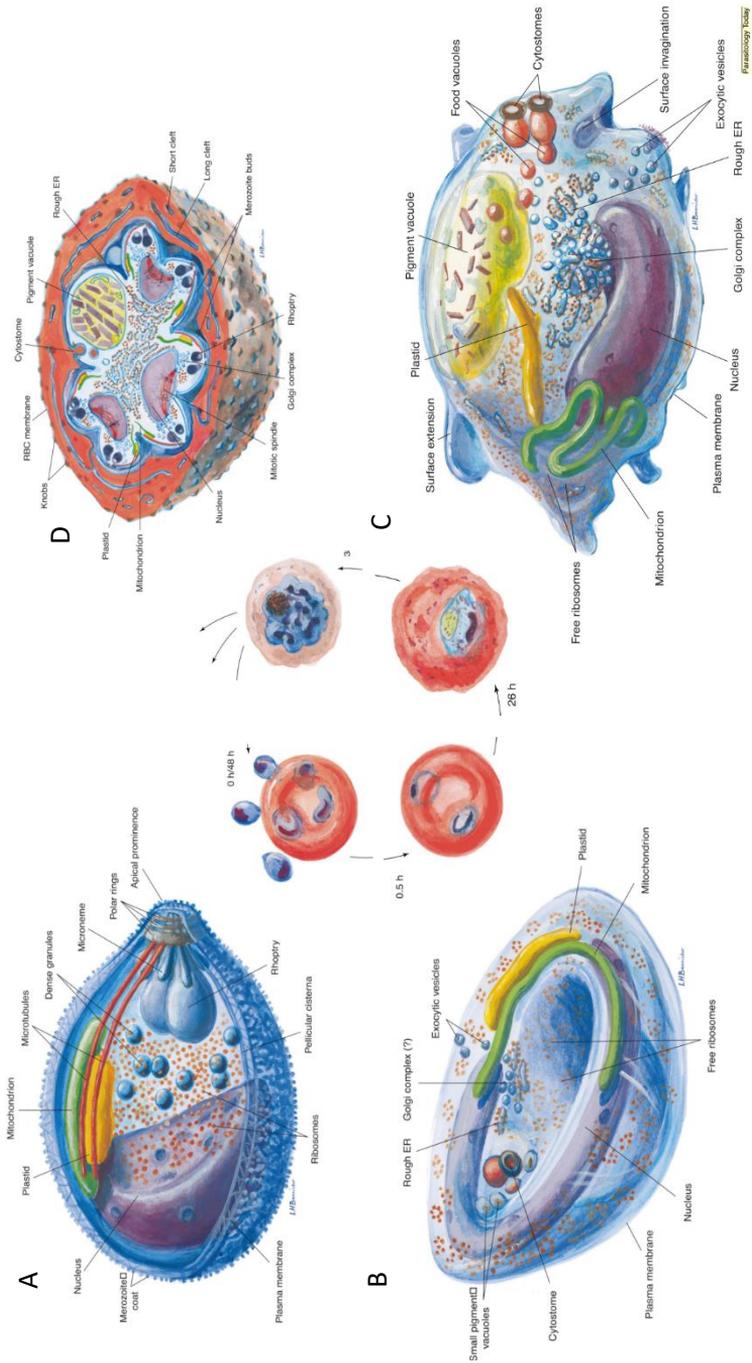


FIGURE 11 : Organisation des phases érythrocytaires de *P. falciparum* (mérozoite (A), jeune anneau (B), trophozoite intermédiaire (C) et schizonte (D)), d'après Bannister et al. ¹⁵⁷

2. MALARIA CÉRÉBRALE

2.1 GÉNÉRALITÉS

Le *P. falciparum* est à l'origine des accès les plus graves de la maladie, bien qu'il ait été démontré que le *P. knowlesi* puisse également être responsable d'accès sévères, principalement sur l'île de Bornéo et d'autres pays d'Asie du Sud-Est.¹⁹ Parmi les groupes les plus vulnérables, les enfants de moins de 5 ans sont les plus touchés. Selon l'OMS, en 2016, 285 000 enfants sont morts avant d'atteindre leur 5^{ème} anniversaire. Étant donné leur jeune âge, ils n'ont pas encore pu développer une immunité partielle. La maladie se développe rapidement, ce qui explique pourquoi les infections sévères (anémies sévères, atteintes neurologiques) sont plus fréquemment observées chez les enfants que chez les adultes. L'apparition d'une malaria dite cérébrale engendre le décès dans 100% des cas, si elle n'est pas prise en charge rapidement. En ce qui concerne les survivants, 10 à 20% conservent des séquelles neurologiques.²¹ Bien qu'il soit établi que le principal agent responsable soit le *P. falciparum*, l'éthologie de cette complication n'est pas encore parfaitement élucidée. Cependant, il est bien établi que la séquestration des globules rouges parasités dans les capillaires cérébraux est liée à la survenue de malaria cérébrale, notamment suite à l'adhésion des globules rouges parasités par le *P. falciparum* dans l'endothélium micro-vasculaire (cytoadhérence) ainsi qu'aux globules rouges non parasités (phénomène de « rosetting ») (fig. 12).²² Cela touche les capillaires et veinules post-capillaires de différents organes vitaux, tels que le cerveau principalement, mais également les poumons, le cœur, les reins, et les intestins. Cela entraîne une réduction de la lumière des capillaires et engendre alors une obstruction au flux sanguin et une hypoperfusion des organes, responsable d'une hypoxie tissulaire. Le manque d'oxygène va également favoriser la production de lactate, suite à la glycolyse anaérobie, entraînant une acidose métabolique et un état de choc.²¹

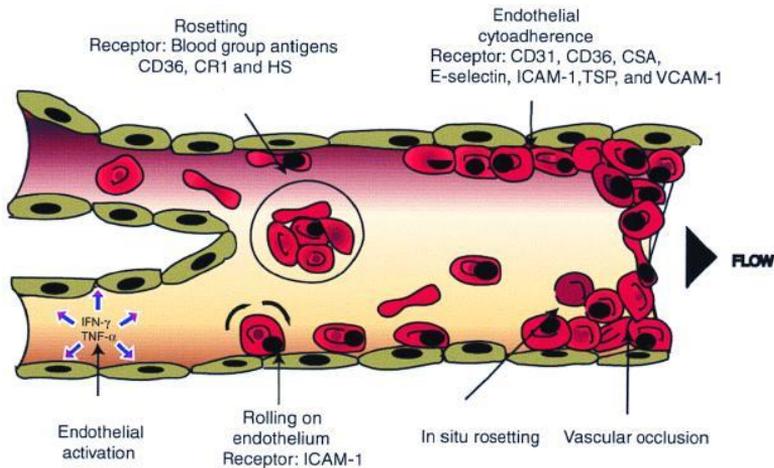


FIGURE 12 : Représentation schématique de la cytoadhérence et du phénomène de rosetting dans un capillaire. Source : Chen et al.

La production de toxines parasitaires induit un phénomène inflammatoire local, participant à la pathogenèse. De plus, la cytoadhérence entraîne l'activation des cellules endothéliales et va favoriser une pro-coagulation, perturbant l'hémostase, et pouvant entraîner une coagulation intravasculaire disséminée (fig.13).

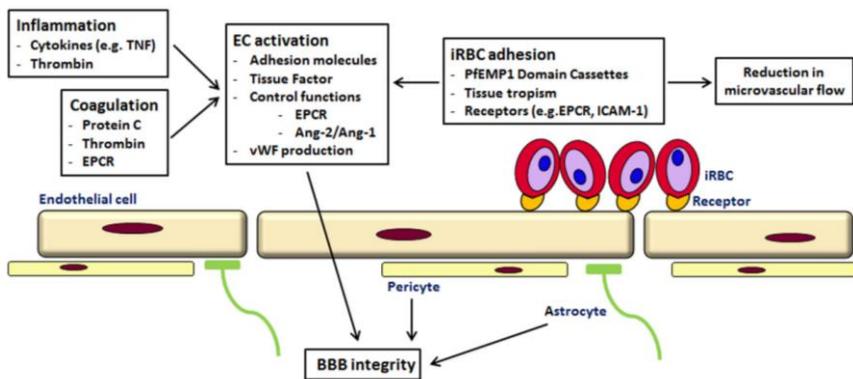


FIGURE 13 : phénomène d'adhésion des globules rouges parasités induisant une réduction du flux microvasculaire, une activation des cellules endothéliales, accentuées par la production de médiateurs pro-inflammatoires. Source : Strom et al.²¹

Les globules rouges parasités qui adhèrent à l'endothélium contiennent le *P. falciparum* au stade trophozoïte ou schizonte, et présentent des protéines parasitaires à leurs surfaces permettant l'adhérence. Ces complexes protéiques parasitaires (ou protubérances), nommés « knobs » permettent notamment aux parasites d'échapper à la clairance hépatique et de se répliquer (fig. 14).²³⁻²¹

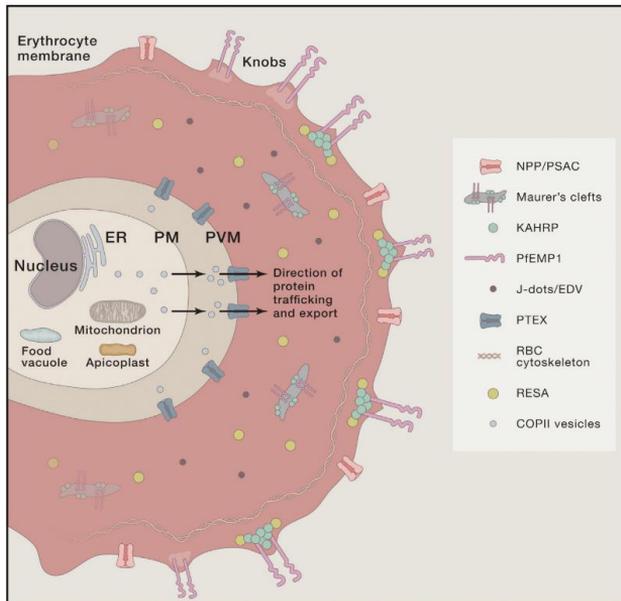


FIGURE 14 : Protéines membranaires exprimées par les globules rouges parasités par le *P. falciparum*.²⁴

Plusieurs molécules d'adhésion cellulaire capables de reconnaître ces « knobs » présents à la surface des globules rouges infectés ont été mises en évidence, telles que CD36, ICAM-1, le chondroïtin sulfate A (CSA), l'héparine, et l'acide hyaluronique. Malgré que le CSA soit identifié comme récepteur de la surface cellulaire pour l'adhésion aux cellules endothéliales dans de nombreux organes, il joue un rôle principal dans la séquestration de globules rouges infectés au niveau placentaire, ainsi qu'au niveau du cerveau,²⁵ pouvant engendrer des infections cérébrales.^{23,26}

Le principal ligand présent sur ces knobs est la protéine PfEMP1, pour « *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 » (fig. 15)²⁷. Il s'agit d'une famille d'adhésines parasitaires exprimées à la surface des globules rouges infectés. Ces protéines comprennent une large région N-terminale extracellulaire, contenant des molécules d'adhésions telles que les « Duffy-binding Like » (DBL) ainsi que des régions riches en cystéine. Un seul segment transmembranaire est observé, et la partie C-terminale se situe à l'intérieur du cytoplasme.²⁸

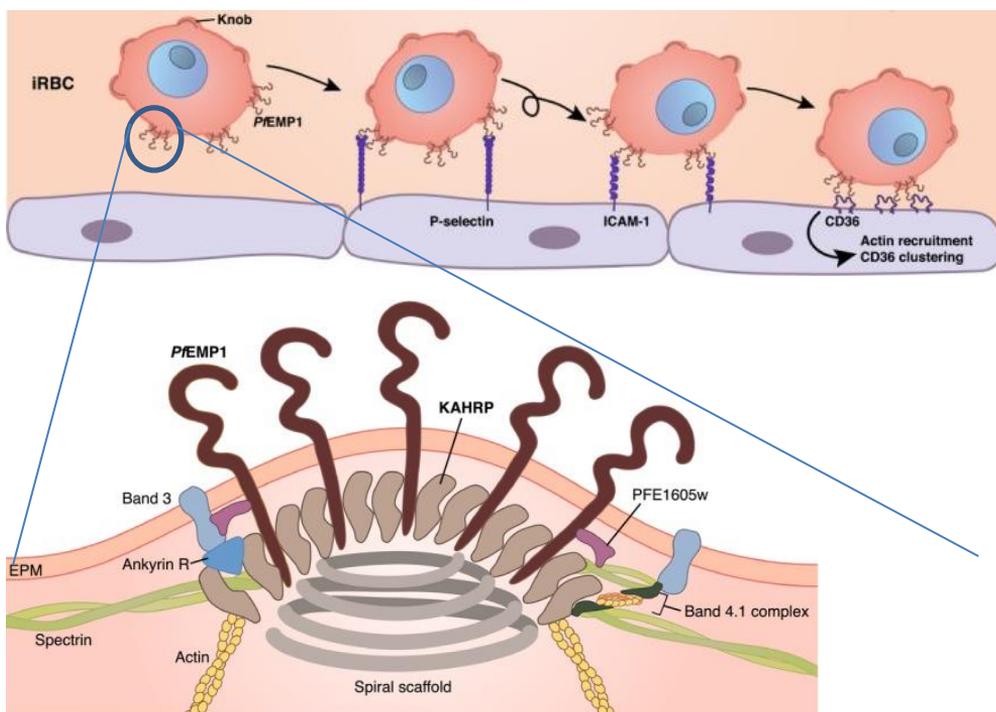


FIGURE 15 : Illustration schématique des phénomènes d'adhésion des globules rouges parasités et zoom sur la structure de knob incluant l'antigène PfEMP1. Source : Adapté à partir de Helms *et al.*

2.2 TRAITEMENTS

Les infections à *P. falciparum* sont donc une urgence médicale, dont la rapidité de la prise en charge est un élément déterminant. Deux molécules sont utilisées en première ligne en cas d'accès grave, l'artésunate et la quinine. L'artésunate est administré préférentiellement par voie intraveineuse (ou à défaut, l'arthéméther en intramusculaire), et le dichlorhydrate de quinine par voie intraveineuse. Si la voie intraveineuse n'est pas disponible, l'artésunate ou la quinine est injecté par voie intramusculaire. Après 24 h de traitement, si le patient est capable de prendre ses médicaments par voie orale, un traitement relais constitué de CTA (Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine) est instauré.²⁹

En cas de convulsions, celles-ci sont traitées avec des benzodiazépines (diazépam, midazolam, lorazépam, i.v.). Une seconde dose est administrée dans le cas où la crise convulsive dure plus de dix minutes. Si malgré cela les convulsions persistent, l'administration de phénytoïne (i.v) ou de phénobarbital (i.v ou i.m) reste la seule option.²⁹

3. LUTTE CONTRE LE PALUDISME

La Stratégie Technique Globale (mondiale) de lutte contre la malaria 2016-2030 (GTS), le plan d'Action et d'Investissement pour combattre la Malaria 2016-2030 (AIM), ainsi qu'une partie de l'objectif 3.3 des Objectifs de Développement Durable (ODD) convergent vers un même but : mettre fin au paludisme, avec des objectifs pour les années 2020, 2025 et 2030. La maîtrise du paludisme aurait également un impact sur l'ODD 3.8 : assurer une couverture sanitaire pour tous. Cependant, comme cité précédemment, les budgets alloués à ces ambitieux (mais possibles !) objectifs ne sont pas suffisants. Les pays d'endémie ont investi 31% du financement total, les États-Unis d'Amérique (38%) sont suivis par d'autres donateurs importants : le Royaume-Uni, la France, l'Allemagne et le Japon.³⁰ Le dernier rapport de l'OMS, traduisant la stagnation des progrès, pourrait constituer une véritable alerte afin de mobiliser au maximum la Communauté Internationale.

3.1 PRÉVENTIONS

3.1.1 ÉVITER LE VECTEUR

Deux moyens de prévention principaux sont recommandés par l'OMS dans le cadre de la lutte antivectorielle : l'utilisation de moustiquaires à imprégnation durable (MID) et la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations.¹⁸

Des méthodes de lutte antivectorielle complémentaires peuvent également être implémentées dans des circonstances particulières, telles que « la gestion des gîtes larvaires », correspondant à la modification ou à la manipulation de l'endroit où la femelle pond ses œufs (fig. 16). Cela peut être réalisé par des moyens physiques, comme le drainage de marais par exemple, ou via des traitements chimiques de type larvicides.³¹



FIGURE 16 : Larves d’anophèle se développent dans des gîtes d’eau stagnante. ©IRD/V.Robert

La protection physique (pantalon long, manches longues,...) ainsi que les répulsifs constituent également des moyens de préventions efficaces.

3.1.2 CHIMIOPROPHYLAXIE

La chimioprévention concerne particulièrement **les voyageurs** qui se rendent en zone endémique palustre. Le type de traitement préventif, tel que la Malarone® (atovaquone + proguanil), le Lariam® (méfloquine), la doxycycline, va dépendre de la zone géographique dans laquelle le voyageur se rendra, afin de tenir compte des résistances locales. La chloroquine n’est d’ailleurs utilisée que dans les rares zones dépourvues de résistances.

Une administration intermittente de sulfadoxine-pyriméthamine, ainsi que d’amodiaquine est utilisée dans le cadre de la **chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS)**. Il s’agit d’administrer ces médicaments à des enfants situés dans les zones où la transmission palustre a un caractère saisonnier. Dans la sous-région du Sahel de l’Afrique sub-saharienne par exemple, la plupart des décès chez les enfants surviennent durant la saison des pluies. Selon l’OMS, ce programme permet de protéger 75% des enfants de moins de 5 ans dans ces régions.³²

Au milieu des années 1990, **le traitement préventif intermittent (TPI)** à base de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) remplace la prophylaxie à base de chloroquine. A ce moment, deux doses sont préconisées. Depuis 2012, l’OMS recommande l’administration de trois doses à toutes les femmes enceintes dès le second trimestre de la grossesse. Cette nouvelle politique s’implémente lentement, il faudra en moyenne 2 ans pour que les pays cibles la mettent en place.³³ L’OMS déclare qu’au vu des preuves disponibles, malgré l’apparition de quintuples mutations liées à la résistance à SP prévalent chez *P.falciparum*, l’efficacité

préventive persiste. Cependant, l'OMS constate qu'une diminution des efforts pour intensifier les traitements préventifs intermittents (TPI) est marquée non pas par la diminution de fréquentation des établissements de soins prénataux, mais bien par l'incertitude des agents de santé concernant l'administration de la SP.¹⁸ Des études récentes appuient l'efficacité clinique des TPIs, mais déplorent la faible utilisation de celles-ci, principalement influencée par les facteurs socio-économiques.³⁴ Ces **traitements préventifs intermittents** sont également recommandés pour les **nourrissons (TPIIn)**. Les administrations s'effectuent à 10 semaines, 14 semaines et à 9 mois, dans les zones d'Afrique sub-saharienne où la transmission est importante et lorsque la prévalence de la mutation du parasite (mutation 540 pfdhps, *P. falciparum*) est inférieure à 50%. Ce schéma d'administration en trois temps correspond au calendrier vaccinal systématique du programme élargi de vaccination. Cette stratégie a pour but d'étendre la couverture des TPIIn-SP.³⁵

3.1.3 VACCINATION

Actuellement, un vaccin contre *P. falciparum* est testé à grande échelle en Afrique. Il est prévu d'administrer ce vaccin (d'ici à 2020) à 360.000 enfants des pays participant à la phase pilote : le Kenya, le Ghana et le Malawi. Le vaccin **Mosquirix® (RTS,S/AS01E)***, élaboré par la firme GlaxoSmithKline (GSK), est composé de protéines de synthèse qui ressemblent à une partie du sporozoïte. Cependant, l'efficacité du vaccin est limitée, de même que sa durée de protection. Dans les années 2000, une première étude effectuée sur 260 enfants avait permis de réduire de 44% le nombre de crises de paludisme. Cependant, quatre ans plus tard, les chiffres diminuent pour faiblement atteindre 0.4%. La seconde étude de phase III menée sur 15.000 enfants (entre 2009 et 2014) avait confirmé ces résultats, avec une efficacité moyenne du vaccin calculée sur une période de 4 ans de 16%.³⁶

285 000 enfants de moins de 5 ans sont décédés à cause du paludisme en 2016. Le calcul est vite fait, 16% de 285 000, cela correspond tout de même à 45 600 vies. Bien sûr, l'efficacité de ce vaccin n'est pas optimale, et nous pourrions discuter de son accessibilité et du taux « réel » de vies épargnées qui en

* Pour plus d'informations concernant ce vaccin: <https://www.ema.europa.eu/en/mosquirix-h-w-2300>

découlerait. C'est un élément de plus pour lutter contre le paludisme, qui nous souffle que l'espoir est permis.

3.2 TRAITEMENTS DISPONIBLES

Afin de contrôler la maladie, un traitement adéquat doit être administré. Un médicament de qualité, efficace, ainsi que la bonne compliance du patient sont des paramètres cruciaux pour la guérison de la personne impaludée, mais également pour la diminution du risque de survenue de résistance.

Le *Plasmodium* dispose d'un métabolisme impressionnant, lui octroyant des défenses particulières pour son développement intra-érythrocytaire. La vacuole nutritive, utilisée pour obtenir des nutriments à partir de l'hôte ; les mitochondries, essentielles à la formation de pyrimidine ; le cytoplasme et le noyau, véritables centrales de production de métabolites essentiels ; l'apicoplaste, permettant notamment la synthèse d'isoprénoïdes et d'acides gras. Toutes ces cibles nous confèrent un arsenal thérapeutique antipaludique qui sera détaillé ci-dessous.

3.2.1 PERTURBATEURS DE LA DÉTOXIFICATION DE L'HÈME

Lors de la phase érythrocytaire, le parasite importe les nutriments qui lui sont nécessaires. L'hémoglobine de la cellule hôte est acheminée via le cytoplasme du globule rouge et est dégradée afin que le parasite puisse en utiliser les acides aminés. La digestion de l'hémoglobine dans la vacuole du parasite libère également la ferriprotoporphyrine IX (FPIX) ou hématine, toxique pour le

parasite. Cependant, le *Plasmodium* a mis au point une stratégie de détoxification de l'hème afin d'assurer sa survie : l'hématine est transformée en hémazoïne, pigment malarique. Les travaux de Pagola *et al*³⁷ ont démontré que l'hématine était dimérisée, et non pas polymérisée, comme il était couramment admis. En interférant avec ce processus de détoxification (fig. 17), le groupe des **quinoléines** entraîne la mort du parasite.

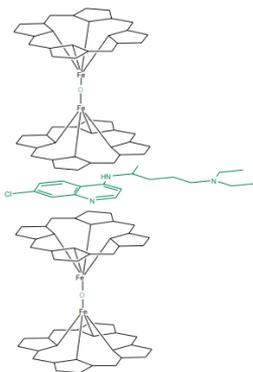


FIGURE 17 : Modèle de l'interaction de la Chloroquine et de la FPIX.³⁷

Deux classes de quinoléines sont capables de pénétrer dans la vacuole digestive : Les **4-aminoquinoléines**, comprenant notamment la **chloroquine** ainsi que les **aryl-**

amino alcools, comprenant la quinine, la quindine, la méfloquine, et la luméfántrine (fig.18).

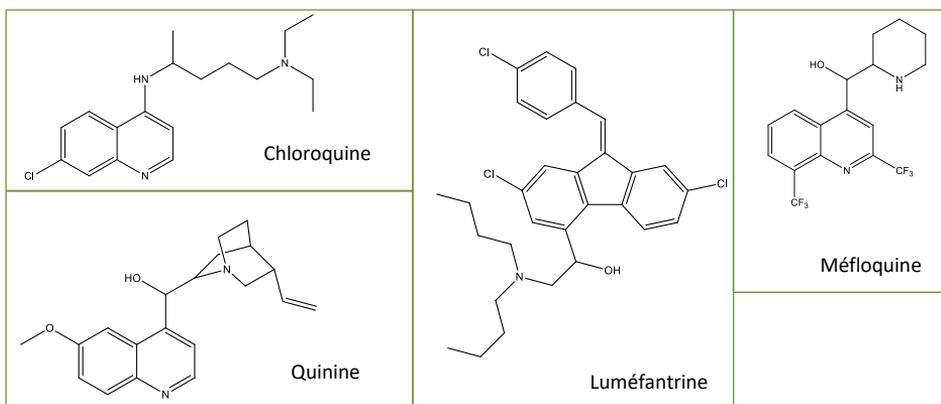


FIGURE 18 : Structures de la chloroquine, de la quinine, de la luméfántrine et de la méfloquine.

3.2.2 PERTURBATEURS DE LA SYNTHÈSE D'ACIDES NUCLÉIQUES DANS LE NOYAU³⁸

L'acide folique, ou vitamine B9, est une vitamine dite « essentielle » chez l'Homme, puisque nous sommes incapables de la synthétiser nous-même. Contrairement à nous, le parasite *Plasmodium* en est capable. L'acide folique est crucial pour la synthèse d'ADN et la survie du parasite.

La synthèse d'acide folique nécessite de l'acide para-aminobenzoïque (PABA), cible des médicaments dits antifoliques, que sont les sulfones et les sulfamidés, comme la sulfadoxine, qui représente une des molécules les plus efficaces de cette classe grâce à sa longue demi-vie. La dihydrofolate réductase (DHFR) est une enzyme indispensable pour l'obtention des bases pyrimidiques de l'ADN. (Fig. 20) Cette enzyme est la cible des antifoliques, des inhibiteurs compétitifs ; les diaminopyrimidines comme la pyriméthamine, ainsi que les biguanides, comme le proguanil (fig.19). Le succès de l'association « sulfadoxine-pyriméthamine » (fig.19) est dû au fait que l'effet de ces deux produits n'est pas seulement additif, mais synergique, utilisant chacun une réaction différente pour affecter la même voie métabolique.

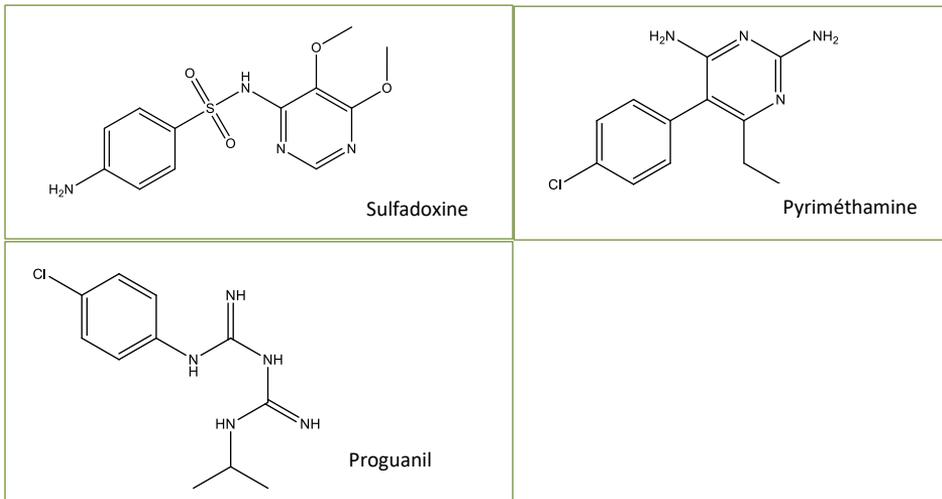


FIGURE 19 : Structures de la sulfadoxine, du proguanil et de la pyriméthamine

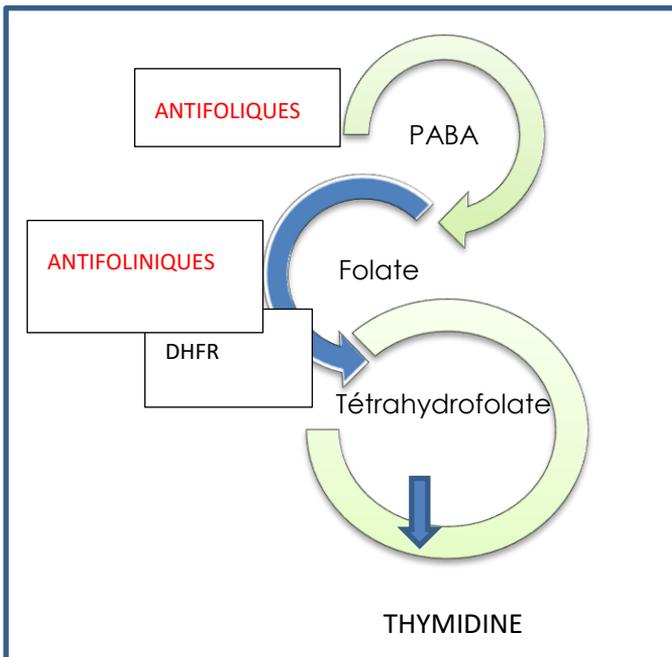


FIGURE 20 : Schéma représentant la formation de bases d'ADN à partir de l'acide folique.

3.2.3 PERTURBATEURS DE LA SYNTHÈSE D'ACIDES NUCLÉIQUES DANS LES MITOCHONDRIES

Dans cette catégorie, nous retrouverons deux inhibiteurs d'enzyme qui interviennent au niveau du transport des électrons, dans les mitochondries.

L'**atovaquone** (fig.21) est une **naphtoquinone** dérivé du lapachol, isolé à partir des écorces des tiges de *Tabebuia chrysotricha*, arbre de la famille des Bignoniaceae. Elle possède une structure similaire à la coenzyme Q (l'ubiquinone). Normalement, la coenzyme Q accepte des électrons provenant d'enzymes de type déhydrogénases et les transfère au cytochrome bc1 (= complexe III), ce qui nécessite une adhésion du complexe coenzyme Q à un domaine particulier du cytochrome (Qo). Cette étape est inhibée par l'atovaquone. Cela entraîne un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale. Plusieurs enzymes parasites sont dépendantes du système de transport des électrons par les mitochondries, comme la dihydroorotate déshydrogénase (DHOD), nécessaire à la biosynthèse des pyrimidines, et sont inhibées. Puisque les *Plasmodium* sont incapables de piéger les pyrimidines de l'hôte, la suppression de la synthèse de novo entraîne la mort du parasite. Cette molécule est associée au proguanil dans la spécialité Malarone®, puisqu'il a été démontré que leurs effets sont synergiques.³⁹

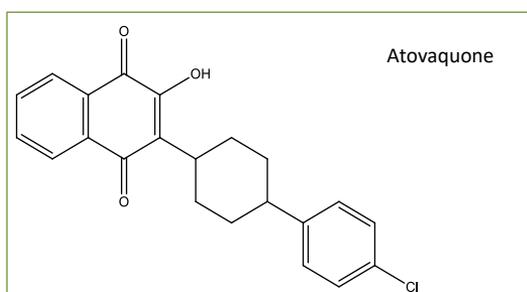


FIGURE 21 : Structure de l'atovaquone.

La **primaquine** (fig.22) est également capable de perturber les fonctions de l'ubiquinone et de produire des métabolites réactifs générant une toxicité. Il s'agit d'une **8-aminoquinoléine**.⁴⁰ La primaquine est également une des seules molécules efficaces envers les hypnozoïtes, responsables de rechutes. Cependant, le traitement est long (14 jours) et elle est contre-indiquée chez les femmes enceintes. De plus, la toxicité hémolytique chez des sujets atteints de favisme pose souvent problème.⁴¹

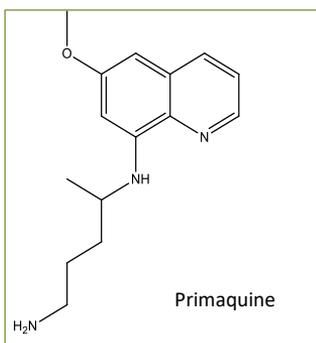


FIGURE 22 : Structure de la primaquine

3.2.4 PERTURBATEURS DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

La **doxycycline** (fig.23) est une tétracycline antibiotique capable de se lier à la sous-unité 30 S ribosomal et à différents acides ribonucléiques dans l'ARN ribosomal 16S. Il y a 3 catégories de ribosomes dans le *Plasmodium*, les mitochondriaux, ceux présents dans les plastides et ceux présents dans le noyau. Les tétracyclines inhiberaient la synthèse protéique mitochondriale et pourraient également diminuer l'activité d'enzymes mitochondriales, telles que la DHOD, impliquée dans la synthèse de pyrimidine. Des études réalisées sur la minocycline démontrent une diminution de transcription des gènes mitochondriaux, mais également des gènes de l'apicoplaste.⁴² Cependant, une approche protéomique a permis de démontrer que la doxycycline agirait spécifiquement au niveau de l'apicoplaste, grâce à l'observation d'une dérégulation protéique dans le métabolisme de cet organelle.⁴³

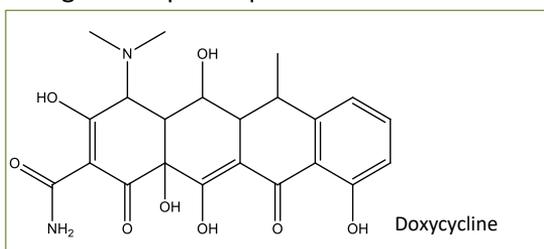
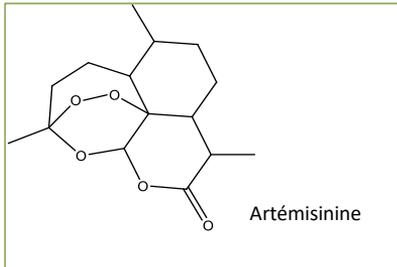


FIGURE 23 : Structure de la doxycycline.

3.2.5 PERTURBATEURS DE L'HOMÉOSTASIE PROTÉIQUE

Véritable pilier dans le traitement antipaludique, l'**artémisinine** (Quinghaosu) (fig.24) a été découverte en 1972, par Tu Youyou. La plante à partir de laquelle

cette molécule est isolée, l'*Artemisia annua*, est connue sous le nom de Qinghao et est utilisée pour ses propriétés fébrifuges depuis plus de 2000 ans en médecine traditionnelle chinoise. Des dérivés hémi-synthétiques ont été mis au point afin d'augmenter la biodisponibilité de la molécule.



Ces lactones sesquiterpéniques sont utilisées en combinaison avec d'autres antipaludiques qui possèdent une plus longue durée d'action (la méfloquine, la luméfántrine) formant les « ACT », « Combinaisons à base d'Artémisinine ». Les ACT restent le traitement recommandé de première ligne dans les accès palustres. Cependant, le mécanisme d'action de l'artémisinine et de ses dérivés hémi-synthétiques n'est pas encore clairement établi. Selon les dernières études, la dihydroartémisinine, métabolite actif de l'artémisinine, semble présenter un double effet destructeur : d'une part elle induit des radicaux libres par le clivage de son pont endoperoxyde, provoquant des dommages protéiques sévères, et d'autre part, elle empêche leurs dégradations via le protéasome. Cela entraîne une accumulation de ces protéines polyubiquitinées endommagées, élément clé conduisant à la mort du parasite.

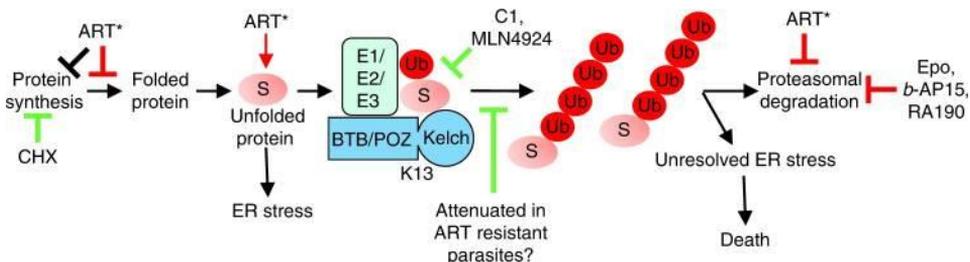


FIGURE 25 : Modèle du mécanisme d'action de l'artémisinine.⁴⁴

La fig. 25 de Bridgford *et al*⁴⁴ schématise cette hypothèse. L'artémisinine activée (ART*) agirait sur plusieurs voies liées à l'homéostasie des protéines et

perturberait le protéasome. (La toxicité est ici représentée par des barres rouges). Elle engendrerait un dysfonctionnement dans la synthèse et le repli des protéines, un stress au niveau du réticulum endoplasmique parasitaire, et une accumulation de substrats (S) polyubiquitinés toxiques ne pouvant être éliminés par le protéasome. D'autres inhibiteurs des protéasomes tel que l'Époxomicine (Epo), sont toxiques pour le parasite. Certains inhibiteurs de l'ubiquitination (C1, MLN4924) ou des inhibiteurs de la synthèse protéique (CHX= Cycloheximide) préviennent l'accumulation de protéines ubiquitinées et améliorent la survie du parasite soumis à l'artémisinine (effet décrit par des barres vertes).⁴⁴

La survenue d'une résistance partielle à l'artémisinine a été décrite et concerne notamment une mutation du gène K13. Lors d'un stress oxydatif, cette mutation permettrait d'interférer avec le processus d'ubiquitination de ces protéines et, par conséquent, d'éviter l'accumulation d'éléments toxiques. Cette résistance partielle à l'artémisinine s'observe en clinique par un allongement du temps de clairance du parasite. En effet, celui-ci possède la capacité de ralentir son métabolisme, d'entrer dans une phase de quiescence en s'arrêtant au stade « anneaux » et reprend son cycle une fois l'artémisinine éliminée.⁴⁵

3.3 TRAITEMENTS MENACÉS

Face à ces traitements, le *Plasmodium* s'est protégé au fil du temps, le rendant de plus en plus difficile à combattre.

La résistance aux antimalariques semble émerger dans les zones où la transmission est la plus faible, particulièrement dans le Sud-Est Asiatique ou l'Amérique du Sud, avant de s'étendre en Afrique. La résistance à la chloroquine, puis à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la méfloquine a été la cause de nombreux échecs thérapeutiques et par conséquent d'un grand nombre de décès.

Les traitements à base d'artémisinine ont contribué à réduire le taux de mortalité imputé au paludisme. Cependant, une diminution de l'efficacité clinique des dérivés de l'artémisinine est décrite en Asie, ce qui nous rappelle l'apparition de la résistance à la chloroquine dans les années 1960 dans cette région du monde, et qui s'est étendue en Afrique, rendant son utilisation de plus en plus difficile.

Face à la menace liée à la pharmaco-résistance, l'OMS recommande que les programmes nationaux de lutte antipaludique sélectionnent des antipaludiques dont le taux d'efficacité est supérieur à 95%. Pour ce faire, des sites sentinelles

sont établis en vue de surveiller la réponse au traitement. Les régions concernées par une résistance confirmée possèdent des sites sentinelles supplémentaires afin de mettre en évidence rapidement de nouveaux foyers de résistances. Lorsque le taux d'échec thérapeutique mesuré est supérieur à 10%, l'OMS recommande un changement de politique nationale de traitement.⁴⁶

4. CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX

Ce travail de thèse a été mené dans le but de contribuer à la recherche de nouveaux médicaments antipaludiques provenant de plantes, efficaces sur les infections les plus conséquentes.

La malaria reste à l'heure actuelle la maladie parasitaire la plus mortelle, frappant principalement en Afrique. La détection croissante de résistance aux traitements à base d'artémisinine préoccupe, et à juste titre. Ce phénomène nous rappelle l'apparition de résistance à la chloroquine en Asie, qui s'était rapidement dispersée sur le grand continent. Il est urgent de mettre en évidence de nouveaux composés antipaludiques actifs sur les souches résistantes à l'artémisinine, mais également de mettre au point des stratégies innovantes en vue de diminuer le risque d'apparition de résistance.

Le potentiel incommensurable thérapeutique des plantes n'est plus à démontrer. Pharmacie vivante, les produits naturels sont une source non négligeable pour la recherche. Rappelons que, durant ces 30 dernières années, 60% des médicaments antiparasitaires ont une origine naturelle, alors que l'on estime qu'en moyenne, seulement 10% des espèces végétales ont fait l'objet d'investigations scientifiques.⁴⁷ L'endémisme de certaines régions du monde constitue une véritable panacée. Cependant, la déforestation, la surexploitation, et les changements climatiques menacent. Selon l'UICN[†], une plante sur cinq est menacée d'extinction. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce double contexte de participation à l'éradication de la malaria et de la valorisation des plantes endémiques des Mascareignes, véritables « hot spot » de biodiversité. Notre collaboration avec l'Université de la Réunion dans le cadre d'un projet FEDER[‡], le projet « BIOMOL TCN[§] », a pour but de mettre en évidence de nouvelles molécules antipaludiques. Parmi les nombreuses activités à tester lors de ce projet, l'évaluation des propriétés antiplasmodiales des plantes réunionnaises a

[†] IUCN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

[‡] FEDER : Fond Européen de Développement Économique et Régional

[§] BIOMOL TCN : Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de MOLécules issues de la BIODiversité terrestre et marine de la zone Ouest de l'Océan Indien)

été confiée à notre laboratoire, le Laboratoire de Pharmacognosie du CIRM, de l'Université de Liège.

Les plantes endémiques des Mascareignes peuvent-elles présenter des activités antiplasmodiales intéressantes ? Le premier objectif de ce travail était de répondre à cette question afin de valoriser la flore endémique des Mascareignes. Un large screening biologique a été réalisé en vue de sélectionner les plantes les plus prometteuses en termes d'activité antiplasmodiale. Ces résultats seront abordés dans le chapitre 2.

Le deuxième objectif était de mettre en évidence de nouveaux composés antiplasmodiaux. Le *Poupartia borbonica*, a été sélectionné pour être soumis à des études phytochimiques et pharmacologiques approfondies. Nous devons alors répondre à cette question : le *Poupartia borbonica* contient-il des molécules antimalariques intéressantes ? Un fractionnement bioguidé a été entrepris afin d'isoler les molécules d'intérêt. Des tests *in vivo* ont été réalisés afin de confirmer le potentiel antimalarique des composés isolés, mais ont également mis en évidence leur toxicité. Ces résultats sont décrits dans le chapitre 3.

L'étude de la toxicité de ces produits s'est alors imposée et a constitué un nouveau défi. Quelles étaient les mécanismes responsables de cette nocivité ? Des tests effectués sur cellules à l'aide de technique d'imagerie en temps réel, ainsi que des tests sur larves de zebrafish (*Danio rerio*) ont été utilisés afin de déterminer les principales causes de nocivité. Ces résultats ainsi que l'étude de la relation structure/activité/toxicité des dérivés d'alkyl cyclohexenones sont discutés dans le chapitre 4.

Cependant, plusieurs questions persistaient. Comment pouvons-nous réduire la toxicité des molécules isolées ? Était-il possible d'utiliser une stratégie qui permettrait d'allier cette réduction de nocivité à l'amélioration de l'activité antiplasmodiale, même sur les souches de *P.falciparum* résistantes à l'artémisinine ? En effet, l'objectif principal de ce travail était de mettre en avant des composés antimalariques, mais également de proposer des méthodes pour lutter contre les formes de *Plasmodium* résistantes aux traitements actuels. Une stratégie alliant la nanovectorisation ainsi que des composés naturels isolés du *Poupartia borbonica* a été envisagée. Les objectifs de ce chapitre sont multiples. D'une part, la vectorisation a pour but de diminuer la dose de composé à administrer, et parallèlement, la toxicité du traitement. D'autre part,

l'administration ciblée de quantités adaptées de principe actif permet de minimiser le risque d'évolution des souches vers la résistance. Ces résultats seront discutés dans le chapitre 5.

CHAPITRE 2 : ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES PLANTES ENDÉMIQUES DES MASCAREIGNES

1. AVANT-PROPOS

Dans le cadre du projet BIOMOL TCN financé par le Fond FEDER, 64 plantes réunionnaises ont été sélectionnées sur base de leur endémisme (étendu aux Mascareignes), leur usage traditionnel, ainsi que leur inscription à la Pharmacopée Française. Le but de ce travail était double. D'une part il s'agissait de sélectionner les organismes les plus intéressants pour la mise en évidence de nouveaux agents antipaludiques, d'autre part, le but était de valoriser la flore locale. À une époque où une espèce sur cinq est menacée d'extinction, il est grand temps de recenser les intérêts thérapeutiques et de protéger les ressources fournies par la nature.

Ce chapitre introduira brièvement la terre d'origine des plantes étudiées, l'île de la Réunion. Il sera ensuite principalement constitué par l'article « Antiplasmodial, Anti-chikungunya virus and Antioxydant Activities of 64 endemic Plants from the Mascarene Islands » publié dans « *International Journal of Antimicrobial Agents* » (2018), 52, 5, 622-628, qui détaille la sélection des espèces végétales, la réalisation des extraits et les tests pharmacologiques effectués. Les résultats présentés dans cet article concernent l'ensemble des investigations menées sur ces plantes dans le cadre du projet FEDER. Ainsi, les propriétés antioxydantes, antiplasmodiales et anti-chikungunya seront discutées. Cependant, les tests réalisés dans le cadre de cette thèse de doctorat concernent la partie antiplasmodiale. C'est pourquoi nous avons décidé de discuter et d'enrichir principalement cette partie.

2. LA RÉUNION

2.1 UNE ÎLE VOLCANIQUE AU MILIEU DE L'OcéAN

Située dans l'archipel des Mascareignes de l'Océan Indien, « L'île intense » comme elle est à juste titre nommée, a surgi il y a plus de deux millions d'années. Cette île presque entièrement volcanique forme un édifice magmatique de 7 à 8000 mètres de haut sur le fond marin. L'île compte deux massifs volcaniques ; un édifice inactif occupant près de deux tiers de l'île, le Massif du Piton des Neiges qui culmine à 3071m, et un ensemble actif, le Massif du Piton de la Fournaise, culminant à 2632 m. Ce dernier est à l'heure actuelle un des plus actifs au monde.

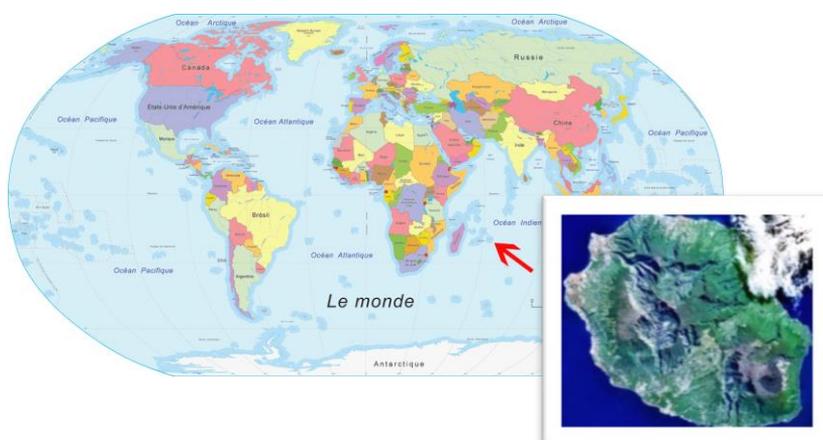


FIGURE 26 : Situation géographique de l'île de la Réunion.

Enceintes naturelles aux parois abruptes, les « Cirques » se rencontrent fréquemment dans les chaînes montagneuses (Cirque de Gavarnie dans les Pyrénées, Cirque du Fer-à-Cheval dans les Alpes,...). Cependant, ceux-ci sont beaucoup plus rares dans les îles volcaniques. Véritables témoins des transformations gouvernés par l'érosion, les coulées de lave, les glissements et les effondrements de terrains, ces Cirques transforment l'île de la Réunion en un monde à part. Ces Cirques sont bordés par des remparts, véritables parois vertigineuses recouvertes de végétaux. Unique en son genre en termes de géomorphologies, cette diversité d'escarpements, de remparts, de bassins, confère un habitat riche à une grande diversité d'organismes végétaux, formant une mosaïque d'écosystème responsable d'un taux d'endémisme élevé.⁴⁸

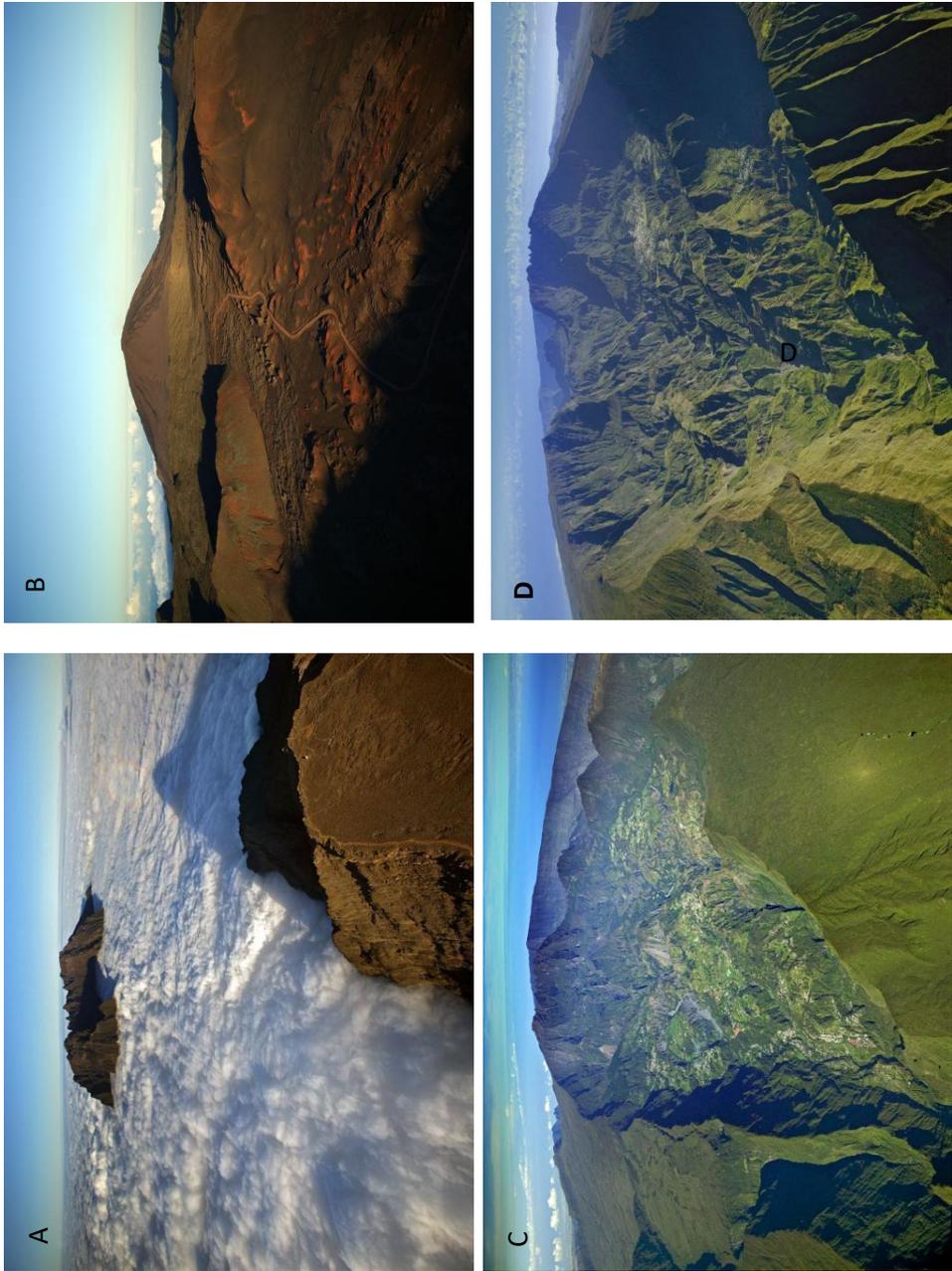


FIGURE 27 : Piton de Neiges (A), Piton de la Fournaise (B), Cirques de Salazie (C) et Cirque de Cialos (D). ©Hervé Douris

2.2 CLIMAT

Les particularités géomorphologiques de l'île ont des conséquences directes sur le climat. L'île est divisée en une partie dite « au vent », qui est située à l'Est, zone d'où proviennent les alizés, et de l'autre côté de la barrière montagneuse, la partie dite « sous le vent », située à l'Ouest. Deux saisons se distinguent : l'hiver (mai-novembre), période fraîche et sèche et l'été (novembre-avril), période plutôt pluvieuse. En été, suite à l'effet de la chaleur, des nuages se forment et stagnent, ce qui engendre une grande dissymétrie entre l'Est et l'Ouest en ce qui concerne la pluviométrie. Les précipitations sont peu abondantes dans l'Ouest, alors que le cumul des pluies peut atteindre 10 mètres par an vers l'Est, ce qui est exceptionnel au niveau mondial.⁴⁹

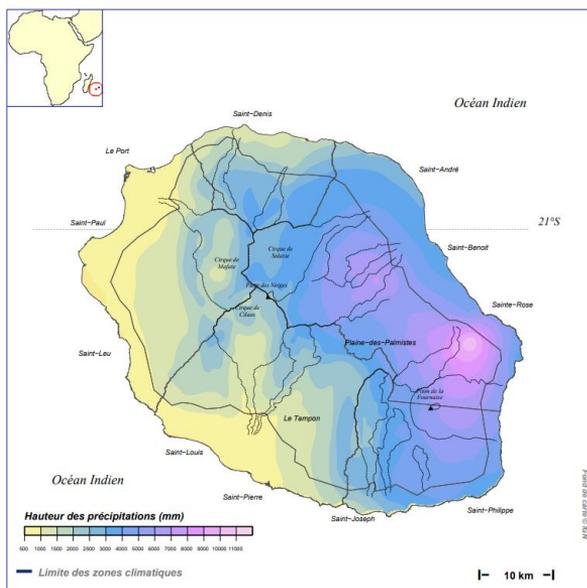


FIGURE 28 : Moyenne annuelle des cumuls pluviométriques, METEO-FRANCE, édition du 23/02/2016.

2.3 UNE VÉGÉTATION À ÉTAGES

Les caractéristiques précitées de l'île lui confèrent une biodiversité extrêmement riche. La Réunion, avec Madagascar, Maurice et Rodrigues est classée parmi les 34 « hotspot » de la biodiversité. Elle est donc reconnue comme étant un des endroits de la terre les plus riches en termes de diversité floristique (et faunistique). (Fig. 21)

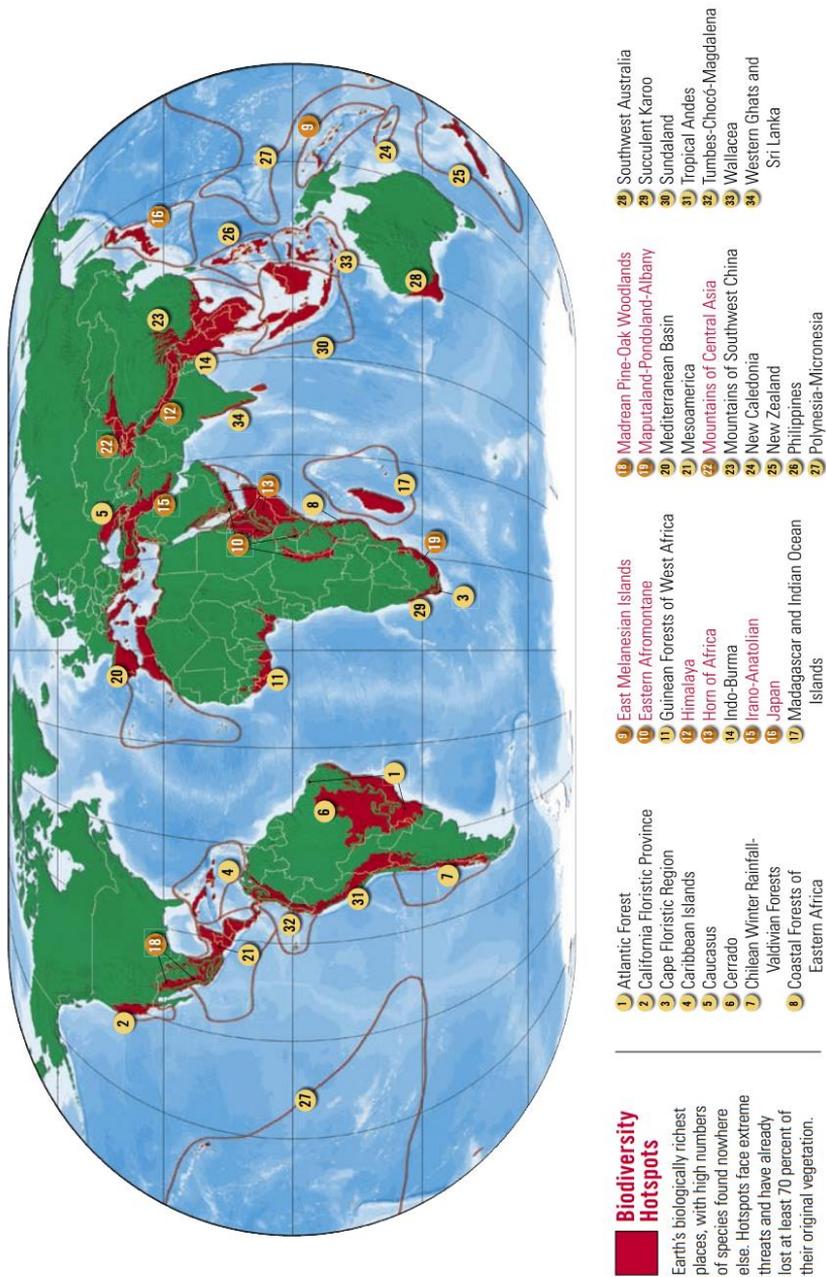


FIGURE 29: Carte mondiale reprenant les 34 « points chauds » de la biodiversité. Source : https://www.cnrs.fr/inee/recherche/fichiers/Biodiversite_hotspots.pdf.

L'effet des alizés ainsi que la présence des deux importants massifs montagneux confèrent à l'île une multitude de microclimats, lui permettant de regorger de véritables trésors botaniques.

Les premiers éléments constitutifs de cette flore particulière sont arrivés des zones continentales les plus proches par les airs, par les eaux et par les animaux. Isolés du reste du monde au sein de ces différents habitats naturels, ces organismes se sont adaptés à leur nouvel environnement, les rendant uniques au monde.

Au fil des années, des « étages de végétations » (fig. 22) se sont superposés, permettant au botaniste Thérésien Cadet d'observer plusieurs principaux types de milieux naturels, basés sur les conditions climatiques, l'altitude et bien sûr, les végétaux présents.⁵⁰

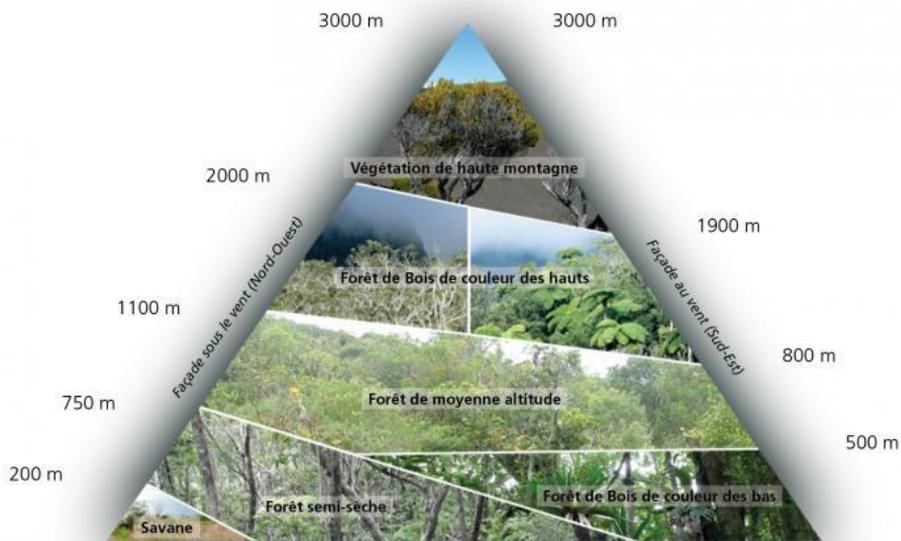


FIGURE 30 : Pyramide des habitats et milieux naturels. Source : <http://www.reunion-parcnational.fr/fr/des-connaissances/les-habitats-et-milieux-naturels>.

2.3.1 LA VÉGÉTATION LITTORALE

Fortement touchée par l'activité humaine, cette zone (200-500 mètres, figure 22) est principalement occupée par des espèces exotiques, qui ont bousculé la flore endémique afin de satisfaire les attentes touristiques. Dans cet environnement où l'eau douce est rare et les vents fréquents, quelques espèces dites halophiles ou halotolérantes se sont adaptées. Cet espace est principalement composé de lianes tels que la liane cochon (*Canavalia rosea*), la liane Patate à Durand (*Ipomoea pes-carprae*) et la liane foutafout (*Cassytha filiformis*) et d'arbustes, comme les Vacoas (*Pandanus utilis*) ou les Filaos (*Casuarina equisetifolia*). Seuls quelques espèces endémiques subsistent, comme la Salillette (*Psiadia retusa*), qui a démontré des propriétés antiplasmodiales dans nos travaux de screening, ainsi que le Bois de paille-en-queue (*Monarrhenus salicifolius*), existant sur la falaise littorale du Massif de La Montagne et utilisé en tisannerie.⁵¹

2.3.2 LA SAVANE

Cette zone est principalement dominée par des graminés pyrophiles, donc résistants au feu, comme le Latanier (*Latania lontaroides*) et le Benjoin (*Terminalia bentzoe*), ayant également démontré des propriétés antiplasmodiales dans le cadre de nos travaux.

2.3.3 LA FORÊT SEMI-SÈCHE

Cette zone fût également victime de l'arrivée de l'homme sur l'île. De larges défrichements ont été opérés en vue de cultiver le caféier et d'extraire ses précieuses ressources pour la construction, comme l'Ebénier (*Diospyros borbonica*) et le bois puant (*Foetida mauritiana*). Cette forêt s'étendait jusqu'à 750 mètres sur les planèzes de la seule Région Sous le Vent, sur les Cirques de Mafate et de Cialos, jusqu'à des altitudes de 1100-1200 mètres. Des vestiges de cette forêt persistent accrochés aux remparts et aux flancs des petits ravins (fig. 23). C'est pourtant dans cette forêt que l'on rencontre des plantes médicinales importantes, en danger d'extinction, tel que le *Croton mauritanus*, le *Zanthoxylum heterophyllum*, et le *Poupartia borbonica*.



FIGURE 31 : Individu (*Poupartia borbonica*) ancré dans la paroi basaltique. Source : Plan National d'Action du Bois Blanc Rouge, *Poupartia borbonica*, 2012-2016.

2.3.4 FORÊT DE BOIS DE COULEUR DES BAS

Cette zone correspond à la forêt tropicale humide des Bas. Chaude et humide, elle abrite une flore très diversifiée. La forêt est dense et la taille moyenne des arbres est de 10 à 15 mètres, conférant une canopée continue. Bien que les lianes soient peu présentes, les épiphytes y foisonnent. Soumise également à de nombreux défrichements, cette forêt est fortement dégradée dans l'Ouest. Elle est mieux représentée dans l'Est, bien que des espèces exotiques s'y installent progressivement.

2.3.5 FORÊT DE BOIS DE COULEUR DES HAUTS

Cette zone correspond à la forêt tropicale humide des Hauts. Elle est caractérisée par un climat frais et un taux d'humidité très élevé. Bien qu'elle fût également soumise à des destructions importantes, particulièrement dans l'Ouest, il s'agit de la végétation primaire la mieux conservée de l'île. Dans le Sud-Est, elle s'étend à partir de 800 mètres et à partir de 1100 mètres jusqu'à 2000 mètres environ dans le Nord-Ouest.

Cette végétation hygrophile montagnarde peut être subdivisée en trois faciès :

2.3.6 LA FORÊT PLUVIEUSE À DOMBEYA

Véritable fouillis végétal, ces forêts nommées également « forêts de brouillards », sont constituées d'arbres aux troncs irréguliers ne dépassant pas une dizaine de mètres. Les espèces médicinales les plus représentatives sont les Mahots (*Dombeya* sp.).

2.3.7 LES FOURRÉES TRÈS HUMIDES À *PANDANUS MONTANUS*

Ces fourrées ne sont observables que sur les versants Nord et Est du Piton de la Fournaise. Cette végétation reçoit 5 à 6 mètres d'eau par an. L'espèce principale est un *Vacoa* indigène, le *Pandanus montanus*, entre les racines duquel croissent certains arbrustes hygrophiles. On y rencontre également la fougère arborescente (*Cythea glauca*) et le Palmiste des Hauts (*Acanthophoenix rubra*).

2.3.8 LA FORÊT DES TAMARINS DES HAUTS

Dans le Nord et l'Ouest, la forêt à Mahots est remplacée par la une végétation représentée par deux espèces dominantes : le Tamarin des Hauts (*Acacia heterophylla*), arbre endémique de l'île pouvant atteindre 20 à 25 mètres de haut, et un bambou endémique, le Calumet (*Nastus borbonicus*).



FIGURE 32 : Tamarin des Hauts. ©J-M Sarrailh

2.3.9 LA VÉGÉTATION ALTIMONTAINE

Cette végétation au-dessus de la « forêt des brouillards » correspond à la végétation de Haute altitude. Il n’y a pas de forêt ici, mais bien des arbrisseaux à petites feuilles, évoluant dans un climat rude aux températures fraîches (12°C en moyenne), l’ensoleillement y est important. Nous y retrouvons principalement des fourrés d’arbustes éricoïdes, dont l’Ericaceae *Philippia montana* est l’espèce dominante.

Cette végétation unique est menacée, et malheureusement ces dangers d’extinctions sont principalement imputés à l’homme. Exploitations, défrichages, importations d’espèces économiquement intéressantes, sont des facteurs qui ébranlent l’équilibre de la flore réunionnaise. Selon l’UICN**, 30% des plantes vasculaires indigènes sont menacées. 49 espèces végétales ont déjà disparu de l’île et 275 autres sont aujourd’hui menacées.⁵² Il apparaît donc indispensable de protéger cette richesse floristique incommensurable.

** Union Internationale pour la Conservation de la Nature

3. ÉVALUATION *IN VITRO* DU POTENTIEL ANTIPLASMODIAL D'EXTRAITS DE VÉGÉTAUX DE LA RÉUNION

Soixante-quatre plantes ont été collectées afin de réaliser des extraits à l'acétate d'éthyle (EtOAc) de leurs feuilles et/ou de leurs écorces, aboutissant à la réalisation de 117 extraits. Ces extraits ont été évalués dans le cadre du Projet « BIOMOL-TCN ». Ainsi, ces mêmes extraits ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes à St Denis, anti-chikungunya à Leuven (KUL-REGA), et antiplasmodiales à Liège (CIRM).

Ces soixante-quatre plantes ont été sélectionnées selon plusieurs critères :

- Leurs endémismes
- Leurs usages en médecine traditionnelle
- Leurs enregistrements à la Pharmacopée Française

Les résultats relatifs à ce screening sont compilés dans l'article "Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands" publié dans le journal « *International Journal of Antimicrobial Agents* ».

La version complète du tableau reprenant ces plantes ainsi que leurs noms vernaculaires, le site et la date de collecte, le numéro d'herbier, les usages, ainsi que leurs enregistrements, s'il y a lieu, à la Pharmacopée Française est disponible dans la rubrique « Supporting information » de l'article initial, en annexe. Seules les plantes qui ont démontré par la suite une activité antiplasmodiale intéressante sont reprises dans la première partie de cette section (3.1 résumé), afin de faciliter la lecture de cette thèse.

La deuxième partie est consacrée aux résultats obtenus, qui constitue le corps de l'article. Puisque notre travail concerne les tests antiplasmodiaux, le tableau des résultats ne reprendra que cette activité. Cependant, le tableau publié synthétisant la totalité des résultats (antiplasmodiaux, anti-chikungunya et antioxydants) est présent dans la publication originale, qui est disponible en annexe. Bien que cette étude soit à l'origine des chemins empruntés lors de ce travail de thèse, elle n'a été publiée qu'à la fin de notre parcours doctoral. Que le lecteur ne soit pas surpris d'y voir quelques éléments qui pourraient dévoiler la suite des investigations, concernant notamment le *Poupartia borbonica* Gmel.

3.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE ET CONTRIBUTIONS PERSONNELLES À L'ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTIPLASMODIAL D'EXTRAITS DE VÉGÉTAUX DE LA RÉUNION

64 plantes sélectionnées sur base des critères repris ci-dessus ont été testées dans notre laboratoire en vue de mettre en évidence leur potentiel antiplasmodial, évalué sur une souche de *P. falciparum* 3D7. Ce screening *in vitro* a permis de mettre en évidence 22 plantes intéressantes. Leurs noms vernaculaires et usages traditionnels sont décrits ci-dessous (tableau 1).

TABLEAU 1 : Espèces, famille, noms vernaculaires et usages traditionnels de certaines plantes étudiées.

↑↑ Espèce	Famille	Noms vernaculaires	Usages traditionnels ‡‡
<i>Callophylum tacamahaca</i> Willd.	Clusiaceae	Takamaka, Takamaka des Hauts, Takamaka rouge	Ulcères, maladies des yeux, gale, croûtes, troubles liés à l'urètre, croûtes, rhumatismes, goutte, sciatique, arthrite, maux de tête
<i>Casearia coriacea</i> Vent.	Flacourtiaceae	Bois de cabri, Bois de cabri rouge	Astringent
<i>Coffea mauritiana</i> Lam.	Rubiaceae	Café marron	Diabète, rétention urinaire, conjonctivite
<i>Croton mauritianus</i> Lam.	Euphorbiaceae	Ti bois de senteur	Fébrifuge
<i>Erica arborescens</i> (Willd.)	Ericaceae	Branle filao, Branle vert	-
<i>Erica reunionensis</i>	Ericaceae	Branle vert, Branne	-
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Cœur de cerise, Cerise côtelée, Cerise à côtes	Anti-inflammatoire, fébrifuge, antioxydant, diabète, diurétique, anti-hypertenseur. Utilisé contre le virus du chikungunya lors de l'épidémie de 2006. Utilisé contre la grippe et la dengue
<i>Maillardia borbonica</i> Duch.	Moraceae	Bois de maman, Bois de gaillard, Bois de gaillet, Bois de liège, Bois de maillet, Bois de requin, Bois de sagaye, Petit cannellier	Abortif, diurétique, anti-inflammatoire. Troubles liés à l'accouchement et purification, jaunisse, hépatite, anti-inflammatoires, calculs rénaux
<i>Monimia rotundifolia</i> Thouars	Monimiaceae	Mapou, Mapou à grandes feuilles, Mapou blanc, Mapou des hauts	-
<i>Nuxia verticillata</i> Lam.	Stilbaceae	Bois maigre, Bois de bombarde, Malbrouc, Valahir, Valaire, Valake	Purification, maladies vénériennes, albuminurie, élimine l'urée et l'acide urique, albuminurie, néphrite, hypocholestérolémiant
Espèce	Famille	Noms vernaculaires	Usages traditionnels

↑↑ According to the classification APG II

‡‡ Many of them are used in mixture.

<i>Phyllanthus phillyreifolius</i> Poir.	Phyllanthaceae	Faux bois de demoiselle, Bois de cafrine, Bois de chien, Bois de négresse, Bois de ravine, Girambelle marron	Cystite, néphrite, leucorrhée, diarrhée, diurétique, astringent, emménagogue, diurétique
<i>Poupartia borbonica</i> J. F. Gmel.	Anacardiaceae	Bois de poupart, Bois blanc rouge, Bois de violon, Bois sandal, Zévi marron	Contraception féminine, néphrite, furoncles
<i>Psidium amygdalina</i> (Lam.) Cordem.	Asteraceae	-	-
<i>Psidium boivini</i> (Klatt) Rob.	Asteraceae	Bouillon blanc, Tabac marron	-
<i>Psidium dentata</i> (Cass.) DC.	Asteraceae	Guérit vite, Ti mangue, Bois collant, Bois de marron, Bois de reinette blanc, Herbe trois jours	-
<i>Psidium retusa</i> (Lam.) DC.	Asteraceae	Salette, La salière, Bien salée, Herbe à Brocus, Herbe à Laurent Martin	-
<i>Sophora denudata</i> Bory	Fabaceae	Petit Tamarin des Hauts, Petit tamarin, Tamarin blanc des hauts, Tamarin gris	Cancer de la peau
<i>Terminalia bentzoë</i> (L.) L. f. subsp. <i>bentzoë</i>	Combretaceae	Benjoin péi, Faux benjoin	Sudorifique, astringent, purifiant, plaies, aménorrhée, diarrhée, mal de gorge, pleurésie, hémorragie du rectum, dysenterie, fébrifuge , rhume, toux, grippe, asthme, règles douloureuses, pleurésie. Utilisé contre le virus du chikungunya lors de l'épidémie de 2006. Utilisé contre la grippe et la dengue
<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam.	Rutaceae	Liane patte poule, Liane patte de poulet, Liane patte poule à piquants, Patte de poule à piquants, Patte poule, Patte poule piquant, Petit patte poule, Ronce, Ronce rouge	Anti-inflammatoire, plaies, purifiant, astringent, tonique, fébrifuge , bronchite, asthme, pleurésie, diarrhée, ecchymose, abcès, grippe, toux, dysménorrhée, purification, hernie, lumbago douloureux, douleurs musculaires, entorses, crampes. Utilisé contre la grippe et la dengue
<i>Turraea thouarsiana</i> (Baill.)	Meliaceae	Quivi, Bois de quivi, Bois de café marron, Petit quivi, Ti quivi	Sudorifique, purifiant, emménagogue. Dysménorrhée, gale, hypertension, Hypertension, albuminurie, rhumatismes
<i>Vernonia jimbrillifera</i> (Cass.) Less.	Asteraceae	Bois de source	-
<i>Zanthoxylum heterophyllum</i> (Lam.) Sm.	Rutaceae	Poivrier des Hauts, Bois de poivre, Bois blanc rouge, Bois de catafille noir, Bois de poivrier, Bois de rat, Poivrier, Poivrier Synonym : <i>Fagara heterophylla</i> Lam	Tonique et stomatal (écorce). Fébrifuge , purifiante, sudorifique, cachexie, rhumatismes, dysenterie, douleurs dentaires, maux de dos

16 plantes ont présenté une activité modérée, avec des IC₅₀^{§§} comprises entre 15 et 50 µg/mL.⁵³ 3 plantes ont présenté une activité prometteuse, avec des IC₅₀ inférieurs à 15 µg/mL, et 3 plantes ont présenté une activité très prometteuse avec des IC₅₀ proches ou inférieurs à 5 µg/mL⁵³ (tableau 2).

TABEAU 2 : Activités antiplasmodiales des plantes les plus prometteuses, les trois plus intéressantes ont une IC₅₀ proches de 5 µg/mL (encadrées en vert).

Espèces	Familles	Parties	3D7, IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Casearia coriacea</i> Vent.	Flacourtiaceae	Feuilles	4.24 ± 2.2
		Écorces	3.62 ± 1.02
<i>Monimia rotundifolia</i> Thouars.	Monimiaceae	Feuilles	11.26 ± 2.88
<i>Poupartia borbonica</i> Gmel.	Anacardiaceae	Feuilles	4.92 ± 2.35
<i>Psiadia retusa</i> (Lam.) DC.	Asteraceae	Feuilles	12.09 ± 0.8
<i>Vernonia fimbrillifera</i> (Cass.) Less.	Asteraceae	Feuilles	5.2 ± 1.3
<i>Zanthoxylum heterophyllum</i> (Lam.) Sm.	Rutaceae	Feuilles	12.46 ± 4.14

Trois plantes testées sont considérées comme étant les plus actives : le *Casearia coriacea*, le *Poupartia borbonica*, ainsi que le *Vernonia fimbrillifera*. Cependant, les activités des 3 autres plantes sont également intéressantes. C'est pourquoi ces 6 plantes ont fait l'objet d'études phytochimiques et pharmacologiques au sein de notre laboratoire ou d'un laboratoire partenaire. Ce screening d'activité a permis de mettre en évidence des plantes qui n'avaient encore jamais été étudiées, telles que le *Casearia coriacea*, le *Monimia rotundifolia*, ou le

^{§§} Concentration qui inhibe 50% de croissance parasitaire.

Poupartia borbonica (fig. 33) et a donc servi de point de départ pour le fractionnement bioguidé entrepris dans le cadre de ces travaux.

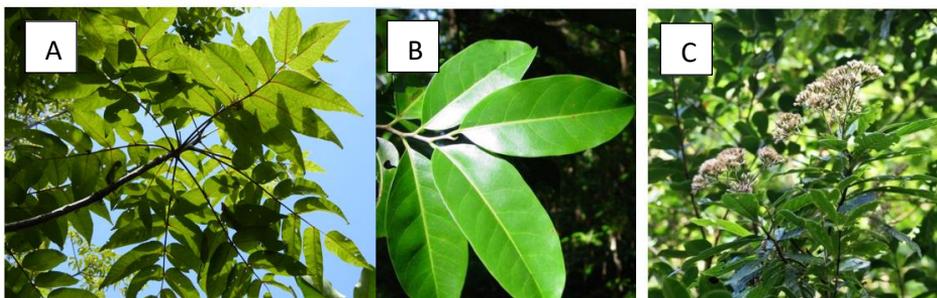


FIGURE 33 : Pictures of *Poupartia borbonica* (A) (©Michel Frédérich), *Casearia coriacea* (B) (©J-M Sarrailh) and *Vernonia fimbriifera* (C) (©F Duban).

Les différents tests antioxydants réalisés à la Réunion (FRAP, ABTS, et ORAC) décrits dans la publication ont mis en évidence que les écorces de huit espèces végétales, dont le *Poupartia borbonica*, avaient des effets intéressants. Les tests anti-chikungunya ont mis en évidence plusieurs extraits actifs, dont l'extrait de l'écorce de *Stillingia lineata*, qui s'est révélé très prometteur.

3.2 PUBLICATION

International Journal of Antimicrobial Agents 52 (2018) 622–628



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

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



Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands



Allison Ledoux ^a, Martine Cao ^b, Olivia Jansen ^a, Lucia Mamede ^a, Pierre-Eric Campos ^c, Bertrand Payet ^c, Patricia Clerc ^c, Isabelle Grondin ^c, Emmanuelle Girard-Valenciennes ^c, Thomas Hermann ^d, Marc Litaudon ^e, Charlotte Vanderheydt ^f, Leen Delang ^e, Johan Neyts ^e, Pieter Leyssen ^e, Michel Frédérich ^a, Jacqueline Smadja ^b

3.2.1 INTRODUCTION

Vector-borne diseases are human pathologies caused by parasites, virus or bacteria. According to WHO, they are responsible for more than 1 million deaths annually ⁵⁴. Mosquitoes are the most studied insects and also the deadliest due to their ability to carry and propagate pathogens to humans. Malaria is one of the most serious vector-borne diseases, accountable for 429.000 deaths worldwide in 2016 ⁵⁵. The resistance of parasites to medicines has become a widespread problem. Malaria is the consequence of a protozoan parasite, *Plasmodium sp.*, transmitted by the bite of anopheles mosquitoes. The *Plasmodium* uses a lot of energy for survival and reproduction increasing the production of reactive oxygen species in hosts, which can impact the general condition of patients ⁵⁶. Chikungunya is caused by a single-stranded RNA virus, chikungunya virus (CHIKV) and is transmitted to humans by the bite of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. Chikungunya is characterized by an important fever and arthralgia, which can frequently become chronic ⁵⁷. Outside the known infection areas (Africa, Islands in the Indian and Pacific Oceans, Southern Europe, and Southeast Africa), the chikungunya epidemic in 2005 that occurred in Reunion Island and its neighbors involved about one-third of the population and led to more than 250 deaths ⁵⁸. Unfortunately, there is currently no specific treatment. The use of antipyretic and analgesic helps to alleviate symptoms ⁵⁹. Antioxidant treatments can be used as adjuvant to decrease articular inflammatory pain. Vector-borne diseases are a major public health problem that makes the search for new treatment essential. In this work, all the plants were collected in Reunion Island based on their medicinal use, endemism

and registration in the French Pharmacopoeia (Smadja, 2016; S. Giraud-Techer, 2016). Some of the studied plants are endangered species, implying the importance of their screening to valorize their potential. We evaluated the antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities. Only the plants which demonstrated activities in our assays are presented for the sake of clarity. The complete list of 64 plants including their local name, population, data of collection and voucher number are available in the Supporting Information.

3.2.2 MATERIALS AND METHODS

○ PLANT MATERIALS AND EXTRACTION

64 plants were collected in Reunion Island for the BIOMOL TCN project through a cooperative network of botanist collaborators. The harvests were made with best regard to the biological patrimony represented by the exceptional biodiversity of the island (Pitons, Cirques and Remparts of Reunion Island are listed in UNESCO World Heritage). The species were identified by Prof. Dominique STRASBERG and Jacques FOURNEL (University of Reunion) and by Hermann THOMAS (Parc National de La Réunion). A voucher specimen of each species was deposited in the University Herbarium. The plants were air-dried at room temperature with no direct sunlight and then pulverized using an electrical grinder. Extracts were prepared with 5 g of powdered dried material in 50 mL of solvent (Ethyl acetate - EtOAc) using an ASE 300 system (Accelerated Solvent Extraction). The EtOAc extracts were then submitted on a small-cartridge polyamide filtration to remove tannins and then weighed and stored in appropriate vials. The filtrates were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure at 40°C. These extracts were evaluated for their antiplasmodial and anti-chikungunya activities.

For the antioxidant activity assays, the plants have been dried in oven at 45°C and crushed. All extractions were also performed using the ASE 300 system. Approximately 50 g of plant powder was extracted using 100 mL-stainless steel cells. Five static cycles of 6 min followed by 2 min of purge with pressurized nitrogen (10 bars) were performed at 40°C, 100 bars leading to approximately 180 mL of extract. The solvent of extraction was ethyl acetate for all the extracts. These extracts have been concentrated and dried on rotary evaporator (Büchi).

○ ANTIPLASMODIAL ASSAYS

Continuous *in vitro* cultures of asexual erythrocyte stages of *P. falciparum*, Chloroquine-sensitive strain 3D7 were maintained following the procedure of Trager and Jensen⁵. The strain was obtained from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, MR4. The host cells were human red blood cells (A+). The culture medium composed of RPMI 1640 (Gibco, Fisher) containing NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM) and L-glutamine, was supplemented with 1.76 g/L of glucose (Sigma-Aldrich), 44 mg/mL of hypoxanthin (Sigma-Aldrich), 100 mg/L of gentamicin (Gibco) and 10% human pooled serum (A+), as previously described.⁶² Each crude extracts was dissolved in DMSO or in EtOH/DMSO [1:1], according to their solubility, at a concentration of 10 mg/mL. The solutions of tested extracts were diluted in the medium; each test sample was applied in a series of eight 2-fold dilutions in a 96-well plate and tested in triplicate. The parasitemia was 2%, and the hematocrit was 1%, as described by Murebwayire et al.⁶³ The highest concentration of solvent to which the parasites were exposed was 1% (which is devoid of toxicity). The *P. falciparum* culture was placed in contact for 48h. Parasite growth was estimated by colorimetric revelation with the measurement of absorbance at 630 nm by the determination of lactate dehydrogenase (pLDH) activity, according to the methods described by Makler et al.⁶⁴ Artemisinin (Sigma-Aldrich) at an initial concentration of 100 ng/mL was used as positive control in all experiments. IC₅₀ (concentration inhibiting 50% of parasitic growth) values were calculated from graphs.

○ ANTI-CHIKUNGUNYA ASSAY

CHIKV causes a pronounced cytopathic effect in cells, such as Vero cells, which served as a starting point for the optimization of a virus-cell-based screening assay employing the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) method.⁶⁵ Following the microtiter plate readout, assay conditions can be quickly and automatically sorted as inactive/toxic (no increase in optical density (OD) at 493 nm) or with potential antiviral activity (an increase greater than 50% in OD compared with the control conditions). However, and this was expected based on prior experience with the screening of complex samples, a high initial

positives rate was obtained (up to 10%). To discriminate true hits from false positives, a microscopic quality-control step was introduced: only samples that completely inhibited virus-induced cell death without causing an adverse effect on the host cell and monolayer morphology were retained for further study.

Serial dilutions of extracts, fractions or compounds were prepared in assay medium [MEM Rega3 (Cat. N19993013; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL 200 mM L-glutamine, and 5 mL 7.5% sodium bicarbonate] that was added to empty wells of a 96-well microtiter plate (Falcon, BD). Subsequently, 50 μ L of virus dilution in assay medium was added, followed by 50 μ L of a cell suspension. This suspension, with a cell density of 25,000 cells/50 μ L, was prepared from a Vero cell line sub-cultured in cell growth medium (MEM Rega3 supplemented with 10% FCS, 5 mL L-glutamine, and 5 mL sodium bicarbonate) at a ratio of 1:4 and grown for 7 days in 150 cm² tissue culture flasks (Techno Plastic Products). The assay plates were placed in the incubator for 6–7 days (37 °C, 5% CO₂, 95–99% relative humidity), a time at which maximal virus-induced cell death or cytopathic effect (CPE) is observed in untreated, infected controls. The assay medium was then aspirated, replaced with 75 μ L of a 5% MTS (Promega) solution in phenol red-free medium and incubated for 1.5 h. The absorbance was measured at a wavelength of 498 nm (Safire2, Tecan); and optical densities reached values between 0.6–0.8 for the untreated, uninfected controls. Raw data were converted to percentage of controls and the EC₅₀ (50% effective concentration or concentration which is calculated to inhibit virus induced cell death by 50%) and CC₅₀ (50% anti-metabolic concentration or concentration calculated to inhibit the overall cell metabolism by 50%) were derived from the dose–response curves. The selectivity index (SI) is calculated as CC₅₀/EC₅₀ and is used as an indication for the antiviral potential of a compound: the larger this value is, the larger is the therapeutic window or the distance between the concentration of compound having a pronounced antiviral effect and causing an adverse effect on the host cell. All assay conditions producing an antiviral effect exceeding 50% were checked microscopically for minor signs of CPE or adverse effects on the host cell (i.e. altered cell morphology). A compound is considered to elicit a selective antiviral effect on virus replication only if, following microscopic quality control, and at least at one concentration of compound, no CPE or any adverse effect is observed.

○ ANTIOXIDANT ASSAYS

Extracts were solubilized at a concentration of 1 mg/mL in ethyl acetate for the FRAP and the ABTS assays and in methanol for ORAC assay. For these three tests, if the results obtained were out of the Trolox range, the extracts were two-fold diluted and the test repeated.

○ FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP) ASSAY

The method described by Benzie and Strain⁶⁶ was used. It is based on the reduction of a ferric (III) complex to its colored ferrous (II) form in the presence of antioxidants. The FRAP reagent was prepared with three solutions as follows: acetate buffer at pH 3.6 (3.1 g of $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ and 16 mL $C_2H_4O_2$ per liter of buffer solution); 10 mmol/L solution of TPTZ in 40 mmol/L HCl; and 20 mmol/L solution of $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$. The working solution was prepared by mixing 10 mL of acetate buffer, 1 mL of TPTZ solution and 1 mL of $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ solution. For the preparation of Trolox standards, 0.250 g of Trolox was dissolved in 50 mL of methanol to give a 0.02 M solution. This solution was diluted with methanol to prepare a standard range between 800 and 25 μ M. For the assay, 10 μ L of the extract at a concentration of 1mg/mL was introduced into a 96-well microplate with 290 μ L of FRAP reagent. After 1h of incubation at 37°C, the absorbance was measured at 593 nm. Trolox equivalents of samples were calculated with a calibration curve of pure Trolox in acetate buffer.

○ ABTS RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

We used the method described by Re et al..⁶⁷ ABTS radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) was produced by the reaction between ABTS and potassium persulfate. ABTS was dissolved in water to a 7 mM concentration (19.2 mg of ABTS in 5 mL of water) and added to 5 mL of a 2.45 mM solution of potassium persulfate. The mixture was left in the dark at room temperature for 12–16 h before use in order to obtain the maximal absorbance of the solution. The $ABTS^{\bullet+}$ solution was diluted with methanol to obtain an absorbance of 0.70 (\pm 0.2) at 734 nm and equilibrated at 30°C. Trolox standards were prepared as explained above. The solution was diluted with methanol to prepare a standard range between 400 and 25 μ M. For the assay, 20 μ L of the extract at a concentration of 1 mg/mL was introduced into a 96-well microplate with 280 μ L of the $ABTS^{\bullet+}$ solution. The absorbance was

measured at 734 nm after 5 min of incubation at 30°C. Trolox equivalents of samples were calculated with a calibration curve of pure Trolox in methanol.

○ OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY (ORAC) ASSAY

As described in the method developed by Ou et al.⁶⁸, the AAPH reagent solution was prepared just before use and kept on ice due to the instability of the radical. AAPH (0.414 g) was dissolved in 10 mL of 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) to a final concentration of 153 mM. Fluorescein stock solution (4.19×10^{-3} mM) was prepared in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) and kept at 4 °C in dark condition. The 8.16×10^{-5} mM fresh fluorescein working solution was made daily from the stock solution in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). Trolox standards were prepared as described hereinabove and the solution was diluted with methanol to prepare a standard range between 75 and 6.25 µM. For the assay, 25 µL of sample at a concentration of 1 mg/mL were introduced in each well into a 96-well microplate with 150 µL of the fluorescein solution. 25 µL of AAPH (153 mM) were added in each well with the injector of the spectrophotometer and the fluorescence was recorded every minute for 100 min. The area under the curve (AUC) was determined automatically for each sample and each Trolox concentration. Standard curve was established by plotting AUC versus Trolox concentrations. Antioxidant activity was expressed as micromoles of Trolox equivalent per mg/mL of extract.

○ STATISTICAL ANALYSIS

The experimental results were expressed as an average of three replicates in each case. For all samples, the Trolox equivalent was calculated for 1 mg/mL of extract with a calibration curve of Trolox according to the concentration. For each point of the standard range, 4 replications have been performed.

3.2.3 RESULTS AND DISCUSSION

Concerning the screening of the crude extracts for **antiplasmodial activity**, **17 plant extracts** showed **moderate activity** with an IC₅₀ comprised between 15 and 50 µg/mL. The bark extract of *Casearia coriacea* and 6 leaves extracts displayed

a **promising activity** with an $IC_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$: *Casearia coriacea*, *Monimia rotundifolia*, ***Poupartia borbonica***, *Psiadia retusa*, *Vernonia fimbrillifera* and *Zanthoxylum heterophyllum*. These results are detailed in Table 1.

The most interesting extracts were obtained from *Casearia coriacea*, *Poupartia borbonica* and *Vernonia fimbrillifera*. As far as we know, these 3 plants have never been either phytochemically nor pharmacology studied.

Our team further investigated some of these plants and we discovered that hydroxy- γ -isosanshool was the main active compound of the extract of *Z. heterophyllum*⁶⁹ and poupartones A, B and C (alkylphenol cyclohexenones derivatives) in *P. borbonica*, the main antiplasmodial compounds in our *in vitro* and *in vivo* assays.⁷⁰ The use of *Zanthoxylum heterophyllum* to treat fever in traditional medicine (Supporting Information available in annex) may be correlated with its antiplasmodial properties.

TABLE 1 : *In vitro* IC₅₀ values against *Plasmodium falciparum* 3D7 strain of the most active plant extracts.

Species	Family	Part (L= leaves, B = bark)	(L= 3D7, IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Callophylum tacamahaca</i> Willd.	Clusiaceae	L.	30.78 ± 8.8
<i>Casearia coriacea</i> Vent.	Flacourtiaceae	L.	4.24 ± 2.2
<i>Coffea mauritiana</i> Lam.	Rubiaceae	B.	37,63 ± 0.7
<i>Croton mauritanus</i> Lam.	Euphorbiaceae	L.	16.4 ± 5.58
<i>Erica arborescens</i> (Willd.)	Ericaceae	B.	37.15 ± 1.33
<i>Erica reunionensis</i>	Ericaceae	B.	32.77 ± 0.59
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	L.	24.18 ± 11.13
<i>Maillardia borbonica</i> Duch.	Moraceae	L.	36.56 ± 17.96
<i>Monimia rotundifolia</i> Thouars	Monimiaceae	L.	11.26 ± 2.88
<i>Nuxia verticillata</i> Lam.	Stilbaceae	L.	18.33 ± 5.61
<i>Phyllanthus phillyreifolius</i> Poir.	Phyllanthaceae	B.	44.81 ± 7.32
<i>Poupartia borbonica</i> J. F. Gmel.	Anacardiaceae	L.	4.92 ± 2.35
<i>Psiadia amygdalina</i> (Lam.) Corderm.	Asteraceae	B.	16.61 ± 0.57
<i>Psiadia boivini</i> (Klatt) Rob.	Asteraceae	L.	23.69 ± 4.91
<i>Psiadia dentata</i> (Cass.) DC.	Asteraceae	L.	22.99 ± 2.96
<i>Psiadia retusa</i> (Lam.) DC.	Asteraceae	L.	12.09 ± 0.8
<i>Sophora denudata</i> Bory	Fabaceae	B.	17.88 ± 3.39
<i>Terminalia bentzoë</i> (L.) L. f. subsp. <i>bentzoë</i>	Combretaceae	L.	18.65 ± 10.6
<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam.	Rutaceae	L.	43.12 ± 12.4
<i>Turraea thouarsiana</i> (Baill.)	Meliaceae	B.	33.43 ± 6.49
<i>Vernonia fimbriifera</i> (Cass.) Less.	Asteraceae	L.	5.2 ± 1.3
<i>Zanthoxylum heterophyllum</i> (Lam.) Sm.	Rutaceae	L.	12.46 ± 4.14

The *Vernonia* genus is known to contain vernolides, a class of sesquiterpene lactones which showed interesting antiplasmodial bioactivity⁷¹. Three sesquiterpene lactones namely 8-(4'-hydroxymethacrylate)-dehydromelitensin, onopordopicrin and 8 α -[4'-hydroxymethacryloyloxy]-4-epi-sonchucarpolide have been isolated and identified as the main active compounds⁷². Leaves of *Terminalia bentzoe* and *Psiadia dentata* showed moderate activity, challenging a previous study⁷³ which demonstrated the promising activity of these plants. This suggests that the leaves of *Psiadia dentata* are less active than the aerial parts previously tested and that the leaves extract of *Terminalia bentzoe* are less active than the bark extract. These differences could also be due to different harvest time or location. In this study, EtOAc extracts of *Aphloia theiformis* was not active, although our team previously showed the activity of the MeOH bark extract and the CH₂Cl₂ leaves extract. The discrepancy observed might be explained by the extraction procedure or the location or time of harvest. Regarding the plants used by local population, 5 species were in use to treat fever or malaria; namely *Croton mauritanus*, *Eugenia uniflora*, *Terminalia bentzoe*, *Toddalia asiatica* and *Zanthoxylum heterophyllum*, demonstrated antiplasmodial activities, which is in accordance with their traditional application. From *Toddalia asiatica*, already known for its antiplasmodial properties, two active molecules were isolated: toddayanis (terpenalkaloid) and skimmianine⁷⁴. Although *Terminalia bentzoe* and *Zanthoxylum heterophyllum* have already been studied by our team, it is the first time that the antiplasmodial activity of *Croton mauritanus* and *Eugenia uniflora* is demonstrated.

Regarding the anti-chikungunya activity, *Stillingia lineata* was one of the most interesting plants (the results are presented in the original paper, in annex). In this study, the crude ethyl acetate extract obtained from the stem bark of *Stillingia lineata* ssp. *lineata* exhibited a selective antiviral activity against the chikungunya virus with an EC₅₀ < 2 μ g/mL whereas only a weak cytotoxic effect was observed on the host cells. A phytochemical investigation of this extract led to the isolation of tonantzitlolone A, tonantzitlolone B, of an original 4'-hydroxytonantzitlolone, named tonantzitlolone C which has an uncommon C₁₅-flexibilane skeleton, and of a new ent-12-hydroxy-3,7- dioxoisopimara-8,15-diene. Subsequent evaluation of the inhibition of chikungunya virus replication in cell demonstrated that the 4'-acetoxytonantzitlolone was endowed with

antiviral activity against CHIKV⁶⁵. Moreover, the LC/MS and the bioassay-guided purification of the EtOAc leaves extract using a chikungunya virus-cell-based assay led to the isolation of six new and three known tonantzitlolones possessing the rare C₂₀-flexibilane skeleton, along with tonantzitloic acid, a new linear diterpenoid, and three new and two known tigliane-type diterpenoids⁷⁵. A bioassay-guided purification of an EtOAc extract of the leaves of *Croton mauritianus* using a chikungunya virus-cell-based assay led to the isolation of 12-O-decanoylphorbol-13-acetate and the new 12-O-decanoyl-7-hydroperoxy-phorbol-5-ene-13-acetate, along with loliolide, vomifoliol, dehydrovomifoliol, annuionone D and bluemol C. 12-O-decanoylphorbol-13-acetate and 12-O-decanoyl-7-hydroperoxy-phorbol-5-ene-13-acetate inhibited chikungunya virus-induced cell death in cell culture with EC₅₀ of 2.4 ± 0.3 and 4.0 ± 0.8 μM, respectively⁷⁶. *Aphloia theiformis* has already been phytochemically and pharmacologically investigated and is known to contain saponins⁷⁷ and xanthone glucosides⁷⁸ and is known to act on multiple pharmacological targets.⁷⁸ *Aphloia theiformis* was used against Chikungunya virus during the epidemic in 2006 in Reunion Island (Supporting Information). Here, we confirmed for the first time the high anti-chikungunya activity of this plant. The barks of *Indigofera amoxylum* and *Securinega durissima* showed an interesting antiviral activity. As far as it could be established, these endemic plants have never been studied.

Some species showed an interesting antioxidant activity of their bark extracts according to the three assays: *Bertiera borbonica*, *Erythroxyton laurifolium* and *Erythroxyton sideroxyloides*, *Indigofera amoxylum*, *Poupartia borbonica*, *Scolopia heterophylla*, *Sophora denudata* and *Terminalia bentzoe* (see results in annex). The leaves extract of *Bertiera borbonica* and the bark extract of *Erythroxyton laurifolium* displayed the highest response to the ORAC assay, respectively 6510.8 and 6310.3 μM of Trolox equivalent per mg/mL of extract. *Bertiera borbonica* also exhibited the highest Trolox equivalent response for the ABTS assay (3612 Trolox equivalent per mg/mL of extract). *Erythroxyton laurifolium* is known to contain oligomeric and polymeric proanthocyanidins and showed moderate activity against Herpes simplex virus type 1.⁷⁹ *Erythroxyton laurifolium* is used in traditional medicine as anti-inflammatory (Supporting Information). This use can be correlated with its high antioxidant activity observed in this study. *Scolopia heterophylla* and *Terminalia Bentzoe* were the

only two leaves extracts that have also exhibited a relatively high activity. *Terminalia bentzoe* seemed particularly interesting, as both its leaves and bark extracts showed an antioxidant activity and their values were really high for the ABTS and FRAP assays. Up to the present, *Bertiera borbonica* and *Scolopia heterophylla* have never been either phytochemically nor pharmacology studied.

3.2.4 CONCLUSION

In this study, elements were put in evidence to justify several traditional uses of the flora of Mascarene Islands. Some uses were not confirmed, but it does not mean the plants don't have any activity. Indeed, some compounds could be more active *in vivo* after metabolisation, and not *in vitro*. They also may act on other pathways than the erythrocytic stage tested in this study (on the liver stage of *P. falciparum* for example) or they may act on the symptoms of the pathologies (fever, cephalgias). These results demonstrated the biological activities of plants which were highlighted for the first time, as *Casearia coriaceae*, *Monimia rotundifolia*, *Indigofera amnoxylum*, *Scolopia durissima*, *Bertiera borbonica*, and *Scolopia heterophylla*. Further investigations, such as bioassay guided fractionation should be carried out to isolate and elucidate the structure of the active compounds from these plants.

4. AVANT-PROPOS AU CHAPITRE 3 : COMMENTAIRES SUR LE CHOIX DE LA PLANTE SÉLECTIONNÉE POUR UNE ÉTUDE APPROFONDIE

Le screening antiplasmodial effectué sur ces plantes réunionnaises, endémiques des Mascareignes, nous a permis de mettre en évidence trois plantes prometteuses, le *Monimia rotundifolia*, le *Psiadia retusa*, et le *Zanthoxylum heterophyllum*, ainsi que trois plantes hautement actives : le *Casearia coriacea*, le *Poupartia borbonica* et le *Vernonia fimbrillifera* dont les IC₅₀ sont proches de 5 µg/mL.

Le *Casearia coriacea* a été étudié à Liège par le docteur Ewa Cieckiewicz, le *Vernonia fimbrillifera*, ainsi que le *Monimia rotundifolia*, ont fait l'objet de la thèse de doctorat de Melle Annélise Bordignon, le *Psiadia retusa* a été étudié par le docteur Keshika Mahadeo à l'Université de la Réunion. Le *Zanthoxylum heterophyllum* a été étudié au commencement de ce parcours doctoral, mais ce travail de thèse se concentre sur le *Poupartia borbonica*, puisque nous avons pour ambition d'analyser les plantes les plus actives du criblage. L'étude de cette plante a présenté certains avantages. Tout d'abord, seules les feuilles ont démontré une activité antiplasmodiale intéressante. Il s'agit d'un paramètre écologique non négligeable, puisqu'il est difficilement imaginable d'abîmer cette plante en voie d'extinction en prélevant l'écorce ou les racines. De plus, bien que les Anacardiaceae ne soient pas particulièrement une source importante de composés antimalariques, comme les Asteraceae par exemple, ceux découverts dans cette famille ont l'avantage d'avoir une activité souvent très prometteuse.⁸⁰ Et enfin, si la littérature concernant cette plante mentionne quelques données sur les aspects botaniques, elle n'avait encore jamais fait l'objet d'investigations phytochimiques, ni pharmacologiques. Un autre *Poupartia* Africain, le *Poupartia birrea* appelé également *Sclerocarya birrea*, avait déjà été mentionné pour ses propriétés antiplasmodiales prometteuses.⁸¹

Pour ces raisons, nous avons sélectionné le *Poupartia borbonica* pour une étude phytochimique approfondie et un fractionnement bioguidé, afin de mettre en lumière les molécules responsables de l'activité de son extrait de feuilles.

CHAPITRE 3: CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU *POUPARTIA BORBONICA*

1. AVANT-PROPOS

Ce chapitre sera consacré à l'étude du *Poupartia borbonica* Gmel.

La première partie constitue la recherche bibliographique des données disponibles dans la littérature : sa description botanique, son habitat, et son histoire. La deuxième partie de ce chapitre concerne les travaux réalisés dans le cadre de ce travail doctoral. L'étude préliminaire phytochimique des feuilles du *P. borbonica* sera détaillée, car elle est le point de départ de la réalisation du fractionnement bioguidé. L'essentiel des travaux sera présenté sous la forme de l'article « Antimalarial activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives isolated from the leaves of *Poupartia borbonica* », publié dans *Journal of Natural Products* (2017), 80, (6): 1750-1757. Celui-ci reprend notamment les activités antiplasmodiales des différents extraits, les étapes du fractionnement bioguidé qui ont permis de mettre en évidence trois nouveaux composés : les **poupartones A, B et C**. Les activités antiplasmodiales et cytotoxiques de ces composés sont évaluées et la poupartone majoritaire, la poupartone A, a été testée *in vivo*.

2. *POUPARTIA BORBONICA* GMEL.

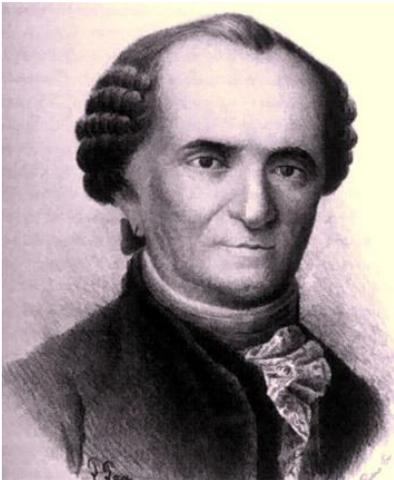


FIGURE 34 : Philibert Commerson (1727-1773)

2.1 UNE DÉCOUVERTE RICHE EN AVENTURES

Philibert Commerson (fig.34) était un naturaliste français, passionné par la botanique. Lorsqu'il acquit son titre de docteur en 1754, il étudia la flore du Languedoc. À la demande de son correspondant et ami, **Carl Von Linné**, qui souhaitait fournir une description des poissons de la Méditerranée à la Reine de Suède, il s'investit dans l'ichtyologie. Ses descriptions précises et détaillées ont fait de lui un personnage scientifiquement reconnu. En 1755, il se consacra à l'herboristerie en Savoie, où il rencontra **Voltaire**, ainsi que le botaniste **Albrecht Von Haller**. De retour dans sa ville natale, il se maria. Cependant, deux ans plus tard, le décès tragique de sa femme lorsqu'elle donna vie à son fils le fit quitter la province pour s'installer à Paris. Grâce aux contacts qu'il possédait au sein de l'Académie des Sciences, il entreprit de rejoindre l'expédition dans les terres australes avec **Louis Antoine Bougainville**. Il découvrit Rio de Janeiro, les îles Malouines, le détroit de Magellan, la Patagonie, et Tahiti. En chemin, il eut quelques ennuis, lorsque les Tahitiens se sont aperçus que son valet était... une femme. Cette botaniste et aventureuse exploratrice s'était déguisée en homme pour se joindre au périple de Bougainville. Pardonné par ce dernier pour cette surprise, Commerson et son valet poursuivirent l'expédition jusqu'à l'île de France en 1768 (actuellement l'île Maurice) où un ordre du roi l'encouragea à étudier la faune et la flore de l'île. Il y fut vivement accueilli par l'éminent naturaliste **Pierre Poivre**. En 1770, il gagna Madagascar et se rendit un an plus tard sur l'île Bourbon (actuellement la Réunion). À la fin de l'année 1771, Commerson possédait une florissante collection de plantes. Ses herbiers étaient riches de 3 000 espèces ou genres nouveaux, et furent envoyés au Jardin du Roi, à Paris (actuellement le Muséum national d'histoire naturelle) où ils seront conservés. Il s'éteignit en mars 1773, avec à ses côtés son valet, **Jeanne Barret**, la première femme à avoir fait le tour du monde, grâce à cette expédition.⁸²

Commerson a décrit de nombreux genres, dont le genre *Poupartia*, qui semble dédié au botaniste François Poupart, membre de l'Académie des Sciences de Paris. L'espèce *P. borbonica* a été décrite à partir de ses échantillons d'herbier par Johann Friedrich Gmelin en 1791.⁸³

2.2 UNE ESPÈCE EN VOIE D'EXTINCTION

Le *Poupartia borbonica* est connu localement sous le nom de « Bois-blanc rouge », « Bois de Poupart » ou « Zévi-marron ». Il s'agit d'une plante endémique des îles des Mascareignes, dont la Réunion. Cet arbre est en danger critique d'extinction et figure sur la liste rouge des espèces protégées par l'arrêté ministériel du 6 février 1987. On la retrouve dans les reliquats de la forêt mégatherme semi-xérophile (la forêt semi-sèche), sur la côte « sous le vent », entre 50 et 950 mètres d'altitude. Les exploitations sylvicoles et agricoles de

cette forêt par l'Homme ont largement contribué à la destruction de l'environnement du *P. borbonica* et donc à sa raréfaction. L'utilisation de son écorce en tisannerie est autant un facteur anthropologique menaçant.

L'introduction d'espèces exotiques envahissantes, telles que la liane à papillon (*Hiptage benghalensis*) est également une des causes de la disparition de cette espèce (fig. 35).

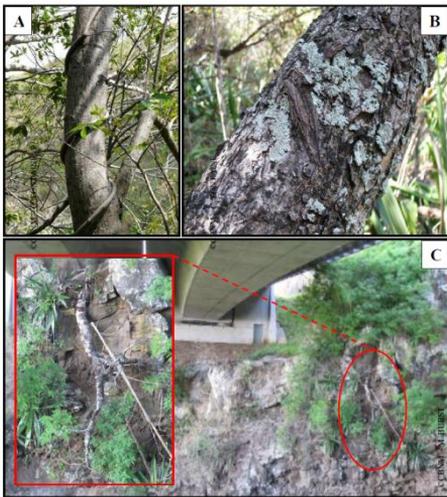


FIGURE 35 : Invasion par la liane à papillon (A), écorçage (B), impact de l'aménagement (C). Source : Plan National d'Action du Bois Blanc Rouge, *Poupartia borbonica*, 2012-2016.

En **2011**, le Plan National d'Action en faveur des espèces menacées recensait 95 individus, dont 5 à Maurice et 90 à la Réunion (fig. 36). Les populations sont considérées comme étant vieillissantes et le taux de régénération très faible de l'espèce en milieu naturel participe au déclin de cet arbre. Cependant, il semble que la culture de cette plante soit bien maîtrisée. Il est dès lors urgent de protéger et restaurer son habitat afin de pouvoir envisager une réintroduction des collections *ex situ*.

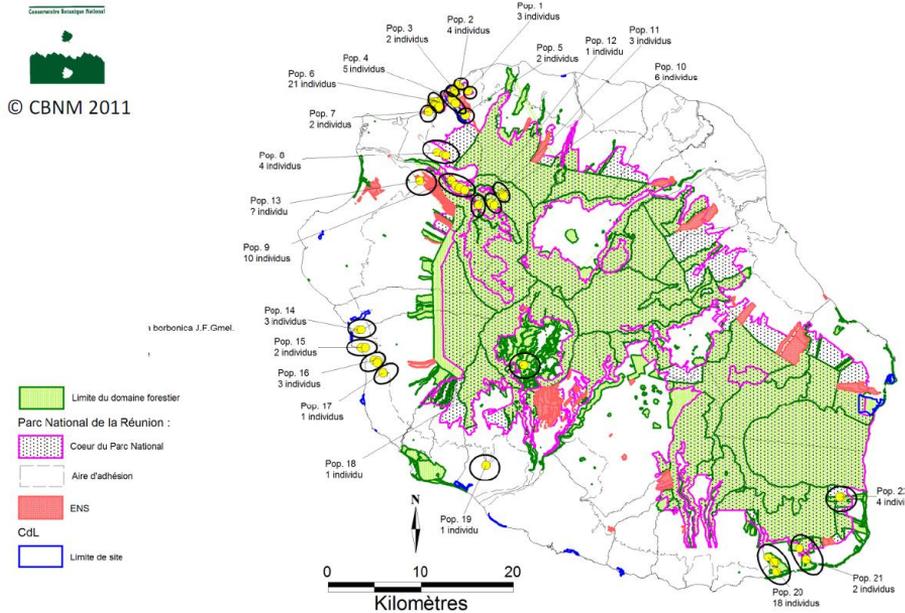


FIGURE 36 : Carte de distribution des populations de *P. borbonica* J.F.Gmel sur l'île de la Réunion. Source : Plan National d'Action du Bois Blanc Rouge, *Poupartia borbonica*, 2012-2016.

2.3 ASPECTS BOTANIQUES⁸³

P. borbonica est un arbre dioïque pouvant atteindre 20 mètres de haut. Son tronc blanchâtre est droit et peut atteindre 70 centimètres de diamètre. Son écorce est brunâtre et spongieuse, gorgée d'une sève rouge. Ce qui lui vaut la première partie de son nom « Bois-blanc rouge » (fig. 37). Trois types de feuilles sont observables en fonction de leur âge. Les feuilles juvéniles, contenant deux à trois paires de folioles, les feuilles de transition, plus grandes que celles adultes, contenant six à huit paires de folioles, et les feuilles adultes, contenant trois à cinq paires de folioles (fig. 38). Les feuilles des stades juvéniles sont pubescentes et contiennent des nervures rouges, qui lui vaut la deuxième partie de son nom de « Bois-blanc rouge », les feuilles adultes, par contre, sont glabres et les nervures sont jaunes-oranges (fig. 39).



FIGURE 37 : Tronc du *P. borbonica*. ©Michel Frédéric

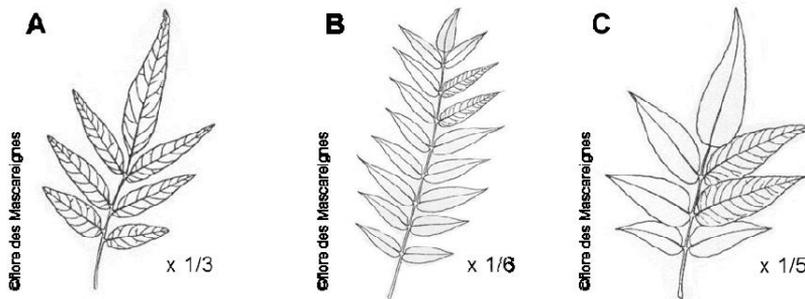


FIGURE 38 : Feuilles juvéniles (A), feuilles de transition (B) et feuilles adultes (C) de *P. borbonica*. ©Flora des Mascareignes

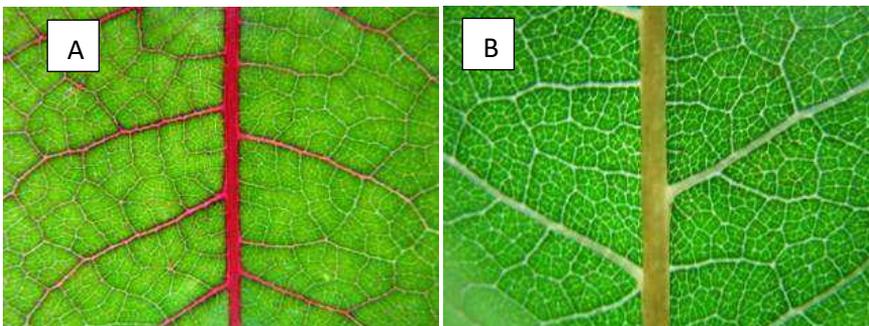
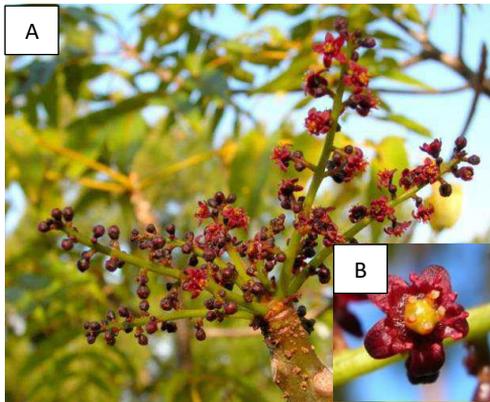


FIGURE 39 : Feuille juvénile (A) et feuille adulte (B) de *P. borbonica*. ©CBNM, M. Burst

Les inflorescences sortent à la fin de la saison sèche, lorsque l'arbre est défeuillé. Les inflorescences mâles sont longues de 10 à 18 centimètres, se regroupent en grappes de cymules dont l'axe et le pédicelle sont parsemés de courts poils glanduleux. L'inflorescence femelle est plus petite, mesurant 5 à 8 centimètres.



Les cymules sont souvent réduites à une seule fleur. La fleur mâle est pourpre noire et mesure environ 5 mm de diamètre. Elle possède 5 sépales de 1,3 mm et 5 pétales elliptiques. Elle contient 10 étamines dont l'anthère est ovale.

FIGURE 40 : Rameau avec inflorescences (A) et fleur femelle (B) de *P. borbonica*. ©CBNM, S. Française

La fleur femelle mesure environ 4 mm de diamètre (fig. 40). Ses staminodes sont long de 1.2 mm à anthère vide. L'ovaire est long de 1 mm. Elle contient 5 carpelles dont les 3 plus petits sont stériles. Chaque carpelle possède un style épais et un ovule par loge fertile.

La drupe est rouge sombre, violacée et mesure 1 à 1,5 cm de diamètre (fig. 41). Sa chair est aqueuse et contient un noyau osseux irrégulier contenant 2 à 3 loges s'ouvrant par un opercule. Une seule loge est fertile, les autres sont vides. L'embryon charnu mesure 6 mm.



FIGURE 41 : Fruits immatures (A) et fruits matures (B) de *P. borbonica*. ©CBNM, M. Burst

2.4 POSITION TAXONOMIQUE

Le *P. borbonica* fait partie de la grande famille des Anacardiaceae, qui comprend environ 70 genres et 700 espèces, principalement présentes dans les régions tropicales. Certaines ont un intérêt économique majeur, tel que le Pistachier (*Pistacia vera*), cultivé en méditerranée. Le genre *Poupartia* comprend une dizaine d'espèces retrouvées en Afrique, dans les Mascareignes et en Inde. Le *P. borbonica* est également connu sous le nom de *Spondias borbonica*, désigné par Baker en 1877.⁸³

2.5 CONFUSIONS

Le stade juvénile pourrait être confondu avec le bois de papaye (*Polyscias rivalsii*). Le stade adulte, quant à lui, ressemble fortement au poivrier des hauts (*Zanthoxylum heterophyllum*) (fig. 42). Ce dernier a également démontré des propriétés antiplasmodiales, mises en évidence lors du screening précité. Des

investigations pharmacologiques effectuées au sein de notre laboratoire ont démontré que cette activité modérée était attribuable à la présence d'hydroxy- γ -isosanshool.⁶⁹

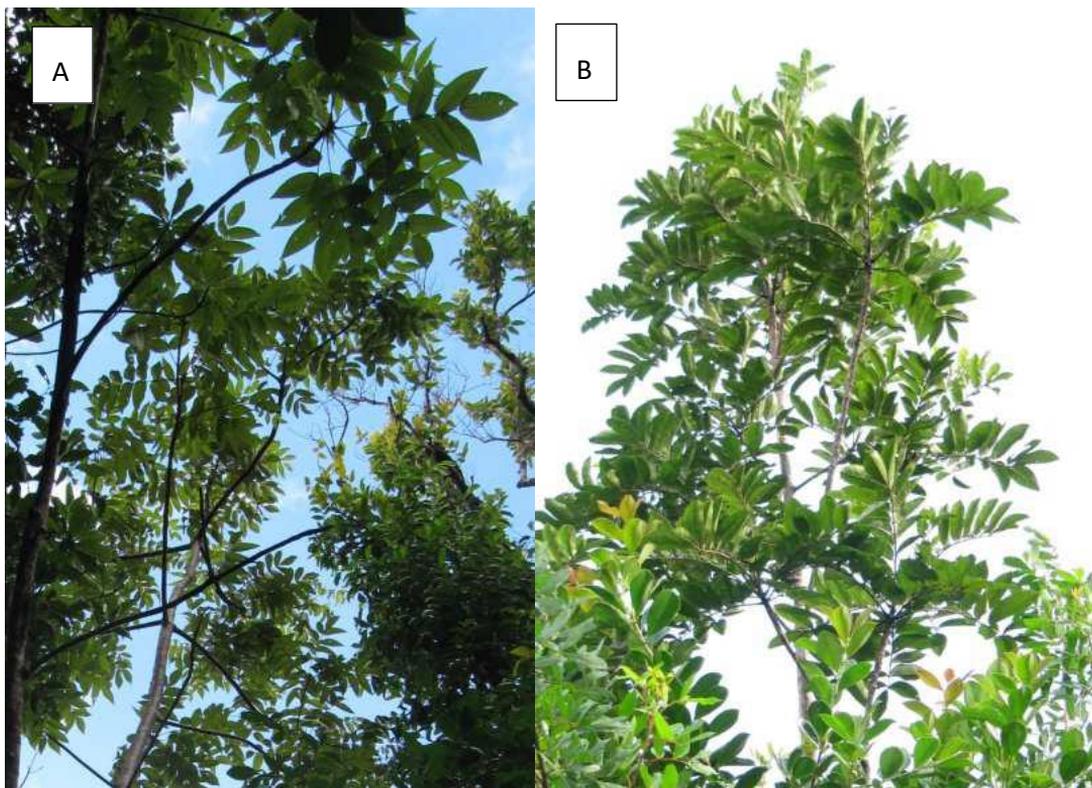


FIGURE 42 : Comparaison entre *Poupartia borbonica* (A) et *Zanthoxylum heterophyllum* (B). ©CBNM, M. Burst

3. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE ET CONTRIBUTION PERSONNELLE À L'ÉTUDE DU *P. BORBONICA*

Cette section résume brièvement les étapes jugées essentielles, présentées dans l'article « Antimalarial activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives isolated from the leaves of *Poupartia borbonica* », publié dans *Journal of Natural Products* (2017), 80, (6) : 1750-1757.

Tout d'abord, la composition de l'extrait méthanolique, qui présentait le meilleur rendement, a été investiguée. Le but était de mettre en évidence des flavonoïdes et acides phénols qui permettraient d'obtenir un profil de l'extrait (fig. 43), et donc d'identifier des principes dits « traceurs ». Les méthodes de détection de cette classe phytochimique sont bien établies et contrôlées au sein de notre laboratoire. Ainsi, chaque lot de *P. borbonica* reçu a pu être contrôlé, afin de vérifier si les principes traceurs détectés étaient systématiquement présents, et en proportions équivalentes. Le but étant de vérifier que certains paramètres ne modifiaient pas le profil phytochimique de l'extrait, tels que le moment et l'endroit de collecte ou les saisons de récolte.

Cette première partie d'étude nous a permis de mettre en évidence 5 composés connus : l'acide ellagique, l'isoquercitrin, le quercitrin, la quercétine, ainsi qu'un composé plus rare, présent sous forme d'ester inorganique, la 3'-O-hydroxysulfonylquercétine.

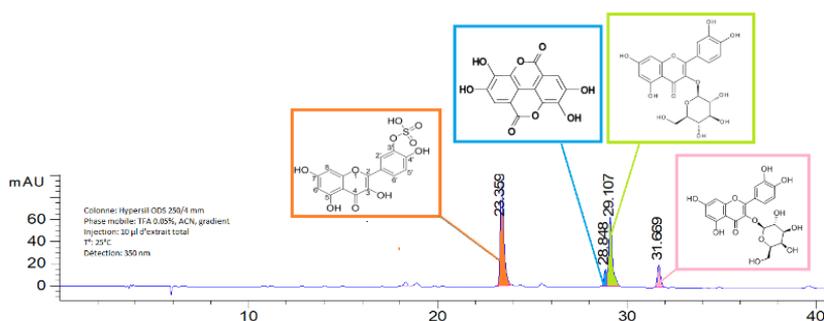


FIGURE 43 : Profil HPLC des flavonoïdes et acide phénol de l'extrait MeOH du *P. borbonica* (en orange : la 3'-O-hydroxysulfonylquercétine, en bleu : l'acide ellagique, en vert : l'isoquercitrin, en rose : l'hyperoside).

La 3'-O-hydroxysulfonylquercétine a été plus difficile à isoler, étant donné que l'évaporation de la phase mobile de la fraction d'intérêt entraînait la dégradation

du composé en quercétine. Une analyse par spectrométrie de masse directement réalisée sur la fraction d'extraction nous a indiqué que la molécule cible contenait probablement du soufre. Nous avons donc utilisé une extraction liquide-liquide afin d'éliminer l'acide de la phase mobile de la fraction et de la lyophiliser, en vue de minimiser les risques de dégradation. Ces étapes nous ont permis de l'identifier.

Ensuite, l'extrait à l'acétate d'éthyle a été utilisé pour le fractionnement bioguidé, pour plusieurs raisons. Il présente une très bonne activité, qui est comparable aux extraits à l'hexane et au dichlorométhane. Cependant, le profil obtenu par CCM de ces trois extraits était similaire (fig. 44), ce qui nous a poussé à sélectionner l'extrait qui était obtenu avec le meilleur rendement. La toxicité des solvants utilisés a également été un paramètre pris en compte.



FIGURE 44 : Profil CCM des extraits à l'acétate d'éthyle (1), au dichlorométhane (2), ainsi qu'à l'hexane (3) avec une phase mobile composée d'hexane, d'acétate d'éthyle et d'acide acétique (14/6/0.3). La révélation a été réalisée avec de la vanilline sulfurique.

Des fractionnements successifs ont conduit à l'obtention de plusieurs fractions, testées sur *Plasmodium falciparum* 3D7. Deux d'entre elles ont concentré l'activité antiplasmodiale, les fractions E et G (IC_{50} de 0.38 et de 0.72 $\mu\text{g/mL}$,

respectivement). Une méthode d'HPLC analytique a été ensuite mise en place afin d'analyser ces fractions (fig. 45). Des techniques de purification successives ont conduit à l'isolement de trois dérivés d'alkylcyclohexenones, les poupartones A, B et C, mises en évidence pour la première fois dans une plante.

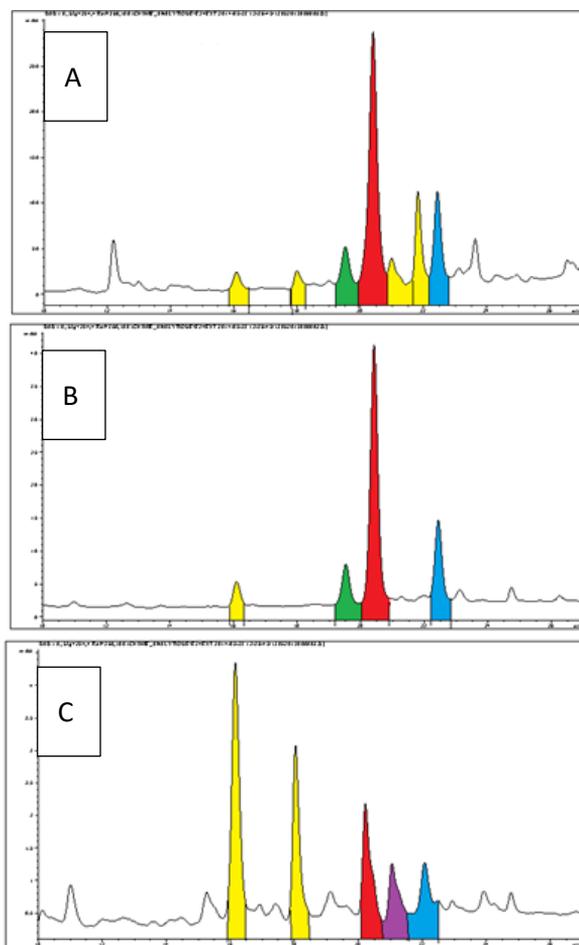


FIGURE 45 : Profil HPLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle (A), de la fraction E (B), ainsi que de la fraction G (C) (colonne RP select B, phase mobile composée de méthanol et d'acide formique 0.1%, mode gradient).

La détermination structurale de ces trois molécules a été obtenue grâce à des techniques de spectrométrie de masse haute résolution, ainsi que de résonance magnétique nucléaire. La configuration absolue de ces composés a été établie grâce à la modélisation moléculaire combinée au dichroïsme circulaire. La position de la double liaison présente sur les poupartones A et C a été définie grâce à une thiométhylation de celles-ci, ce qui a permis, par des techniques de spectrométrie de masse (EI-MS), d'obtenir un fragment majoritaire correspondant à la partie terminale de la chaîne et d'un groupement thiométhyle.

L'activité antiplasmodiale de ces poupartones a été évaluée et est prometteuse ($IC_{50} < 2\mu M$). La poupartone majoritaire, la poupartone A (en rouge sur le chromatogramme de la fig. 45) a été testée *in vivo* sur un modèle murin. Son potentiel antimalarique a été confirmé à une dose de 15 mg/kg/jour en réduisant la parasitémie de presque 70% au jour 7. Cependant, malgré la réduction drastique de la parasitémie, une certaine toxicité de la molécule a été détectée.

Des tests sur larve de zebrafish ont mis en évidence une atteinte cardiovasculaire, ainsi qu'une toxicité de contact.

Antimalarial Activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives Isolated from the Leaves of *Poupartia borbonica*

Allison Ledoux,^{*,†,‡,§} Alexis St-Gelais,^{†,§} Ewa Cieciewicz,[†] Olivia Jansen,[†] Annélie Bordignon,[†] Bertrand Illien,[‡] Nicolas Di Giovanni,^{||} Arnaud Marvilliers,[‡] Floriane Hoareau,[‡] Hélène Pendeville,[∇] Joëlle Quetin-Leclercq,[‡] and Michel Frédéric[†]

[†]Laboratory of Pharmacognosy, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liège, Avenue Hippocrate 15, 4000 Liège, Belgium

[‡]Pharmacognosy Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Avenue E. Mounier, B1 72.03, B-1200 Brussels, Belgium

[§]Laboratoire d'Analyses et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Université du Québec   Chicoutimi, 555 Boulevard de l'Université, Saguenay, Québec G7H 2B1, Canada

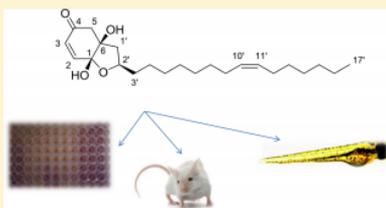
[‡]Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNA), University of Reunion Island, Avenue René Cassin 15, 97744 Saint-Denis, La Réunion France

^{||}Laboratoire de Chimie Analytique Organique et Biologique (OBiAChem), University of Liège, Allée de la Chimie 3, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgium

[∇]Plateforme Zebrafish Facility and Transgenics, GIGA, University of Liège, Avenue Hippocrate 15, 4000 Liège, Belgium

Supporting Information

ABSTRACT: Bioactivity-guided fractionation of the ethyl acetate extract of the leaves of *Poupartia borbonica* led to the isolation of three new alkyl cyclohexenone derivatives 1–3, named Poupartone A–C. The structures of the new compounds were elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopic data analysis and MS, whereas calculated and experimental ECD spectra were used to define the absolute configurations. These compounds were active against 3D7 and W2 *Plasmodium falciparum* strains with IC_{50} values between 0.55 and 1.81 μ M. In vitro cytotoxicity against WI38 human fibroblasts and the human cervical cancer cell line HeLa (WST-1 assay) showed that these compounds were also cytotoxic, but no hemolytic activity was observed for the extract and pure compounds. An in vivo antimalarial assay was performed on the major cyclohexenone using *P. berghei*-infected mice at a dose of 15 mg/kg/day ip. The assay revealed growth inhibition of 59.1 and 69.5% at days 5 and 7 postinfection, respectively, although some toxicity was observed. Zebrafish larvae were used as a model to determine the type of toxicity, and the results showed cardiac toxicity. The methanol extract was also studied, and it displayed moderate antiparasmodial properties in vitro. This extract contained the known flavonoids, quercetin, 3'-O-hydroxysulfonylquercetin, quercitrin, and isoquercitrin as well as ellagic acid, which showed high to low activity against the 3D7 *P. falciparum* strain.



3.1.1 MATERIALS AND METHODS

GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

The UV spectra were recorded in MeOH on a Hitachi U-2910 spectrophotometer. The ECD spectra were recorded in MeOH at 25 C using a Jasco J-810 spectrophotometer. The FT-IR spectra were measured on a Frontier Perkin Elmer spectrophotometer equipped with an ATR module. Proton (128 scans), ¹³C APT (8k scans), COSY (16 scans), edited HSQC (16 scans), HMBC (32 scans), NOESY (32 scans) and TOCSY (32 scans) NMR spectra were recorded in CD₃CN and/or MeOH-d₄ on a Bruker AVANCE I 500 MHz spectrometer equipped with a

cryoprobe. 2D experiments were performed using standard Bruker parameters.^{***} Chemical shifts were reported in δ values (ppm) relative to internal TMS and data were processed using Topspin 4.0 software (Bruker, France). LC/MS was performed on a Thermo Scientific LTQ orbitrap XL mass spectrometer with ESI source in positive mode with an RP select B LiChrospher 60 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) column. All solvents used were analytical grade (Merck, Hohenbrunn, Germany). A Varian ProStar chromatography system with diode array detector was employed to profile the extracts. A Varian ProStar chromatography equipped with a Büchi fraction collector C-660 unit was used to accomplish the preparative isolation. The following columns were employed: Hypersil C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), PFP Luna (250 mm x 4.6 mm, 10 μ m), RP select B LiChrospher 60 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m). GC-MS analysis of compounds 1 and 3 was performed with a Jeol JMS-T100GCV (EI-TOFMS, positive ion mode) apparatus fitted with an Rtx-5 capillary column (Restek - 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane), using the same conditions described by Mansour et al.⁸⁴

Analytical TLC was performed on precoated Si gel 60 F254 (Merck, Hohenbrunn, Germany) plates. After development (n-hexane/EtOAc/HOAc, 14:6:0.3), the dried plates were observed under 254 nm and sprayed with sulfuric vanillin and heated for 15 min at 110°C to analyze the EtOAc extract and isolated compounds. TLC plates for the MeOH extract were developed with EtOAc/formic acid/HOAc/H₂O (100:11:11:26) and sprayed with NP-PEG [Natural Product Reagent (1% diphenylboryloxyethylamine in MeOH) and polyethylene glycol 4000 (5% polyethylene glycol 4000 in EtOH)]. The dried plates were examined under ultraviolet light (366 nm).

○ PLANT MATERIAL

The male plants were collected on Reunion Island and identified by H. Thomas (Parc National de La Réunion). Voucher specimens (n°RUN 028F, TCN-P022F) were deposited in the Herbarium of the University of Reunion Island. The leaves were air-dried at room temperature with no direct sunlight and then pulverized using an electrical grinder. Extracts were prepared with 5 g of powdered dried material and then macerated three times in 50 mL of solvent (MeOH, EtOAc, *n*-

^{***} Number of scans and software name were added as a supplement of the original paper.

hexane, or CH₂Cl₂) for 30 min with constant shaking at room temperature. The filtrates were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure at 40°C.

The leaves of *P. borbonica* were air-dried (200 g), pulverized, and extracted by maceration with EtOAc (2 L, 30 minutes × 3) at room temperature. After filtration, the solvent was evaporated at low temperature (< 40°C) under pressure. The resulting dried extract (1.0 g) was defatted using a two-phase solvent system, *n*-hexane/MeOH/CH₃CN (6:0.5:3.5), as described by Roumy et al.⁸⁵ The biologically active lower phase was dispersed in EtOAc and subjected to open silica column chromatography, eluting with a gradient of EtOAc and CH₂Cl₂ from 5:95 to 100:0. A total of 67 fractions were collected and analyzed by analytical TLC and grouped into 8 subfractions (A-H) on the basis of the TLC profiles. The biologically active fractions E and G (53 mg) were grouped based on their HPLC profiles and subjected to a preparative HPLC column (30 cm x 2.5 cm) using a LichroPrep RP-18 (25-40 μm, Merck) support. The flow rate was 30 mL/min with a binary solvent system of formic acid 0.1% in H₂O and MeOH (40:60 to 0:100 v/v in 30 min). Compounds **1-3** were eluted between the 15th and 25th minute. Further purification of compound **3** was performed by preparative TLC eluted with *n*-hexane/EtOAc/HOAc (14:6:0.3).

○ ISOLATION OF THE PHENOLIC COMPOUNDS IN THE MEOH EXTRACT OF *P. BORBONICA* LEAVES

Leaves of *P. borbonica* were air-dried (100 g), pulverized, and extracted by maceration with MeOH (1L, 30 minutes × 3) at room temperature. After filtration, the solvent was evaporated at a temperature below 40°C under pressure. The resulting dried (18 g) extract was fractionated by preparative HPLC with a LichroPrep RP-18 (25-40 μm, Merck, Hohenbrunn, Germany) support column using a gradient of trifluoroacetic acid (0.05%) and CH₃CN (100:0 to 60:40 v/v). Fractions containing 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin were washed 6 times with 30 mL of Et₂O to remove trifluoroacetic acid. The same procedure was performed without TFA to obtain ellagic acid.

○ *IN VITRO* ANTIPLASMODIAL ACTIVITY

Performed as previously described (3.2.2 pages 54).

○ IN VITRO CYTOTOXIC ACTIVITY

Assays were performed on HeLa cells to evaluate the cytotoxicity potential of crude extracts and isolated compounds. Compounds were tested in 96-well microplates using the tetrazolium salt WST-1 (Roche Diagnostics Belgium, Vilvoorde, Belgium) colorimetric assay based on the cleavage of the reagent by mitochondrial succinate-tetrazolium reductase in living cells. Cells (6000) were seeded per well in 200 μ L of medium supplemented with adequate concentrations of the tested drugs. After 48 h of incubation, 10 μ L of WST-1 was added to each well. After 30 min at 37°C, the plates were shaken, and absorbance values were recorded at 450 nm. The absorbance values were expressed in percentage terms compared to untreated control cells. IC₅₀ values were calculated from graphs. The HeLa cells were obtained from the Laboratory of Medical Chemistry, GIGA, ULg.

○ SELECTIVITY INDEX

The selectivity index was calculated as the ratio between the cytotoxic activity on WI38 cells (IC₅₀) and 3D7 or W2 antiparasitic activities (IC₅₀).

○ IN VITRO HEMOLYTIC ACTIVITY

Hemolysis assays were performed according to a reported procedure⁸⁶ with EtOAc crude extract and isolated compounds. A red blood cell suspension (A+, 10% in PBS (v/v)) was incubated with extract or isolated compounds in triplicate. The final concentrations were 100 μ g/mL for the extract and 10 μ g/mL for each isolated compound (DMSO <1%). After agitation at room temperature for one hour, the mixtures were centrifuged for 5 min at 2,000 rpm, and 150 μ L of each supernatant was transferred to a 96-microwell plate to measure the absorbance (OD) at 550 nm with a microplate reader. The positive control was Triton X-100 1% (v/v) (corresponding to 100% red blood cell lysis) and PBS as the negative control (corresponding to 0% red blood cell lysis). The percentage of red blood cell lysis (H) was calculated as follows: $H = (OD_{550 \text{ nm sample}} - OD_{550 \text{ nm PBS}}) / (OD_{550 \text{ nm Triton X-100 1\% (v/v)}} - OD_{550 \text{ nm PBS}})$.

○ CYTOTOXIC ACTIVITY ON THE ZEBRAFISH LARVA

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were maintained while fulfilling the criteria of the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals at the University of Liège.

They were maintained at 28°C on a 14 h day/10 h night period, and fertilized eggs were collected, washed with sterile water and placed in Petri dishes. Larvae were collected, and chorions were removed. Tests were performed in two steps; the first one to determine the range of concentrations to be used to determine LC₅₀ during the second step, by a narrower geometric series, as described by Shaukat et al.⁸⁷ Geometric series were performed in duplicate. First, logarithmic concentrations were tested (10 to 0.001 µg/mL). Second, the range of tested concentrations was narrowed and included only between 10 and 1 µg/mL. Compound **1** was in DMSO solution and was diluted with the medium used for zebrafish. The DMSO final higher concentration was 0.4%. Twenty-five embryos were used per condition in a 6-well plate. Each well contained 5 mL of the treatment dose, which was replaced once daily for three days. The embryos were observed each day until 72 hfp. Twenty-five embryos were used as control and 25 others were used to control the solvent (DMSO, 0.4%).

○ ANTIPLASMODIAL ACTIVITY TESTING *IN VIVO*

The present study was approved by the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals at the University of Liège (no. 721) and was designed according to internationally recognized guidelines. Female Swiss mice (10 weeks old, 25 ± 2 g), obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France), were infested by the murine parasite *Plasmodium berghei* NK173, following the protocol described by Frédérick et al.⁸⁸ Groups of five mice were formed randomly. Parasitized red blood cells (2 × 10⁷) were injected into each mouse by i.p. injection. Compound **1** was tested using a protocol based on the four-day suppressive test of Peters,⁸⁹ as recommended by the WHO.⁹⁰ The treatment dose (15 mg/kg i.p., dissolved in 7% Tween 80 and 3% EtOH in sterile water) was given four hours after infection (day 0) and was repeated once daily for the next three days. The parasitemia was evaluated by microscope using thin blood smears made from mouse-tail blood and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium) and determined by counting at least 500 erythrocytes. The vehicle solution was used as a negative control (7% Tween 80 and 3% EtOH in sterile water), and chloroquine was used as the positive control, at 4 mg/kg i.p. with the same vehicle. The percentage of inhibition of parasite growth was calculated by comparison of the parasitemia counted for the test group with the parasitemia of the negative control group at days 5 and 7.

○ COMPUTATIONAL METHODS

The quantum chemical calculations were performed using density functional theory (DFT). The molecular geometries were optimized by the DFT/ ω B97XD/6-31+G(d,p) method. Chemical shifts were calculated for the obtained geometries by DFT/TPSSH/6-311+G (2d,p) and re-optimized taking into account the solvent by TDA/RI-B2GP-PLYP/def2-TZVPP/SMD. ECD spectra were calculated from the spectra of individual conformers according to their contribution calculated by Boltzmann weighting.

3.1.2 RESULTS AND DISCUSSION

Different extraction solvents of dried and pulverized *P. borbonica* leaves were tested to select the starting point of the bioassay-guided fractionation. The resulting extracts were tested against the *P. falciparum* 3D7 strain (Table 2).

Extraction solvent	Yield (% m/m)	IC ₅₀ (μ g/mL) n = 3
EtOAc	1.66	2.43 \pm 0.5
<i>n</i> -hexane	1.13	3.28 \pm 0.2
CH₂Cl₂	1.05	3.25 \pm 0.7
MeOH	19.04	16.23 \pm 4.3

Table 2 : Antiplasmodial Activity of the extracts of *P. borbonica* Leaves against *P. falciparum*.

First, the **methanol extract**, obtained with a much higher yield, was phytochemically investigated to determine its major compounds. Five known phenolic compounds were isolated: ellagic acid and the four flavonoids, isoquercitrin, quercitrin, 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin, and quercetin, which showed high to low activity against the *P. falciparum* strain. The structures of these known compounds, except 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin, were elucidated by comparison of their ¹H NMR and UV spectra and HPLC retention behaviors against standard compounds.

The **major compound** of this extract was 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin, a rare flavonoid inorganic ester. It was isolated by preparative HPLC using a mobile phase containing TFA (0.05%). When the solvent of the fraction was removed under vacuum in a rotary evaporator at a temperature < 30°C, degradation of

the 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin to quercetin was observed based on the HPLC retention time (fig. 46).

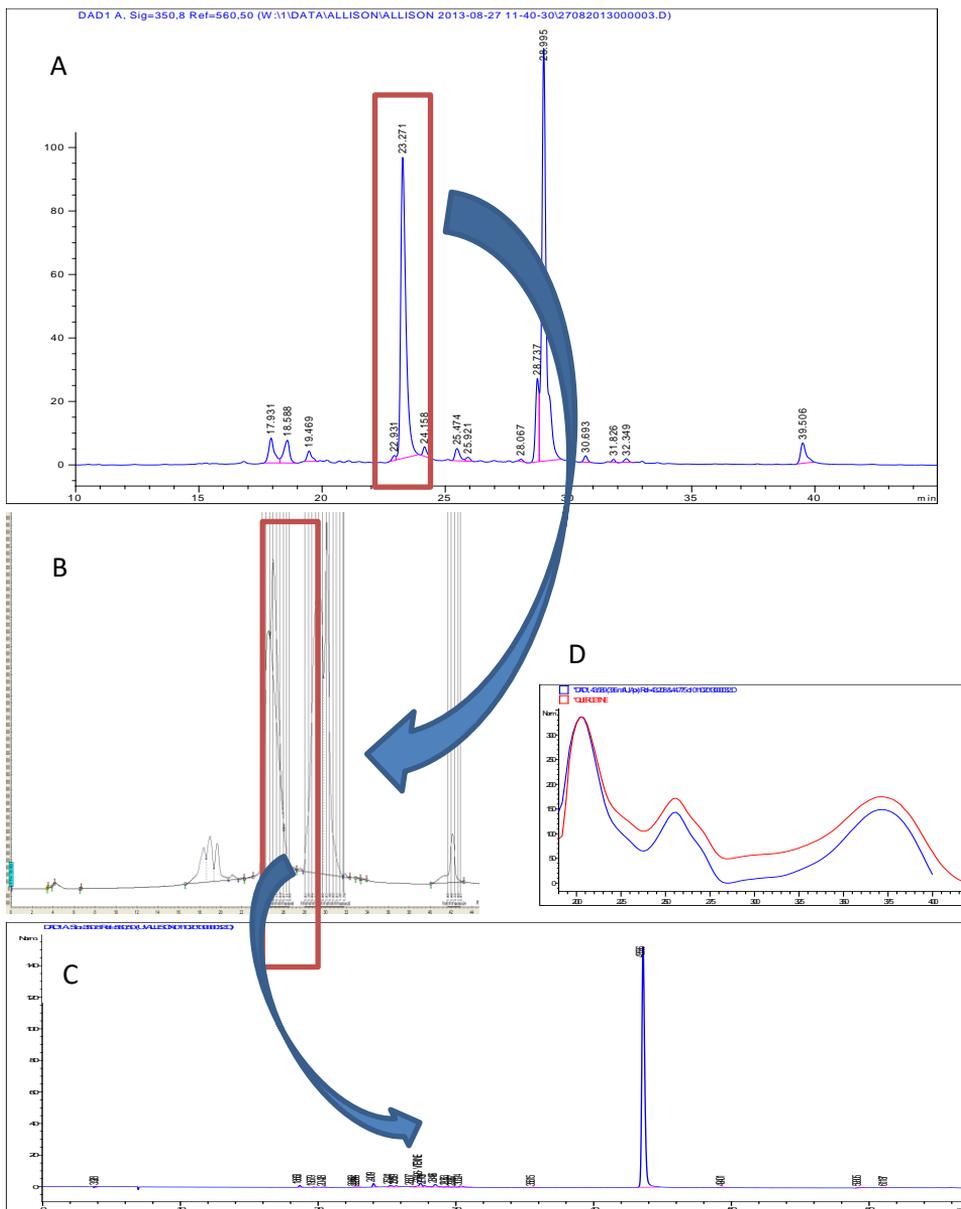


FIGURE 46 : Chromatograms of MeOH extract (A) containing the 3'-O-hydroxysulfonylquercetin (framed in red) submitted to prep HPLC (B) generating Quercetin after removing TFA under vacuum (C) as observed compared to reference (D).^{†††}

^{†††} This figure is added as a supplement of the original paper.

The acid of the mobile phase was then changed to HOAc (0.1%) and eventually to formic acid (0.1%). However, this mobile phase modification did not preclude hydrolysis of the hydroxysulfonyl ester. To avoid this problem, the TFA was removed from the fraction directly by liquid/liquid extraction using Et₂O, and the aqueous fraction was then lyophilized. The instability of these types of compounds is the main reason why they are not often isolated. However, sulfate conjugation of flavonoid compounds has been widely observed in many plant families⁹¹ to facilitate their storage.⁹² Hydroxysulfonylquercetin compounds have been reported in the Asteraceae genus in the species *Oenanthe crocata*, *Flaveria bidentis*, and *Flaveria choloraefolia*,^{91,93} as well as in *Cuphea carthagenensis* (Lythraceae).⁹⁴

The structure of 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin (fig. 47) was established by comparison with spectra recorded for a quercetin standard by mass spectrometry, ¹H NMR, and UV data analysis. 3'-*O*-Hydroxysulfonylquercetin was assigned the formula C₁₅H₁₀O₁₀S from the [M+H]⁺ ion at *m/z* = 381.5998 in the ESI-HR-TOF-MS data (calc. for C₁₅H₁₀O₁₀S 381.9995). The presence of an ion at *m/z* 383.5998 (5.05%) confirmed the presence of a sulfur atom. UV data analysis confirmed the presence of an auxochrome group and a modification of the quercetin B-ring. Similar UV spectra have been described by O'Leary and coworkers.⁹⁵ The position of the hydroxysulfonyl group was deduced from the chemical shift of H-2' compared to a quercetin standard.

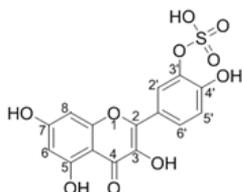


FIGURE 47 : structure of 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin

Quercetin is a natural flavonoid found in a wide range of plants and is known to have multiple therapeutic properties, such as anticancer, anti-inflammatory, anti-obesity, and antimicrobial activities, as reviewed by D'andrea⁹⁶ and by Gupta et al.⁹⁷ Even though data concerning the antiplasmodial activity of quercetin have shown that this flavonol inhibits the growth of different *P. falciparum* strains,⁹⁷ its clinical application may be limited because of its low

solubility in aqueous media. On the other hand, it has been shown that increasing the solubility of quercetin by preparing aminoalkylated analogues improved its antiplasmodial activity.⁹⁸ The presence of a sulfate group on quercetin may act similarly by increasing solubility.

The antiplasmodial activities of both 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin and quercetin were evaluated on the *P. falciparum* 3D7 strain. The IC₅₀ value of quercetin was assessed in this study at 17.54 ± 3.9 μM, in agreement with reported data.⁹⁹ The 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin was found to be less active, with an IC₅₀ value of 40.58 ± 8.1 μM. This decrease in activity, despite the higher solubility compared to quercetin, may be due to the steric bulk of the B-ring. In contrast, an aminoalkylated group added to the A-ring of quercetin increased its antiplasmodial activity.⁹⁸ Isoquercitrin and ellagic acid, whose antiplasmodial activities corresponded to reported data,^{99,100} were also tested. Their IC₅₀ values were calculated to be 42.34 ± 5.4 μM and 2.6 ± 0.98 μM, respectively.

The crude EtOAc extract was found to exhibit the highest activities. Fractionation of the EtOAc extract on an open column led to eight fractions, A to H (fig. 48).^{***} Evaluation of the antiplasmodial activity of these fractions showed that fractions E and G were the most active, with IC₅₀ values of 0.38 and 0.72 μg/mL, respectively.

Purification of fractions E and G using preparative HPLC (fig. 49)^{§§§} afforded three compounds **1-3**, (fig. 50) which were identified using NMR and LC-MS analysis. Their IR spectra showed a broad OH absorption band at 3383 cm⁻¹ and a strong absorption band of a conjugated carbonyl moiety at 1667 cm⁻¹. The three compounds were not separable by TLC but were separable by reverse-phase HPLC, even though the difference in retention times between **1** and **2** was small.

*** This figure is added as a supplement of the original paper.

§§§ This figure is added as a supplement of the original paper.

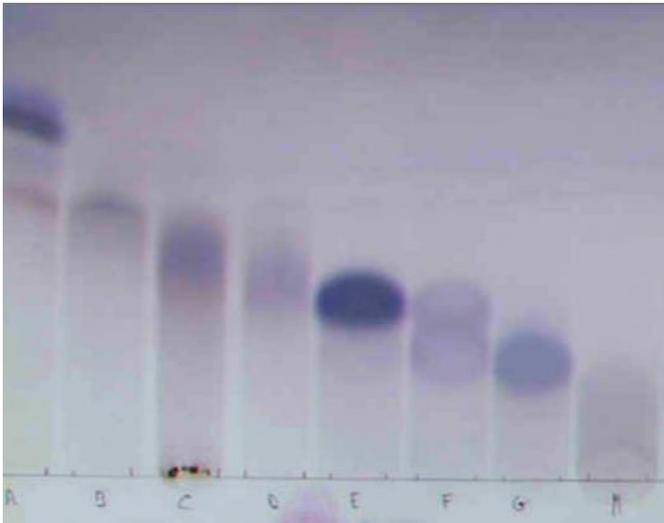


FIGURE 48 : TLC of the eight fractionations obtained after the fractionation of the EtOAc extract, eluted with n-hexane/EtOAc/HOAc (14:6:0.3) and sprayed with vanillin-sulfuric acid reagent

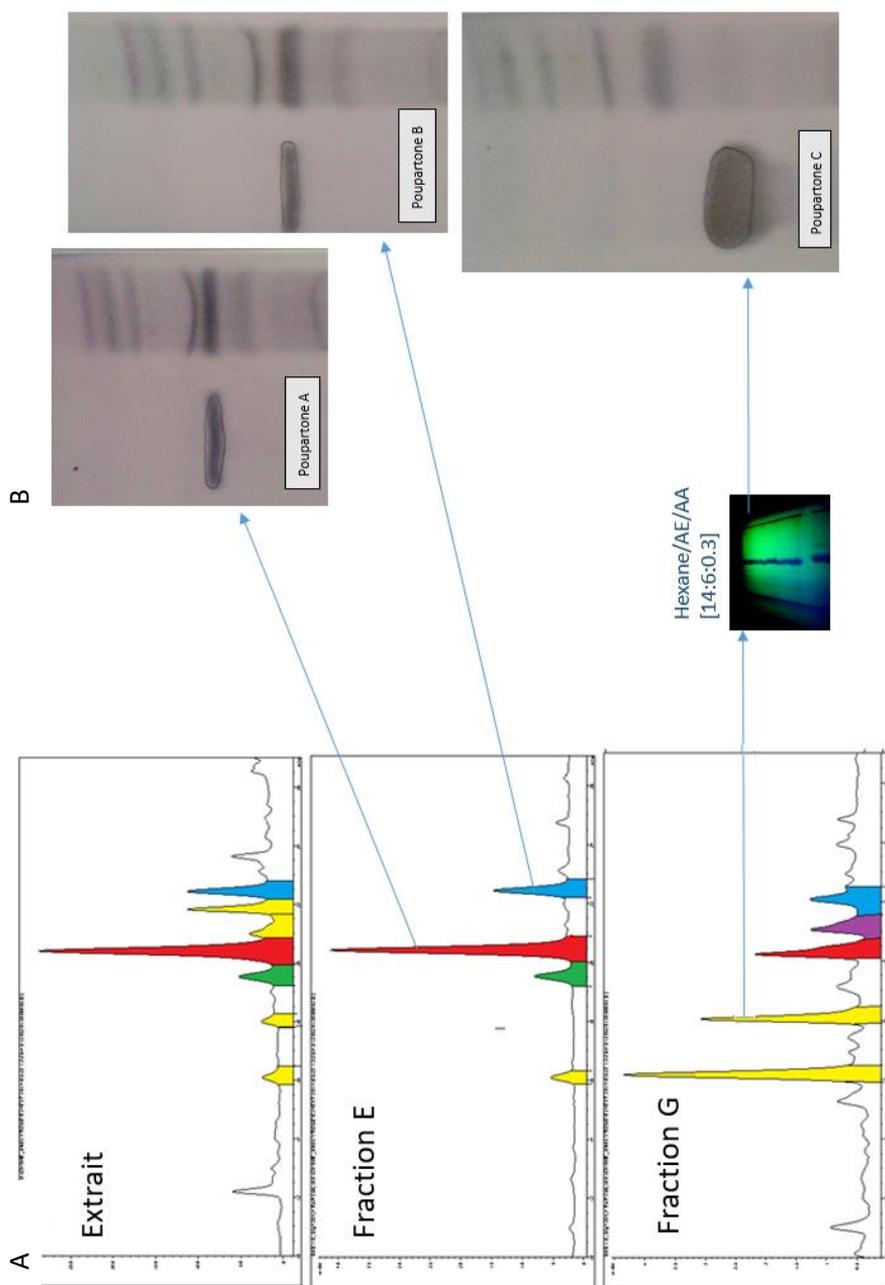


FIGURE 49 : HPLC profiles of EtOAc extract, fractions E and G (A), eluted with formic acid 0.1% in H₂O and MeOH (40: 60 to 0:100 in 30 min) on a RP-18 support, and TLC profiles of poupartone A, B and C after the purification of fractions E and G (B), eluted with n-hexane/EtOAc/HOAc (14:6:0.3) and sprayed with vanillin-sulfuric acid reagent.

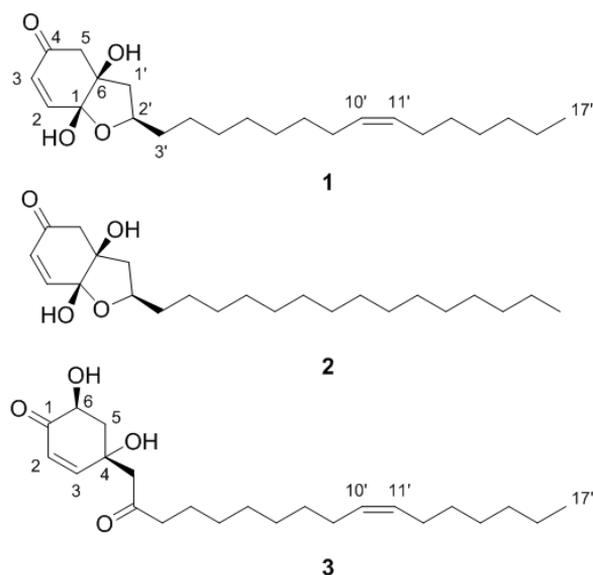


FIGURE 50 : Structures of Compounds 1-3

Compound **1** was assigned the formula $C_{23}H_{38}O_4$ from the $[M+H]^+$ ion at $m/z = 379.2845$ by HR-ESI-TOF-MS analysis (calc. for $C_{23}H_{39}O_4 = 379.2848$). ^{13}C APT NMR and edited-HSQC experiments indicated the presence of one methyl, five methine (including four olefinic), 14 methylene, and three carbons with no attached protons, including a carbonyl function. Examination of the COSY spectrum showed that most of the methylenes were involved in an alkyl chain bearing one of the two olefinic functionalities and terminated by Me-17'. The other end of this spin system consisted of methylene H-1', methine H-2', and methylene H-3'. Both H-1' and H-5 correlated with the deshielded C-1 and C-6 resonances. The former had a chemical shift that was characteristic of a hemiketal. Additionally, the deshielded C-2' resonance suggested that it was bonded to an oxygen. Since only two protons of hydroxy groups were visible in the 1H NMR spectra and neither correlated to C-2' in the HMBC spectrum, it was deduced that C-1 and C-2' were linked through an ether bond, with C-1 bearing an additional hydroxy group, in accordance with its chemical shift. The more shielded C-6 was thus connected to both C-1' and C-5 and to a hydroxy group. This was in accordance with the observed HMBC cross-peaks of both hydroxy

protons and C-6. The 1-OH proton also correlated with C-2, whose proton was part of an olefinic spin system that included H-3 as per the COSY spectrum. H-2 further exhibited an HMBC cross-peak with C-4, while H-3 correlated with C-5, suggesting a six-membered ring comprising C-1 through C-6. The remaining HMBC cross-peaks were consistent with the proposed bicyclic structure. TOCSY experiments with increasing mixing times indicated that the acyclic olefinic group was closer to the terminal methyl group than the bicyclic functionality. Its position was inferred from the literature, as all known Anacardiaceae cyclohexenones possess $\Delta^{10(11)}$ double bonds. This position was confirmed by an intense ion at m/z 145 observed in the GC-EI-MS spectrum of an α,β -bis-(methylthio)-derivative of compound **1** (fig. 51) ****, obtained by a DMDS derivatization procedure.

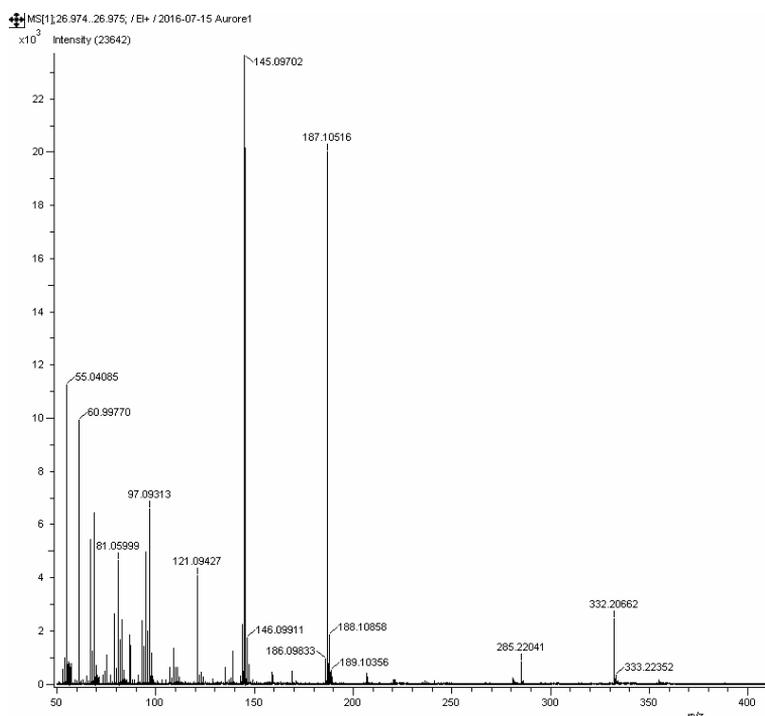


FIGURE 51 : GC-EI-MS spectrum obtained after the DMDS derivatization procedure on poupartone A.

**** This figure is added as a supplement of the original paper.

The (Z) configuration of the $\Delta^{10(11)}$ olefinic moiety was confirmed by comparison of the chemical shifts of C-9' and C-12' with literature values.¹⁰¹ Thus, the structure of compound **1** was defined as (2*R*,3*aR*,7*aR*)-2-[(*Z*)-pentadec-8-en-1-yl]-3*a*,7*a*-dihydroxy-2,3,3*a*,7*a*-tetrahydrobenzofuran-5(4*H*)-one, and named **poupartone A**.

The NMR spectra of compound **2** indicated that it featured the same fused ring structure as **1** with a saturated aliphatic chain, while its HR-ESI-TOF-MS sodium adduct ion at $m/z = 403.2812$ indicated the presence of two more protons for a formula of $C_{23}H_{40}O_4$ (calc. for $[C_{23}H_{40}O_4Na]^+$ 403.2824). The broad multiplets of the aliphatic methylene protons integrated for two more protons than in compound **1**. Thus, the structure of compound **2** was assigned as (2*R*,3*aR*,7*aR*)-2-pentadecyl-3*a*,7*a*-dihydroxy-2,3,3*a*,7*a*- tetrahydrobenzofuran-5(4*H*)-one, and named **poupartone B**.

Compound **3** has the same molecular formula as **1**, given its HR-ESI-TOF-MS ion at $m/z = 379.2843$. However, while the aliphatic chain was the same as in compound **1**, its spectra differed from the two former compounds with respect to the cyclic part of the molecule. A two-proton spin system of the olefinic moiety and a three-proton spin system comprising H-6 and H_z-5 were evident in the ¹H NMR spectrum. The H-6 resonance was deshielded, indicating C-6 substitution by a hydroxy group. Both H-5 and H-3 showed HMBC cross-peaks with the C-1 carbonyl. Additional HMBC cross peaks, including H-2/C-4 and H-6/C-4, completed a six-membered ring with the deshielded C-4 carrying the aliphatic chain and an additional hydroxy group. H-1' exhibited HMBC cross-peaks with both C-4 and the C-2' carbonyl carbon. A spin system starting from H-3' constituted the remainder of the aliphatic chain. Thus, compound **3** was found to be a 2'-oxo analogue of 4,6-dihydroxy-4-[(10'*Z*)-heptadecenyl]cyclohexenone,¹⁰¹ and its structure was defined as (4*S*,6*R*)-4,6-dihydroxy-4-[(*Z*)-2-oxoheptadec-10-en-yl]-cyclohexen-2-enone, and named **poupartone C**. The key correlations observed in the HMBC (↘) and COSY (↔) NMR spectra of compounds **1-3** are shown in fig. 52.

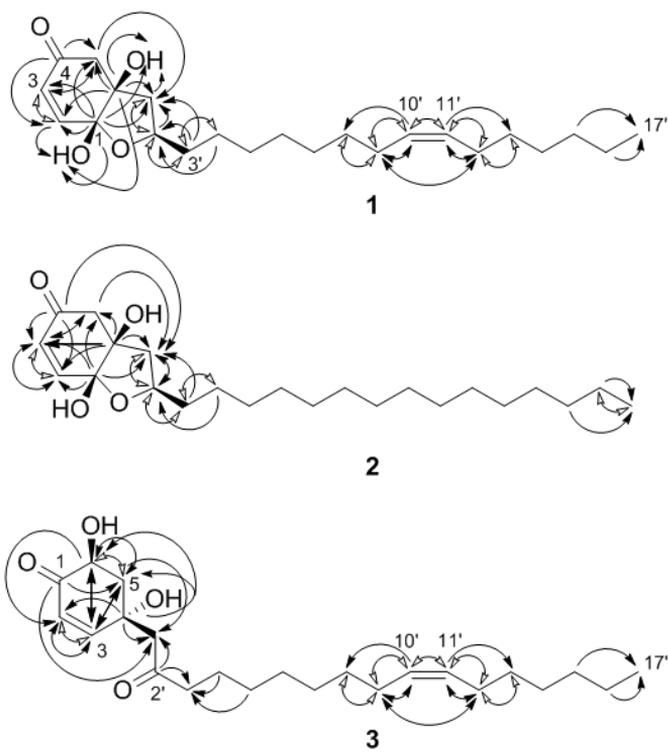


FIGURE 52 : Key correlations observed in the HMBC () and COSY () NMR spectra of compounds 1-3

TABLE 3 : NMR Data of Compound 1 (δ in ppm, Multiplicity (J in Hz) and HMBC correlations).

Compound 1			
Position	^{13}C , type	^1H (J in Hz)	HMBC
1	100.5, C		3, 5, 6, 1'
2	147.4, CH	6.65 (d, $J = 10.2$)	1
3	127.5, CH	5.83 (dd, $J = 10.2, 0.7$)	5
4	198.3, C		2, 5
5	48.4, CH ₂	2.70 (dd, $J = 15.9, 0.7$); 2.57 (d, $J = 15.9$)	1', 3, 6
6	79.9, C		1, 2, 5, 1'
1-OH		4.65 (s)	
6-OH		3.72 (s)	
1'	44.3, CH ₂	2.14 (dd, $J = 13.2, 6.7$); 1.62 (dd, $J = 13.2, 8.5$)	6, 5
2'	77.6, CH	4.28 (ddd, $J = 13.2, 8.5, 6.7$)	1', 3'
3'	37.0, CH ₂	1.50 (m); 1.40 (m)	1', 2'
4'	26.6, CH ₂	1.25-1.35 (br. m)	3'
5'-8'	30.1-30.7, CH ₂	1.25-1.35 (br. m)	4', 10', 11'
9'	28.03, CH ₂	2.02 (m)	6', 7', 8', 10', 11'
10'	131.03, CH	5.35 (m)	7', 8', 9', 11'
11'	130.98, CH	5.35 (m)	7', 8', 9', 10', 12'
12'	27.98, CH ₂	2.02 (m)	10', 11'
13'-14'	30.65, 29.9, CH ₂	1.25-1.35 (m)	12', 15', 16'
15'	32.7, CH ₂	1.25-1.35 (m)	17'
16'	23.6, CH ₂	1.25-1.35 (br. m)	17'
17'	14.6, CH ₃	0.88 (t, $J = 7.3$)	

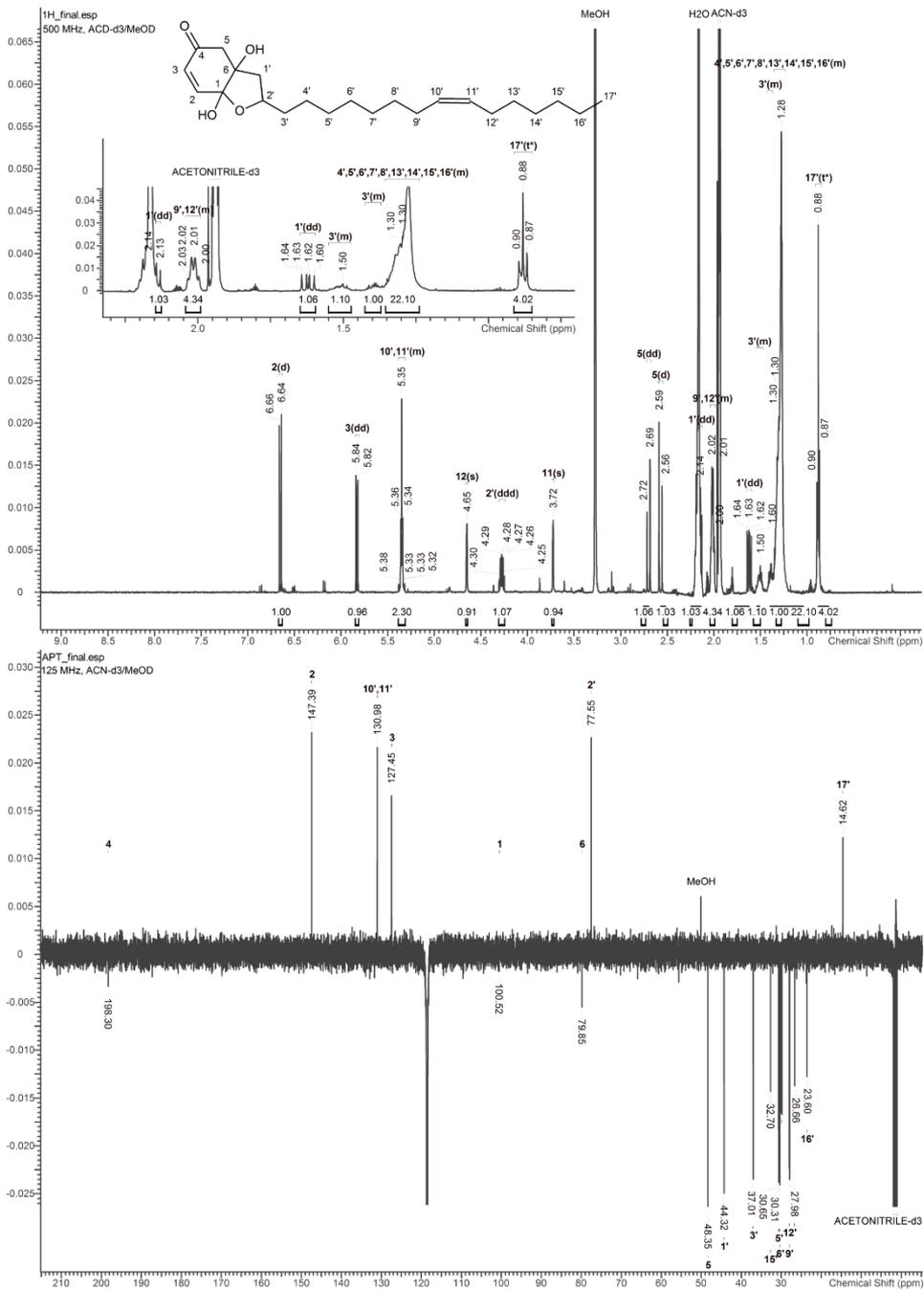


FIGURE 53 : ¹H NMR spectrum and ¹³C APT spectrum of poupartone A (compound 1).

TABLE 4 : NMR Data of Compound 2 (δ in ppm, Multiplicity (J in Hz) and HMBC correlations).

Compound 2			
Position	^{13}C , type	^1H (J in Hz)	HMBC
1	100.4, C		3, 5, 1'
2	147.3, CH	6.65 (d, J = 10.1)	1
3	127.3, CH	5.83 (dd, J = 10.1, 0.4)	5
4	198.2, C		2, 5
5	48.2, CH ₂	2.70 (dd, J = 16.1, 0.4); 2.57 (d, J = 16.1)	3, 1'
6	79.7, C		
1'	44.2, CH ₂	2.15 (dd, J = 13.1, 6.7); 1.62 (dd, J = 13.1, 8.4)	5
2'	77.4, CH	4.28 (ddd, J = 13.1, 8.4, 6.7)	2, 5, 1', 3'
3'	36.9, CH ₂	1.51 (m); 1.39 (m)	1'
4'	26.5, CH ₂	1.24-1.34 (br. m)	2', 5', 6', 7'
5'-8'	30.44, 30.43 (2x), 30.41 (2x), 30.33 (2x), 30.32 (2x), 30.1, CH ₂	1.24-1.34 (br. m)	4'
9'		1.24-1.34 (br. m)	6', 7', 8', 10', 11'
10'		1.24-1.34 (br. m)	7', 8', 9', 11'
11'		1.24-1.34 (br. m)	7', 8', 9', 10', 12'
12'		1.24-1.34 (br. m)	10', 11'
13'-14'		1.24-1.34 (br. m)	12', 15', 16'
15'	32.7 CH ₂	1.24-1.34 (br. m)	17'
16'	23.5 CH ₂	1.24-1.34 (br. m)	
17'	14.5, CH ₃	0.88 (t, J = 7.1)	

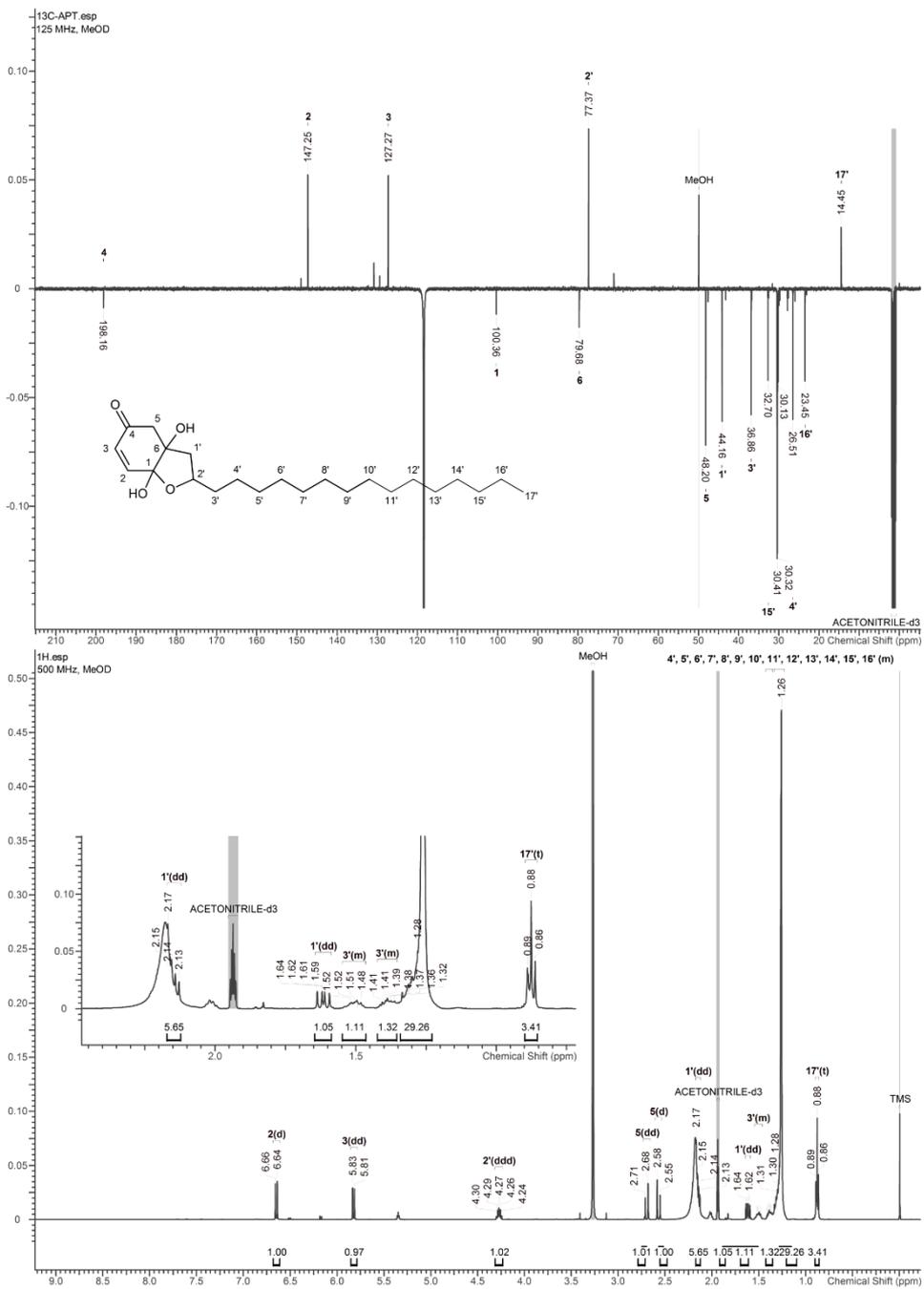


FIGURE 54 : ¹H NMR spectrum and ¹³C APT spectrum of poupartone B (compound 2).

TABLE 5 : NMR Data of Compound 3 (δ in ppm, Multiplicity (J in Hz) and HMBC correlations).

Compound 3			
Position	^{13}C , type	^1H (J in Hz)	HMBC
1	200.7, C		3, 5, 1'
2	126.3, CH	5.95 (dd, J = 10.2, 2.1)	3, 6
3	154.2, CH	6.90 (dt, J = 10.2, 2.0)	5, 1
4	75.8, C		
5	44.7, CH ₂	2.50 (ddd, J = 12.9, 4.9, 2.0); 1.80 (dd, J = 12.9, 9.1)	3
6	65.9, CH	4.51 (ddt, J = 9.1, 4.9, 2.0)	2, 5
1'	48.7, CH ₂	2.64 (d, J = 14.7); 2.59 (d, J = 14.7)	6, 3'
2'	210.2, C		1', 3'
3'	45.6, CH ₂	2.47 (d, J = 8.5)	1', 4', 5', 6'
4'	24.1, CH ₂	1.47 (m)	3'
5'-8'	30.5, 30.23, 30.21, 30.17, 30.0, 29.8, CH ₂	1.23-1.34 (br. m)	10', 11'
9'	27.8, CH ₂	2.02 (m)	10', 11', 12'
10'	130.84, CH	5.35 (m)	11'
11'	130.79, CH	5.35 (m)	10'
12'	27.6, CH ₂	2.02 (m)	10', 11', 13'
13'-14'		1.23-1.34 (br. m)	12', 15', 16'
15'	32.8, CH ₂	1.23-1.34 (br. m)	17'
16'	23.1, CH ₂	1.23-1.34 (br. m)	17'
17'	14.3, CH ₃	0.89 (t, J = 7.4)	

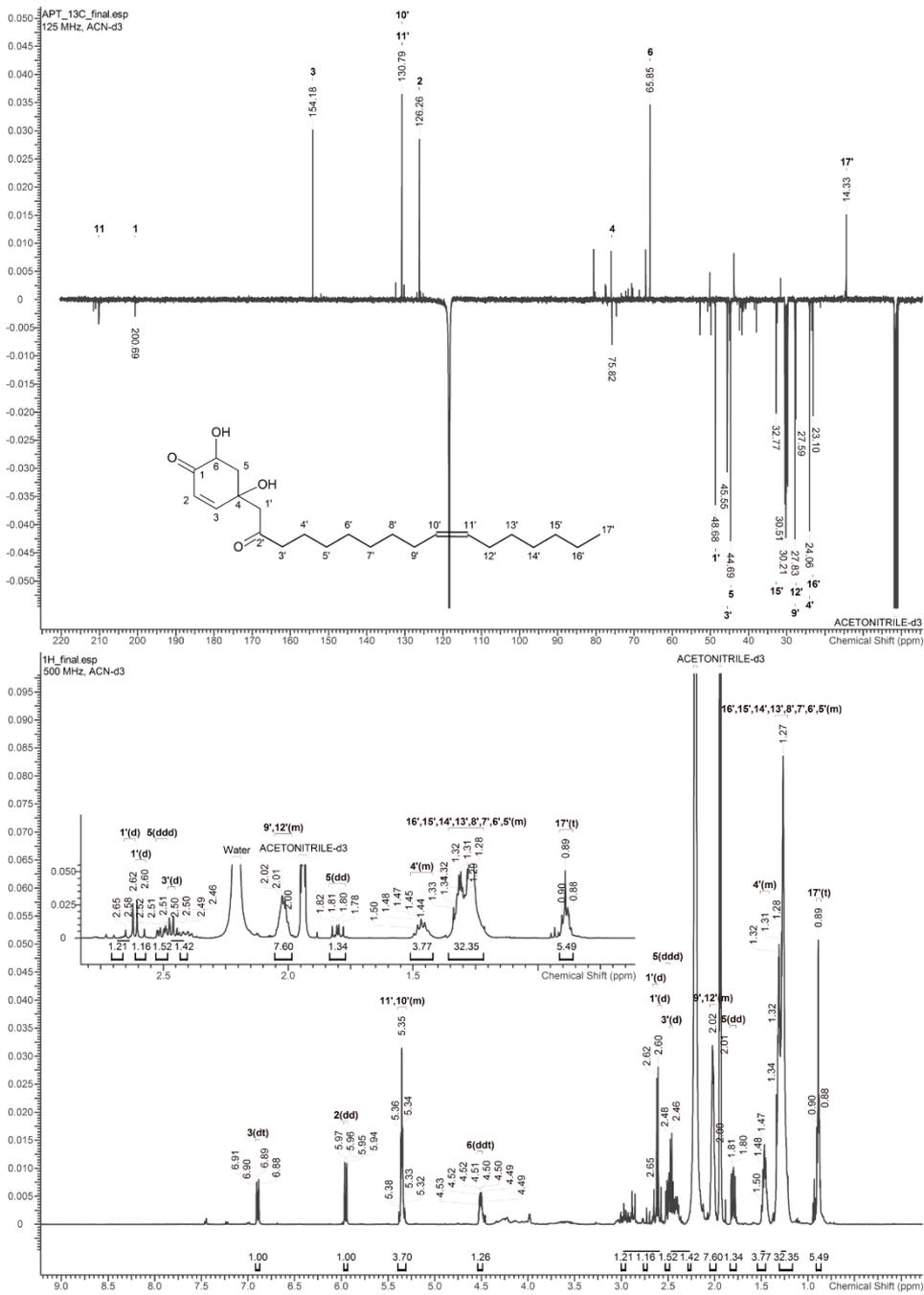


FIGURE 55: ^1H NMR spectrum and ^{13}C APT spectrum of poupartone C (compound 3).

The absolute configurations of compounds 1-3 were established by comparison of their experimental electronic circular dichroism (ECD) and ^{13}C NMR data with those predicted using the DFT/ $\omega\text{B97XD}/6\text{-}31\text{+G(d,p)}$ method. The modified probability (DP4+) method was used, which differs from the DP4 method by the inclusion of unscaled data and the use of higher levels of theory for the NMR calculation procedure.¹⁰² On the basis of geometrical considerations, four possible isomers were conceivable: 1*S*,6*R*,2'*R*/1*R*,6*S*,2'*S*, 1*S*,6*R*,2'*S*/1*R*,6*S*,2'*R*, 1*S*,6*S*,2'*R*/1*R*,6*R*,2'*S*, and 1*S*,6*S*,2'*S*/1*R*,6*R*,2*R* (fig. 56).

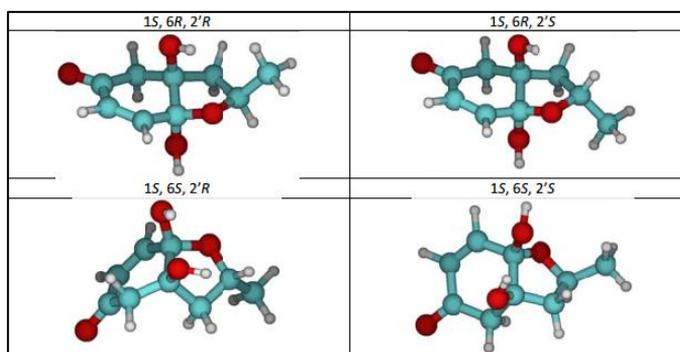


FIGURE 56 : Diagram of the most stable configurations of the four isomers of compound 1

The comparison of experimental and calculated NMR spectra allowed the determination of the relative configuration of **1** and **2** as (1*S*,6*S*,2'*S*/1*R*,6*R*,2'*R*) with a DP4+ probability of 100%. The (1*R*,6*R*,2'*R*) absolute configuration was then assigned by comparing the experimental and calculated ECD spectra at the TDA/RI-B2GP-PLYP/def2-TZVPP/SMD level in MeOH.

The comparison of the experimental and calculated NMR spectra of compound **3** allowed the definition of the relative configuration as (4*R*,6*S*/4*S*,6*R*) with a DP4+ probability of 100%. The (4*S*,6*R*) absolute configuration was then assigned by comparing the experimental and calculated ECD spectra at the TDA/RI-B2GP-PLYP/def2-TZVPP/SMD level in MeOH.

The compounds from the EtOAc extract were tested *in vitro* on the parasitic protozoa *P. falciparum*, and all showed high levels of activity against both chloroquine-resistant strain W2 and chloroquine-sensitive strain 3D7 (Table 6) with $\text{IC}_{50} < 2 \mu\text{M}$.

TABLE 6 : Antiplasmodial and cytotoxic activities of compounds **1-3** and EtOAc extract

Samples	<i>P. falciparum</i>		Cytotoxicity		Selectivity index (SI)	Hemolysis (%)
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µM) (n = 3)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µM) (n = 2)		
1	W2	3D7	HeLa	W158	2.86	1.76
	0.21 ± 0.010	0.34 ± 0.040	0.80 ± 0.120	0.60 ± 0.380		
2	W2	3D7	HeLa	W158	2.81	1.51
	0.55 ± 0.003	0.90 ± 0.015	2.10 ± 0.316	1.58 ± 1.000		
3	W2	3D7	HeLa	W158	2.10	2.34
	0.37 ± 0.050	0.69 ± 0.200	1.44 ± 0.340	1.04 ± 0.500		
EtOAc extract	W2	3D7	HeLa	W158	1.81	1.33
	0.97 ± 0.130	1.81 ± 0.520	3.77 ± 0.890	2.73 ± 1.300		
Artemisinin	W2	3D7	HeLa	W158	1.81	1.33
	0.48 ± 0.040	0.43 ± 0.160	1.31 ± 0.430	1.01 ± 0.820		
Camptothecin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	1.27 ± 0.105	1.13 ± 0.420	3.45 ± 1.130	2.66 ± 2.160		
EtOAc extract	W2	3D7	HeLa	W158	1.81	1.33
	1.78 ± 0.390	2.43 ± 0.500	3.37 ± 0.350	3.23 ± 0.350		
Artemisinin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.010 ± 0.002	0.004 ± 0.001	NT	NT		
Camptothecin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.035 ± 0.007	0.014 ± 0.004	0.080 ± 0.015	0.030 ± 0.011		
EtOAc extract	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	1.78 ± 0.390	2.43 ± 0.500	3.37 ± 0.350	3.23 ± 0.350		
Artemisinin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.010 ± 0.002	0.004 ± 0.001	NT	NT		
Camptothecin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.035 ± 0.007	0.014 ± 0.004	0.230 ± 0.043	0.086 ± 0.032		
EtOAc extract	W2	3D7	HeLa	W158	1.81	1.33
	1.78 ± 0.390	2.43 ± 0.500	3.37 ± 0.350	3.23 ± 0.350		
Artemisinin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.010 ± 0.002	0.004 ± 0.001	NT	NT		
Camptothecin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.035 ± 0.007	0.014 ± 0.004	0.080 ± 0.015	0.030 ± 0.011		
EtOAc extract	W2	3D7	HeLa	W158	1.81	1.33
	1.78 ± 0.390	2.43 ± 0.500	3.37 ± 0.350	3.23 ± 0.350		
Artemisinin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.010 ± 0.002	0.004 ± 0.001	NT	NT		
Camptothecin	W2	3D7	HeLa	W158	-	-
	0.035 ± 0.007	0.014 ± 0.004	0.230 ± 0.043	0.086 ± 0.032		

This class of compounds was previously observed in the Anacardiaceae family in *Tapirira guianensis* and showed antiprotozoal and antibacterial activities.⁸⁵ One of the compounds, described by Roumy et al.⁸⁵ as 1,2',4,5-tetrahydroxy-1-[10'Z-heptadecenyl]-2-cyclohexene, had a much lower activity level ($86.4 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ on *P. falciparum*).⁸⁵ Thus, it seems there is a positive effect on activity by the presence of a C-1 carbonyl and of an oxidation on C-2' for compound **3**. Similar observations can also be established for compounds **1-2** possessing $\Delta^{2(3)}$ double bonds, as the compound devoid of this double bond, 1,3,4,6-tetrahydroxy-1,2'-epoxy-6-[10'Z-heptadecenyl]cyclohexane, is less active, with an IC_{50} on *Plasmodium falciparum* F32 strain of $101.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$.⁸⁵ Other cyclohexenone derivatives were also described in *Tapirira obtusa*,¹⁰³ as well as in *Pistacia vera*.¹⁰⁴ The cytotoxic activities of these types of compound were highlighted in *Tapirira guianensis*.¹⁰¹

A Chinese patent (CN 1733748 A, Feb 15, 2006) was filed for a compound that has a structure similar to that of compound **1** but with a longer side chain and a different configuration of the bicyclic system. It was obtained from extracts of *Choerospondias axillaris*, a plant from the Anacardiaceae, and possesses cell cycle inhibitory and apoptosis inductor effects allowing its potential as an anti-tumor and anticancer agent.¹⁰⁵ This finding was a factor in the decision to analyze the cytotoxicity of **1-3**. These results show that compounds **1-3** are the bioactive compounds responsible for the activity of the EtOAc extract of the leaves of *P. borbonica* but also for the cytotoxicity which is similar to related compounds.⁸⁵ Compound **1** has the most promising activity but is also the most cytotoxic, with an SI of 1.76 on the *P. falciparum* 3D7 strain and WI38 cells. However, the antiplasmodial activity was not due to hemolysis, because neither the extract nor the isolated compounds induced red blood cell lysis at the highest concentration tested.

Using the method described by Deharo and Ginsburg,¹⁰⁶ the cyclohexenones **1-3** explain almost 50% of the activity of the EtOAc crude extract against *P. falciparum* (compound **1**: 21.5%; compound **2**: 21.4%; compound **3**: 2.9%). As compound **1** was the most abundant, an *in vivo* antimalarial assay was performed using *P. berghei*-infected mice. Compound **1** showed an inhibition of 59.1 and 69.5% of parasitic growth at days 5 and 7 post-infection, respectively (fig. 57). Compound **1** significantly reduced parasitemia compared to the negative

control. However, it was not devoid of toxicity, and despite the reduction of parasitemia, mice started to die on day 7.

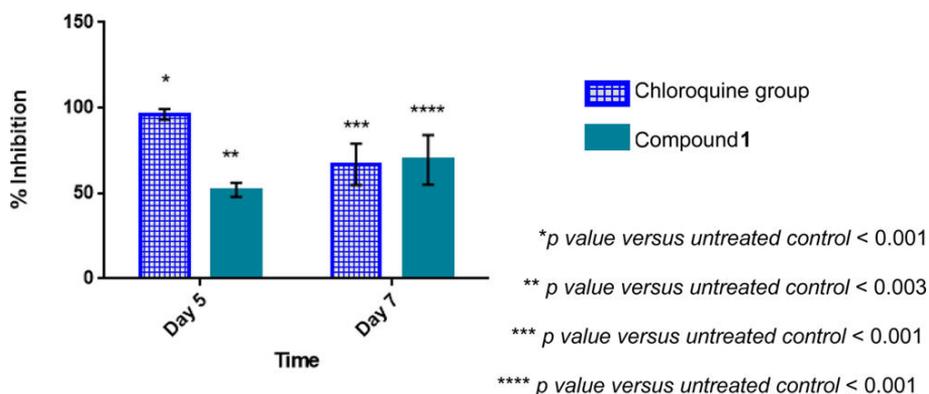


FIGURE 57 : *In vivo* parasitemia inhibition in mice infected by *Plasmodium berghei* and treated intraperitoneally with 15 mg/kg/d of Compound 1

Zebrafish larvae were used as a model to observe the toxicity of compound 1. The embryonic development of zebrafish is rapid, and the optical transparency of the embryos is convenient for investigating the causes of lethality.¹⁰⁷ It is also possible to observe developmental effects of a drug. Even if zebrafish cannot replace rodent models, they are useful for rapidly determining the toxicity of a drug in the early stages of an investigation. Embryos were dechorionated because the chorion has a protective function and isolates the embryo physically and chemically from external environmental conditions.¹⁰⁸ In the first step of analysis, logarithmic concentration series were used for range-finding. During the period of 24 hours post-fertilization (hpf) to 72 hpf, it was observed that all embryos died within 1 day after introduction of 10 µg/mL of compound 1. The second part of the test enabled more detailed observations of toxicity at a range of specific drug levels. After the first treatment doses, all embryos died at doses of 10, 5 or 3 µg/mL. At these concentrations, the embryos disintegrated, suggesting high contact toxicity. Neither 2.5 nor 2 µg/mL doses induced disintegration, but a few (5%) of the embryos developed bradycardia. No toxicity was observed at 1 µg/mL. Cumulative mortality was observed at 48 and 72 hpf, after two and three treatment doses, respectively. The 2.5 µg/mL concentration dose was lethal for all embryos at 48 hpf. At 2 µg/mL, 60% of the embryos died at 48 hpf, while the survivors developed a large decrease in pericardial function

and body axis deformation and died at 72 hpf after the third dose. In contrast, at 72 hpf, no significant mortality or morphological modifications were observed in embryos treated with 1 µg/mL.

The toxicity results from using a zebrafish embryo model may be an indication of the toxicity observed in mice. Indeed, although their cardiac morphology is simpler than the mammalian one, many features of the zebrafish heart are similar to those of mice.¹⁰⁹

In conclusion, the bioguided fractionation of an extract of the leaves of *P. borbonica* led to the isolation of three new alkyl cyclohexenone derivatives (**1-3**) that could explain, at least in part, the antiplasmodial activity of the EtOAc crude extract. These compounds showed high *in vitro* antiplasmodial activities, without any hemolysis, on the chloroquine-sensitive *P. falciparum* strain as well as on the resistant strain and displayed some toxicity. The *in vivo* assays performed on mice confirmed the high antimalarial activity of compound **1**, even if toxicity was recorded from day 7. Regarding the toxicity test on the zebrafish embryo model, compound **1** seems to be responsible for heart failure. The mechanisms of action of these high potential antiplasmodial cyclohexenones, as well as elucidation of their structure-activity relationships, still need to be investigated. Ellagic acid, which is known to have high antiplasmodial activity,^{100,110} seems to be the compound that explains the major part of the activity of the methanol crude extract, even if other compounds may act in synergy or have an additive action. The moderate antiplasmodial activity of 3'-*O*-hydroxysulfonylquercetin is described here for the first time, as is the suggestion that the B-ring of quercetin plays an important role in that activity.

Poupartone A (**1**): colorless oil; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 207 (2.27); IR 3383 (*br* OH), 3000 (alkene) 2916, 2833, 1667 (C=O), 1450 (alkane) cm^{-1} ; ^1H , ^{13}C NMR (500, 125 MHz, CDCl_3 and methanol- d_4) see Table 3; HR-ESI-MS m/z : = 379.2845 $[\text{M}+\text{H}^+]$ (calc. $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_4$, 379.2848).

Poupartone B (**2**): colorless oil; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 210 (2.18); IR 3383 (*br* OH), 3000 (alkene) 2917, 2850, 1667 (C=O), 1467 (alkane) cm^{-1} ; ^1H , ^{13}C NMR (500, 125 MHz, CDCl_3) see Table 4; HR-ESI-MS m/z : = 381.299 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4$, 381.299) and 403.2812 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}$, 403.2824).

Poupartone C (**3**): colorless oil; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 200 (1.90); IR 3400 (br OH), 3000 (alkene) 2915, 2835, 1683, 1667 (C=O), 1450 (alkane) cm^{-1} ; ^1H , ^{13}C NMR (500, 125 MHz, CDCl_3 and methanol- d_4) see Table 5; HR-ESI-MS m/z : = 379.2843 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_4$, 379.2848).

4. AVANT-PROPOS AU CHAPITRE 4 : QUELS SONT LES DÉFIS À RELEVER CONCERNANT LES POUPARTONES ?

Comme nous avons pu l'observer tout au long de ce chapitre, le *Poupartia borbonica* est une plante aux potentialités multiples. Elle contient des composés aux intérêts non négligeables, tels que des flavonoïdes et acides phénols, dont un flavonoïde particulier, la 3'-O-hydroxysulfonylquercetine. Elle est riche en ces composés hautement antimalariques, que sont les poupartones. Cependant, certains doutes persistent, puisque notre étude démontre une certaine toxicité. Quelle est la cause de cette nocivité observée chez les souris, malgré la diminution de la parasitémie ? Peut-on lier cette toxicité à celle bien connue de certaines Anacardiaceae, telles que les toxicodendrons ? Et, question plus importante encore, est-il possible de la contourner ? C'est pour pouvoir répondre à une partie de ces questions que le chapitre 4 sera consacré à l'étude de la toxicité des poupartones.

CHAPITRE 4 : TOXICITÉ DES POUPARTONES

1. AVANT-PROPOS

Dans ce chapitre, nous commencerons par répertorier les données disponibles dans la littérature quant aux dérivés d'alkylcyclohexenones. Ensuite, nous détaillerons les résultats obtenus lors des travaux relatifs à l'évaluation du potentiel cytotoxique des poupartones, principalement de la poupartone B. Le but de ce chapitre sera d'obtenir des pistes de réflexions quant aux mécanismes possibles de toxicité. Les observations effectuées précédemment nous indiquent que la toxicité pourrait être due à une atteinte cardiovasculaire, suite à l'observation des souris traitées. En effet, malgré une réduction drastique de la parasitémie et un bon état général, certaines sont mortes de manières abrutées. Un premier test de toxicité sur zebrafish avait mit en évidence l'apparition d'œdèmes cardiaques marqués, ainsi qu'une bradycardie à des concentrations proche de l'IC₅₀, alors que des concentrations supérieures induisaient une toxicité de contact importante. Ces phénomènes ont été observés avec la poupartone A, ainsi qu'avec la poupartone B.^{****} Des tests ont donc été effectués sur larves de zebrafish mutées afin de mettre en évidence une éventuelle toxicité vasculaire et/ou musculaire. Si ce type d'atteinte n'a pas été démontré, la toxicité de contact a fait l'objet d'une attention toute particulière, car elle rappelle une nocivité non négligeable observée dans la famille des Anacardiacees : les toxicités de contact liées à l'urushiol. L'étude de cytotoxicité réalisée grâce à l'incucyte, technique de videomicroscopie permettant de visualiser en temps réel les atteintes cellulaires, nous a permis de mettre en évidence des similitudes entre les mécanismes de toxicité de la poupartone et de l'urushiol.

Ces résultats concernant la relation structure/activité/toxicité seront discutés sous la forme d'un article intitulé : *Toxicity of Poupartia borbonica* Gmel. and their poisonous Alkyl Cyclohexenone Derivatives».

^{****} Nous avons sélectionné la poupartone B pour la suite des investigations, puisque son rendement d'extraction était meilleur. Cela permettait de limiter la consommation de matière végétale.

2. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE: « TOXICITY OF *POUPARTIA BORBONICA* GMEL. AND THEIR POISONOUS ALKYL CYCLOHEXENONE DERIVATIVES»⁺⁺⁺

Les informations disponibles dans la littérature ont permis de constater que certains dérivés d'alkylcyclohexenone ont fait l'objet d'études pharmacologiques indiquant des effets intéressants. Beaucoup présentent des propriétés anticancéreuses, antibactériennes, ou antiparasitaires. Malheureusement, ces molécules sont fréquemment cytotoxiques. Cependant, une molécule de cette classe, isolée à partir des tiges de *Lannea rivae*, une autre Anacardiacee, a démontré des propriétés antiplasmodiales et une absence de toxicité sur les cellules investiguées (cellules CHO). Les informations ont donc été regroupées afin d'obtenir des hypothèses concernant la relation structure/activité/toxicité. Cela nous a permis d'apprécier l'importance de la cétone α - β insaturée, puisque la plupart des molécules antiparasitaires présentent cette fonction. De plus, nous avons également observé que la seule molécule n'ayant pas démontré de toxicité sur les cellules, malgré une activité antiparasitaire à faible concentration, contient moins de groupement hydroxyles que les autres composés (fig. 58).

⁺⁺⁺ Article à soumettre pour publication.

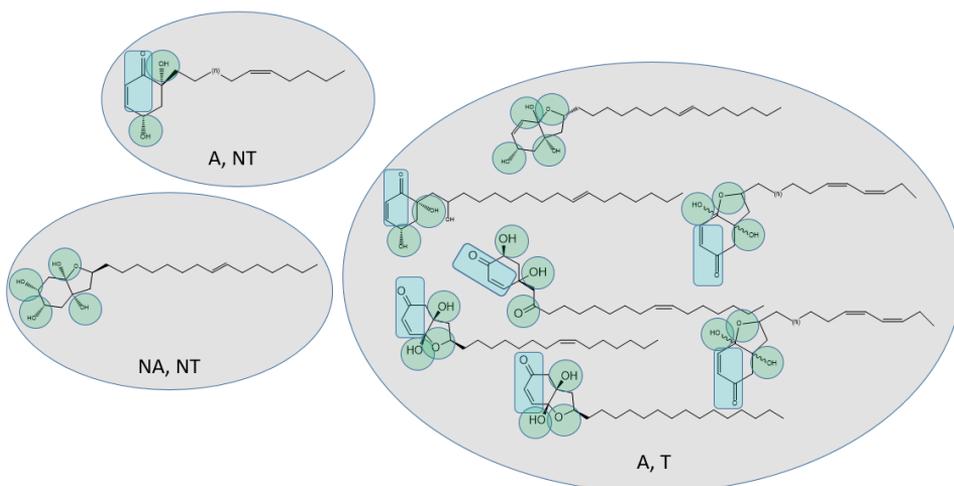


FIGURE 58 : Composés décrits comme étant antiparasitaires (A), non-antiparasitaires (NA), toxiques sur modèle cellulaire (T) ou non toxiques sur modèle cellulaire (NT).

La présence de groupements hydroxyles semble être un élément important lié à la toxicité des composés. Dans la grande famille des Anacardiaceae, de nombreuses molécules de structures proches sont décrites et connues pour leurs toxicités de contact : les urushiols. Contrairement aux dérivés d'alkylcyclohexenone, ils contiennent un noyau catéchol. Il a également été démontré que les groupements hydroxyles des urushiols étaient reliés à leur toxicité, puisque leur méthylation la diminue. Ces composés entraînent des dermatites importantes, et au niveau cellulaire, des mécanismes apoptotiques.

Afin de mettre en lumière une corrélation entre la toxicité des poupartones et ces composés toxiques des Anacardiaceae, nous avons entrepris d'explorer la toxicité de la poupartone B, la poupartone obtenue avec le meilleur rendement.

Tout d'abord, des tests sur larves de zebrafish ont été réalisés afin de relier la toxicité préalablement observée à une atteinte vasculaire ou musculaire. Deux modèles de larves transgéniques de zebrafish ont été utilisés : des zebrafish exprimant une fluorescence au niveau musculaire, ainsi qu'un autre modèle exprimant une fluorescence au niveau vasculaire. Nous avons observé que le système musculaire des larves traitées ainsi que la vasculogénèse et l'angiogénèse se sont établis de manière correcte, malgré l'exposition à la poupartone B, à des doses allant jusqu'à 15 µg/mL. Cependant, toutes les larves

traitées (transgéniques ou non), présentaient une atteinte de la nageoire caudale, traduisant une toxicité de contact importante.

L'étude de la cytotoxicité du composé a été réalisée par vidéomicroscopie et a mis en évidence différents modes d'action en fonction des lignées cellulaires investiguées, induisant des phénomènes de rétraction et vacuolisation sur les cellules MDA-MB-231 (cancer du sein), ainsi que la rétractation et la formation de protubérances (blebs) sur les cellules A375 (mélanome). La transfection des cellules afin de visualiser une fluorescence au sein des noyaux nous a permis d'observer une condensation des noyaux, et des mécanismes ressemblant à de l'apoptose.

Ces éléments indiquent qu'il pourrait y avoir certaines similitudes entre la toxicité des urushiols et des poupartones. Des études supplémentaires à ce sujet sont nécessaires. Confirmer cela nous permettrait d'envisager la réalisation de dérivés héli-synthétiques moins toxiques, par exemple en modulant le nombre de groupements hydroxyles présents.

3. « TOXICITY OF *POUPARTIA BORBONICA* GMEL. AND THEIR POISONOUS ALKYL CYCLOHEXENONE DERIVATIVES»

3.1 ALKYL CYCLOHEXENONE FROM ANACARDIACEAE: AN UPDATE^{§§§§}

Anacardiaceae family includes many species used as foodstuffs, such as pistachio, mangos, and cashews. All these plants can cause allergic reaction, particularly due to allergens able to cross-react with urushiol (fig. 59), an allergen present in well-known Anacardiaceae toxic species as sumac, poison oak, poison ivy and the Japanese lacquer tree.¹¹¹ Urushiol is a resinous oil found mainly in Anacardiaceae family, which consist of catechol with an hydrocarbonated chain containing 15 to 17 carbon atoms. In contact with skin, urushiol induces immune reaction leading to rash and dermatitis.¹¹² According to literature, hydroxyl groups play an important role in the compound toxicity, as their methylation

^{§§§§} This section is a mix between the introduction of the original paper and its Supporting informations.

canceled sensitizing capacity.¹¹³ Even if urushiol is toxic, some urushiol derivatives have been described for their biological interests, such as anticancer¹¹⁴, antimicrobial and antioxidant.¹¹⁵⁻¹¹⁶

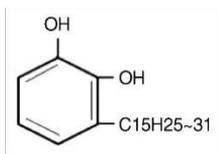


FIGURE 59 : structure of urushiol.

Alkyl cyclohexenone derivatives represent a rare group of secondary metabolites which was, as far as it could be established, previously reported exclusively in Anacardiaceae family until 2015, when Pseudoxyphorones were isolated from the fungal kingdom in *Hygrophorus abieticola*.¹¹⁷ They have a lot of similarities with urushiol compounds. Some studies even suggested that some alkyl cyclohexenones could be biogenetic precursors of the quite common urushiols in Anacardiaceae family.¹⁰³ A lot of biological properties have been reported concerning these compounds (table 7, fig. 60), as antimalarial and anti-bacterial^{70,85}, anti-phytopathogenic fungi¹¹⁷, and anticancer, putting them in the spotlight for further pharmacological investigations.^{101,103}

TABLE 7 : Plants containing alkyl cyclohexnone derivatives, their structures, their bioactivities and/or toxicities. In blue: antiplasmodial and no-cytotoxic compounds on cell(s) investigated, in grey: antibacterial and no cytotoxic compounds on healthy cell(s) investigated (structures are in fig 59).

Plant	Part	Compounds	Bioactivities investigated	Cytotoxicity (against non cancer cell lines)
<i>Tapirira guianensis</i> ¹⁰¹	seeds	2-[10(Z)-heptadecenyl]-1,4-hydroquinone (1) 4,6-Dihydroxy-4-[10(Z)-heptadecenyl]-2-cyclohexenone (2)	Cytotoxic activities against cancer cells (BC1 , human breast cancer; Lu1 , human lung cancer; Col2 , human colon cancer; KB , human epidermoid carcinoma; LNCaP , human hormone-dependent prostate cancer (IC ₅₀ between 0.2-4.3 µg/mL)	NT
	bark	4,6,20-Trihydroxy-6-[10(Z)-heptadecenyl]-1-cyclohexen-2-one (3a); 1,4,6-trihydroxy-1,20-epoxy-6-[10(Z)-heptadecenyl]-2-cyclohexene (3b) in mixture	Antiparasitic activities against <i>P. falciparum</i> , <i>L.amazonensis</i> (IC ₅₀ between 1-5.4 µM)	MCF-7 cells (IC ₅₀ : 6.8 ± 0.2 µM)
		1,4,5,20-Tetrahydroxy-1-[10(Z)-heptadecenyl]-2-cyclohexene (4)	Antiparasitic activities against <i>P. falciparum</i> , <i>L.amazonensis</i> (IC ₅₀ between 86.4 -95.5 µM)	MCF-7 cells (IC ₅₀ : 34.8 ± 7.7 µM)
		1,3,4,6-Tetrahydroxy-1,20-epoxy-6-[10(Z)-heptadecenyl]- cyclohexane (5)	Antiparasitic activities against <i>P. falciparum</i> , <i>L. amazonensis</i> (IC ₅₀ between 86.490.4 -159.5 µM)	MCF-7 cells (IC ₅₀ : 74.1 ± 6.3 µM)
<i>Tapirira obtusa</i> ¹⁰³	bark	6a : n=10; 6b : n=8 7a : n=15 ; 7b : n=13 1-Hydroxy-3-[(Z)-7H-nonadecenyl]benzene (6a); 1-hydroxy-3-[(Z)-7H-heptadecenyl]benzene (6b); 1-hydroxy-3-heptadecenylbenzene (7b); 1-hydroxy-3-pentadecenylbenzene (7b)	Cytotoxic activities against Lu1 , human lung cancer; Col2 , human colon cancer and LNCaP , human hormone-dependent prostate cancer (IC ₅₀ between 15.5-18.8 µg/mL)	NT
		8a : n=13 ; 8b : n=11 1-Hydroxy-3-[14H-phenyltetradecyl]benzene (8a); 1-hydroxy-3-[14H-phenyldodecyl]benzene (8b)	Cytotoxic activities against cancer cells KB , human epidermoid carcinoma (IC ₅₀ :14.4 µg/mL)	NT
		1-(16H-Phenyl-12H-(Z)-hexadecenyl)-4-cyclohexene- (1S*,3S*)-diol (9)	Cytotoxic activities against cancer cells Lu1 , human lung cancer; Col2 , human colon cancer; KB , human epidermoid carcinoma (IC ₅₀ between 10.2-19.5 µg/mL)	NT

Plant	Part	Compounds	Bioactivities investigated	Cytotoxicity (against non cancer cell lines)
		4S*, 6S*-Dihydroxy-6-(14H-nonadecenyl)2-cyclohexenone (10)	Cytotoxic activities against cancer cells (BC1 , human breast cancer; Lu1 , human lung cancer; Col2 , human colon cancer; KB , human epidermoid carcinoma; LNCaP , human hormone-dependent prostate cancer (IC ₅₀ between 1-12 µg/mL)	NT
<i>Poupartia borbonica</i> ⁷⁰	Leaves	poupartone A (11) poupartone B (12) poupartone C (13)	Antiparasitic activities against <i>P. falciparum</i> , (IC ₅₀ between 0.55-1.81 µM) Cytotoxic activities against cancer cells (HeLa), (IC ₅₀ between 2.10-3.77 µM)	WI-38 cells (IC ₅₀ between 1.58-2.66 µM)
<i>Lannea rivae</i> ^{118, 119}	Root stem	14a : n=10 ; 14b : n=8 ; 14c : n=6 14d : n=10 3-[nonadec-14(Z)-enyl]-phenol (14a-d) in mixture	No antibacterial nor antiparasitic activities (<i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. falciparum</i>)	No cytotoxicity Chinese Hamster Ovarian cell (CHO) (IC ₅₀ > 100 µg/mL)
		15 : n=10 4,5-dihydroxy-4,5-furan-20-[16(Z),18(E)-nonadecadienyl]-cyclohex-2-enone (15)	Antiparasitic activities against <i>P. falciparum</i> , (IC ₅₀ between 0.43-0.48 µg/mL) Antibacterial activities against <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> (zones of inhibition in mm between 10-14)	Chinese Hamster Ovarian cell (CHO) (IC ₅₀ = 1.93 µg/mL)
		16 : n= 12 2,4,5-trihydroxy-2-[heneicos-16(Z)-enyl]-cyclohex-anone (16)	Antiparasitic activities against <i>P. falciparum</i> , (IC ₅₀ between 1.40 – 2.05 µg/mL)	Chinese Hamster Ovarian cell (CHO) (IC ₅₀ = 6.52 µg/mL)
		17a : n=8 ; 17b : n= 10 4S,6R-dihydroxy-6-[12(Z)-heptadecenyl]-cyclohex-2-enone (17 a-b) in mixture	Antiparasitic activities against <i>P. falciparum</i> , (IC ₅₀ between 0.88 – 1.03 µg/mL) Antibacterial activities against <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> (zones of inhibition in mm between 8-16)	No cytotoxicity Chinese Hamster Ovarian cell (CHO) (IC ₅₀ > 100 µg/mL)
		18 : n=12 1,2,4-trihydroxy-4-[16(Z)-heneicosenyl]-cyclohex-ane (18)	No antibacterial nor antiparasitic activities (<i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. falciparum</i>)	Chinese Hamster Ovarian cell (CHO) (IC ₅₀ = 56.5 µg/mL)

Plant	Part	Compounds	Bioactivities investigated	Cytotoxicity (against non cancer cell lines)
		(4R,6S)-4,6-Dihydroxy-6-((Z)-nonadec-14'-en-1-yl)cyclohex-2-en-1-one (19)	Antibacterial activities against <i>E.coli</i> (zones of inhibition in mm: 9 at 150 µg/mL ; 59.44% of inhibition with 80µg/mL) Cytotoxic activities against cancer cells (DU-145), (IC ₅₀ = 0.55 µg/mL)	No cytotoxicity Vero cells (IC₅₀ > 100 µg/mL)
		(2S*,4R*,5S*)-2,4,5-Trihydroxy-2-((Z)-nonadec-14'-en-1-yl)cyclohexanone (20)	Antibacterial activities against <i>S. aureus</i> , (59.44% of inhibition with 80 µg/mL) Not active against <i>E.coli</i>	NT
Fungi	Part	Compounds	Bioactivities	Toxicity
<i>Hygrophorus abieticola</i> ¹¹⁷		Pseudohygrophorone A ¹² (21) Pseudohygrophorone B ¹² (22) Hygrophorone B ¹² (23)	Fungicidal plant protection agent: antiphytopathogenic activities against <i>B. cinerea</i> , <i>S. tritici</i> , and <i>P. infestans</i> (IC ₅₀ between 1.6-24.5 µM)	NT

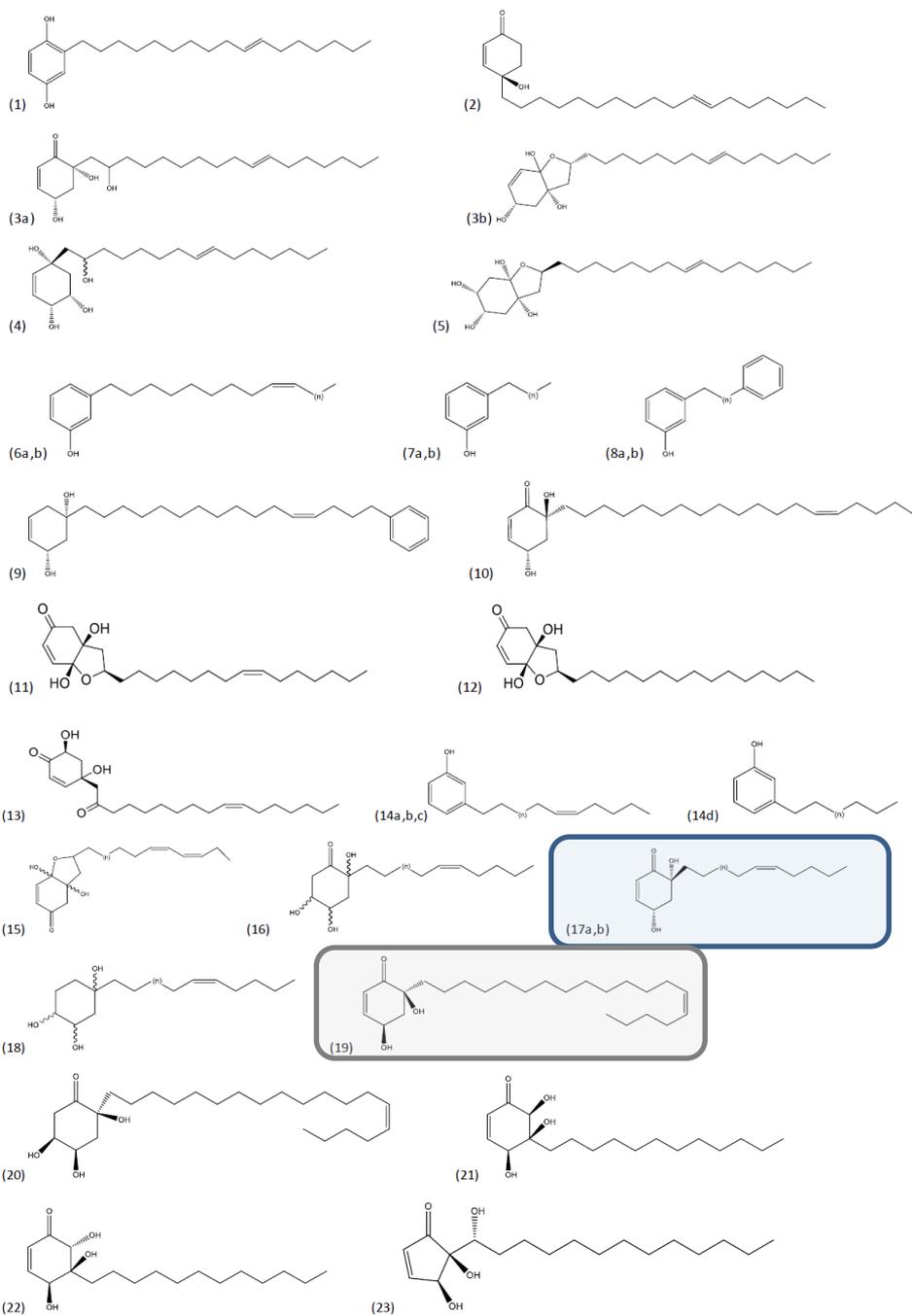


FIGURE 60 : Structures of compounds described in table 7.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 *IN VITRO* CYTOTOXICITY TEST

○ CELL LINES

Human MDA-MB-231 and A375 cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine in humidified tissue culture incubators (Hera cell, Thermo Scientific) at 37°C with 5% CO₂ and 95% air. All culture reagents were purchased from Invitrogen (Merelbeke, Belgium). All cultures were mycoplasma free as confirmed by the MycoAlert detection kit (Lonza).

○ mEMERALD-NUCLEUS-7 EXPRESSING CELL LINES

Polyclonal MDA-MB-231 and A375 cell lines expressing nuclear-localized mEmerald (mEmerald-Nucleus-7) were generated by transfection with a mammalian expression vector containing cDNA encoding Nuclear Localization Signal-mEmerald (mEmerald-Nucleus-7 plasmid was a gift from Michael Davidson; Addgene plasmid # 54206). Polyclonal mEmerald-expressing populations were selected using neomycin and fluorescence activated cell sorting (FACSaria III, GIGA-Flow Cytometry platform, University of Liège).

○ CELL SEEDING AND COMPOUND ADDITION

Experiments were performed in 96-well plates. On Day -1 cells grown in 10 cm standard tissue culture dishes (Falcon, Becton-Dickinson) were trypsinized and counted using a Cedex XS cell analyzer (Roche Innovatis). 100 µL of cell suspension containing 2,000 MDA-MB-231 and 1,500 A375 viable cells was added manually to a 96-well tissue culture plates (Falcon, Becton-Dickinson). On day 0, vehicle (DMSO) and test compounds were prepared in growth medium as 3-fold concentrated solutions and 50 µl of these solutions were added to the cell cultures (final DMSO concentration 0.5%). Doxorubicin (2µM), a chemotherapeutic drug, was used as positive control.

○ ACQUISITION OF POPULATION IMAGES

Cell counts were obtained over time using an IncuCyte S3 dual color live content imaging system (Essen BioSciences, Welwyn Garden City, UK) residing within an In-VitroCell ES NU-5831 (NuAir) tissue culture incubator maintained at 37°C with 5% CO₂. Data were acquired using a 20x objective lens in phase contrast and green fluorescence (Ex: 460 ± 20, Em: 524 ± 20, acquisition time: 200 ms) channels. Images (0.62 µm/pixel) were acquired from each well every 30 min for a total of 48 h. Data acquisition time per well was less than two seconds. All IncuCyte experiments were performed in triplicate.

○ LIVE CELL COUNTING AND CONFLUENCE MEASUREMENTS

Automated image analysis routines were optimized for each cell line using the IncuCyte S3 software package and training data from vehicle and compound-treated samples. MDA-MB-231 populations were analyzed using a routine with the following settings to count mEmerald positive objects (Segmentation: Top Hat; Parameter adaption, radius: 80 µm; threshold adjustment: 2; Edge split on; Edge sensitivity -50; Cleanup: adjust size: -3; Filter area min 30 µm², Mean intensity: min 3). A375 populations were analyzed using a routine with the following settings to count mEmerald positive objects (Segmentation: Top Hat; Parameter adaption, radius: 100 µm; threshold adjustment: 2; Edge split on; Edge sensitivity -40; Cleanup: hole fill: 35; adjust size: -3; Filter area min 30 µm²). Confluency of the cultures was measured using the IncuCyte Confluence software, which quantified cell surface area coverage as confluence values (segmentation adjustment, background: 1.8; Cleanup, hole-fill: 400 µm²; Filter, minimum area: 200 µm²). mEmerald positive counts, expressed as objects per mm², and confluence measures, expressed as an overall percentage, were then analyzed further on Excel (Microsoft) and GraphPad Prism 7.0. Counts more than 10-fold different than the one immediately preceding in the time course were censored. All data were normalized to time 0 samples as 100%.

3.2.2 CYTOTOXICITY ON ZEBRAFISH EMBRYO-LARVAS

Adult transgenic Zebrafish (*Danio rerio*) were kept while fulfilling the criteria of the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals at the University of Liège. They were maintained at 28°C on a 14 h day/10 h night period, and fertilized eggs were collected, washed with sterile water and placed in Petri

dishes. Tests were performed as already described.⁷⁰ Briefly, embryos were collected, and their chorions were not removed. Poupartone B (30 µg/ mL) was dissolved in DMSO solution and was diluted with the medium used for zebrafish. The exposure concentration of poupartone B was 15 µg/mL for vascular specific Zebrafish Fli-GFP and 10 µg/mL for muscular specific zebrafish Mylz-mcherry (as previous tests suggested a higher resistance of these transgenics embryo-larvas to poupartone B, particularly for the vascular transgenic). The DMSO final highest concentration was 0.4%. Twenty embryos were used per condition in a 6-well plate. Each well contained 5 mL of the treatment dose, which was replaced once daily for three days. The embryos were observed each day until 72 hfp (hours post fertilization). Twenty embryos were used as control, twenty were used to control the solvent (DMSO, 0.4%) and twenty others were used for the poupartone B. Two different transgenic zebrafish models were used; vascular specific Zebrafish Fli-GFP which express green fluorescent proteins on endothelial cells and muscular specific Zebrafish Mylz-mcherry which express red fluorescent proteins in muscular cells.

3.3 RESULTS

3.3.1 CYTOTOXIC *IN VITRO*

Real-time imaging of the human MDA-MB-231 breast cancer and A375 melanoma cell lines showed that proliferation was inhibited with poupartone B at an early stage of incubation. The vehicle-treated cells displayed uniform cytoplasm and clear nucleus. The mechanism of cell death seems to be different between the two cell lines investigated. A375 cells were affected at lower concentrations than the MDA-MB-231 cells (fig. 61 and 62).

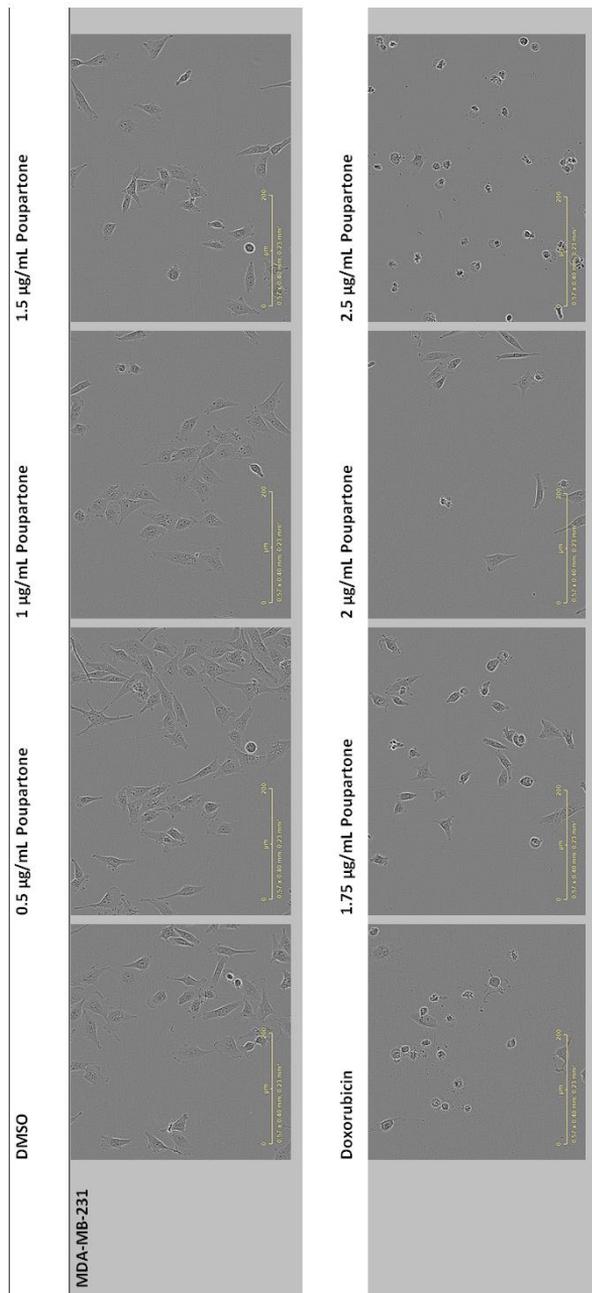


FIGURE 61 : MDA-MB-231 cells exposed to 0.5 to 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of poupartone B after 48 hours of incubation (control doxorubicin at 2 μM)

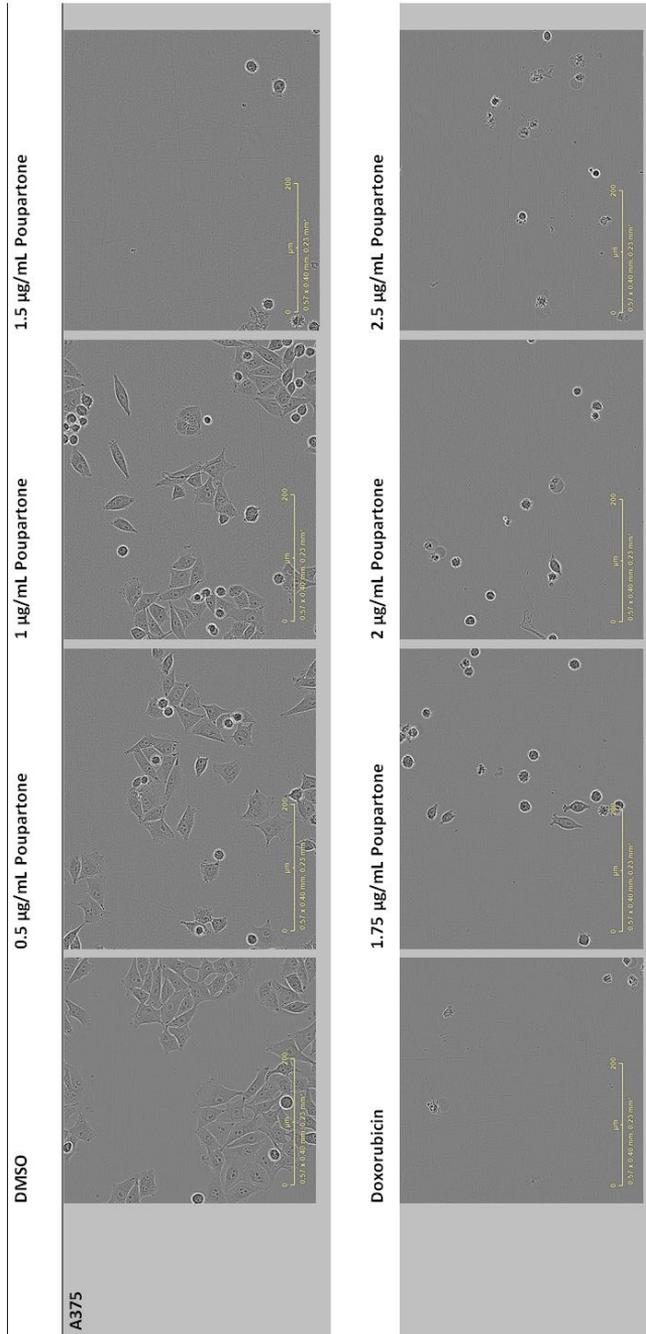


FIGURE 62 : A375 cells exposed to 0.5 to 2.5 µg/mL of poupartone B after 48 hours of incubation (control doxorubicin at 2 µM)

Refraction and cells' rounding appeared with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on A375 cells at the early stages of incubation (Fig. 63). A disruption of adherence organization and the formation of surface protrusion (blebs) were observed. These blebs were mainly visible with A375 cells.

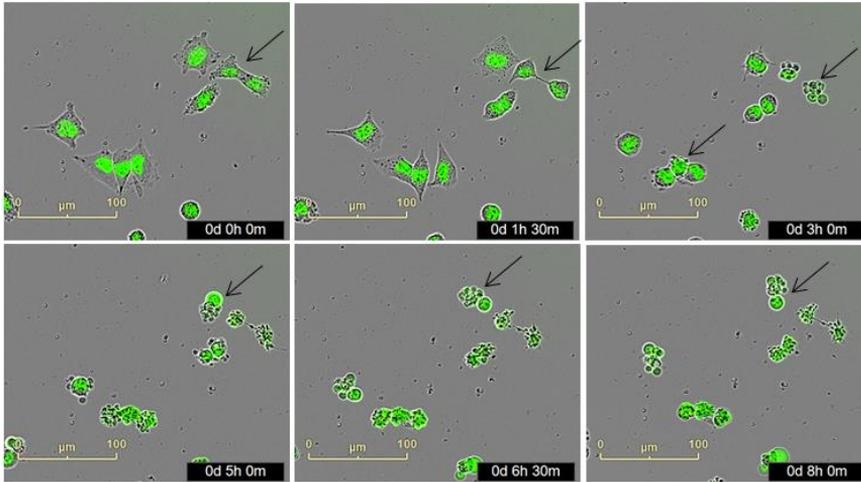


FIGURE 63 : Observation of refractions phenomenon and blebs (indicated by arrows) at $t=0$, 90 min, 5 hours, 6 hours $\frac{1}{2}$, and 8 hours , with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of poupartone B on A375 cells.

Refractions also appeared on MDA-MB-231 cells. Cells no longer adhere to the plate and rounding-up, and this was associated with a smaller cytoplasm. Cytoplasmic vacuolization occurred with MDA-MB-231 cells at the lower concentration. Tests performed allowed to conclude that vacuolization was irreversible before death, but was transient in surviving cells (fig. 64).

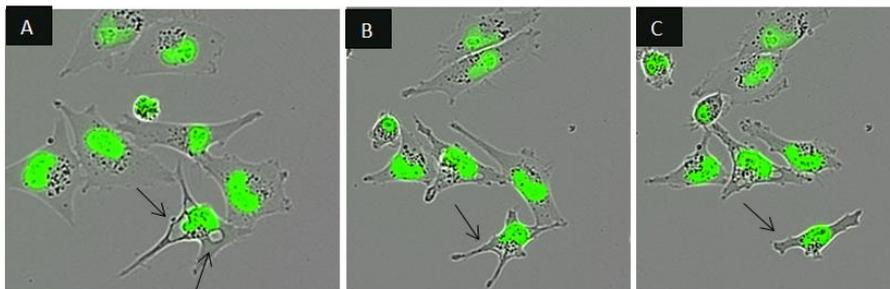


FIGURE 64 : Observation of transient vacuolization after 40 hours (A), 44 hours (B) and 45 hours (C) of 1 μmL of drug exposure

The calculated Relative Confluency and Nuclear Density of the cells allowed us to observe that the compound is cytostatic at concentrations below 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and cytotoxic from 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Fig. 65)

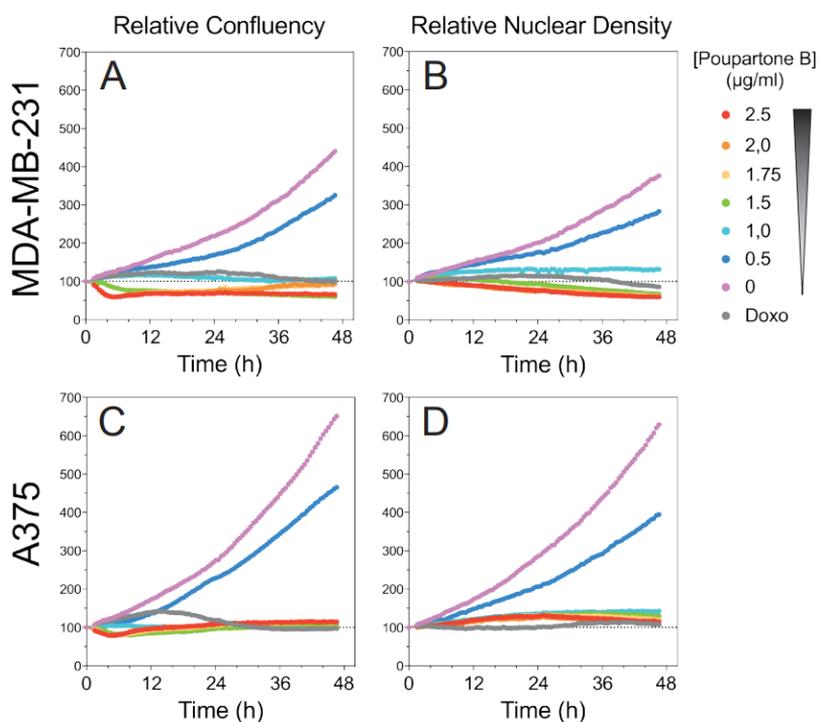


FIGURE 65 : Relative Confluency and Relative Nuclear Density of MDA-MB-231 and A375 cells exposed to different concentration of poupartone B (0-2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) according to time

The structures of the nucleus were followed by their fluorescence. This signal allows the visualization of the nucleus morphology modifications, and then the formation of chromatin condensation. This apoptosis-like mechanism was observable in both cells, even if the chronology was a little bit different. (Fig. 66)

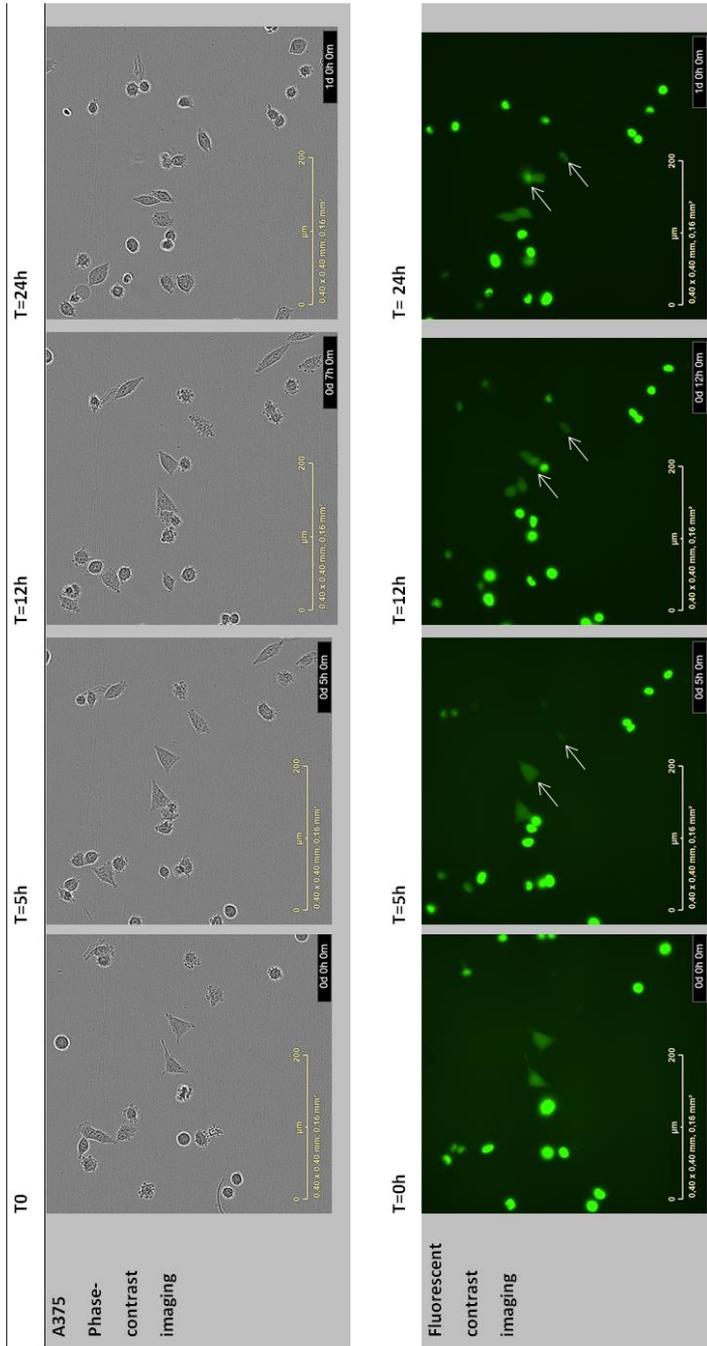


FIGURE 66 : A375 cells exposed to 2.5 µg/ mL of poutpartone B at 0h, 5h, 12h, and 24h incubation time, nuclear condensation is shown by arrows

3.3.2 TOXICITY ON ZEBRAFISH EMBRYO-LARVAS

○ FLI-GFP EMBRYO-LARVAS

This model express enhanced GFP in the entire vasculature and then allows the observation of vascular dysfunction. Thus, these transgenic Zebrafish embryos were used to observe vasotoxic effect. Endothelial cells differentiation did not seem to be involved in the mechanism of toxicity (fig. 67). Vascular circulation was slowed down, but it could be the consequence of general impairment. Indeed, embryo-larvas exposed to poupartone B developed body axis deformation and high contact toxicity resulting in skin injuries. Even in a model where re-epithelization is extremely rapid, injuries caused by this natural compound are very invasive (fig. 69).

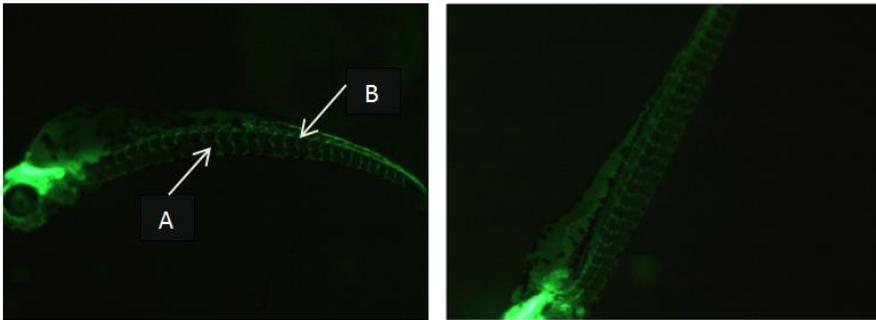


FIGURE 67 : Effect of poupartone B exposure on vascular transgenic Zebrafish embryos-larvas Fli-GFP (on the left). (A) Intersomitic vessels, (B) Dorsal aorta and cardinal vein, compared to untreated larva (on the right) at 72 hours post-fertilization.

○ MYLZ-MCHERRY EMBRYO-LARVAS

Transgenic muscular Zebrafish embryos were used to observe toxic effect on muscular system, as they express red fluorescence in muscular cells. However, no major difference in notochord or myotome morphology could be observed between the control and the treated embryo-larvas, regarding the muscular system formation (fig. 68). However, body axis deformations and tail necrosis were observed, which could be the consequence of a general impairment. Indeed, when embryo-larvas are exposed to poupartone B, the skin is attacked, particularly on the terminal part of the embryo-larva (fig. 69).

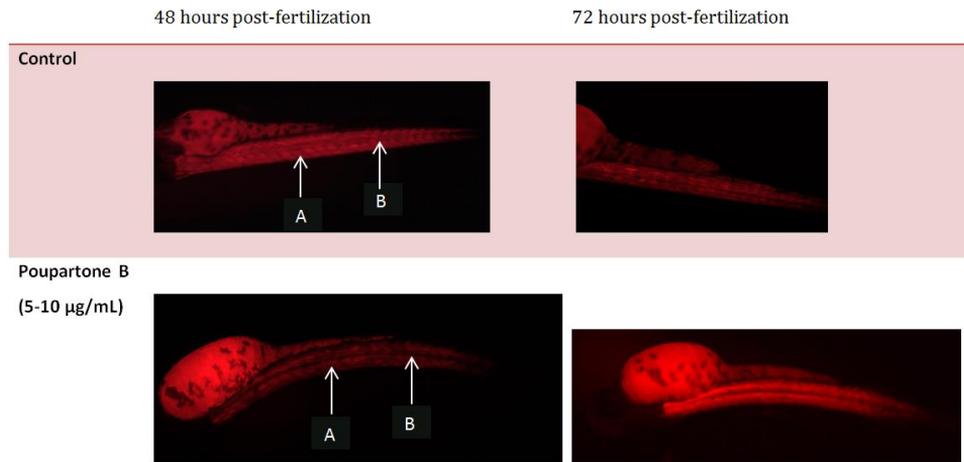


FIGURE 68 : Effect of poupartone B exposure on muscular transgenic Zebrafish embryo larvas Mylz-mcherry. (A) myotomes, (B) notochord.

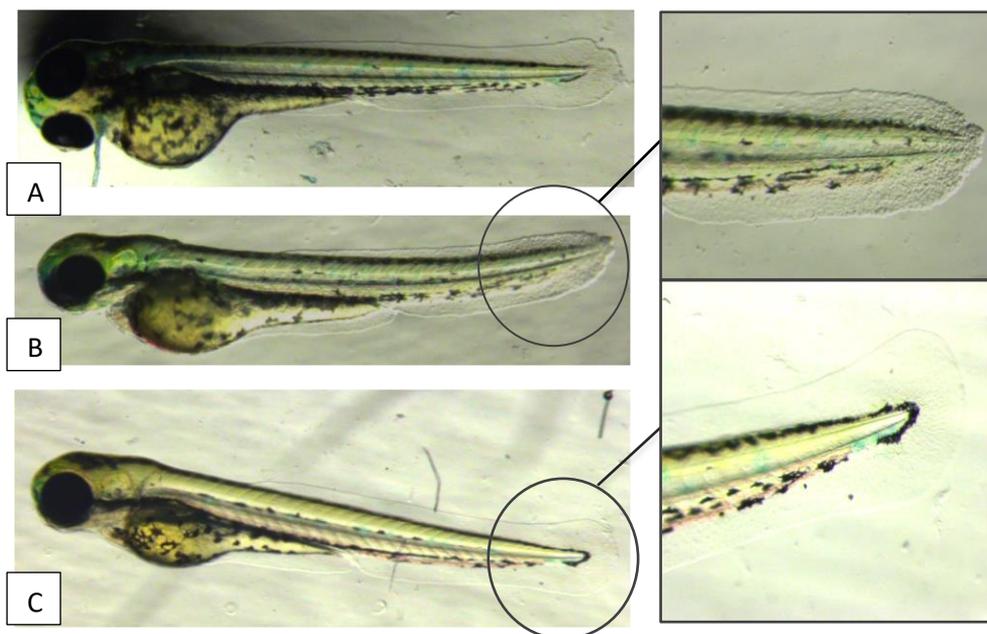


FIGURE 69 : Effect of poupartone B exposure on the tail (zoom on the right) of Zebrafish embryos-larvas at 5 µg/mL (A), and 10 µg/mL (B) compared to control (C) 72 hours post fertilization.

These tests do not allow to highlight specific mechanism of toxicity related to muscle or vascular development. However, the tests carried out consistently showed high contact toxicity, whether on the naive or transgenic population.

3.4 DISCUSSION

In vitro tests with the IncuCyte imaging system allow the observation of different cell reactions when they are in contact of poupartone B. The morphological modification of the nucleus in both cell lines investigated indicates that poupartone seems to induce apoptosis-like mechanisms. A375 human malignant melanoma cells demonstrated more suffering signs than MDA human breast adenocarcinoma cells. At the early stage of incubation, they started to retract themselves and to become round with formation of blebs, before dying. Process of death is a little bit different with MDA cells, as blebs developed in lower quantities, and the cells showed, overall, a different behaviour at the lowest dose of the compound. Even if the cells investigated are both epithelials, a lot of differences between them can be observed. Indeed, imaging allowed the observation of a vacuolization process which was reversible and not present with A375 cells at lower concentration. Thus, these elements encourages the idea that the compound modifies complex metabolic pathways in cells, and could be interesting against epidermoid carcinoma. Transient vacuolization only occurs when cells are exposed to an inducer, and it affects cell cycle and migration.^{120,121} It is established that some lipophilic compounds can be transported inside the cell and, by different ways, induce an osmotic pressure. Water diffusion helps to equilibrate the pressure leading to vacuoles.¹²⁰ Vacuolization could also be an autonomous protection of the cell, isolation and buffering of the toxins.¹²¹ Extensive cytoplasmic vacuolization, without any other morphological hallmarks of apoptosis, is also one of the main feature of paraptosis, which consists of a kind of programmed cell death, morphologically and biochemically different from apoptosis.¹²² More investigations have to be performed to confirm this.

Tests on zebrafish embryo-larva did not allow to clearly assume the origin of toxicity as a vascular or muscular dysfunction. Even if some dysfunctions were observed, they were attributed to the consequence of a general discomfort of the embryos-larvas. However, the observation of very high contact toxicity appears to be one of the primary causes of toxicity.

These tests allowed the hypothesis that the toxicity of poupartone B involves a specific pathway in cells, especially by producing vacuolization, and induces high contact toxicity in zebrafish model.

Thus, a matching between the toxic compounds of the Anacardiaceae family and poupartone B becomes evident, namely from the apparent contact toxicity.¹¹⁴ Indeed, urushiol compounds showed a lot of similarities with poupartone B, in terms of origin and structure. This study allowed us to establish a link between their toxicities, as urushiol also induced death by different mechanisms, according to the cell investigated. For example, it induced apoptosis on MKN-45 cells while no apoptotic features were observed on MNK-28 (both gastric cancer cells), suggesting another pathway to death.¹¹⁴ Even if this observation concern a prokaryote organism, vacuolization and blebs were also observed after urushiol treatment of the bacteria *H. pylori*.¹²³

However, the main similarities between compounds happen on more complex living organisms. Urushiol is known to induce very high contact toxicity, both on human and non-human animals. The high contact dermatitis induced by poupartone B on zebrafish embryos-larvas is another interesting similarity with urushiol compounds. Clearly more investigations have to be performed to assume that the mechanism of toxicity of the alkyl cyclohexenone derivatives corresponds to that of urushiol. Learning about the toxicity of this kind of compounds is essential, as their bioactivities are increasingly on the spotlight. The overview of the alkyl cyclohexenones compounds (table 7) suggests that the toxicity appears to be related to the number of oxygen atoms, which could be correlated to the toxicity of urushiol, as it can be modulated by the methylation of hydroxyl group¹¹³. However, major biological activities seem to depend of the presence of the α - β insaturated ketone, a Michael acceptor which is often involved in biological activities. Indeed, as far as it could be established, all the alkyl cyclohexenone derivatives from nature with high antiparasitic activities also presents a ketone function (compounds 3a, 3b, 11, 12, 13, 15, 16, 17a, 17b, and 19 fig.60), and the only two compounds which demonstrated high antiparasitic activities without toxicity contain only three oxygen atoms (compounds 17 a-b and 19, fig.60), including the α - β insaturated ketone.

Alkyl cyclohexenone derivatives are a very promising class of compounds, with a large panel of biological activities. Some of them demonstrated anticancer properties against different type of cells (breast, lung, colon, epidermoid carcinoma, prostate, cervical), antiparasitic activities against *P. falciparum*, the *Plasmodium* species responsible for the most aggressive malaria and against

Leishmania amazonensis, one of the parasites responsible for the disease leishmaniasis. Some showed interesting antibacterial activities both against positive and negative gram bacteria, even antifungal activities. Thus, if it is confirmed that the toxicity is related to the number of oxygens in the structure, it is suggested that it might be possible to decrease toxicity by modifying this number, without modifying activity, if it is related to α - β insaturated ketone. This study paves the way for further investigations, to define clearly the mechanism of toxicity and encourage hemi-synthesis or synthesis to obtain a similar structure preserving the α - β insaturated ketone part and a reduced number of oxygen.

3.5 CONCLUSION

Poupartone B is a promising antiplasmodial compound, but its toxicity put a curb on its future applications. Thus, better understanding the mechanism of toxicity is a determinant factor to be able to circumvent it. This study demonstrated that the mechanism of toxicity not firstly concerns the muscular or vascular system in a zebrafish model, but put in evidence a very high contact toxicity, in both types of investigated zebrafish (naive and transgenic). Tests performed with living cell imaging allowed the observation of different mechanisms of cell response when in contact with the compound, including rounding up, blebs or vacuolization and nucleus modification. It was also possible to confirm the rapidity of the apparition of cells' discomfort. The similarities between poupartone and urushiol compounds in terms of origin, structure, bioactivities and toxicities point the way towards a renewed pharmacological modulation possibility. Based on the literature, it is possible to hypothesise that the toxicity of alkyl cyclohexenone derivatives may be correlated with the number of oxygens in the molecule. Indeed, active and non-toxic compounds have less oxygen atoms than the toxic compound. The fact that the most active compounds contain α - β insaturated ketone moiety suggests its importance towards the biological activities.

4. AVANT-PROPOS AU CHAPITRE 5

La toxicité de la poupartone B est non négligeable. Bien que le mécanisme sous-jacent ne soit pas encore élucidé, nos investigations menées sur les larves de zebrafish ont démontré une certaine similitude entre les composés entraînant des dermatites de contact importantes et la poupartone B. Il semblerait également qu'elle agisse différemment en fonction des cellules avec lesquelles elle est en contact, suite à la différence de réactions visualisées sur les cellules de mélanome et de cancer du sein. Cela renforce l'idée que les cellules épithéliales soient les plus affectées, autant *in vitro* que sur larve de zebrafish.

Plusieurs pistes ont été suggérées afin de diminuer la toxicité des poupartones. L'une d'entre elle consistait à cibler spécifiquement le parasite, afin de minimiser les effets collatéraux. La littérature nous a confortés dans l'idée que cela était possible, puisque des stratégies destinées à viser précisément les globules rouges parasités par *P. falciparum* ont déjà été appliquées à des molécules connues. La question était de savoir si cela pouvait s'étendre aux poupartones.

CHAPITRE 5: NANOVECTORISATION ET poupartone B

1. AVANT-PROPOS

Plusieurs types de nanoparticules font actuellement l'objet de recherches intensives, afin de lutter contre les maladies humaines. Dans ce chapitre, nous discuterons principalement des liposomes, qui constituent l'objet de nos recherches. Nous aborderons les liposomes antiplasmodiaux décrits dans la littérature, avec une attention particulière sur l'utilisation de l'héparine, comme agent de modification de surface de ces nanovecteurs, ainsi que comme agent de ciblage actif. Ensuite, nous aborderons la manière dont la poupartone B a été encapsulée dans ces nanovecteurs, afin de réduire sa toxicité et d'augmenter son efficacité en ciblant spécifiquement les globules rouges parasités. Bien que les tests *in vivo* discutés dans le chapitre 3 concernent la poupartone A, nous avons choisi de développer cette stratégie sur la poupartone B, car le rendement de l'extraction nécessaire à l'obtention de ce composé avec une pureté élevée était meilleur. Cela nous a permis de consommer moins de matière première végétale. De plus, l'activité antiparasitaire et la toxicité de ces deux poupartones étaient similaires.

Les tests de toxicité ont été effectués sur cellules, ainsi que sur larves de zebrafish, ce qui nous a permis de visualiser une diminution de la toxicité engendrée par la poupartone B. Les tests d'activité antiplasmodiaux ont été effectués et mettent en évidence une potentialisation modérée de l'activité. Cependant, cette amélioration de l'activité a été confirmée grâce à l'utilisation d'un second modèle, des souches résistantes à l'artémisinine, au moyen de tests évaluant la survie des parasites après de courte période d'exposition aux traitements.

2. NANOVECTEURS : PRINCIPE ET INTÉRÊT

Les nanovecteurs destinés à une application médicale sont des particules de taille nanométrique, qui ont la capacité d'encapsuler un principe actif et de le véhiculer jusqu'à sa cible. Devenus un élément clé pour la médecine du 21^{ème} siècle, ils présentent beaucoup d'avantages par rapport aux médicaments classiques, dont la distribution dans l'organisme est non ciblée. Ils permettent une augmentation de la biodisponibilité et de la stabilité du principe actif, augmentent sa concentration dans les cellules cibles et, de ce fait, diminuent sa toxicité périphérique.¹²⁴ Cette stratégie consistant à encapsuler des principes actifs afin de mieux les distribuer n'est pas uniquement le fruit de l'Homme, comme nous pouvons l'observer à maintes reprises dans la nature. Notre intérêt non dissimulé pour la pharmacognosie nous pousse à expliciter cela au travers d'un exemple de défense végétale. En effet, lorsqu'une plante est attaquée, elle va lutter pour assurer sa survie. Les métabolites dits « secondaires » incluent des molécules protectrices, qui constituent, comme nous l'avons discuté, une grande part de notre pharmacie actuelle. Ces moyens de défense doivent être transportés jusqu'à cet agent perturbateur et pour cela, les plantes utilisent notamment des exosomes, petites vésicules de tailles nanométriques, afin de les distribuer. De la même manière, la fig. 70 décrite par Thomma et Cook¹²⁵ schématise la défense d'une plante attaquée par un champignon pathogène, sécrétant des exosomes contenant de l'ARN sur sa cible afin de la neutraliser.

Exosome-delivered sRNA to a fungal pathogen

In plant cell defense to a fungal pathogen, exosomes containing sRNA are delivered to invading fungal cells. sRNAs are packed into exosomes that assemble into multivesicular bodies (MVBs) and are secreted.

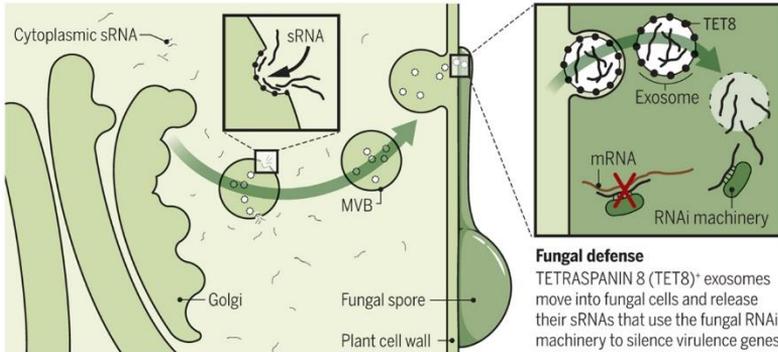


FIGURE 70 : Dans la défense des cellules végétales contre un agent pathogène fongique, des exosomes contenant de l'ARN sont administrés aux cellules fongiques envahissantes. Ils sont encapsulés dans des exosomes qui s'assemblent dans des corps multivésiculaires (MVB) et sont sécrétés. Source : Thomma & Cook.

3. NANOVECTEURS ET MALARIA

La difficulté de lutter contre le parasite responsable de la malaria, notamment face à l'apparition rapide de nouvelles résistances, ainsi que sa distribution mondiale sont autant de facteurs qui constituent un véritable frein à son éradication. Afin de poursuivre la lutte, les chercheurs doivent s'orienter vers de nouvelles molécules ou/et de nouvelles stratégies. C'est pourquoi la nanomédecine a été utilisée afin d'incorporer des principes actifs dans des systèmes biocompatibles et ciblant spécifiquement le parasite. Les objectifs sont multiples : il faut neutraliser le parasite, les rechutes, contrôler l'apparition de résistance, et diminuer la toxicité des agents utilisés.¹²⁴

3.1 LIPOSOMES

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une **double couche phospholipidique** et d'un compartiment aqueux. Leurs structures se rapprochent des **membranes biologiques**. Ces nanoparticules sont **biocompatibles** et **biodégradables**. Les interactions liposomes-membranes sont facilitées de par leur composition. Il s'agit d'un paramètre important pour la suite de notre travail, puisqu'il est bien établi que les globules rouges ont un faible processus

d'endocytose. C'est pourquoi les liposomes semblent faire partie des nanovecteurs les plus facilement adaptables à la physiopathologie de la malaria.¹²⁶ De plus, la faible toxicité (dépendante des lipides utilisés pour la formulation) de ce type de nanoparticules confère aux liposomes un intérêt particulier, ce qui fait qu'ils sont largement décrits dans la littérature.

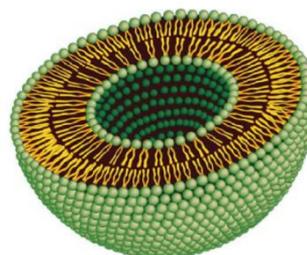


FIGURE 71 : Représentation d'un liposome. Source : Adapté à partir de Bozzuto *et al.*¹²⁷

Les liposomes ont été découverts par Alec D. Bangham dans les années 1960, à l'Université de Cambridge. Les premières formulations ont été réalisées à partir de lipides naturels. Ces nanoparticules sphériques, composées d'un compartiment aqueux et d'une ou plusieurs bicouches de lipides (fig. 71)¹²⁷ ont très vite été associées à des systèmes de délivrance de médicaments. En effet, leur morphologie ainsi que leur caractère amphiphile permettant l'incorporation de multiples substances ont fait d'eux un sujet de recherche intensif ces cinquante dernières années.¹²⁷

3.1.1 LIPOSOMES DE PREMIÈRE GÉNÉRATION

Ces liposomes sont constitués de lipides et du principe actif (fig. 72). Lorsqu'il se répand dans la circulation sanguine, il est reconnu comme élément étranger. Les opsonines (protéines destinées à mettre en évidence le non-soi) vont s'accrocher aux liposomes, qui vont alors être reconnues par les macrophages, cellules du

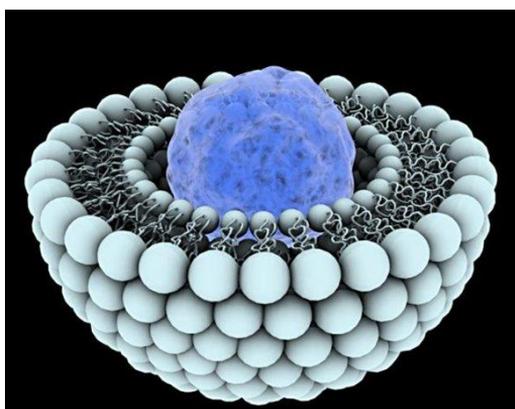


FIGURE 72 : Liposome de première génération. Source : nanotechnologieoncologie/appliquees-au-cancer/le-traitement/la-vectorisation-des-medicaments.

système immunitaire. Dans le foie, ces cellules sont les cellules de Kupffer, reconnaissant ces opsonines. Cela explique que ces liposomes soient principalement retrouvés au niveau du foie. Cette propriété a été mise à profit pour le traitement de cancer hépatique, en utilisant de la doxorubicine. Les macrophages servent alors de réservoirs médicamenteux, puisque le principe actif est libéré lors de la

lyse de la membrane liposomale par des enzymes, et s'infiltrer dans les cellules hépatiques.¹²⁸ Cependant, la reconnaissance de ces liposomes par le système immunitaire peut engendrer des effets indésirables tels qu'une pseudo-allergie liée à l'activation du complément.¹²⁹ De plus, d'autres stratégies doivent être utilisées si le foie n'est pas l'organe cible.

3.1.2 LIPOSOMES DE DEUXIÈME GÉNÉRATION

Afin de lutter contre l'opsonisation, la surface des liposomes est ici recouverte de polymères hydrophiles, principalement le polyéthylène glycol (PEG) (fig. 73). Des polymères naturels ont également démontré un intérêt comme modificateur de surface liposomale. L'héparine, par exemple, grâce à sa haute flexibilité et à son hydrophilie, réduit les interactions avec les protéines du sérum.¹³⁰ Ces polymères repoussent les protéines de l'opsonisation par un phénomène de répulsion. Ces liposomes ne sont pas reconnus par les opsonines et restent donc plus longtemps dans la circulation sanguine. Ils sont alors dits «furtifs». Ils circulent dans les vaisseaux sanguins et sont capables de s'infiltrer lorsque l'endothélium est fenestré, c'est-à-dire lorsque sa perméabilité est accrue. Ce type d'endothélium est présent dans certains tissus malades, notamment auprès des cellules tumorales. Pour ces raisons, ce type de liposome a été réalisé pour lutter contre certains cancers. Le risque principal de ces nanovecteurs est lié à la complexité de notre organisme. Des infections diverses pourraient, par exemple, entraîner une modification de la perméabilité de la barrière endothéliale. La distribution du principe actif dans les cellules saines pourrait alors engendrer des effets toxiques.

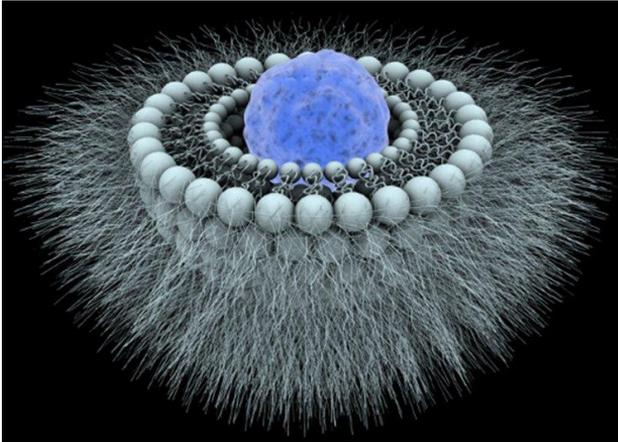


FIGURE 73 : Liposome de deuxième génération, contenant des PEG (en gris). Source : nanotechnologieoncologie/appliquees-au-cancer/le-traitement/la-vectorisation-des-medicaments.

3.1.3 LIPOSOMES DE TROISIÈME GÉNÉRATION

Les liposomes de première et de deuxième générations sont des nanovecteurs dont le ciblage est passif, puisque la délivrance du principe actif est basée sur les caractéristiques de l'environnement. Les liposomes de troisième génération (fig. 74) constituent un **ciblage actif**, par l'ajout d'un **ligand** sur le polymère qui peut **spécifiquement reconnaître** une protéine exprimée par une **cellule cible**. Cette stratégie permet de sécuriser l'utilisation des liposomes, puisque la délivrance du principe actif a lieu uniquement dans ces cellules cibles.

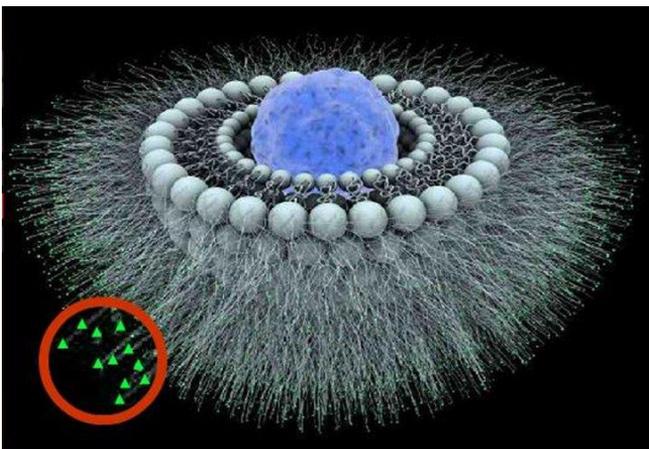


FIGURE 74 : Liposome de troisième génération, contenant des ligands (en vert). Source : nanotechnologieoncologie/appliquees-au-cancer/le-traitement/la-vectorisation-des-medicaments.

3.1.4 LIPOSOMES ET MALARIA

En ce qui concerne la malaria, les liposomes ont fait l'objet de plusieurs investigations, puisqu'ils présentent de nombreux avantages. Les liposomes dont le ciblage est passif améliorent la biodisponibilité et augmentent la concentration hépatique de certains principes actifs, ce qui est intéressant, considérant la physiopathologie de la malaria. De plus, des recherches concernant un ciblage actif des parasites, plus précisément des globules rouges infectés par le parasite, ouvrent la voie vers de nouveaux antipaludiques.

○ CIBLAGE PASSIF

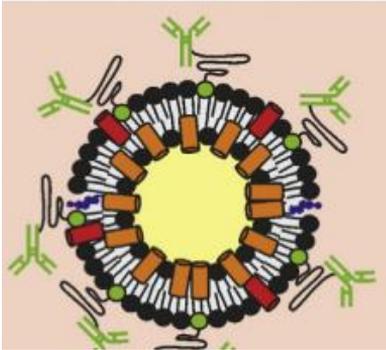
La curcumine est un polyphénol aux propriétés médicinales multiples isolée du curcuma, et présente une activité antipaludique prometteuse (*in vitro* et *in vivo*) et a été la source du développement de nouvelles applications. Comme la chloroquine, il s'agit d'un perturbateur de la détoxification de l'hème, induisant la mort du parasite.¹³¹ Bien que son activité *in vitro* soit supérieure à la chloroquine, sa faible biodisponibilité était un frein à son utilisation.

Des études *in vivo* réalisées sur souris ont démontré l'intérêt d'associer au sein d'une même formulation liposomale, la curcumine, et l'artheéther. Encapsulée seule, la curcumine démontre une réduction de parasitémie et une augmentation de la survie des souris. Combinée à l'artheéther, on observe également une prévention quant à la recrudescence du parasite.¹³²

La curcumine a également été utilisée en combinaison avec de l'artémisinine lors de la réalisation de liposomes PEGylés. Une réduction rapide de la parasitémie a été observée sur un modèle murin.¹³³

○ CIBLAGE ACTIF

Des liposomes ont ensuite été réalisés en vue de cibler spécifiquement les globules rouges parasités. Des liposomes couplés à des anticorps anti-glycophorine A, (spécifiques des glycophorines A, glycoprotéines exprimées par les globules rouges parasités) ont été utilisés dans un premier temps pour



encapsuler la **chloroquine**. Cela a augmenté quarante fois son efficacité *in vivo*, sur souris.¹³⁴ Cette formulation a ensuite été appliquée, par la même équipe, à de nouvelles molécules prometteuses, des **aminoquinoléines** et des **aminoalcools** (fig. 75).¹³⁵

FIGURE 75 : Schéma d'un liposome contenant deux principes actifs (en rouge et en orange), des PEG (en noir et vert), et des anticorps (en vert). Source : figure adaptée de Moles et al.

3.2 L'HÉPARINE

L'héparine, un anticoagulant naturel, a été découverte en 1916 à partir du foie de chien, par Jay McLean, alors étudiant en médecine à Johns Hopkins Medical School. Elle est utilisée comme anticoagulant depuis la fin des années 1930. Cette molécule appartient à la famille des glycosaminoglycans (GAGs), un groupe de polysaccharides chargés négativement. L'héparine est un polymère de taille variable, constitué essentiellement par des unités disaccharidiques trisulfatés, dont les oses constitutifs sont l'acide **L-iduronique-2-O-sulfate** (ou acide D-glucuronique-2-O-sulfate) et la **D-glucosamine-N-sulfate-6-O-sulfate**. On observe également la présence de N-acétylglucosamine (fig. 76).¹³⁶

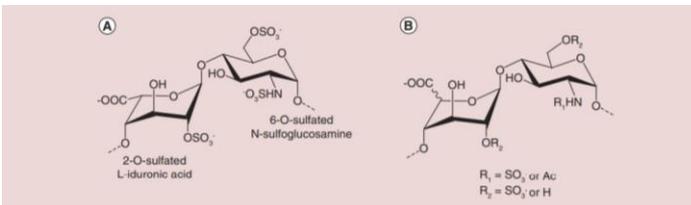


FIGURE 76 : Disaccharides formant l'héparine : disaccharide trisulfaté principale (A), disaccharide moins abondant (B). Source : Aláez-Versón *et al.*

Actuellement, l'héparine non fractionnée, ainsi que les héparines fractionnées, obtenues par hydrolyse partielle de l'héparine naturelle, sont utilisées dans le traitement et la prévention de l'embolie pulmonaire et de la phlébite, ainsi que dans les cardiopathies ischémiques. Cependant, parallèlement à ses usages thérapeutiques d'origine, d'autres potentialités thérapeutiques font surface. En effet, l'héparine est naturellement présente dans les mastocytes, et son activité anticoagulante est loin d'être sa fonction primaire. Elle a la capacité d'interagir avec un grand nombre de cibles, telles que les cytokines, les facteurs de croissance, des protéines d'adhésion, ainsi que des protéases. Puisqu'un grand nombre de molécules précitées possèdent un rôle important dans les mécanismes liés à l'inflammation, des études ont été réalisées sur des pathologies impliquant un processus inflammatoire. L'article de revue consacré à l'héparine, réalisée par Aláez-Versón *et al*¹³⁶ recense les activités étudiées prometteuses, telles que son action sur l'asthme, la fibrose kystique, la colite ulcéreuse, Alzheimer, ainsi que sur certains cancers.

3.2.1 L'HÉPARINE COMME AGENT DE MODIFICATION DE SURFACE LIPOSOMALE

Face à ce regain d'intérêt, il n'est pas étonnant de voir que l'héparine commence à être étudiée dans le domaine de la nanomédecine. La première référence bibliographique liant « héparine » et « nanomédecine » remonte à 2008, et décrit des techniques destinées à prolonger l'effet anticoagulant de l'héparine via des nanoparticules. Cependant, l'héparine a également démontré, outre ses propriétés pharmacologiques, un intérêt en tant qu'**agent de modification de surface des liposomes**. Ces propriétés seraient dues au **caractère hydrophile** de l'héparine. Stériquement stable sur le liposome, elle diminue l'interaction avec les protéines plasmatiques grâce à des **forces de répulsion**.¹³⁷ Une étude réalisée afin de comparer ces deux polymères hydrophiles présents à la surface de liposomes contenant de la doxorubicine démontre que l'héparine pourraient également protéger les liposomes des interactions avec les protéines plasmatiques, augmenter leur stabilité et leur temps de circulation *in vivo* sur souris (fig. 77).¹³⁰ Cependant, contrairement aux PEG, l'héparine est liée aux liposomes grâce à des interactions électrostatiques et non pas par liaison covalente. Une certaine toxicité pourrait donc survenir, si celle-ci était libérée dans la circulation.

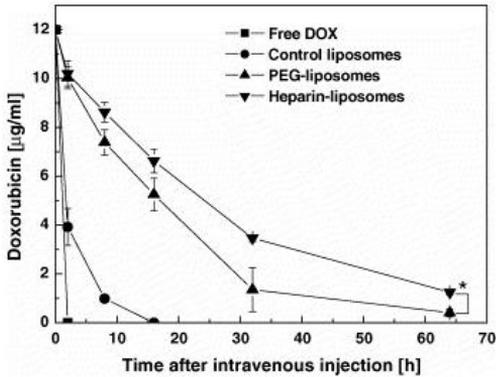


FIGURE 77 : Profils pharmacocinétiques de la doxorubicine dans diverses formulations après injection i.v sur souris. Source : Han H. *et al.*

Des modèles sont alors proposés pour le traitement de l'asthme avec des cyclodextrines héparinées,^{138,139} la régénération tissulaire (grâce à des nanostructures à base de chitosan et d'héparine contenant des cytokines)¹²², ainsi qu' osseuse (grâce à des nanocomplexes similaires, contenant des facteurs de croissance placentaires).¹⁴⁰

3.2.2 L'HÉPARINE COMME LIGAND POUR CIBLER LA MALARIA

Il a été démontré que l'héparine possédait des activités antiplasmodiales, notamment grâce au fait qu'elle représente une des principales molécules interagissant avec les globules rouges parasités. Elle a la capacité de se lier au domaine DBL de la protéine PfEMP1, compromettant ainsi son activité.²⁸ De plus, l'héparine, ainsi que d'autres GAGs, peuvent cibler la CSP, perturbant ainsi le stade primaire de l'affection palustre, la phase hépatique (fig. 78).¹⁴¹⁻¹⁴²

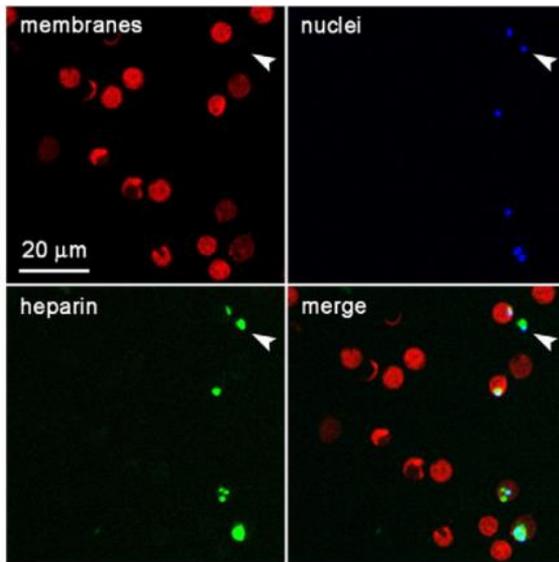


FIGURE 78 : Technique de fluorescence microscopique sur sang de souris infectées par *P. yoelii*. L'héparine cible spécifiquement les globules rouges parasités. Source : Adapté de Marques *et al.*

Son potentiel antimalarique était cependant compromis, suite à ses propriétés anticoagulantes et hémorragiques. C'est pourquoi le lien entre héparine et nanomédecine pourrait s'avérer être une avancée majeure dans la découverte de nouveaux traitements antipaludiques. Son faible coût, sa biocompatibilité, ses propriétés antiparasitaires intrinsèques en font un excellent agent antiplasmodial. De plus, les propriétés qu'elle confère aux nanoparticules en tant qu'agent de modification de surface ont poussé les chercheurs à associer ces deux précieux outils.

L'équipe du Pr. Fernandez-Busquets a pu démontrer que **remplacer les anticorps** anti-glycophorine A présents à la surface de liposomes contenant un antipaludique, **par de l'héparine** semblait tout aussi **efficace**. En effet, ils ont confirmé par des techniques de fluorescence confocales, que ces liposomes contenant de l'héparine (à des concentrations inférieures à celles induisant ses propriétés anticoagulantes) à leur surface, ciblaient spécifiquement les globules rouges infectés.¹⁴² L'héparine a été liée aux liposomes de manière électrostatique, grâce à l'incorporation d'un lipide chargé positivement dans la formulation liposomale.

C'est grâce ces travaux, que nous avons orienté les nôtres. Rappelons que notre objectif initial était de mettre en évidence de nouveaux composés

antimalariques, qui pourraient être utilisés dans le cadre de malaria compliquée, en tenant compte du fait que l'apparition de résistance mettait véritablement en danger l'utilisation des médicaments actuels. Ces éléments issus des recherches bibliographiques nous ont confortés dans l'idée d'utiliser un modèle de nanovecteur, lié à de l'héparine, afin d'encapsuler la pauptone B. D'une part, nous souhaitons diminuer drastiquement la toxicité périphérique du composé, et d'autre part, nous souhaitons obtenir un agent capable de lutter contre les formes les plus sévères de la malaria. L'utilisation de liposomes héparinés nous a donc semblée être une double approche judicieuse.

Plusieurs défis étaient à relever. Était-il possible d'encapsuler notre composé ? Pourrions-nous le quantifier et quantifier l'héparine ? Ces nanovecteurs seraient-ils efficaces sur les souches les plus résistantes ? Ce mécanisme engendrerait-il la diminution de toxicité escomptée ?

Les réponses à ces questions constituent la dernière partie de ce chapitre, sous la forme de l'article intitulé : « Natural product-based liposomes for targeted activities in the fight against Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* isolate: a tool for next-generation antimalarial drugs », soumis dans «Journal of Pharmacy and Pharmacology».

4. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE SOUMIS: "NATURAL COMPOUND-CONTAINING LIPOSOME FOR TARGET ACTIVITIES TOWARD ARTEMISININ-RESISTANT *PLASMODIUM FALCIPARUM* ISOLATE"

Cette section résume brièvement les étapes essentielles décrites dans l'article ci-après, qui a été soumis pour publication.

Suite à l'étude de toxicité réalisée sur la poupartone B, nous avons jugé opportun d'utiliser des stratégies dans le but de diminuer la toxicité de notre composé d'intérêt, tout en augmentant son efficacité.

Afin d'atteindre ce double objectif, nous avons utilisé certaines propriétés des globules rouges infectés par *P. falciparum*, afin de mieux les cibler par la poupartone B. Nous avons développé des nanovecteurs, alliant les propriétés des liposomes et de l'héparine pour vectoriser la poupartone B. En effet, lorsqu'un globule rouge est parasité par *P. falciparum*, comme expliqué précédemment, il exprime à sa surface des protéines parasites, afin de permettre aux parasites d'optimiser leur survie. Parmi celles-ci, la protéine PfEMP1 a la capacité de se lier à de nombreux récepteurs endothéliaux, et également aux glycosaminoglycans, comme l'héparine.²¹

Des études réalisées par le centre « Nanomalaria » à Barcelone, par l'équipe dirigée par le Pr. Fernandez-Busquets avaient mis en évidence l'intérêt d'utiliser un nanovecteur (les liposomes) recouvert d'héparine (liée de manière électrostatique) pour améliorer l'activité d'antipaludiques commercialisés (tels que la primaquine).

Nous nous sommes appuyés sur ces études en vue d'améliorer l'activité antiplasmodiale de la poupartone B, notamment sur une souche partiellement résistante à l'artémisinine, mais également et principalement dans le but de diminuer sa toxicité. Nous avons réalisé plusieurs formulations, modulant les proportions de lipides et avons sélectionné celle présentant les paramètres les plus intéressants. Les liposomes constitués ont alors été caractérisés avant les tests pharmacologiques. Afin de s'assurer de la quantité réelle d'héparine présente au sein de la surface des liposomes, un dosage indirect par RMN du proton a été réalisé sur les liquides de lavages des liposomes. L'héparine à la surface des liposomes a été quantifiée à 25 µg par 20 mM de lipides liposomaux,

contenant 0.8 mM de poupartone B. Une prévalidation de la méthode analytique permettant la quantification de la poupartone B au sein de la matrice liposomale a été effectuée, dans le but de nous assurer de la validité des résultats biologiques obtenus.

Les liposomes contenant la poupartone B entourés (ou non) d'héparine, ainsi que la poupartone seule ont alors été testés *in vitro* sur *P. falciparum* 3D7, ainsi que sur une souche de *P. falciparum* IPC 3445, souche partiellement résistante à l'artémisinine. Ces résultats indiquent une tendance à l'augmentation de l'activité lorsque la poupartone B est encapsulée dans les liposomes entourés d'héparine. Nous observons également une diminution de la toxicité, observée sur cellules HeLa (tableau 3).

TABLEAU 3 : résumé des IC₅₀ obtenues avec les liposomes héparinés contenant la poupartone B et les non héparinés contenant la poupartone B, sur *P. falciparum* et cellules HeLa (n=3).

	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (µg/mL) 3D7 IPC 3445	Cytotoxicité IC ₅₀ (µg/mL) HeLa
Poupartone B	0.69 ± 0.20 0.40 ± 0.15	1.44 ± 0.34
Liposomes contenant la poupartone, sans héparine	0.86 ± 0.26 0.61 ± 0.19	3.88 ± 0.60
Liposomes contenant la poupartone B et 1.3 µg heparine/mM de lipides	0.41 ± 0.01 0.35 ± 0.08	2.52 ± 0.02

Afin de valider ces résultats, un test antiplasmodial différent a été réalisé en vue de confirmer l'amélioration de l'activité induite par la formulation liposomale via le test de survie des anneaux 'Ring stage Survival Assay'. A la différence des tests classiques, le temps de contact avec le produit testé est plus court (6h à la place de 48h). Il permet d'apprécier le pourcentage des parasites qui ont été capables de poursuivre leur cycle, malgré le contact avec la drogue. Ces tests ont confirmé l'amélioration de l'activité, puisque plus de 60% des parasites ont

survécu au contact de la poupartone B seule, alors que moins de 40% en ont été capables avec la formulation liposomale.

Afin de confirmer la diminution de cytotoxicité observée sur les cellules HeLa, des tests sur larves de zebrafish ont été entrepris. Au bout de trois jours de traitement, seules 10% des larves ont survécu à des doses de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de poupartone B, alors que cette même dose encapsulée dans les nanovecteurs a permis la survie de plus de 80% des larves. Malheureusement, la formulation liposomale n'a pas pu prévenir le taux de mortalité important des larves à des doses de poupartone de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, marquant la limite de notre modèle. Cependant, cela indique que la poupartone B, malgré qu'elle ait été encapsulée à l'intérieur des liposomes, a été capable d'atteindre les larves.

5. NATURAL COMPOUND-CONTAINING LIPOSOME FOR TARGET ACTIVITIES TOWARD ARTEMISININ-RESISTANT *PLASMODIUM FALCIPARUM* ISOLATE.”

5.1 MATERIALS AND METHODS

Except where otherwise indicated, all lipid materials were purchased from Avanti Polar Lipids (Delfzyl, The Netherlands) and all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). The poupartone B was isolated from the leaves of *P. borbonica*, as previously described by our team (purity > 98% according to HPLC analysis).⁷⁰

5.1.1 LIPOSOMES PREPARATION

Liposomes were prepared by *lipid film hydration method*.¹⁴³ Different formulations (with and without bounded heparin) were performed based on the protocol described by Marques *et al.*¹⁴² Briefly, lipids (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate, DOTAP (4% molar); 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC (76% molar); Cholesterol (20% molar) (ovine wool, >98%)) were dissolved with poupartone B in chloroform (20 mM total lipids with a poupartone B concentration of 2.6 mM). The organic solvent was removed by rotary evaporation under reduced pressure at 37°C to yield a lipid film. The film was hydrated with 1.0 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Liposomes were formed by vortexing and downsized by extrusion through 100 nm polycarbonate membranes (5 times on 400 nm, 3 times on 200 nm and 3 times on 100 nm). Liposomes were purified 3 times by ultracentrifugation at 35.000 RPM at 4°C during 2 hours by cycle (Beckman Coulter, Optima L-90K). Heparin was electrostatically bounded to cationic liposomes by addition of proportional 100 to 150 µg heparin / mL PBS for 20mM of lipids liposomes preparation containing 4% DOTAP. The unbound heparin was removed by ultracentrifugation with the same conditions described for the purification and all the supernatants were collected for NMR quantification. Liposomes size, polydispersity index (PDI) and zeta potential were obtained by dynamic light scattering (DLS) technic using Malvern Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Encapsulated poupartone B was quantified by an

HPLC-DAD method. Except where otherwise indicated, the term “formulation” is used to designate the liposomes containing poupartone B and bounded heparin.

5.1.2 Poupartone B QUANTIFICATION

Analytical HPLC was carried on an Agilent 1100 Series at a flow rate of 1mL/min. RP select B LiChrospher 60 (250 x 4.6 mm) column was selected. A mobile phase composed of formic acid 0.1% in water and methanol was used in gradient mode (40:60 to 0:100 v/v in 30 min). The UV-Vis detector was set at 254 nm. The HPLC-DAD method was subjected to evaluation. The following criteria were investigated: linearity, trueness, precision, accuracy, limits of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Pre-validation of the method was performed on two series with three independent replicates at three concentrations (20 µg, 50 µg, 100 µg in the presence of 20mM lipids such as in liposome preparation) over a period of 2 days, Data processing was performed with Enoval 4.1 software.

When the formulation were analysed, a calibration curve was performed for each quantification. Liposomes were diluted 10 times in MeOH and destroyed by ultra-sonication before being injected in HPLC for poupartone B quantification.

5.1.3 HEPARIN NMR QUANTIFICATION

¹H NMR spectra were recorded in D₂O on a Bruker Avance spectrometer operating at 500.13 MHz equipped with a cryoprobe. Maleic acid was used as internal standard for 1D experiment quantification. All spectra were calibrated with internal sodium 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-d₄-propionate at 0.00 ppm chemical shift. All the supernatants collected during the liposome preparation were gathered and lyophilized. The lyophilizate was dissolved in D₂O and 700 µL of this solution were taken to quantify the heparin that had not bound to the liposomes. The amount of heparin bound to the liposomes was deduced by the difference between what was initially introduced and what was not bound.

5.1.4 IN VITRO ANTIPLASMODIAL ACTIVITIES

Continuous *in vitro* cultures of asexual erythrocyte stages of *P. falciparum*, chloroquine-sensitive strain 3D7 (originally isolated from a patient living near Schipol airport in the Netherlands)¹⁴⁴ and artemisinin partial-resistant strain IPC 3445 (originally isolated from a patient in western Cambodia in 2010)¹⁴⁵ were maintained following the procedure of Trager and Jensen.⁵ Strains were obtained

from ATCC, Bei Resources. The host cells were human red blood cells (A+). The culture medium comprised RPMI 1640 (Gibco, Fisher Scientific, Loughborough, UK) containing NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM) and L-glutamine. The medium was supplemented with 1.76 g/L of glucose (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium), 44 mg/mL of hypoxanthine (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium), 100 mg/L of gentamycin (Gibco, Fisher Scientific, Loughborough, UK) and 10% human pooled serum (A+), as previously described.^{70,72}

Liposome tested solutions were directly diluted with the medium; each test sample was applied in a series of eight 2-fold dilutions in a 96-well plate and tested in triplicate (concentration tested was calculated in µg/ml of poupartone B). The parasitemia was 2%, and the hematocrit was 1%, as previously described.¹⁴⁶ Parasite growth was estimated after 48 h incubation by the determination of lactate dehydrogenase (pLDH) activity, according to the methods described by Makler et al.⁶⁴ Artemisinin (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium) at an initial concentration of 100 ng/mL was used as positive control in all experiments. IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) values were calculated from sigmoidal curves.

5.1.5 RING-STAGE SURVIVAL ASSAY (RSA 0-3H)

Ring-Stage Survival Assays were performed on artemisinin partial-resistant strain IPC 3445 as previously described by Witkowski et al.¹⁴⁷ and Baumgärtner et al.¹⁴⁸

Briefly, zero to 3h post-invasion ring stages were adjusted to 2% haematocrit and 1% parasitaemia. 900µL of this solution were added to 100µL of solutions containing DHA (700 nM) or poupartone B (2.6 µM) or liposome formulation (2.6 µM of poupartone B). Tests were performed into 48-well plates and exposed for 6 h. Afterwards, cultures were transferred to 15 mL tubes and were centrifuged at 800 G for 5 minutes. The blood pellets were dispersed in medium (10 mL) in a cleaning step. After removing the drug, the red blood cells were dispersed with 1 mL of culture media. They were transferred to new wells for a 66h incubation period. The survival percentage was established by comparing the number of the iRBC in thin blood smears to that of the drug-free dimethylsulfoxide (DMSO) incubation.

5.1.6 *IN VITRO* CYTOTOXIC ACTIVITY

Assays were performed on HeLa cells to evaluate the cytotoxicity potential of the formulation and the compound alone. Compounds were tested in 96-well microplates using the tetrazolium salt WST-1 (Roche Diagnostics Belgium, Vilvoorde, Belgium) colorimetric assay based on the cleavage of the reagent by mitochondrial succinate-tetrazolium reductase in living cells. Tests were performed as previously described.⁷⁰ Briefly, cells (6000) were seeded per well in 200 μ L of medium supplemented with adequate concentrations of the tested drugs. After 48 h of incubation, 10 μ L of WST-1 was added to each well. After 30 min at 37°C, the plates were shaken, and absorbance values were recorded at 450 nm. The absorbance values were expressed in percentage terms compared to untreated control cells. IC₅₀ values were calculated from graphs. The HeLa cells were obtained from the Laboratory of Medical Chemistry, GIGA, ULg.

5.1.7 *IN VITRO* HEMOLYTIC ACTIVITY

A red blood cell suspension (A+, 10% in PBS (v/ v)) was incubated with poupartone B and liposomal formulation, in triplicate. The final concentrations were 5 μ g/mL for the poupartone B (with and without formulation) and the corresponding formulation without the active compound. After agitation at room temperature for 1 h, the mixtures were centrifuged for 5 min at 2000 rpm, and 150 μ L of each supernatant was transferred to a 96-microwell plate to measure the absorbance (OD) at 550 nm with a microplate reader. The positive control was Triton X-100 1% (v/v) and PBS as the negative control. The percentage of red blood cell lysis (H) was calculated as follows: $H = (OD_{550 \text{ nm sample}} - OD_{550 \text{ nm PBS}}) / (OD_{550 \text{ nm Triton X-100 1\% (v/v)}} - OD_{550 \text{ nm PBS}})$, as previously described.⁷⁰

5.1.8 SELECTIVITY INDEX

The selectivity index was obtained as the ratio of IC₅₀ between the cytotoxic activity on HeLa cells and 3D7 or IPC 3445 parasitic activities.

5.1.9 ZEBRAFISH EMBRYOS ACUTE TOXICITY TEST

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were maintained while fulfilling the criteria of the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals at the University of Liège. They were maintained at 28°C on a 14 h day/10 h night period, and fertilized eggs

were collected, washed with sterile water and placed in Petri dishes. Embryos were collected, and their chorions were not removed. As the range of concentrations to be used to determine LC₅₀ (half maximal lethal exposure concentration) for poupartones had already been highlighted⁷⁰, the narrower geometric series was performed without first carrying out the logarithmic concentrations series test⁸⁷ to avoid wasting fish uselessly. Poupartone B was dissolved in DMSO solution and was diluted with the medium used for zebrafish. The exposure concentrations of poupartone B were between 1 and 15 µg/mL. The DMSO final highest concentration was 0.4%. The liposome formulations were directly dissolved in the medium used for zebrafish. Twenty embryos were used per condition in a 6-well plate. Each well contained 5 mL of the treatment dose, which was replaced once daily for three days. The embryos were observed each day until 72 hfp (hours post fertilisation). Twenty embryos were used as control, twenty were used to control the solvent (DMSO, 0.4%) and another twenty were used to control the formulation (liposome + heparin) without including poupartone B

5.2 RESULTS AND DISCUSSION

5.2.1 CHARACTERIZATION OF LIPOSOMES

Liposome formulations containing 20% cholesterol, 76% DOPC and 4% DOTAP (molar ratios) combined with poupartone B (1.0 mg for 20.0mM lipids) and 100 µg/mL heparin presented the most interesting parameters in terms of size, charge and PDI. According to the Light Scattering analysis, the liposome size was 183 ± 22 nm and 256 ± 2 nm before and after heparin addition, respectively. The PDI was lower than 0.1 and, as a result, suitable for medical use.¹²⁷ Zeta potential was 16.6 ± 1.7 mV before the addition of heparin and decreased to 11.8 ± 1.4 mV after its electrostatic bounding. The fact that the charge remained positive, making this a cationic liposome, is an advantage, because these are known to be preferably endocytosed by targeted cells, as they are more attracted by the negatively-charged cell membrane, improving the cellular concentration of the molecule of interest.^{127,149}

5.2.2 PRE-VALIDATION OF HPLC METHOD TO QUANTIFY poupartone B IN LIPOSOMES

The pre-validation of the analytical procedure allows verifying the method's ability to accurately quantify the poupartone B in the liposome formulation. Linearity, trueness, precision, accuracy, LOD and LOQ¹⁵⁰ were evaluated and are presented in table 8.

TABLE 8 : Pre-validation results (k= number of series; n= number of replicates per series).

Trueness (µg/mL) (k=2, n=3)	Relative bias (%)	
20	-2.69	
50	-1.73	
100	-0.32	
Linearity		
Slope	1.502 ; 1.513	
Intercept	-2.946 ; -4.131	
r ²	0.9920 ; 0.9994	
Precision	Repeatability RSD (%)	Intermediate precision RSD (%)
20	1.7	2.4
50	1.7	1.9
100	0.7	0.7
LOQ (µg/mL)	20	
LOD (µg/mL)	5.3	

The accuracy acceptance limits were set at 15%, as per usual for isolated natural compounds. The upper and lower β -expectation tolerance limits never exceeded the acceptance limits (fig. 80).

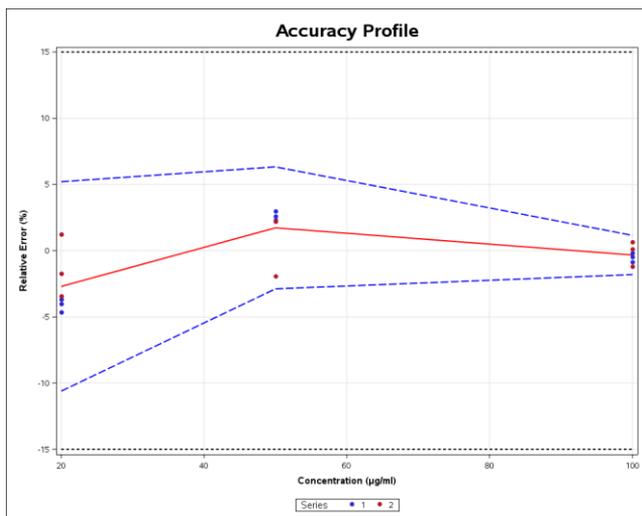


FIGURE 79 : Accuracy profile obtained considering a linear regression for poupartone B; plain line: relative bias, dashed lines: β -expectation tolerance limits, dotted lines: acceptance limits, and dots: relative back-calculated concentrations.

Considering those results, HPLC method was found to fulfill its objective that is the accurate quantification of poupartone B in liposomal matrix.

5.2.3 Poupartone B QUANTIFICATION

Liposomes were diluted ten times before injection in HPLC. Using a calibration curve, the formulation was found to contain $304 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ ($797.46 \pm 8 \mu\text{M}$) of poupartone B in the 20 mM of liposomes. The high activity of the compound allows the use of a low concentration of product.

5.2.4 HEPARIN QUANTIFICATION

The quantification of the heparin on the liposomes surface was performed indirectly, since the quantity incorporated was below the detection limit of several tested techniques. Alcian Blue method¹⁵¹ was tested, but it was not sensitive enough to obtain repeatable results. Hence, the method used was ^1H NMR performed on the lyophilized supernatants, which contained the heparin that was not incorporated in the liposome formulation. Maleic acid 5 mM solution in D_2O was used, as reference. The signal around 1.9 ppm is the proton signal from the acetyl group of the sugars in the heparin molecule. Through the integration of the maleic acid and the control of heparin, the average percentage of heparin was $25.78 \pm 0.63\%$. This corresponds to $25.78 \mu\text{g}$ of heparin on

liposomes 'surfaces (20 mM total lipids, 0.80 mM of poupartone B) disperse in 1.0 mL of PBS. Considering the IC₅₀ of poupartone B (1.81 μM)⁷⁰, this quantity is thought to be adequate, as it stays within the interval of concentrations, used by Marques *et al.*, for targeting activities.¹⁴²

5.2.5 ANTIPLASMODIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES

According to the results described in Table 9, the formulation with poupartone B and heparin seems to be more active than the compound alone, as much on Chloroquine-sensitive strain 3D7 as on the artemisinin-resistant strain IPC 3445. This trend suggests the liposome intracellular delivery of the poupartone B to the iRBC and that the improvement is due to the heparin. The decrease of toxicity on non-vascular human cells HeLa, which were used previously to highlight the toxicity of poupartones' compounds⁷⁰, reinforced the idea that this improvement of activities only occurred on iRBC, and thus confirmed the applicability of heparin as a targeting ligand to iRBC. These elements together are encouraging, increasing the selectivity index from two times (on IPC strain) to three times (on 3D7 strain) for the poupartone B/heparin liposome formulation. The formulation could be a good solution to avoid the compounds inherent toxicity.

TABLE 9 : Antiplasmodial and cytotoxic activities of poupartone B, empty liposomes, and liposomes containing poupartone B with or without heparin. NA = Non-active. NT = Not treated

Samples	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (n=3) 3D7 IPC 3445	Cytotoxicity IC ₅₀ (µg/mL) (n=2) HeLa	Selectivity index (SI)		Hemolysis (%)
			HeLa/3D7	HeLa/IPC 3445	
Poupartone B	0.69 ± 0.20	1.44 ± 0.34	2.09		< 1%
	0.40 ± 0.15		3.60		
Formulation without poupartone B	NA	NA	NA		< 1%
	NA				
Formulation poupartone B-Liposome without heparin addition	0.86 ± 0.26	3.88 ± 0.60**	4.51		< 1%
	0.61 ± 0.19		6.36		
Formulation poupartone B-Liposome added with 1.3 µg heparin/mM liposomes' lipids	0.41 ± 0.01*	2.52 ± 0.02**	6.15		< 1%
	0.35 ± 0.08		7.20		
Artemisinin	0.004±0.001	NT	-		NT

*P value < 0.05, compared to the administration of the formulation without heparin; **p value < 0.02 compared to the administration of poupartone B without any formulation.

5.2.6 RING-STAGE SURVIVAL ASSAY (RSA 0-3H)

Prolonged parasite clearance times with artemisinin derivatives were reported in Southeast Asia, suggesting a presence of artemisinin resistance phenotype. It was observed that the ring-stage parasites were able to develop a quiescent state. This mechanism was associated with a mutation in the Kelch 13 propeller domain.¹⁵² In reality, the use of conventional methods, such as pLDH assay⁶⁴, to evaluate the IC₅₀ of drugs cannot discriminate the artemisinin-resistant strain from the susceptible one after artemisinin administration.¹⁴⁸ In order to correlate survival of parasites *in vitro* with the time of parasitic clearance observable *in vivo*, Ring-stage Survival Assay was developed by Witkowski *et al.*¹⁴⁷ Indeed, a short pulse of DHA treatment during the early ring stage of the erythrocyte phase allows to observe differences in susceptibility between the sensitive strain and the K13 mutant.¹⁴⁷ Synchronized young ring parasites were exposed to drugs during 6h, in correlation to the DHA's half-life. After the washing step, they were grown in medium for 66h to evaluate recrudescence. The parasitic growth was assessed by microscopic analysis.

The percentages of parasite' survivals exposed to DHA, poupartone B and to the formulation containing poupartone B with heparin are shown in Fig. 81 poupartone B and the formulation were tested at the same concentration, corresponding to the IC₅₀ of poupartone B, as established by a conventional method, of 1 µg/mL (2.6µM). This way, approximately half of the parasite's population is left and the test is able to establish the difference of survivability of the *Plasmodium* artemisinin-resistant strain, between the compound alone and the formulation.

The formulation showed an approximately 1.6-fold increase in potency compared to the poupartone B alone, supporting the fact that liposomes' formulation is able to improve the activity by concentrating poupartone B in the red blood cell rapidly. As a whole, these results are encouraging for further investigation, considering the liposomal system is able to deliver the compound in short pulse time (<6h).

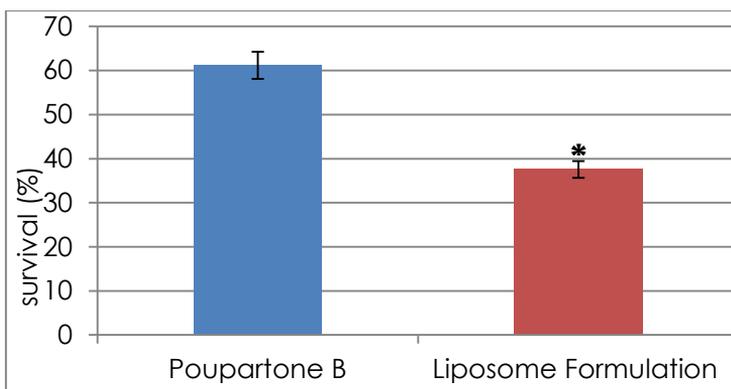


FIGURE 80 : Survival rate of parasites in the RSA test (%), with treatment dose of 2.6 μ M of poupartone B and liposomes containing 2.6 μ M of poupartone B with heparin, *p value < 0.003.

5.2.7 CYTOTOXIC ACTIVITY ON ZEBRAFISH LARVA

The *Zebrafish* Embryo Acute Toxicity Test was used to observe the reduction of toxicity obtained by the nanovectorization. Zebrafish embryo and larvae are easily obtained in high quantities and the transparency of the embryos, such as the possibility to use mutant's fluorescent larvae, is convenient for investigating the causes of toxicity. Even if this model cannot replace rodents, they are very useful to qualitatively compare toxicity of drugs in the early stages of research. poupartone B and the liposome formulation were tested and the comparisons between the survivals were observed at 24hpf, 48hpf and 72hpf (fig. 82) after the first treatment administration. After 24h, both populations were alive. The survival rate at 10 and 5 μ g/ml exposure concentrations differ greatly between the poupartone B and the formulation. With 5 μ g/mL of poupartone B, half of the larvae were dead at 72h, which accounts for a LC_{50} of 5 μ g/mL. With 10 μ g/mL of liposomes 'formulation, only 2 larvae died, thus the LC_{50} is set between 10 and 15 μ g/mL.

At the end of the test, with 10 μ g/mL of exposure concentration, more than 80% of the larvae were alive with the formulation while only 10% survived with the compound alone, which accounts for a major difference in survivability. All the population died at an exposure concentration of 15 μ g/mL. Even if the survival rate was improved with the formulation, morphological alterations, such as the disappearance of somite, necrosis in the tail, smaller size, cardiac toxicity, and abnormal movements, once outside the chorion were observed in both populations.

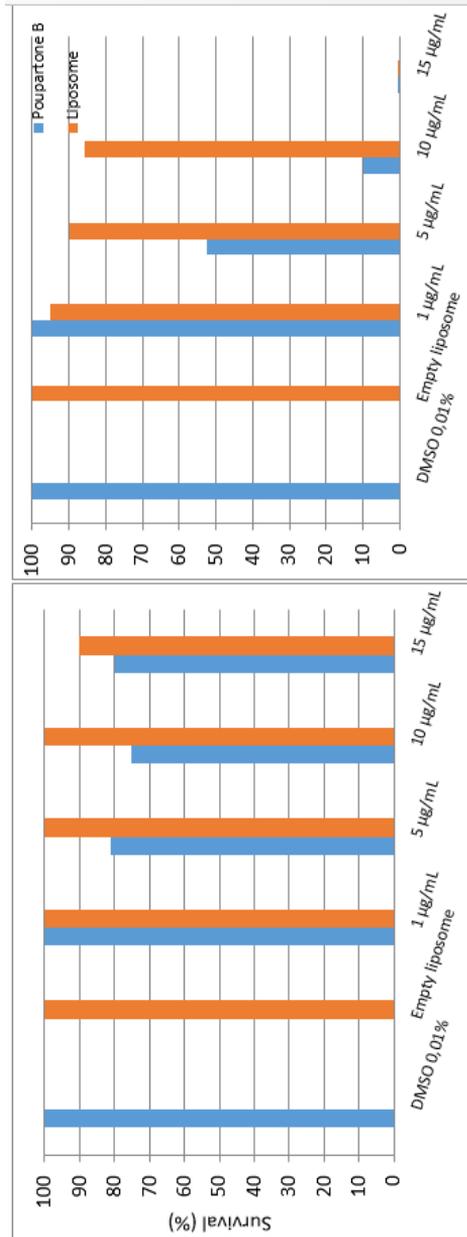


FIGURE 81 : Survival (%) of the zebrafish at 48 and 72h exposed to the control (DMSO 0.01%, in blue), the liposomes containing heparin without Poupartone B (Empty liposome, in red), a concentration range (1 to 15 µg/mL) of poupartone B (1-15µg/mL, in blue) and liposomes containing the same quantity of poupartone B with heparin (1-15µg/mL, in red). Test was performed once, each condition contained 20 larvae.

5.3 CONCLUSION

In this study, a targeted nanovectorization approach based on Marques *et al* results¹⁴² was tested for the administration of a natural antimalarial cytotoxic compound, pauptone B. The results showed a decrease of toxicity and an improvement of the activity. Additionally, the RSA_{0-3h}, which is able to predict the potency of compounds against artemisinin-resistant parasites in malaria patients¹⁴⁸, also demonstrated the potent activity of the heparin targeted liposomes towards an artemisinin-resistant isolate, compared to pauptone B alone. Furthermore, it confirmed that this formulation was able to kill resistant parasites, even with a short drugs' contact time. Cytotoxicity tests confirmed the decrease of toxicity by the formulation with both HeLa cells *in vitro* and *Zebrafish* embryos model.

These data indicate that this efficient heparin targeted nanovectorization system could be successfully applied against artemisinin-resistant *P. falciparum*, even with a narrow therapeutic index compound. In this research, the erythrocytic stage of malaria was the exclusive phase investigated. Other studies have demonstrated that heparin can also target different *P. falciparum* stages, such as the sexual stage in mosquitoes. This might pave the way for multiple approaches on where to proceed with these studies.

Nanotechnology will be a key player in the fight against the occurrence of drugs resistance, especially for malaria, where new treatments are urgently needed.

CHAPITRE 6: DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La malaria est présente depuis plusieurs milliers d'années, emportant de nombreuses vies sur son passage. Bien qu'elle ait été éradiquée dans l'hémisphère nord grâce à l'utilisation massive d'insecticides, le drainage des gîtes larvaires, la bonne observance des traitements et surtout grâce à la rudesse du climat, qui joue en sa défaveur, la malaria continue de toucher les parties les plus pauvres du monde. Les années 2000 à 2010 ont été marquées par des progrès gargantuesques, réduisant d'un quart la mortalité palustre. Malheureusement, plusieurs facteurs ont participé à la chute vertigineuse de ces progrès. La réorientation des ressources financières allouées au paludisme, ballotées aux flux des changements de paradigme, est à pointer du doigt. Cela impacte directement la prévention, le diagnostic rapide, ainsi que l'accès aux médicaments adaptés et de qualité. Cependant, ce n'est pas la seule ombre au tableau. Le parasite lui-même est un ennemi redoutable. Armé de trois types d'ADN différents, il s'adapte, évolue et mute. Tous ces facteurs amènent systématiquement au fait que nous sommes face au même schéma : la découverte d'un antimalarique prometteur, une vague de succès, l'apparition de résistances et cela nous ramène à la case départ.

Avec le temps et l'expérience, nous avons appris que face à ce dangereux adversaire, nous devons adapter également nos démarches, les faire évoluer de manière parallèle afin d'enfin éradiquer ce fléau. L'actuelle association de plusieurs antimalariques, comme les Combinaisons à base d'Artémisinine (ACT), est un exemple. Cependant, des résistances à l'artémisinine ont déjà été observées en Asie et menacent sérieusement l'efficacité de ces traitements.⁴⁶

Face à l'apparition de ces résistances, il est utile de rechercher de nouveaux principes actifs et il est rationnel de se tourner vers la nature, puisqu'elle constitue une véritable panacée concernant les molécules antiparasitaires.¹⁵³ De plus, mettre en avant la valeur d'une plante en voie d'extinction, grâce à la richesse de ses composés, est un élément qui peut conscientiser et appuyer les politiques de sauvegarde et de préservation des espèces concernées.

Nous avons donc besoin de nouvelles molécules... mais pas seulement ! D'une part, il faut obtenir des nouveaux agents capables de lutter contre les souches les plus résistantes et, d'autre part, il faut s'assurer que ces agents ne permettent pas aux *Plasmodium* de développer des résistances, grâce à la mise en place de techniques innovantes.

C'est dans cette optique que ces travaux de thèse ont été réalisés. Le point de départ était de valoriser la flore réunionnaise en mettant en évidence des plantes endémiques aux potentialités thérapeutiques multiples. Le second défi consistait à sélectionner les plantes les plus prometteuses et d'en isoler les molécules actives. Plusieurs embûches nous ont fait obstacle, notamment la toxicité observée des molécules isolées. Cependant, ces difficultés se sont transformées en véritables défis, puisque non seulement nous devons nous assurer de leur efficacité envers les souches résistantes, mais nous devons également lutter contre leur toxicité intrinsèque. Ces contraintes nous ont poussées à utiliser des stratégies qui constituent maintenant des moyens nouveaux d'atteindre notre but. Ce véritable et non négligeable troisième objectif était donc d'aborder la toxicité de ces produits et de la contourner en ciblant spécifiquement les parasites.

Ces travaux de thèses nous ont permis de répondre à plusieurs questions :

- **Quelles sont les plantes endémiques des Mascareignes présentant une réelle activité sur *P. falciparum* ?**

Lors du screening réalisé, nous avons souligné l'intérêt de six plantes dont l'activité antiplasmodiale était prometteuse ($IC_{50} < 15\mu\text{g/mL}$), dont le *Casearia coriacea*, le *Monimia rotundifolia*, le *Psiadia retusa*, le *Vernonia fimbriifera*, le *Zanthoxylum heterophyllum* et le *Poupartia borbonica*. Le *Poupartia borbonica* a été sélectionné pour plusieurs raisons. La plus décisive fut sans nul doute sa haute activité ($IC_{50} < 5\mu\text{g/mL}$). Le fait que cette plante était très peu étudiée sur le plan pharmaco-chimique a également été un paramètre pris en compte. La présence d'activité uniquement dans les parties feuillues était également un élément déterminant. Il était impensable de détruire ou d'abîmer cette plante en danger d'extinction en prélevant son écorce ou ses racines. Et c'est également parce qu'elle est en danger que cette plante a été sélectionnée. En effet, conserver cette espèce et la protéger n'est plus seulement un devoir éthique,

mais une nécessité scientifique ! Nous nous devons d'encourager sa préservation, puisque actuellement, cette plante est cultivée, en collection *ex-situ* à la Réunion, par le Conservatoire Botanique National de Mascarin (CBNM), l'Office Nationale des Forêts (ONF) ou l'Université de la Réunion, dans un but de sauvegarde. A noter également que cette plante est protégée par l'arrêté ministériel du 6 février 1987, puisqu'il s'agit d'une espèce rare.⁸³

La mise en place du protocole de Nagoya, qui concerne l'utilisation des ressources génétiques, ainsi que des connaissances traditionnelles qui y sont associées, (complétant ainsi le dispositif de la Convention sur la Biodiversité Biologique) pourrait également être un élément important dans la protection des espèces menacées. En effet, entré en vigueur en octobre 2014, ce protocole promeut l'Accès et le Partage des Avantages, permettant au Pays détenteurs de la ressource de profiter des bénéfices financiers (droits de collecte, redevances,...) ainsi que non financiers (informations sur la biodiversité, résultats de recherche, gestion des ressources,...) obtenus par un tiers dans un autre état. Les objectifs de ce protocole sont nombreux. Nous citerons ici celui d'éviter l'accaparement abusif des ressources et leurs exploitations, ainsi que celui de conscientiser les intervenants quant à la conservation de ce patrimoine.¹⁵⁴

Bien que notre étude ait débuté avant la mise en place légale de ce protocole, nos recherches ont été orientées dans ce sens, en encourageant nos collaborations et en partageant nos résultats, afin de compléter et d'alimenter les connaissances scientifiques des plantes étudiées.

- Quelles sont les molécules actives du *Poupartia borbonica* ?

L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des feuilles nous a permis de mettre en évidence plusieurs flavonoïdes et acides phénols connus dans d'autres plantes, tels que l'isoquercitrin, le quercitrin, la quercétine, et l'acide ellagique, possédant des activités antiplasmodiales modérées à prometteuses. La découverte d'un flavonoïde plus particulier, la 3'-O-hydroxysulfonylquercétine nous a causé des difficultés. En effet, plusieurs tentatives destinées à isoler ce deuxième pic majoritaire de l'extrait nous laissaient perplexes, puisqu'une fois isolé, le composé se transformait en quercétine. Des analyses de spectrométrie de masse avant l'évaporation du solvant d'extraction nous ont donné un indice de taille : nous observions la présence d'un ion de m/z 383 qui représentait à peu

près 5% du pic majoritaire, de m/z 381, ce qui nous a indiqué la présence probable de soufre dans la molécule. Afin de ne pas dégrader l'échantillon, le TFA a été éliminé par extraction liquide-liquide, et le solvant a ensuite été sublimé par lyophilisation. Nous avons alors pu éviter la dégradation de notre composé et réaliser les tests nécessaires à son identification structurale.

Le fractionnement bioguidé réalisé sur les extraits apolaires du *P. borbonica*, nous a permis de mettre en évidence trois nouveaux composés, alors inconnus dans la littérature, les poupartones A, B et C. Leurs activités antiplasmodiales étaient très intéressantes ($IC_{50} < 2 \mu m$). Les structures de ces composés ont été définies grâce à des techniques de Résonance Magnétique Nucléaire, ainsi que de Spectrométrie de Masse. La configuration absolue de ces molécules a été obtenue grâce à la modélisation moléculaire et au Dichroïsme Circulaire. La position de la double liaison présente sur les chaînes aliphatiques des poupartones A et C a été déterminée grâce à une dérivatisation de ces composés soumis ensuite à des techniques de GC-MS. La poupartone majoritaire, la poupartone A, a été testée *in vivo* sur modèle murin. Nous avons pu confirmer son potentiel antipaludique, puisqu'une dose de 15mg/kg a permis une réduction de la parasitémie de presque 70%, 7 jours après l'infection. Cependant, une certaine toxicité a été observée. Des tests ont été réalisés *in vitro* sur cellules saines et cancéreuses, ainsi que sur Zebrafish. Nous avons pu observer des anomalies cardiaques chez les larves de Zebrafish, ainsi qu'une nécrose tissulaire importante.

- Peut-on lier la toxicité des poupartones à la toxicité d'autres dérivés d'alkylphénols ?

La toxicité des poupartones nous a beaucoup interpellée, puisque leur potentiel antipaludique était vraiment intéressant. Des recherches bibliographiques concernant des composés similaires nous ont permis de mettre en évidence des molécules proches possédant également des activités antiparasitaires et cytotoxiques. L'étude structure-activité semble indiquer que la présence d'hydroxyle(s) sur la partie polaire de ce type de molécules est importante pour la toxicité, alors que la partie qui semble être responsable de l'activité est la cétone α,β insaturée. Nous avons également pu constater que ce type de molécules était fréquemment rencontré dans la famille des Anacardiaceae. Une

des classes toxiques les plus étudiées de cette famille concerne l'urushiol, qui induit notamment des dermatites importantes.¹¹² La littérature nous a indiqué que sa cytotoxicité induisait des phénomènes particuliers sur des cellules, tels que la formation de vacuoles, et de blebs.¹¹⁴ Afin d'argumenter la discussion sur la relation entre la structure et l'activité de ce type de composé, nous avons soumis la poupartone B (la poupartone obtenue avec le meilleur rendement), à des tests sur plusieurs modèles. Tout d'abord, des tests de toxicité cellulaire réalisés avec des techniques d'imagerie en temps réel, ont révélé le caractère particulièrement agressif de la poupartone envers les cellules de mélanome. Très vite, ces cellules se sont rétractées, ont formé des blebs et ont perdu toute vitalité. La toxicité était différente sur les cellules de cancer mammaire. Les cellules semblaient être atteintes moins rapidement, et les plus résistantes ont formé des vacuoles transitoires qui les a semble-t-il protégées. Puisque certaines souris avaient perdu la vie soudainement lors des tests *in vivo*, en dépit de l'amélioration flagrante de la parasitémie, nous avons décidé de vérifier l'absence de toxicité cardiaque et musculaire. Pour ce faire, deux modèles de larves de Zebrafish ont été utilisés, un premier qui exprimait une fluorescence au niveau musculaire et un second qui exprimait une fluorescence au niveau vasculaire. Cependant, aucun de ces modèles ne nous a permis de mettre en évidence une toxicité spécifique. Bien que l'atteinte cardiaque soit réelle, elle semble être la conséquence de la détérioration de l'état général de la larve. Cependant, tous les modèles ont présenté la même atteinte rapide : une dermatite agressive.

- Peut-on à la fois contourner cette toxicité et exacerber l'activité antiplasmodiale ?

Afin de contourner cette toxicité, nous avons décidé d'utiliser un système couplant nanoparticules et héparine décrit dans la littérature. Nous avons sélectionné ce modèle pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le choix des nanovecteurs (les liposomes) a été réalisé en considérant les nombreux avantages qu'ils comportaient. Ils sont peu toxiques, biocompatibles et biodégradables. De plus, ils permettent d'encapsuler un grand nombre de molécules différentes. Leurs structures, proches des membranes biologiques, facilitent les processus d'endocytose, beaucoup plus difficile pour un globule rouge que pour une cellule classique. Les propriétés physico-chimiques des

poupartones, présentant une partie polaire et une chaîne apolaire nous paraissaient particulièrement adaptées à ce type de formulation. L'héparine a été utilisée pour ses propriétés multiples : pour stabiliser les liposomes, ainsi que pour cibler spécifiquement les globules rouges parasités, puisque les capacités de l'héparine à reconnaître précisément ces derniers étaient bien documentées dans la littérature. De plus, le fait qu'elle soit naturellement présente dans le corps est un avantage en ce qui concerne sa biocompatibilité. Son coût a également été un argument de choix par rapport aux techniques utilisant des anticorps, puisque nous devons sélectionner des méthodes qui aboutiraient à la réalisation de médicaments moins onéreux. De plus, des études ont démontré qu'il n'y a pas de résistance du *Plasmodium* envers l'héparine, même lorsqu'on le soumet à des administrations répétées.¹⁵⁵

L'encapsulation du composé a été une réussite. Nous avons réalisé plusieurs formulations différentes, et nous avons sélectionné celle dont les paramètres nous semblaient les plus prometteurs. La charge ne devait pas être trop haute, le liposome sans la poupartone ne devait pas présenter de toxicité et la taille ainsi que l'index de polydispersité devaient être suffisamment petits. Notre formulation sélectionnée, nous avons entrepris de la tester sur plusieurs modèles. Les tests *in vitro* sur cellules et *Plasmodium* nous ont permis de constater une légère amélioration de l'activité et une légère diminution de la toxicité. Toutefois, ces résultats étaient à confirmer, puisque la différence d'IC₅₀ n'était pas significative. Afin de valider la diminution de toxicité, nous avons à nouveau utilisé des larves de Zebrafish. Les résultats ont appuyé les premières observations que nous avons réalisées sur cellules, puisque le taux de survie des larves à la fin du test passait de 10% avec la poupartone B seule à plus de 80% lorsqu'elle était encapsulée dans les liposomes héparinés. Nous avons ensuite entrepris de tester ces liposomes versus le composé seul sur un autre modèle de *Plasmodium in vitro*. Nous avons utilisé une souche résistante à l'artémisinine pour effectuer le test de « Survie des Anneaux ». Contrairement aux tests classiques, celui-ci s'effectue avec un temps de contact de drogue beaucoup plus court (6h à la place de 48h) et évalue ensuite la survie des parasites, une fois lavés de la drogue. Cela permet de mimer, *in vitro*, les résistances à l'artémisinine observées *in vivo* chez les patients. Nous avons pu constater qu'à une concentration sélectionnée pour permettre la survie d'approximativement la

moitié des parasites (IC_{50}), plus de 60% des parasites ont survécu avec la poupartone seule, alors que seulement moins de 40% en ont été capables après 6h de contact avec la formulation héparinée. Non seulement la formulation diminue la toxicité, mais elle améliore l'activité antiparasitaire, même sur les souches résistantes à l'artémisinine. De plus, nous avons pu constater la rapidité d'action du produit, puisqu'il a atteint en seulement 6h, la même gamme d'activité que ce que nous observons aux mêmes concentrations sur un test classique, où la drogue reste en contact avec les *Plasmodium* durant 48h.

- Quelles sont les perspectives de ces travaux ?

Tout d'abord, en ce qui concerne les poupartones, la littérature et les relations structures/activités qui en découlent nous laissent penser qu'une héli-synthèse de ce type de composés, avec moins de groupements hydroxyles pourrait être une piste exploitable. Cela permettrait de confirmer les hypothèses avancées et ouvrirait la voie vers une nouvelle classe de composés antimalariques utilisables, les poupartones étudiées dans ce travail étant malheureusement trop toxiques pour une application en thérapie humaine dans le cadre de la malaria. Cependant, les tests préliminaires effectués sur cellules cancéreuses nous indiquent que ces agents pourraient avoir un intérêt dans le domaine de la cancérologie, principalement contre les mélanomes. Des tests complémentaires sont nécessaires. Il serait également utile en parallèle de promouvoir les cultures *in vitro* de *Poupartia borbonica* en vue de la réimplanter dans son milieu naturel. Incontestablement, ce milieu si particulier doit avant tout être protégé, sans quoi une ré-introduction de l'espèce n'est pas possible. Il serait également très intéressant de pouvoir déterminer si cette plante, lorsqu'elle est cultivée en milieu contrôlé, est toujours capable de synthétiser ces dérivés d'alkylcyclohexénones antimalariques, alors qu'elle n'est plus soumise à la rudesse de son environnement. Des études complémentaires à ce sujet sont nécessaires.

En ce qui concerne la réalisation de nanoparticules héparinées, nous avons pu démontrer qu'en plus de la potentialisation d'action que cela engendrait, nous observons une diminution de la toxicité du composé. Malgré cette réduction de la nocivité de la poupartone par cette approche nanotechnologique, celle-ci reste trop toxique que pour être utilisée chez l'Homme. Cependant l'intérêt de

nos travaux est d'avoir confirmé que ce modèle était applicable à de nouveaux produits naturels et pourrait s'appliquer aux dérivés hémisynthétiques envisagés ci dessus. De plus, un autre point important qui n'avait pas encore fait l'objet d'investigation dans la littérature est que ce nanovecteur est également efficace pour cibler de nouvelles molécules naturelles sur des souches de *Plasmodium* résistantes à l'artémisinine. Dans une époque où ce paramètre est une condition *sine qua non* pour la découverte de nouveaux agents, c'est un élément important. A l'avenir, il serait utile de tester à nouveau nos nanovecteurs sur des cellules humaines saines telles que des cellules endothéliales, afin de mimer plus justement ce qu'il pourrait se passer lors d'une administration *in vivo*. En effet, les cellules utilisées dans notre étude sont principalement des cellules issues de lignées cancéreuses, d'origines différentes en fonction des disponibilités. Il serait également intéressant de réaliser l'autopsie des souris traitées pour tenter de mieux expliquer la toxicité observée.

Le fait que les GAGs soient également capables de cibler spécifiquement le stade du *Plasmodium* chez l'Anophèle donne lieu à des perspectives intéressantes. En effet, il pourrait être envisagé d'utiliser des molécules encapsulées dans des liposomes présentant des GAGs à leurs surfaces afin de cibler le parasite chez le moustique. Ce genre d'approche pourrait être moins onéreux que la mise en place d'un nouveau médicament à usage humain. De plus, tuer le parasite à la place du vecteur nous paraît être une solution plus sûre écologiquement. De fait, éliminer entièrement une espèce d'insectes avec des insecticides ou des inductions de mutations génétiques stérilisantes, pourrait avoir des conséquences sur la faune et la flore que nous ne sommes pas capables de prédire.

En poursuivant la discussion dans cette voie, il nous semblerait également utile de mettre en évidence de nouveaux types de GAGs, qui pourraient présenter de meilleures propriétés de ciblage sans posséder d'activité hémolytique intrinsèque. Un grand nombre de nouveaux glycosaminoglycans d'origine marine fait actuellement l'objet d'investigations scientifiques. Mettre en place un modèle permettant de facilement déterminer la capacité de nouveaux glycosaminoglycans comme agents de vectorisation envers les globules rouges parasités nous semble également être une perspective enthousiasmante.

A l'avenir, il sera nécessaire de nous orienter vers des travaux pluridisciplinaires, indispensables à la lutte contre le paludisme. La complexité de ce parasite impose un travail d'équipe, réunie autour d'un même objectif. C'est en collaborant que notre génération sera peut-être celle qui vaincra la malaria.

CHAPITRE 7: BIBLIOGRAPHIE

1. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. (2010).
2. Barnett, R. Malaria. *Lancet* **387**, 2495 (2016).
3. Miller, R. L. *et al.* Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 31–32 (1994).
4. Meshnick, S. R. & Dobson, M. J. The History of Antimalarial Drugs. 15–25 (2001).
5. Trager, W. & Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673–5 (1976).
6. Piperaki, E. T. & Daikos, G. L. Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance? *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 487–493 (2016).
7. WHO | World Malaria Report 2017. *WHO* (2017).
8. WHO | World Malaria Report 2011. *WHO* (2014).
9. WHO | World Malaria Report 2013. *WHO* (2014).
10. Objectifs du Millénaire pour le développement, Available at: <http://www.un.org/fr/africa/osaa/peace/mdgs.shtml>.
11. Objectifs de développement durable. Available at: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/fr/objectifs-de-developpement-durable/>. (Accessed: 14th August 2018)
12. Zachariasen Fleur. Des Objectifs du Développement Durable à la COP 21, arrêt sur les engagements de la communauté internationale pour un développement durable - Guinée 44. (2015). Available at: <http://www.cooperation-atlantique.org/spip.php?article375>. (Accessed: 14th August 2018)
13. Fullman, N. *et al.* Measuring progress and projecting attainment on the basis of past trends of the health-related Sustainable Development Goals in 188 countries: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2016 GBD 2016 SDG Collaborators. *The Lancet* **390**, (2017).
14. OMS | Prêts à vaincre le paludisme. *WHO* (2018).

15. WHO | World Malaria Report 2018. *WHO* (2018).
16. Kiszewski, A. *et al.* A global Index Representing the Stability of Malaria Transmission. **70**, 486–498 (2004).
17. Rund, S. S. C. *et al.* Daily rhythms in antennal protein and olfactory sensitivity in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* **3**, 2494 (2013).
18. OMS | Traitement préventif intermittent du paludisme (TPI) pour les femmes enceintes. *WHO* (2017).
19. Barber, B. E., *et al.* World Malaria Report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. *Malar. J.* **16**, (2017).
20. Nilsson, S. K., *et al.* Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLOS Pathog.* **11**, e1004871 (2015).
21. Storm, J. & Craig, A. G. Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 100 (2014).
22. Chen, Q., *et al.* Molecular aspects of severe malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 439–50 (2000).
23. Beeson, J. G. *et al.* Structural Basis for Binding of *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 to Chondroitin Sulfate and Placental Tissue and the Influence of Protein Polymorphisms on Binding Specificity (2007).
24. Cowman, A., *et al.* Malaria: Biology and Disease. *Cell* 610–624 (2016).
25. Ponsford, M. J. *et al.* Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* **205**, 663–671 (2012).
26. Guillotte, M. *et al.* Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* PfEMP1-VarO Adhesin: Induction of Surface-Reactive and Rosette-Disrupting Antibodies to VarO Infected Erythrocytes. *PLoS One* **10**, e0134292 (2015).
27. Helms, G., *et al.* Modeling cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and leukocytes-common principles and distinctive features. *FEBS Lett.* **590**, 1955–71 (2016).

28. Juillerat, A. *et al.* Biochemical and biophysical characterisation of DBL1 α 1-varO, the rosetting domain of PfEMP1 from the VarO line of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **170**, 84–92 (2010).
29. OMS | La prise en charge du paludisme grave, guide pratique Troisieme Edition. 1–92 (2013).
30. OMS | Le rapport de l’OMS sur le paludisme indique une stagnation des progrès. Available at: <http://www.who.int/fr/news-room/detail/29-11-2017-global-response-to-malaria-at-crossroads>. (Accessed: 17th August 2018)
31. OMS | Méthodes de lutte antivectorielle complémentaires. *WHO* (2017).
32. OMS | Chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS). *WHO* (2017).
33. Henry, M., *et al.* An analysis of country adoption and implementation of the 2012 WHO recommendations for intermittent preventive treatment for pregnant women in sub-Saharan Africa. *Malar. J.* **17**, 364 (2018).
34. Yaya, S. *et al.* Use of Intermittent Preventive Treatment among Pregnant Women in Sub-Saharan Africa: Evidence from Malaria Indicator Surveys. *Trop. Med. Infect. Dis.* **3**, 18 (2018).
35. OMS | Traitement préventif intermittent chez les nourrissons (TPIIn). *WHO* (2017).
36. Olotu, A. *et al.* Four-Year Efficacy of RTS,S/AS01E and Its Interaction with Malaria Exposure. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1111–1120 (2013).
37. Pagola, S., *et al.* The structure of malaria pigment β -haematin. *Nature* **404**, 307–310 (2000).
38. Metz, J. Folic acid metabolism and malaria. in *Food and Nutrition Bulletin* **28**, S540-9 (2007).
39. Baggish, A. L. & Hill, D. R. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1163–73 (2002).
40. Menard, D. & Dondorp, A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **5**, 7,

- a0025619 (2017).
41. Campo, B., *et al.* Killing the hypnozoite--drug discovery approaches to prevent relapse in *Plasmodium vivax*. *Pathog. Glob. Health* **109**, 107–22 (2015).
 42. Gaillard, T., *et al.* Tetracyclines in malaria. *Malar. J.* **14**, 445 (2015).
 43. Briolant, S. *et al.* *Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment. *Malar. J.* **9**, 141 (2010).
 44. Bridgford, J. L. *et al.* Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat. Commun.* **9**, 3801 (2018).
 45. Witkowski, B. *et al.* Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1872–7 (2010).
 46. OMS | Riposte face à la résistance aux médicaments antipaludiques. *WHO* (2017).
 47. Atanasov, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1582–1614 (2015).
 48. Les cirques | Parc national de la Réunion. Available at: <http://www.reunion-parcnational.fr/fr/des-decouvertes/patrimoine-mondial/les-cirques>. (Accessed: 28th November 2018)
 49. Pluviométrie - Pluies extrêmes à La Réunion. Available at: <http://pluiesextremes.meteo.fr/lareunion/Pluviometrie.html>. (Accessed: 28th November 2018)
 50. Les habitats et milieux naturels | Parc national de la Réunion. Available at: <http://www.reunion-parcnational.fr/fr/des-connaissances/les-habitats-et-milieux-naturels>. (Accessed: 4th December 2018)
 51. Lavergne, R. *Le grand livre des tisaneurs et plantes médicinales indigènes l'île de la Réunion*. (Orphie, 1999).
 52. La Liste rouge de la flore vasculaire de La Réunion - UICN France. Available at: <https://uicn.fr/liste-rouge-flore-reunion/>. (Accessed:

11th December 2018)

53. Philippe, G. *et al.* In vitro screening of some *Strychnos* species for antiplasmodial activity. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 535–539 (2005).
54. WHO | Mosquito-borne diseases. (2017).
55. WHO | World Malaria Report 2016. *WHO* 186 (2016).
56. Zahari, A. *et al.* In vitro antiplasmodial and antioxidant activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Alseodaphne corneri* Kosterm. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **9**, 328–332 (2016).
57. Wada, Y. *et al.* Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. **505**, 102–112 (2017).
58. Lani, R. *et al.* Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Res.* **133**, 50–61 (2016).
59. WHO | *Centre des médias Chikungunya*. (2016).
60. S. Giraud-Techer, *et al.* Plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée française. *Ethnopharmacologia* **56**, 7–33 (2016).
61. Smadja, Jacqueline & Marodon, C. *Plantes médicinales de la Réunion*. (2016).
62. Bero, J., *et al.* In vivo antimalarial activity of *Keetia leucantha* twigs extracts and in vitro antiplasmodial effect of their constituents. *J. Ethnopharmacol.* **149**, 176–183 (2013).
63. Murebwayire, *et al.* Antiplasmodial and antitrypanosomal activity of *Triclisia saclexii* (Pierre) Diels. *Phytomedicine* **15**, 728–733 (2008).
64. Makler, M. T. *et al.* Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**, 739–41 (1993).
65. Techer, S. *et al.* Tonantzitlolones from *Stillingia lineata* ssp. *lineata* as potential inhibitors of chikungunya virus. *Phytochem. Lett.* **12**, 313–319 (2015).
66. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal.*

- Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
67. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–7 (1999).
 68. Ou, B., *et al.* Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **49**, 4619–4626 (2001).
 69. Ledoux, A. *et al.* Phytochemical Profile and Biological Activity Evaluation of *Zanthoxylum heterophyllum* Leaves against Malaria. *Planta Medica Lett.* **2**, (2015).
 70. Ledoux, A. *et al.* Antimalarial Activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives Isolated from the Leaves of *Poupartia borbonica*. *J. Nat. Prod.* **80**, 1750–1757 (2017).
 71. Toyang, N. J. & Verpoorte, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **146**, 681–723 (2013).
 72. Bordignon, A. *et al.* *In vitro* antiplasmodial and cytotoxic activities of sesquiterpene lactones from *Vernonia fimbrillifera* Less. (Asteraceae). *Nat. Prod. Res.* 1–4 (2017). doi:10.1080/14786419.2017.1350665
 73. Jonville, M. C. *et al.* Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. *J. Ethnopharmacol.* **136**, 525–531 (2011).
 74. Hirunwong, C., *et al.* Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Toddalia asiatica*. *Phytochem. Lett.* **17**, 242–246 (2016).
 75. Olivon, F. *et al.* Antiviral Activity of Flexibilane and Tigliane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J. Nat. Prod.* **78**, 1119–1128 (2015).
 76. Corlay, N. *et al.* Tigliane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of chikungunya virus replication. *Fitoterapia* **97**, 87–91 (2014).
 77. Gopalsamy, *et al.* Saponins from leaves of *Aphloia theiformis*. *Phytochemistry* **27**, 3593–3595 (1988).

78. Carene, M. *et al.* Multiple pharmacological targets, cytotoxicity, and phytochemical profile of *Aphloia theiformis* (Vahl.) Benn. (2017).
79. Lohezic, F., *et al.* *In-vitro* Antiherpetic Activity of *Erythroxylon laurifolium* (Erythroxylaceae). *Pharm. Pharmacol. Commun.* **5**, 249–253 (1999).
80. Bero, J., *et al.* Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 1401–1433 (2009).
81. Gathirwa, J. W., *et al.* The *in vitro* anti-plasmodial and *in vivo* anti-malarial efficacy of combinations of some medicinal plants used traditionally for treatment of malaria by the Meru community in Kenya. *J. Ethnopharmacol.* **115**, 223–231 (2008).
82. Encyclopédie Larousse en ligne - Philibert Commerson. Available at: https://www.larousse.fr/encyclopedie/personnage/Philibert_Commerson/114232. (Accessed: 12th December 2018)
83. Burst, M. & Lavergne, C. *Plan National d'Action du Bois Blanc Rouge 2012-2016, Poupertia borbonica*. (2011).
84. Mansour, M. P., *et al.* High contents of 24:6(n-3) and 20:1(n-13) fatty acids in the brittle star *Amphiura elandiformis* from Tasmanian coastal sediments. *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 659–674 (2005).
85. Roumy, V., *et al.* Four anti-protozoal and anti-bacterial compounds from *Tapirira guianensis*. *Phytochemistry* **70**, 305–311 (2009).
86. Jansen, O., *et al.* Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15- O-acetate as the main active compound. *Malar. J.* **11**, 289 (2012).
87. Ali, S., *et al.* Large-Scale Assessment of the Zebrafish Embryo as a Possible Predictive Model in Toxicity Testing. *PLoS One* **6**, e21076 (2011).
88. Frédéricich, M., *et al.* Antiplasmodial Activity of Alkaloids from Various *Strychnos* Species. (2002).
89. W, P., *et al.* The chemotherapy of rodent malaria. XLVI. Reversal of mefloquine resistance in rodent *Plasmodium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **85**, 5–10 (1991).

90. Fidock, D., *et al.* Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 509–520 (2004).
91. Barron, D., *et al.* Sulphated flavonoids—an update. *Phytochemistry* **27**, 2375–2395 (1988).
92. Varin, L. & Ibrahim, R. K. Partial Purification and Some Properties of Flavonol 7-Sulfotransferase from *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* **95**, 1254–8 (1991).
93. Barron, D. & Ibrahim, R. K. Ombuin 3-sulphate from *Flaveria chloraefolia*. *Phytochemistry* **27**, 2362–2363 (1988).
94. Krepsky, P. B., *et al.* Quercetin-3-sulfate: A chemical marker for *Cuphea carthagenensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**, 125–127 (2010).
95. O’Leary, K. A., *et al.* Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 479–91 (2003).
96. D’Andrea, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* **106**, 256–71 (2015).
97. Gupta, A., *et al.* Quercetin: A wonder bioflavonoid with therapeutic potential in disease management. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **6**, 248–252 (2016).
98. Helgren, T. R., *et al.* The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 327–332 (2015).
99. Murakami, N., *et al.* New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis* folium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2445–2447 (2001).
100. Verotta, L. *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Tristaniaopsis* species and identification of the active constituents: ellagic acid and 3,4,5-trimethoxyphenyl-(6’-O-galloyl)-O-beta-D-glucopyranoside. *J. Nat. Prod.* **64**, 603–7 (2001).
101. David, J. M., *et al.* New cytotoxic compounds from *Tapirira guianensis*. *J. Nat. Prod.* **61**, 287–289 (1998).

102. Grimblat, N., *et al.* Beyond DP4: an Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. *J. Org. Chem.* **80**, 12526–12534 (2015).
103. Correia, S. D. J., *et al.* Alkyl phenols and derivatives from *Tapirira obtusa*. *Phytochemistry* **56**, 781–784 (2001).
104. Saitta, M., *et al.* Characterisation of alkylphenols in pistachio (*Pistacia vera* L.) kernels. *Food Chem.* **117**, 451–455 (2009).
105. 1733748A, C. Cyclohexenone analog bicyclo (condensed ring) compound and its preparation method and uses. (2005).
106. Deharo, E. & Ginsburg, H. Analysis of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts. *Malar. J.* **10**, S5 (2011).
107. Bian, W. P. & Pei, D. S. in *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* (ed. Gupta, R. C.) 333–339 (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-12-802147-7.00025-5
108. Cotelli, F., *et al.* Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*). *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **99**, 70–78 (1988).
109. Mccollum, C. W., *et al.* Developmental toxicity screening in zebrafish. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **93**, 67–114 (2011).
110. Banzouzi, J.-T. *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. *J. Ethnopharmacol.* **81**, 399–401 (2002).
111. Aronson, J. K. & Meyler, L. *Meyler's side effects of drugs : the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*.
112. Patel, S. & Rauf, A. Oleoresin urushiol: Can its immunogenicity be exploited for healthcare? (2018). doi:10.1016/j.biopha.2018.02.087
113. Baer, H., *et al.* Chemistry and immunochemistry of poisonous *Anacardiaceae*. *Clin. Dermatol.* **4**, 152–159 (1986).

114. Kim, S., *et al.* Urushiol Induces Apoptosis via a p53-dependent Pathway in Human Gastric Cancer Cells. *J. cancer Prev.* **18**, 169–76 (2013).
115. Jeong, S., *et al.* Preparation and the antioxidant and antibacterial activities of urushiol powders (YPUOH). *Prog. Org. Coatings* **77**, 981–987 (2014).
116. Cho, J. Y., *et al.* Antimicrobial activity of the synthesized non-allergenic urushiol derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1915–1918 (2015).
117. Otto, A., *et al.* Structure and Absolute Configuration of Pseudohygrophorones A ¹² and B ¹² , Alkyl Cyclohexenone Derivatives from *Hygrophorus abieticola* (Basidiomycetes). *J. Nat. Prod.* **79**, 74–80 (2016).
118. Okoth, D. A., *et al.* Alkyl phenols, alkenyl cyclohexenones and other phytochemical constituents from *Lannea rivaie* (chiiov) Sacleux (*Anacardiaceae*) and their bioactivity. *Med. Chem. Res.* **25**, 690–703 (2016).
119. Yaouba, S., *et al.* Alkenyl cyclohexanone derivatives from *Lannea rivaie* and *Lannea schweinfurthii*. *Phytochem. Lett.* **23**, 141–148 (2017).
120. Shubin, A. V, *et al.* Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* **7**, 55863–55889 (2016).
121. Aki, T., *et al.* Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biol. Toxicol.* **28**, 125–131 (2012).
122. Wang, W.-B. *et al.* Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2196–2206 (2012).
123. Suk, K. T. *et al.* *In vitro* antibacterial and morphological effects of the urushiol component of the sap of the Korean lacquer tree (*Rhus vernicifera* Stokes) on *Helicobacter pylori*. *J. Korean Med. Sci.* **25**, 399–404 (2010).
124. Aditya, N. P., *et al.* Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Adv. Colloid Interface Sci.* **201–202**, 1–17 (2013).

125. Thomma, *et al.* Targeting microbial pathogens. *Science* (80-.). **360**, 1070–1071 (2018).
126. Urban, P. & Fernandez-Busquets, X. Nanomedicine Against Malaria. *Curr. Med. Chem.* **21**, 605–629 (2014).
127. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).
128. La vectorisation des médicaments - TPE Nanotechnologies. Available at: <https://sites.google.com/site/nanotechnologieoncologie/applique-es-au-cancer/le-traitement/la-vectorisation-des-medicaments>. (Accessed: 20th January 2019)
129. Duehrkop, C. *et al.* Development and characterization of an innovative heparin coating to stabilize and protect liposomes against adverse immune reactions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **141**, 576–583 (2016).
130. Han, H. D. *et al.* *In vivo* distribution and antitumor activity of heparin-stabilized doxorubicin-loaded liposomes. *Int. J. Pharm.* **313**, 181–188 (2006).
131. Akhtar, F., *et al.* Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured *Plasmodium yoelii* infected mice. *Biotechnol. Adv.* **30**, 310–320 (2012).
132. Aditya, N. P. *et al.* Curcuminoids-loaded liposomes in combination with arteether protects against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Exp. Parasitol.* **131**, 292–299 (2012).
133. Isacchi, B. *et al.* Artemisinin and artemisinin plus curcumin liposomal formulations: Enhanced antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei*-infected mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **80**, 528–534 (2012).
134. Moles, E. *et al.* Immunoliposome-mediated drug delivery to *Plasmodium*-infected and non-infected red blood cells as a dual therapeutic/prophylactic antimalarial strategy. *J. Control. Release* **210**, 217–229 (2015).
135. Moles, E. *et al.* ImmunoPEGliposomes for the targeted delivery of novel lipophilic drugs to red blood cells in a *falciparum* malaria

- murine model. *Biomaterials* **145**, 178–191 (2017).
136. Aláez-Versón, C. R., Lantero, E. & Fernández-Busquets, X. Heparin: new life for an old drug. *Nanomedicine* **12**, 1727–1744 (2017).
 137. Sahli, A. *et al.* The stability of heparin-coated liposomes in plasma and their effect on its coagulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **10**, (1998).
 138. Oyarzun-Ampuero, *et al.* Chitosan–hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. *Int. J. Pharm.* **381**, 122–129 (2009).
 139. Oyarzun-Ampuero, F. A., *et al.* A Potential Nanomedicine Consisting of Heparin-Loaded Polysaccharide Nanocarriers for the Treatment of Asthma. *Macromol. Biosci.* **12**, 176–183 (2012).
 140. Liu, Y. *et al.* Sustained dual release of placental growth factor-2 and bone morphogenic protein-2 from heparin-based nanocomplexes for direct osteogenesis. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 1147–58 (2016).
 141. Rathore, D. & McCutchan, T. F. Heparin can regulate the binding of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**, 253–256 (2000).
 142. Marques, J. *et al.* Application of heparin as a dual agent with antimalarial and liposome targeting activities toward *Plasmodium*-infected red blood cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 1719–1728 (2014).
 143. MacDonald, R. C. *et al.* Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297–303 (1991).
 144. BEI Reagent Search. Available at: <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIParasiticProtozoa/MRA-102.aspx>. (Accessed: 27th July 2017)
 145. BEI Reagent Search. Available at: <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIParasiticProtozoa/MRA-1236.aspx>. (Accessed: 27th July 2017)
 146. Jansen, O. *et al.* Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. *J.*

- Ethnopharmacol.* **130**, 143–150 (2010).
147. Witkowski, B. *et al.* Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 914–23 (2013).
 148. Baumgärtner, F. *et al.* *In vitro* activity of anti-malarial ozonides against an artemisinin-resistant isolate. *Malar. J.* **16**, (2017).
 149. Kang, J. H., *et al.* The Effect of Surface Charges on the Cellular Uptake of Liposomes Investigated by Live Cell Imaging. *Pharm. Res.* **34**, 704–717 (2017).
 150. Naveen, P., *et al.* Method Development and Validation for the Determination of Caffeine: An Alkaloid from *Coffea arabica* by High-performance Liquid Chromatography Method. *Pharmacognosy Res.* **10**, 88–91 (2018).
 151. Whiteman, P., *et al.* The quantitative measurement of Alcian Blue-glycosaminoglycan complexes. *Biochem. J.* **131**, 343–50 (1973).
 152. Tilley, L., *et al.* Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **32**, 682–696 (2016).
 153. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).
 154. *Mise en oeuvre du Protocole de Nagoya au Muséum d’Histoire naturelle.* Available at: https://labex-bcddiv.mnhn.fr/sites/labex-bcddiv.mnhn.fr/files/file_fields/2016/09/21/protocolenagoya-notemnhn.pdf
 155. Boyle, M. J., *et al.* Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood* **115**, 4559–68 (2010).
 156. Moustique d’anophèles image stock. Image du danger, infectieux - 46146093. Available at: <https://fr.dreamstime.com/photo-stock-moustique-d-anophèles-image46146093>. (Accessed: 14th August 2018)
 157. L.H. Bannister, *et al.* A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages. *Parasitol. Today* **16**, 427–433 (2000).

CHAPITRE 8: ANNEXES

- Liste des publications associées à ce travail
- Travaux sur le *Poupartia borbonica* non discutés dans le cadre de ce mémoire
- Publications en premier auteur
- Liste des publications en tant que co-auteur

1. PUBLICATIONS EN TANT QUE PREMIER AUTEUR FAISANT L'OBJET DE CETTE THÈSE

Ledoux A., Cao M., Jansen O., Coelho Cristino Mamede L. C., Campos P.-E., Payet B., Clerc P., Grondin I., Girard Valenciennes E., Hermann T., Litaudon M., Vanderheydt C., Delang L., Neyts J., Leyssen P., Frederich M., & Smadja J. (2018). Antiplasmodial, Anti-chikungunya virus and Antioxidant Activities of 64 endemic Plants from the Mascarene Islands. *International journal of antimicrobial agents*.

Ledoux A., St-Gelais A., Cieckiewicz E., Jansen O., Bordignon A., Illien B., Di Giovanni N., Marvilliers A., Hoareau, F. Pendeville-Samain, H. Quetin-Leclercq J., & Frederich M. (2017). Antimalarial Activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives Isolated from the Leaves of *Poupartia borbonica*. *Journal of Natural Products*, 80 (6), 1750-1757.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

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

Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands

Allison Ledoux^{a,*}, Martine Cao^{a,b}, Olivia Jansen^a, Lucia Mamede^a, Pierre-Eric Campos^c, Bertrand Payet^c, Patricia Clerc^c, Isabelle Grondin^c, Emmanuelle Girard-Valenciennes^c, Thomas Hermann^d, Marc Litaudon^e, Charlotte Vanderheydt^f, Leen Delang^e, Johan Neyts^e, Pieter Leyssen^e, Michel Frédéric^g, Jacqueline Smadja^b

^a Laboratory of Pharmacognosy, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liège, Avenue Hippocrate 15, 4000 Liège, Belgium

^b Laboratory of Pharmaceutical Technological and Biopharmacy, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liège, Avenue Hippocrate 15, 4000 Liège, Belgium

^c Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNA), University of Reunion Island, Avenue René Cassin 15, 97744 Saint-Denis, La Réunion, France

^d Parc National de La Réunion – 112, rue Sainte-Marie – 97400 Saint-Denis

^e Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^f Rega Institute for Medical Research (KU Leuven), Minderbroederstraat 10, B3000, Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 March 2018
Accepted 20 July 2018
Available online xxx

Editor: Philippe Colson

Keywords:
Chikungunya virus
Malaria
Antiplasmodial
Antioxidant

ABSTRACT

Vector-borne diseases cause more than 1 million deaths annually. The research into new medicines is urgent, especially as there is currently no specific treatment. In this study, the authors have selected 64 endemic plants from the Mascarene Islands based on their endemism, their medicinal use and their registration in the French Pharmacopeia to evaluate the antiplasmodial, anti-chikungunya and antioxidant activities. The list of these 64 plants including their local name, population, data of collection and voucher number are available in the Supporting Information. Forty active extracts were identified from the 38 species: 22 responded positively to the antiplasmodial activity, 8 to the anti-chikungunya activity and 8 to the antioxidant activity.

Six plants demonstrated high antiplasmodial activity (concentration inhibiting 50% of parasitic growth (IC₅₀) <5 µg/mL): *Casearia coriacea*, *Monimia rotundifolia*, *Pouportia borbonica*, *Psidium retusa*, *Vernonia fimbrillifera* and *Zanthoxylum heterophyllum*; and five showed high anti-chikungunya activity (IC₅₀ <20 µg/mL): *Aphloia theiformis*, *Sillinia lineata*, *Croton mauritanicus*, *Indigofera ammosylum*, and *Securinega durissima*. Eight plants displayed an important antioxidant activity, with values of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP) or oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) >2000 µM of Trolox equivalent per mg/mL of extract: *Bertiera borbonica*, *Erythroxylon laurifolium*, *Erythroxylon sideroxyloides*, *I. ammosylum*, *P. borbonica*, *Scolopia heterophylla*, *Sophora denudata*, and *Terminalia bentzoe*. Some data obtained tend to corroborate the reported traditional use of the plant, such as *Z. heterophyllum* (antiplasmodial), *A. theiformis* (anti-chikungunya), and *E. laurifolium* (antioxidant).

© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Vector-borne diseases are human pathologies caused by parasites, viruses or bacteria. According to the World Health Organization (WHO), they are responsible for more than 1 million deaths annually [1]. Mosquitoes are the most studied insects and also the

deadliest due to their ability to carry and propagate pathogens to humans. Malaria is one of the most serious vector-borne diseases, accountable for 429 000 deaths worldwide in 2016 [2]. The resistance of parasites to medicines has become a widespread problem. Malaria is the consequence of a protozoan parasite, *Plasmodium* sp., transmitted by the bite of anophelid mosquitoes. The *Plasmodium* uses a large amount of energy for survival and reproduction, increasing the production of reactive oxygen species in hosts, which can impact the general condition of patients [3]. Chikungunya is caused by a single-stranded RNA virus,

* Corresponding author. Tel.: +32 4366 43 36.

E-mail addresses: allison.ledoux@uliege.be, allison.ledoux@ulg.ac.be (A. Ledoux).

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>

0924-8579/© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Please cite this article as: A. Ledoux et al., Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, International Journal of Antimicrobial Agents (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>

chikungunya virus (CHIKV) and is transmitted to humans by the bite of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. Chikungunya is characterized by an important fever and arthralgia, which can frequently become chronic [4]. Outside the known infection areas (Africa, Islands in the Indian and Pacific Oceans, Southern Europe, and Southeast Africa), the chikungunya epidemic in 2005 that occurred in Reunion Island and its neighbors involved about one-third of the population and led to more than 250 deaths [5]. Unfortunately, there is currently no specific treatment. The use of antipyretic and analgesic helps to alleviate symptoms [6]. Antioxidant treatments can be used as adjuvant to decrease articular inflammatory pain. Vector-borne diseases are a major public health problem that makes the search for new treatment essential. Natural products are an immeasurable therapeutic potential resource for drug discovery. Recently, a review showed that more than 60% of all anti-infective (antibacterial, fungal, parasitic and viral) drugs commercialized from January 1981 to December 2014 are unaltered natural products (5.5%), natural product derivatives (35.2%), synthetic drugs with a natural product pharmacophore (18.6%) or synthetic drugs with natural product mimic (3.3%) (vaccines not included) [7]. Reunion Island is described as a biodiversity hotspot containing a high rate of endemic plants, due to its specific geomorphology and microclimate. In this work, all the plants were collected in Reunion Island based on their medicinal use, endemism and registration in the French Pharmacopoeia [8,9]. Some of the studied plants are endangered species, implying the importance of their screening to valorize their potential. We evaluated the antiplasmodial, anti-CHIKV and antioxidant activities. Only the plants that demonstrated activities in our assays are presented for the sake of clarity. The complete list of 64 plants including their local names, populations, data of collection and voucher numbers are available in the Supporting Information.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials and extraction

Sixty-four plants were collected in Reunion Island for the BIOMOL TCN project through a cooperative network of botanist collaborators. The harvests were made with best regard to the biological patrimony represented by the exceptional biodiversity of the island (Pitons, Cirques and Remparts of Reunion Island are listed in UNESCO World Heritage). The species were identified by Dominique Strasberg and Jacques Foumel (University of Reunion) and by Hermann Thomas (Parc National de La Réunion). A voucher specimen of each species was deposited in the University Herbarium. The plants were air-dried at room temperature with no direct sunlight and then pulverized using an electrical grinder. Extracts were prepared with 5 g of powdered dried material in 50 mL of solvent (ethyl acetate – EtOAc) using an ASE 300 system (Accelerated Solvent Extraction). The EtOAc extracts were then submitted on a small-cartridge polyamide filtration to remove tannins and then weighed and stored in appropriate vials. The filtrates were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure at 40°C. These extracts were evaluated for their antiplasmodial and anti-chikungunya activities.

For the antioxidant activity assays, the plants were dried in an oven at 45°C and crushed. All extractions were also performed using the ASE 300 system. Approximately 50 g of plant powder was extracted using 100-mL stainless steel cells. Five static cycles of 6 min followed by 2 min of purge with pressurized nitrogen (10 bars) were performed at 40°C, 100 bars leading to approximately 180 mL of extract. The solvent of extraction was EtOAc for all the extracts. These extracts were concentrated and dried on rotary evaporator (Büchi).

2.2. Antiplasmodial assays

Continuous in vitro cultures of asexual erythrocyte stages of *P. falciparum*, chloroquine-sensitive strain 3D7 were maintained following the procedure of Trager and Jensen [10]. The strain was obtained from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, MR4. The host cells were human red blood cells (A+). The culture medium composed of RPMI 1640 (Gibco, Fisher) containing NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM) and L-glutamine, was supplemented with 1.76 g/L of glucose (Sigma-Aldrich), 44 mg/mL of hypoxanthin (Sigma-Aldrich), 100 mg/L of gentamicin (Gibco) and 10% human pooled serum (A+), as previously described [11].

Each crude extract was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) or in EtOH/DMSO [1:1], according to their solubility, at a concentration of 10 mg/mL. The solutions of tested extracts were diluted in the medium; each test sample was applied in a series of 8 two-fold dilutions in a 96-well plate and tested in triplicate. The parasitemia was 2%, and the hematocrit was 1%, as described by Murebwayire et al. [12]. The highest concentration of solvent to which the parasites were exposed was 1% (which is devoid of toxicity). The *P. falciparum* culture was placed in contact for 48 h. Parasite growth was estimated by colorimetric revelation with the measurement of absorbance at 630 nm by the determination of lactate dehydrogenase (pLDH) activity, according to the methods described by Makler et al. [13]. Artemisinin (Sigma-Aldrich) at an initial concentration of 100 ng/mL was used as positive control in all experiments. IC₅₀ (concentration inhibiting 50% of parasitic growth) values were calculated from graphs.

2.3. Anti-chikungunya assay

CHIKV causes a pronounced cytopathic effect in cell, such as Vero cells, which served as a starting point for the optimization of a virus-cell-based screening assay employing the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) method [14]. Following the microtiter plate readout, assay conditions can be quickly and automatically sorted as inactive/toxic (no increase in optical density (OD) at 493 nm) or with potential antiviral activity (an increase greater than 50% in OD compared with the control conditions). However, and this was expected based on prior experience with the screening of complex samples, a high initial positives rate was obtained (up to 10%). To discriminate true hits from false positives, a microscopic quality-control step was introduced: only samples that completely inhibited virus-induced cell death without causing an adverse effect on the host cell and monolayer morphology were retained for further study.

The same assay was used to guide the fractionation process, in the end yielding selective inhibitors of CHIKV replication. The eight plant extracts from Reunion presenting selective antiviral activity were submitted to bioassay-guided fractionation in order to identify some active molecules.

Serial dilutions of extracts, fractions or compounds were prepared in assay medium (MEM Rega3 (Cat. N19993013; Invitrogen), 2% FCS (Integro), 5 mL 200 mM L-glutamine, and 5 mL 7.5% sodium bicarbonate) that was added to empty wells of a 96-well microtiter plate (Falcon, BD). Subsequently, 50 µL of virus dilution in assay medium was added, followed by 50 µL of a cell suspension. This suspension, with a cell density of 25 000 cells/50 µL, was prepared from a Vero cell line sub-cultured in cell growth medium (MEM Rega3 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 5 mL L-glutamine, and 5 mL sodium bicarbonate) at a ratio of 1:4 and grown for 7 days in 150-cm² tissue culture flasks (Techno Plastic Products). The assay plates were placed in the incubator for 6–7 days (37°C, 5% CO₂, 95–99% relative humidity), a time at which maximal virus-induced cell death or cytopathic effect (CPE)

Please cite this article as: A. Ledoux et al., Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, International Journal of Antimicrobial Agents (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>

is observed in untreated, infected controls. The assay medium was then aspirated, replaced with 75 μ L of a 5% MTS (Promega) solution in phenol-red-free medium and incubated for 1.5 h. The absorbance was measured at a wavelength of 498 nm (Safire2, Tecan); and optical densities reached values between 0.6 and 0.8 for the untreated, uninfected controls. Raw data was converted to percentage of controls and the EC₅₀ (50% effective concentration or concentration which is calculated to inhibit virus induced cell death by 50%) and CC₅₀ (50% anti-metabolic concentration or concentration calculated to inhibit the overall cell metabolism by 50%) were derived from the dose–response curves. The selectivity index (SI) is calculated as CC₅₀/EC₅₀ and is used as an indication for the antiviral potential of a compound: the larger this value is, the larger is the therapeutic window or the distance between the concentration of compound having a pronounced antiviral effect and causing an adverse effect on the host cell. All assay conditions producing an antiviral effect exceeding 50% were checked microscopically for minor signs of CPE or adverse effects on the host cell (i.e. altered cell morphology). A compound is considered to elicit a selective antiviral effect on virus replication only if, following microscopic quality control, and at least at one concentration of compound, no CPE or any adverse effect is observed.

2.4. Antioxidant assays

Extracts were solubilized at a concentration of 1 mg/mL in EtOAc for the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assays and in methanol for oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. For these three tests, if the results obtained were out of the Trolox range, the extracts were two-fold diluted and the test repeated.

FRAP assay

The method described by Benzie and Strain [15] was used. It is based on the reduction of a ferric (III) complex to its colored ferrous (II) form in the presence of antioxidants. The FRAP reagent was prepared with three solutions as follows: acetate buffer at pH 3.6 (3.1 g of C₂H₃NaO₂ · 3H₂O and 16 mL C₂H₄O₂ per liter of buffer solution); 10 mmol/L solution of tripyridyltriazine (TPTZ) in 40 mmol/L HCl; and 20 mmol/L solution of FeCl₃ · 6H₂O. The working solution was prepared by mixing 10 mL of acetate buffer, 1 mL of TPTZ solution and 1 mL of FeCl₃ · 6H₂O solution. For the preparation of Trolox standards, 0.250 g of Trolox was dissolved in 50 mL of methanol to give a 0.02 M solution. This solution was diluted with methanol to prepare a standard range between 800 and 25 μ M. For the assay, 10 μ L of the extract at a concentration of 1 mg/mL was introduced into a 96-well microplate with 290 μ L of FRAP reagent. After 1 h of incubation at 37°C, the absorbance was measured at 593 nm. Trolox equivalents of samples were calculated with a calibration curve of pure Trolox in acetate buffer.

ABTS radical scavenging activity

We used the method described by Re et al. [16]. ABTS radical cation (ABTS⁺) was produced by the reaction between ABTS and potassium persulfate. ABTS was dissolved in water to a 7 mM concentration (19.2 mg of ABTS in 5 mL of water) and added to 5 mL of a 2.45 mM solution of potassium persulfate. The mixture was left in the dark at room temperature for 12–16 h before use in order to obtain the maximal absorbance of the solution. The ABTS⁺ solution was diluted with methanol to obtain an absorbance of 0.70 (\pm 0.2) at 734 nm and equilibrated at 30°C. Trolox standards were prepared as explained above. The solution was diluted with methanol to prepare a standard range between 400 and 25 μ M. For the assay, 20 μ L of the extract at a concentration of 1 mg/mL were introduced into a 96-well microplate with 280 μ L of the ABTS⁺

solution. The absorbance was measured at 734 nm after 5 min of incubation at 30°C. Trolox equivalents of samples were calculated with a calibration curve of pure Trolox in methanol.

ORAC assay

As described in the method developed by Ou et al. [17], the AAPH reagent solution was prepared just before use and kept on ice due to the instability of the radical. AAPH (0.414 g) was dissolved in 10 mL of 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) to a final concentration of 153 mM. Fluorescein stock solution (4.19 \times 10⁻³ mM) was prepared in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) and kept at 4°C in dark condition. The 8.16 \times 10⁻⁵ mM fresh fluorescein working solution was made daily from the stock solution in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). Trolox standards were prepared as described hereinabove and the solution was diluted with methanol to prepare a standard range between 75 and 6.25 μ M. For the assay, 25 μ L of sample at a concentration of 1 mg/mL were introduced in each well into a 96-well microplate with 150 μ L of the fluorescein solution. A total of 25 μ L of AAPH (153 mM) was added to each well with the injector of the spectrophotometer and the fluorescence was recorded every minute for 100 min. The area under the curve (AUC) was determined automatically for each sample and each Trolox concentration. Standard curve was established by plotting AUC vs. Trolox concentrations. Antioxidant activity was expressed as micromoles of Trolox equivalent per mg/mL of extract.

2.5. Statistical Analysis

The experimental results were expressed as an average of three replicates in each case. For all samples, the Trolox equivalent was calculated for 1 mg/mL of extract with a calibration curve of Trolox according to the concentration. For each point of the standard range, four replications were performed.

3. Results and Discussion

Concerning the screening of the crude extracts for antiplasmodial activity, 17 plant extracts showed moderate activity with an IC₅₀ of between 15 and 50 μ g/mL. The bark extract of *Casearia coriacea* and six leaf extracts displayed promising activity with an IC₅₀ < 15 μ g/mL: *C. coriacea*, *Monimia rontundifolia*, *Poupartia borbonica*, *Psidia retusa*, *Vernonia fimbriifera* and *Zanthoxylum heterophyllum*. These results are detailed in Table 1. The most interesting extracts were obtained from *C. coriacea* (IC₅₀ ~5 μ g/mL), *P. borbonica* (IC₅₀ < 5 μ g/mL) and *V. fimbriifera* (IC₅₀ = 5.2 μ g/mL \pm 1.3 for the leaf extracts). As far as we know, these three plants have never been either phytochemically or pharmacologically studied. Our team further investigated these plants and discovered that hydroxy- γ -isosanshool was the main active compound of the extract of *Z. heterophyllum*, with IC₅₀ corresponding to 11.3 \pm 1.5 μ g/mL [18] and Poupartones A, B and C (alkylphenol cyclohexenones derivatives, with IC₅₀ < 1 μ g/mL) in *P. borbonica*, the main antiplasmodial compounds in our *in vitro* and *in vivo* assays [19]. The use of *Z. heterophyllum* in decoction to treat fever in traditional medicine [20] may be correlated with its antiplasmodial properties. The *Vernonia* genus is known to contain vernolides, a class of sesquiterpene lactones which show interesting antiplasmodial bioactivity [21]. Three sesquiterpene lactones, namely 8-(4'-hydroxymethacrylate)-dehydromelintin, onopordopicrin and 8 α -[4'-hydroxymethacryloyloxy]-4-epi-sonchucarpolide have been isolated and identified as the main active compounds with IC₅₀ < 5 μ g/mL [22]. Leaves of *Terminalia bentosea* and *Psidia dentata* showed moderate activity (IC₅₀ of 18.7 μ g/mL \pm 10.6 and 23.0 μ g/mL \pm 3.0, respectively), challenging a previous study [23] which demonstrated the promising activity of these plants (IC₅₀ < 10 μ g/mL). This suggests that the leaves of *P. dentata* are less active

Please cite this article as: A. Ledoux et al., Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, International Journal of Antimicrobial Agents (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>

Table 1
In vitro IC₅₀ values against *Plasmodium falciparum* 3D7 strain; IC₅₀, IC₉₀, CC₅₀ and Selectivity index (SI) values against Chikungunya virus (CHIKV); 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (C₁₈H₁₆N₂O₆S₂ (NH₄)₂) radical scavenging activity (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) antioxidant activities values.

Species	Part	3D7, IC ₅₀ (µg/ml)	CHIKV, IC ₅₀ (µg/ml)	CHIKV, CC ₅₀ (µg/ml)	CHIKV, SI	ABTS (µM/mg/ml)	FRAP (µM/mg/ml)	ORAC (µM/mg/ml)
<i>Aphloia theiformis</i> (Vahl) Benn.?	L.	>50	9.7 ± 1.18	53.5 ± 0.18	5.5	NA	NA	NA
<i>Berteria borbonica</i> A. Rich. ex DC	B.	>50	NA	NA	—	161.2 ± 4.4	5.2 ± 0.6	159.5 ± 33.9
<i>Calliphylum (ocmahuaca) Willd.</i> ²	B.	30.78 ± 8.8	NA	NA	—	362.0 ± 42.1	625.4 ± 25.0	6510.8 ± 677.6
<i>Casearia coriacea</i> Vent.	B.	>50	NA	NA	—	NA	NA	NA
<i>Coffea mauriflora</i> Lam.	B.	4.24 ± 2.2	NA	NA	—	NA	NA	NA
<i>Croton mauritianus</i> Lam. ¹	B.	3.8 ± 1.02	NA	NA	—	NA	NA	NA
<i>Dorstenium apetalum</i> (Poir.) Radlk. var. <i>diphyllum</i> (Cordem.) F. Friedmann	L.	37.68 ± 0.7	18.41 ± 0.3	>100	>5.4	NA	NA	NA
<i>Erica arborescens</i> (Willd.) E.G.H. Oliv.	B.	16.4 ± 5.38	28.4 ± 3.92	>100	> 3.5	NA	NA	NA
<i>Erica reunitensis</i> E.G.H. Oliv.	B.	>50	NA	NA	—	NA	NA	NA
<i>Erythroxylum lanifolium</i> Lam. ^{1,2}	B.	37.15 ± 1.33	NA	NA	—	NA	NA	NA
<i>Erythroxylum sderoxyloides</i> Lam.	B.	32.77 ± 0.59	NA	NA	—	134.5 ± 2.5	18.1 ± 0.8	72.2 ± 7.1
<i>Eugenia uniflora</i> L. ^{1,2}	B.	24.18 ± 11.13	NA	NA	—	1927.0 ± 217.9	301.9 ± 38.1	6310.3 ± 1404.2
<i>Indigofera ammosyrium</i> (DC.) Polhill	L.	21.03 ± 6.03	NA	NA	—	157.4 ± 3.0	63.9 ± 4.7	229.1 ± 22.2
<i>Mallotia borbonica</i> Duch. ²	B.	15.6 ± 2.88	ND	>100	> 5.4	1493.7 ± 2.9	88.8 ± 2.6	4441.1 ± 491.6
<i>Monnina rotundifolia</i> Thouars	B.	36.56 ± 17.96	NA	NA	—	NA	NA	NA
	B.	11.26 ± 2.88	NA	NA	—	150.9 ± 1.9	18.9 ± 5.2	252.8 ± 30.0
	B.	>50	NA	NA	—	23.2	95.1 ± 79.6	5882.7 ± 1295.9
	B.	>50	NA	NA	—	NA	NA	NA

(continued on next page)

Please cite this article as: A. Ledoux et al., Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, International Journal of Antimicrobial Agents (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>

Table 1 (continued)

Species	Family	Part	3DT _{1/2} (µg/ml)	CHKV ₁ IC ₅₀ (µg/ml)	CHKV ₁ IC ₅₀ (µg/ml)	CHKV ₁ IC ₅₀ (µg/ml)	CHKV ₁ CC ₅₀ (µg/ml)	CHKV ₁ SI	ARIS (µM/mg/ml)	FRAP (µM/mg/ml)	ORAC (µM/mg/ml)
<i>Nuxia verticillata</i> Lam.	Sillibaceae	L.	18.37 ± 5.61	NA	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA
<i>Phyllanthus phillyrifolius</i> Poir.	Phyllanthaceae	L.	>50	24.5 ± 4.12	47.7 ± 10	47.4 ± 22.5	1.9	NA	NA	NA	NA
<i>Psidium borbonica</i> J. E. Gmel.	Anacardiaceae	L.	44.81 ± 7.32	NA	NA	NA	–	244.0 ± 9.6	55.8 ± 1.3	121.8 ± 17.6	1837.7 ± 186.6
<i>Psidium arnygdolium</i> (Lam.) Cordem.	Asteraceae	L.	>50	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Psidium botryi</i> (Klatt) Rob.	Asteraceae	L.	16.61 ± 0.57	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Psidium denitum</i> (Cass.) DC.	Asteraceae	L.	22.89 ± 4.91	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Psidium retusum</i> (Lam.) DC.	Asteraceae	L.	22.99 ± 2.86	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Scaevola heterophylla</i> (Lam.) Sleumer	Salicaceae	L.	12.09 ± 0.8	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Securinega durissima</i> J.E. Gmel.	Phyllanthaceae	L.	>50	NA	NA	NA	–1.57	441.0 ± 33.2	732.0 ± 34.1	2195.5 ± 219.6	1858.6 ± 122.1
<i>Sophora denudata</i> Bory de Saint-Vincent	Fabaceae	L.	50	15.9 ± 3.88	30 ± 7.62	24.9 ± 1.57	–	357.9 ± 4.7	180.6 ± 8.2	840.0 ± 92.4	3041.1 ± 509.7
<i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Mill. Arg.	Euphorbiaceae	L.	>50	1.94 ± 0.36	3.71 ± 0.88	21.1 ± 3.51	10.9	NA	NA	NA	NA
<i>Terminalia benzoides</i> (L.) L. subsp. <i>benzoides</i> ^{1,2}	Combretaceae	L.	16.65 ± 10.6	NA	NA	NA	–	2758.4 ± 3063.3 ± 302.9	332.6 ± 38.1	1065.7 ± 212.3 ± 126.0	NA
<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam. ^{1,2}	Rutaceae	L.	43.12 ± 12.4	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Tournefortia bicolor</i> (Baill.) Cowie et Kerndler	Meliaceae	L.	>50	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Vernonia fimbrilifera</i> (Cass.) Less.	Asteraceae	L.	33.43 ± 6.49	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Zanthoxylum heterophyllum</i> (Lam.) Sm.	Rutaceae	L.	12.46 ± 4.14	NA	NA	NA	–	NA	NA	NA	NA
<i>Artemisia</i>	–	–	0.006 ± 0.002	–	–	–	–	–	–	–	–

NA, not active at higher concentration tested

¹ Species used to treat fever or malaria.

² Species used as anti-inflammatory, antirheumatic, anti-arthritis, or against CHIKV during the epidemic of 2005.

Please cite this article as: A. Ledoux et al., Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, International Journal of Antimicrobial Agents (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantmicag.2018.07.017>

than the aerial parts previously tested and that the leaf extract of *T. bentzoe* is less active than the bark extract. These differences could be due to different harvest times or locations. In this study, EtOAc extracts of *A. theiformis* were not active, although our team previously showed the activity of the MeOH bark extract and the CH₂Cl₂ leaf extract. The discrepancy observed might be explained by the location or time of harvest. Regarding the plants used by the local population, five species were in use to treat fever or malaria [20]: *C. mauritianus* (decoction), *Eugenia uniflora* (infusion), *T. bentzoe* (decoction and sometimes macerated in alcohol), *Toddalia asiatica* and *Z. heterophyllum* (decoction or infusion), demonstrated antiplasmodial activities, which validate their traditional application. Even if aqueous extracts are closer to the traditional preparation method, they contain many polar molecules such as glycosides. Glycosides can be inactive in vitro but active in vivo after metabolization, and the EtOAc extract contains the active corresponding aglycone. Since the aqueous extracts hold many compounds, their presence can mask minor interesting extracted molecules and thus appear to be less active than they are in reality. Another reason that could explain the in vivo activity of traditional aqueous preparations is linked to the remedy's consumption. Indeed, when the herbal tea is prepared, filtration is not complete and some plants fragments can be swallowed (including active compounds which have not been extracted in water); this could be the case for example, of *C. mauritianus*. The traditional remedies actually involve a decoction of chopped leaves [20] which are difficult to fully filter.

From *T. asiatica*, already known for its antiplasmodial properties, two active molecules were isolated: toddayanin (terpenalkaloid) and 8-methoxynorchelerythrine (IC₅₀ <10 µg/mL) [24]. Although *T. bentzoe* and *Z. heterophyllum* have already been studied by our team, it is the first time that the antiplasmodial activity of *C. mauritianus* and *E. uniflora* (IC₅₀ < 25 µg/mL) has been demonstrated.

Regarding the anti-chikungunya activity, *S. lineata* was one of the most interesting plants, with IC₅₀ of 1.9 ± 0.4 µg/mL (the results are shown in Table 1). In this study, the crude EtOAc extract obtained from the stem bark of *S. lineata* ssp. *lineata* exhibited a selective antiviral activity against CHIKV with an EC₅₀ <2 µg/mL whereas only a weak cytotoxic effect was observed on the host cells. A phytochemical investigation of this extract led to the isolation of tonantzitolone A, tonantzitolone B, of an original 4'-hydroxytonantzitolone, named tonantzitolone C which has an uncommon C₁₅-flexibilane skeleton, and of a new ent-12-hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diene. Subsequent evaluation of the inhibition of CHIKV replication in cell demonstrated that the 4'-acetoxytonantzitolone was endowed with antiviral activity against CHIKV [14]. Moreover, the liquid chromatography/mass spectrometry and the bioassay-guided purification of the EtOAc leaf extract using a CHIKV-cell-based assay led to the isolation of six new and three known tonantzitolones possessing the rare C₂₀-flexibilane skeleton, along with tonantzitolic acid, a new linear diterpenoid, and three new and two known tiglane-type diterpenoids [25]. A bioassay-guided purification of an EtOAc extract of the leaves of *C. mauritianus* using a CHIKV-cell-based assay led to the isolation of 12-O-decanoylphorbol-13-acetate and the new 12-O-decanoyl-7-hydroperoxy-phorbol-5-ene-13-acetate, along with loliolide, vomifolol, dehydromifolol, annuione D and bluemel C. 12-O-decanoylphorbol-13-acetate and 12-O-decanoyl-7-hydroperoxy-phorbol-5-ene-13-acetate inhibited CHIKV-induced cell death in cell culture with EC₅₀ of 2.4 ± 0.3 and 4.0 ± 0.8 µM, respectively [26]. *Aphloia theiformis* has already been phytochemically and pharmacologically investigated and is known to contain saponins [27] and xanthone glucosides [28] and is known to act on multiple pharmacological targets [28]. The bark of *A. theiformis* was used in decoction against CHIKV during the

epidemic in 2006 in Reunion Island [29]. It was traditionally prepared to treat fever and articular pain [20]. Here, we confirmed for the first time the high anti-chikungunya activity of this plant, with IC₅₀ of 9.7 ± 1.2 µg/mL and a selectivity index of 5.5. The barks of *I. ammoxyllum* and *Securinea durissima* showed an interesting antiviral activity, with IC₅₀ of 15.6 ± 2.9 µg/mL and 15.9 ± 3.9 µg/mL, respectively. Even if the activities of these two plants are similar, *I. ammoxyllum* has more potentiality for further investigations, as its selectivity index is 3.5 vs.1.6 for *S. durissima*. As far as it could be established, these endemic plants have never been studied.

Some species showed an interesting antioxidant activity of their bark extracts according to the three assays: *Bertiera borbonica*, *Erythroxylon laurifolium* and *Erythroxylon sideroxyloides*, *I. ammoxyllum*, *P. borbonica*, *Scolopia heterophylla*, *Sophora denudata* and *T. bentzoe* (see results in Table 1). The leaf extract of *B. borbonica* and the bark extract of *E. laurifolium* displayed the highest response to the ORAC assay, respectively 6510.8 and 6310.3 µM of Trolox equivalent per mg/mL of extract. *Bertiera borbonica* also exhibited the highest Trolox equivalent response for the ABTS assay (3612.0 ± 42.1 Trolox equivalent per mg/mL of extract). *Erythroxylon laurifolium* is known to contain oligomeric and polymeric proanthocyanidins and showed moderate activity against Herpes simplex virus type 1 [30]. The decoction of *E. laurifolium* is used in traditional medicine as an anti-inflammatory (Supporting Information). This use can be validated by its high antioxidant activity observed in this study. *Scolopia heterophylla* and *T. bentzoe* were the only two leaf extracts that have also exhibited a relatively high activity: respectively, 2195.5 and 1005.7 µM of Trolox equivalent per mg/mL of extract. *T. bentzoe* seemed particularly interesting, as both its leaf and bark extracts showed an antioxidant activity and their values were really high for the ABTS (2758.4 and 3063.3 µM of Trolox equivalent per mg/mL of extract) and FRAP (332.6 and 1954.5 µM of Trolox equivalent per mg/mL of extract) assays. Up until now, *B. borbonica* and *S. heterophylla* have never been either phytochemically or pharmacology studied.

4. Conclusion

In this study, elements were put in evidence to justify several traditional uses of the flora of Mascarene Islands. Some uses were not confirmed, but it does not mean the plants do not have any activity. Indeed, they may act on other pathways than the erythrocytic stage tested in this study (on the liver stage of *P. falciparum* for example) or they may act on the symptoms of the pathologies (fever, cephalgias) and impact the patient's recovery. In this study, EtOAc extracts were performed, because some compounds could be more active in vivo after metabolization, and not in vitro, which is frequently the case for plants containing prodrugs. This can explain why EtOAc or dichloromethane extracts are generally more active than in vitro aqueous extracts [31]. These results demonstrated the biological activities of plants which were highlighted for the first time, as *C. coriaceae*, *Monimia rotundifolia*, *I. ammoxyllum*, *Scolopia durissima*, *B. borbonica* and *S. heterophylla*. Further investigations, such as bioassay guided fractionation should be carried out to isolate and elucidate the structure of the active compounds from these plants.

Acknowledgments

The authors wish to thank D. Étienne, S. Cardoen and V. Saive, for their scientific and technical assistance. E. Boyer, T. Hermann and M. Felicite are acknowledged for the plant collection. The following reagents were obtained through BEI Resources Repository, NIAID, NIH: *Plasmodium falciparum*, strain 3D7, MRA-102, contributed by Daniel J. Carucci.

Please cite this article as: A. Ledoux et al., Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, International Journal of Antimicrobial Agents (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>

Declarations**Funding**

This research was supported by the European Commission and the Regional Council of Reunion Island: BIOMOL-TCN program (Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de Molécules Issues de la Biodiversité Terrestre, Marine et Microbienne de la Zone Sud-Ouest de l'Océan Indien), ERDF (European Regional Development Fund) and the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) (grant no. T.0190.13).

Competing Interests

None.

Ethical Approval

Not required.

Supporting Information

The list of the 64 plants including their local name, population, data of collection and voucher number are available in the Supporting Information.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017.

References

- [1] World Health Organization. Mosquito-borne diseases, 2017.
- [2] World Health Organization. WHO World Malaria Report, 2016, p. 186.
- [3] Zahari A, Abiat A, Sivasathy Y, Mohamad J, Choudhary MI, Awang K. In vitro antiparasmodal and antioxidant activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Alseodaphne cornetii* Koster. *Asian Pac J Trop Med* 2016;9:328–32. doi:10.1016/j.apjtm.2016.03.008.
- [4] Wada Y, Orba Y, Sasaki M, Kobayashi S, Carr MJ, Nobori H, et al. Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus 2017-505-102-12. doi:10.1016/j.virol.2017.02.014.
- [5] Lani R, Hassandarvish P, Shu M-H, Phoon WH, Chu JH, Higgs S, et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Res* 2016;133:50–61. doi:10.1016/j.antiviral.2016.07.009.
- [6] World Health Organization. Centre des médias Chikungunya 2016.
- [7] Newman DJ, Crag GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 2016;79:629–61. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- [8] Giraud-Techer S. JAEG-VHTSIBGCMJS. Plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée française. *Ethnopharmacologia* 2016;56:7–33.
- [9] Smadja J, Marodon C. Plantes médicinales de la Réunion, 2016.
- [10] Trager W, Jensen JB. Human malarial parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673–5.
- [11] Bero J, Hérent M-F, Schmieda-Hirschmann G, Frédéric M, Quetin-Ledercq J. In vivo antimalarial activity of *Keetia leucantha* twigs extracts and in vitro antiparasmodal effect of their constituents. *J Ethnopharmacol* 2013;149:176–83. doi:10.1016/j.jep.2013.06.018.
- [12] Murebwayire S, Frédéric M, Hannaert V, Jonville M-C, Duez P. Antiparasmodal and antitrypanosomal activity of *Ficinia sacculxii* (Pierre) Diels. *Phytomedicine* 2008;15:728–33. doi:10.1016/j.phymed.2007.10.005.
- [13] Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:739–41.
- [14] Techer S, Girard-Valenciennes E, Retalleau P, Neyts J, Guérite F, Leyssen P, et al. Tonanzitrifolones from *Stillingia lineata* ssp. *lineata* as potential inhibitors of chikungunya virus. *Phytochem Lett* 2015;12:313–19. doi:10.1016/j.phytol.2015.04.023.
- [15] Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–6. doi:10.1006/abio.1996.0292.
- [16] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231–7.
- [17] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe 2001;49:4619–26. doi:10.1021/jf010386o.
- [18] Ledoux A, Maraetefau H, Jansen O, Etienne D, Quetin-Ledercq J, Clerc P, et al. Phytochemical profile and biological activity evaluation of *Zanthoxylum heterophyllum* leaves against malaria. *Planta Medica Lett* 2015;2. doi:10.1055/s-0035-1545321.
- [19] Ledoux A, St-Gelais A, Ciekiewicz E, Jansen O, Bordignon A, Ilien B, et al. Antimalarial activities of alkyl cyclohexenone derivatives isolated from the leaves of *Poupartia borbonica*. *J Nat Prod* 2017;80. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01019.
- [20] Lavergne R. Le grand livre des tisaneurs et plantes médicinales indigènes l'île de la Réunion. *Orphie* 1990.
- [21] Toyang NJ, Verpoorte R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 2013;146:681–723. doi:10.1016/j.jep.2013.01.040.
- [22] Bordignon A, Frédéric M, Ledoux A, Campos P-E, Clerc P, Hermann T, et al. In vitro antiparasmodal and cytotoxic activities of sesquiterpene lactones from *Vernonia fimbriiflora* Less. (Asteraceae). *Nat Prod Res* 2017;1–4. doi:10.1080/14786419.2017.1330665.
- [23] Jonville MC, Kodja H, Strassberg D, Pichette A, Ollivier E, Frédéric M, et al. Antiparasmodal, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. *J Ethnopharmacol* 2011;136:525–31. doi:10.1016/j.jep.2010.06.013.
- [24] Hinunwong C, Sukieum S, Phatchana R, Yenjai C. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Foddalia asiatica*. *Phytochem Lett* 2016;17:242–6. doi:10.1016/j.phytol.2016.08.008.
- [25] Olivon F, Palenzuela H, Girard-Valenciennes E, Neyts J, Pannecoque C, Roussi F, et al. Antiviral activity of flexibilane and tiglane diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J Nat Prod* 2015;78:1119–28. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00116.
- [26] Corlay N, Delang L, Girard-Valenciennes E, Neyts J, Clerc P, Smadja J, et al. Tiglane diterpenes from *Croton mauritanicus* as inhibitors of chikungunya virus replication. *Fitoterapia* 2014;97:87–91. doi:10.1016/j.fitote.2014.05.015.
- [27] Gopalsamy N, Vargas D, Guého J, Ricaud C, Hostettmann K. Saponins from leaves of *Aphilia theiformis*. *Phytochemistry* 1988;27:3593–5. doi:10.1016/0031-9422(88)80774-X.
- [28] Carene M, Picot N, Bender O, Atalay A, Zengin G, Loffredo L, et al. Multiple pharmacological targets, cytotoxicity, and phytochemical profile of *Aphilia theiformis* (Vahl.) Benn. *Biomed Pharmacother* 2017;89:342–50. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.031.
- [29] Stalkowsky F, Le Roux K, Schuffenecker L, Laurent P, Gr P, Develay A, et al. Retrospective survey of Chikungunya disease in Réunion Island hospital staff, 2008;136:196–206. doi:10.1017/S0950268807008424.
- [30] Lohezic F, Amoros M, Boustie J, Girre L. In-vitro antihypertheric activity of *Erythroxylon laurifolium* (Erythroxylaceae). *Pharm Pharmacol Commun* 1999;5:249–53. doi:10.1211/14739080899128734695.
- [31] Jansen O, Angenot L, Tits M, Nicolas JP, De Mol P, Nikiéma J-B, et al. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiparasmodal properties. *J Ethnopharmacol* 2010;130:143–50. doi:10.1016/j.jep.2010.04.032.

Please cite this article as: A. Ledoux et al., Antiparasmodal, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, *International Journal of Antimicrobial Agents* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>

Supporting informations : list of the 64 plants selected for the screening.

Sample number-Species	Family	Local name	Collection site (altitude)	Date	Voucher number	Ancient uses	Current uses	Registered in the French Pharmacopoeia
11 & 19 - <i>Acacia baobab</i> <i>inegrifolia</i> Willd.	Euphorbiaceae	Bois de Charles, Bois de creve-cœur	Bébour (1210 m)	February 2013	TON-P112L TON-P111B	Purifying, astringent	-	-
21 - <i>Agarista baufolia</i> (Comm. ex Lam.) G. Don	Ericaceae	Petit bois de rempart, Bois de rempart des hauts, Petit bois de rempart des hauts	Bébour (1360 m)	February 2009	TON-P052L	Rheumatism, hemorrhoids, scabies, venereal diseases, dermatitis	-	-
31 - <i>Agarista salicifolia</i> (Comm. ex Lam.) G. Don <i>var. salicifolia</i>	Ericaceae	Petit bois de rempart	Bébour (1314 m)	November 2009	TON-P053L	Rheumatism, scabies, venereal diseases	Dermatitis, hemorrhoids	-
41 - <i>Aleur macra</i> Haw.	Asphodelaceae	Mazambon marron, Mazambon sa lavage	Vincendo (67 m)	November 2009	TON-P049L	-	Eczema, dermatitis	-
51 & 59 - <i>Arididesma madagascariense</i> Lam.	Phyllanthaceae	Bois de cabri blanc, Bois d'oiseaux, Bois de cabri, Bois de gaullettes blanc	Mare Longue (560 m) Mare Longue (365 m)	March 2013 May 2009	TON-P101L TON-P034B	-	-	-
61 & 6B - <i>Aphila theiformis</i> (Vahl) Benn.	Aphilaaceae	Change écorce, Bois change écorce, Bois de Gouape, Fandamane, Fondamane, Gouape marron, Gouape marron, Saie-écorce	Bébour (1366 m) Basse Vallée (700 m)	May 2009 November 2012	TON-P004L TON-P080B	Emetic, wounds, child's stomach problems	Anti-inflammatory, dysentery, febrifuge, malaria. Used against Chikungunya virus during the epidemic of 2006	List A (leaf)
71 - <i>Ayapana triplineris</i> (Vahl) R.M. King et H. Rob.	Asteraceae	Ayapana	Plaine des Grégués (69 m)	March 2010	TON-P061L	Nausea, emesis, indigestion, stomach pains, colic, diarrhea. Used against influenza and dengue fever	-	List A (leaf)
81 & 8B - <i>Bertera barbotica</i> A. Rich. ex DC	Rubiaceae	Bois d'oiseau, Bois de raisin	Mare Longue (365 m) Plaine des Chicots (1645 m)	March 2010 April 2013	TON-P031L TON-P110B	-	-	-
91 - <i>Bertera rufa</i> DC.	Rubiaceae	Bois de raisin	Bébour (1380 m)	October 2009	TON-P042L	-	-	-

101 & 108-C <i>Calophyllum tocamahaco</i> Willd.	Celastraceae	Takamaka, Takamalaades hauts, Takamaka rouge	Langewin (67 m)	May 2009	TN- P030L	Ulcers, eye diseases, scabies, scabs, wounds and urethra mucous	Scabs, rheumatisms, gout, sciatic, arthrosis, headaches	-
111 & 118-C <i>Carissa spinarum</i> L.	Apocynaceae	Bois amer, Bois de ronce, Bois de soude, Bois sandal	Vincendo (67 m)	November 2009	TN- P073L	Wounds, caners, ulcers, boils, scabs, scabies, gonorrhea, neoplasms, gastritis, tonic, stomachic, coxyza	Antidiabetic, febrifuge, expectorant, antirheumatic, hepato-protective, kidney's tones, gout	-
121 & 128-C <i>Casuarina coriacea</i> Vert.	Flacourtiaceae	Bois de cabri, Bois de cabri rouge	Mare Longue (560m)	March 2013	TN- P103L	-	Astringent	-
131 & 148-C <i>Cassytha filiformis</i> L.	Lauraceae	Liane fourfour, Lianejaune, Liane sans feu, Liane sans feuille, Fourfour, Fourte à toute, Plante marine	L'Hermitage (20m)	May 2013	TN- P115V	Skin diseases, dysentery, hematuria, rickets	Skin diseases, eczema, spots, boils	-
141 & 148-C <i>Claaylon glandulosum</i> Boivin ex Baill.	Euphorbiaceae	Gras bois d'oiseaux	Be-bour (1360 m)	February 2013	TN- P086L	-	-	-
151 & 158-C <i>Claaylon parviflorum</i> A. Juss.	Euphorbiaceae	Bois d'oiseaux	Dos d'Ane (1210m)	May 2013	TN- P114L	-	-	-
161 & 168-C <i>Coffea mauritiana</i> Lam.	Rubiaceae	Café marron	Mare Longue (560m)	March 2013	TN- P100L	-	Diabetes, urinary retention, conjunctivitis	List A (leaf)
171 & 178-C <i>Condamoya integrifolia</i> (Willd.) Pax	Euphorbiaceae	Bois de perroquet, Jacques marron, Jaque marron	Haut de Saine-Rose (560m)	February 2013	TN- P094L	-	Tonic, hypertension, liver diseases	-
181 & 188-C <i>Coscinopimento</i> Comm. ex Lam.	Sapindaceae	Bois de Judas, Faux Bois de fer	Langewin (67m)	May 2009	TN- P026L	-	Asthma, influenza	-

19L & 19B-Eraton mauritanus Lam.	Euphorbiaceae	Ti bois de senteur	Bellegrie (280 m)	May 2009	TN- P0258 TN- P035L	-	Febrifuge	-
20L-Donos fragrans (Lam.) Pers.	Rubiaceae	Liane jaune, Liane bois jaune, Liane de boeuf, Lingue noir	Mare Longue (365 m)	May 2009	TN- P036L	Tonic, febrifuge, scabs, ulcers, stomadic, breast cracking, eczema, hemorrhoids, diuretic, strongly active soothing effect	Fever, anti-inflammatory, jaundice, hepatitis, stomach ulcer, constipation	-
21L & 21B-Dodonaea viscosa (L.) Jacq.	Sapindaceae	Bois de reinette, Bois d'arnette, Bois d'aurine	Langevin (67 m)	September 2009	TN- P028L TN- P027B	Sudorific, purifying, astringent, soothing effect, syphilis, rheumatism, gout, sore throat, bruises, wounds, ulcers	Rheumatism, arthritis, gout, scaldic, kidney stones, colic, gastric ulcer, sprain, haemorrhage	List A (leaf)
21L & 21B-Doraxylon operatum (Poir.) Boidl. var. <i>diphyllum</i> (Cordem.) F. Friedmann	Sapindaceae	Bois de gaulette rouge, Bois de gaulette rouge, Bois de gaulettes, Bois de gaulettes rouge	Belbour (1220 m) Mare Longue (248 m)	February 2013 November 2009	TN- P087L TN- P056B	Purifying, astringent, diarrhoea, gargle	Dysentery, purifying	-
23L & 23B-Embellia angustifolia (A. DC.) A. DC.	Mysinaceae	Liane savon, Bourtaigre, Liane poilie, Queue aige	Belbour (1360 m)	November 2009	TN- P055L TN- P054B	Renal colic, cystitis, constipation, stomach irritations, pneumonias	Anti-inflammatory, heartburn or stomach cramps, kidney stones, eczema	-
24L & 24B-Erythroxylum laurifolium Lam.	Erythroxylaceae	Bois de rougue, Bois de ronde	Mare Longue (365 m)	May 2009	TN- P033L TN- P032B	Astringent, diuretic, febrifuge	Febrifuge, nephritis, diuretic, anti-inflammatory, influenza, dermatitis	-
25L & 25B-Erythroxylum sideroxyloides Lam.	Erythroxylaceae	Bois de ronde, Petit Bois de rougue	Langevin (67 m) Vincendo (67 m)	June 2009 December 2012	TN- P039L TN- P083B	-	-	-
26L & 26B-Eugenia uniflora L.	Myrtaceae	Coeur de cerise, Cerise cotelee, Cerise à cotes	Avrions (400 m)	February 2010	TN- P060L TN- P059B	-	Anti-inflammatory, febrifuge, antioxidant, anti-diabetes, diuretic, antihypertensive. Used against chikungunya virus during the epi demic of 2005. Used against influenza and dengue fever	-

271 & 275 - <i>Fouquieria leuosa</i> (Lam.) C. Jeffrey s. subsp. <i>bourbonensis</i> C. Jeffrey	Asteraceae	Liane zigzag, Bois cassant, Petit café, Zigzag	Grand Etang (540 m)	April 2013	TON- P107L TON- P108B	Asthma, pulmonary catarrh, pleurisy	Asthma	-
285 - <i>Foetida mauritiana</i> Lam.	Lecythidaceae	Bois puant, Bois blanc, Bois plon	Languevin (67 m)	May 2009	TON- P010B	Emménagogue, diurétique, laxative, de worming	Influenza, fever, asthma, warts, bronchitis	-
294 - <i>Hugonia serrata</i> Lam.	Linaceae	Liane de chef, Grosserone, Liane de cidé, Liane de corne, Liane papangae	Coloradi (670 m)	March 2010	TON- P064L	Tonic, sudorific	-	-
304 & 305 - <i>Indigofera ammayilum</i> (DC) Polhill	Fabaceae	Bois de saHe, Bois de rose	Languevin (67 m)	November 2009	TON- P047L	-	Hypoglycemic, weight loss	-
311 & 315 - <i>Melastoma barzonica</i> Duch.	Moraceae	Bois de manan, Bois de gillard, Bois de gallet, Bois de liège, Bois de maillet, Bois de requin, Bois de sajeve, Petit Camellier	Pette Plaine (1247 m)	March 2010	TON- P063L TON- P062B	Abortive, diuretic, anti-inflammatory	Problems related to childbirth, purifying, jaundice, hepatitis, anti-inflammatory, kidney stones	-
321 & 325 - <i>Monimia rotundifolia</i> Thouais	Momimaceae	Ma pou, Ma pou à grandes feuilles, Ma pou blanc, Ma pou des hauts	Bébour (1370 m)	February 2009	TON- P003L	-	-	-
331 & 335 - <i>Mussaenda arcuata</i> Poir.	Rubiaceae	Lingue café, Gros lingue, Lingue	Bébour (1360 m)	February 2013	TON- P088B	Rheumatisms, syphilis, herpes, infant gastroenteritis, colic, swelling	Used against chikungunya virus during the epidemic of 2006. Anti-inflammatory, febrifuge, purifying, infant gastro-enteritis, conjunctivitis, albuminuria, dermatitis, asthma, irritant dental pain	List A (leaf)
341 & 345 - <i>Mussaenda londa</i> Poir. var. <i>londa</i>	Rubiaceae	Lingue en arbre, Quinquina pays	Languevin (67 m)	May 2009	TON- P024L TON- P023B	Veneral diseases, scabs, tonic, strengthening, febrifuge, astrigent	Febrifuge, Used against chikungunya virus during the epidemic of 2006	-
351 & 355 - <i>Nuxia verticillata</i> Lam.	Stilbaceae	Bois maigre, Bois de bombardier, Ma bruc, Valahe, Valahe, Valahe	Grand Etang (526 m)	July 2009 November 2012	TON- P041L	Purifying, venereal diseases, albuminuria	Eliminates urea and uric acid, albuminuria, against nephritis, chol esterol-lowering	List A (leaf)

36L & 36B-Olaz <i>Piptocarum</i> (Lam.) Vahl	Ola ceae	Bois d'effort, Bois de perroquet, Corce rouge	Basse Vallée (700 m) Colorado (670 m)	March 2010	TON- P082B TON- P066L TON- P065B	Hernia, efflors, baclaches	-
37L-Peperomia <i>barbонensis</i> Miq.	Piperaceae	No common name	Plaine des Cafres (1698 m)	May 2013	TON- P105L	-	-
38L & 38B-Erica <i>arborescens</i> (Willd.) E.G.H. Oliv. = <i>Philippia</i> <i>arborescens</i>	Ericaceae	Branle-filao, Benlevert	Bebour (1362 m)	February 2009	TON- P002L TON- P001B	-	-
39L & 39B-Erica <i>reunionensis</i> E.G.H. Oliv.= <i>Philippia montana</i>	Ericaceae	Branlevert, Branme	Nez de Bouif (2087 m)	May 2009	TON- P014L TON- P013B	-	-
40L & 40B-Phyllanthus <i>phillyreifolius</i> Poir.	Phyllanthaceae	Faux bois de demoiselle, Bois de cafrine, Bois de chien, Bois de négresse, Bois de ravine, Girambelle marron	Bébour (1270 m)	February 2013	TON- P092L TON- P091B	Cystitis, nepatitis, leucorrhoea, diarrhoea, diuretic, astringent, emmenagogue	Diarrhoea, diuretic List A (bank)
41L & 41B-Piper <i>barbонense</i> (Miq.) C.DC.	Piperaceae	Lingue à poivre, Cubbe du pays, Liane à poivre, Liane de pohnier, Liane poivre, Lingue poivre, Petit lingue, Pohnier marron	Mare Longue (80 m)	March 2013	TON- P098L TON- P097B	Strengthening, purifying, gonorrhoea, diuretic, stimulant	Refreshing, a phtha, inflammations of oral mucosa, purifying, eczema. Used against influenza and dengue fever
42L & 42B-Pittosporum <i>sensu</i> Pott. s. subsp. <i>reticulatum</i> (Tul.) Coode	Pittosporaceae	Bois de joli cœur, Bois de mangue marron, Joli cœur	Plaine d'Afouche (1198 m)	November 2009	TON- P058L TON- P057B	Febrifuge, nervous breakdown, infant rheumatisms, astringent, sore throat, purifying	For heart, bile, arterial hypertension, boils, influenza, diabetes, rheumatisms. Used against chikungunya virus during the epidemic of 2006.
43L & 43B-Pittosporum <i>sensu</i> Pott. s. subsp. <i>senada</i>	Pittosporaceae	Bois de joli cœur, Bois de mangue marron, Joli cœur	Langevin (67 m)	May 2009	TON- P012L TON- P011B	Febrifuge, nervous breakdown, infant gastro-enteritis, astringent, sore throat, purifying	List A (cutaneous use - leaf) For heart, bile, arterial hypertension, boils, influenza, diabetes, rheumatisms. Used against chikungunya virus during the epidemic of 2006.

414 & 418-Poupartia barbonica J. F. Gmel.	Anacardiaceae	Bois de poupart, Bois blanc rouge, Bois de violon, Bois sandal, Zévi marron	Langévin (67 m)	May 2009	TON-P022L TON-P021B	Female contraception	Nephritis, furunculosis	-
451 & 458-Pouzolzia laevigata (Poir.) Gaudich.	Urticaceae	Bois de fièvre, Bois Maurice, Petit bois de source, Plante de la tension, Plante la tension	Bellepierre (280 m)	October 2009	TON-P045L TON-P044B	-	Hypertension, drizines, breathlessness, diarrhea, influenza	-
461 & 468-Psidia amygdalina (Lam.) Cordem.	Asteraceae	No Common name known	Route du Volcan (1134 m)	February 2010	TON-P076L TON-P070B	-	-	-
471 & 478-Psidia bovini (Riat) Rob.	Asteraceae	Bouillon blanc, Tabac marron	Bébour (1370 m) Plaine des Fougères (1370 m)	February 2009 February 2013	TON-P067L TON-P095B	-	-	-
481 & 488-Psidia dentata (Cass.) DC.	Asteraceae	Guéitt vilb, Ti manque, Bois collant, Bois de marron, Bois de reinette blanc, Herbe trois pous	Langévin (67 m)	May 2009	TON-P020L TON-P019B	-	-	-
491 & 498-Psidia laurifolia (Lam.) Cordem.	Asteraceae	Bois de tabac, Bois de chemille	Bébour (1372 m)	October 2009	TON-P075L TON-P069B	-	-	-
501 & 508-Psidia retusa (Lam.) DC.	Asteraceae	Sajlette, La salette, Bins saïle, Herbe à Brouss, Herbe à Laurent Martin	Langévin (67 m)	May 2009	TON-P071L TON-P068B	-	-	-
511 & 518-Psilyon maximatum (Bouton ex Hook. f.) Baill.	Psilovaceae	Bois de gouyave marron, Bois à gratter, Boisé pêche marron, Bois sans écorce	Mare Longue (560 m)	February 2013 May 2009	TON-P096L	Amenorrhoea, dysentery, astringent	Diuretic, gout, cholesterol, renal colic, albuminuria	List A (leaf)

		Mare Longue (355 m)	TCH P035B	
574 & 575 <i>Scolopia heterophylla</i> (Lam.) Steurer	Salicaceae	Bois de prunier, Bois à fièvre, Bois d'oiseau, Bois de baïbi, Bois de Quivi, Bois de tisane rouge, Prunier marron	November 2009 TCH- P051L TCH- P050B	Febrifuge -
573 <i>Sicomone volubilis</i> (Lam.) Meras	Anacardiaceae	Liane d'olive, Liane à queue, Liane bois d'olive, Ti bram, Ti bois d'olive	June 2009 TCH- P040L	Child diarrhea, febrifuge, diabetes, hypertension, inguinal hernia
574 & 575 <i>Securinega dansmannii</i> J.F. Ghiesb.	Phyllanthaceae	Bois dur, Bois de pêche marron, Corce rouge, Mènal	November 2009 TCH- P040L	-
574 & 575 <i>Sophora danadana</i> Bory	Fabaceae	Petit Tamarin des Haïti, Petit tamarin, Tamarin blanc des haïti, Tamarin gris	February 2013 TCH- P077B	-
574 & 575 <i>Silligida ifi</i> (Lam.) Nutt. Ag.	Euphorbiaceae	Tangail papay, Bois de lait, Tangilin du pays, Tangain de pays	May 2009 TCH- P007L TCH- P006B	Skincancer
574 & 575 <i>Fromhouissa elliptica</i> (L.) A. DC.	Monimiaceae	Bois de bombande, Bois de tambour	December 2011 TCH- P040L TCH- P079B	-
574 & 575 <i>Formicaria bentzkei</i> (L.) L. subsp. bentzkei	Combretaceae	Benipin pèl, Foux benjin	May 2009 TCH- P009L TCH- P008B	Emmenagogue, dermatitis Fever, cold, cough, influenza, asthma, pertussis, pleurisy, sinusitis, urinary tract infection, throat, pleurisy, rectum hemorrhage, dysentery
574 & 575 <i>Toddalia anaiaria</i> (L.) Lam.	Rutaceae	Liane patte poule, Liane patte de poulet, Liane patte poule à piquants, Patte de poule à piquant, Patte poule, Patte poule piquant, Petit patte poule, Ronce, Ronce rouge	February 2013 TCH- P009L TCH- P008B	Anti-inflammatory, wounds, purifying, astringent, tonic, fever, bronchitis, asthma, pleurisy, diarrhea, bruises, abscess

60A & 60B - <i>Turraea thouraziana</i> (Baill.) Cavaco et Veldmaiden	Meliaceae	Quivi, Bois de quivi, Bois de café marron, Feiti quivi, Ti quivi	Langevin (67 m)	November 2009 December 2012	TN- P072L TN- P081B	Sudorific, purifying, emmenagogue, Dysmenorrhea, scabies, hypertension	Hypertension, albuminuria, rheumatisms, gout	List B (stem and leaf)
61A & 61B - <i>Verris lanceolata</i> (Lam.) G. Don	Rutaceae	Patte poule, Bois de patte de poule, Bois Guilaine, Bois patte de poule, Grand patte poule, Bois Saint-Lieu, Patte de poule, Patte de poule, Pied de poule	Vincendo (67 m)	April 2013	TN- P109L TN- P108B	Dysentery (bark), carabids and strengthening (leaves), colics (roots), astringent, amenorrhoea, sprains, sore throats, tonic, stimulant, fever, diarrhoea	Bruises, sprains, rheumatisms, influenza, fever, gout, burns, skin diseases, Used against influenza and dengue fever	List A (cutaneous use - leaf)
62A & 62B - <i>Vernonia fimbriifera</i> (Cass.) Less.	Asteraceae	Bois de source	Grand Étang (526 m) Mare Longue (560 m)	July 2009 March 2013	TN- P047L TN- P104B	-	-	-
63A - <i>Viscum triflorum</i> DC.	Santalaceae	Sourchaude, Bois de chourchaude, Bois de sourchaude, Oneridrod, Onerie chaude, Chourchaude, Sourchaude, Sourchaude, Souris-chaude	Bébour (1329 m)	October 2009	TN- P043L	Sudorific, anti-sporadic, rheumatisms, infant gastro-enteritis	Infant gastro-enteritis, rheumatisms, asthmatic cough, arteriosclerosis. Used against influenza and dengue fever	-
64A & 64B - <i>Zanthoxylum heterophyllum</i> (Lam.) Sm.	Rutaceae	Poivrier des Hauts, Bois de poivre, Bois blanc rouge, Bois de catalalle noir, Bois de poivrier, Bois de rat, Poivrier, Poivrier	Langevin (67 m)	May 2009	TN- P016L TN- P015B	Tonic and stomatal (bark), Fever, purifying, sudorific, ca thetha, rheumatisms, dysentery, dental pains	Backaches	-
Synonym : <i>Fagara heterophylla</i> Lam								

Antimalarial Activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives Isolated from the Leaves of *Poupartia borbonica*

Allison Ledoux,^{*,†} Alexis St-Gelais,^{†,§} Ewa Ciekiewicz,^{†,§} Olivia Jansen,[†] Annélie Bordignon,[†] Bertrand Illien,[†] Nicolas Di Giovanni,^{||} Arnaud Marvilliers,[‡] Floriane Hoareau,[‡] Hélène Pendeville,[▽] Joëlle Quetin-Leclercq,[‡] and Michel Frédérick[†]

[†]Laboratory of Pharmacogeny, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liège, Avenue Hippocrate 15, 4000 Liège, Belgium

[‡]Pharmacogeny Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Avenue E. Mounier, B1 72.03, B-1200 Brussels, Belgium

[§]Laboratoire d'Analyses et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE), Université du Québec à Chicoutimi, 555 Boulevard de l'Université, Saguenay, Québec G7H 2B1, Canada

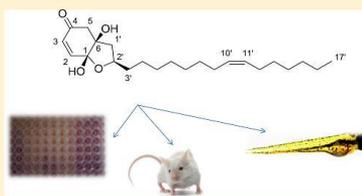
[‡]Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNA), University of Reunion Island, Avenue René Cassin 15, 97744 Saint-Denis, La Réunion France

^{||}Laboratoire de Chimie Analytique Organique et Biologique (OBiAChem), University of Liège, Allée de la Chimie 3, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgium

[▽]Plateforme Zebrafish Facility and Transgenics, GIGA, University of Liège, Avenue Hippocrate 15, 4000 Liège, Belgium

Supporting Information

ABSTRACT: Bioactivity-guided fractionation of the ethyl acetate extract of the leaves of *Poupartia borbonica* led to the isolation of three new alkyl cyclohexenone derivatives 1–3, and named Poupartone A–C. The structures of the new compounds were elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopic data analysis and MS, whereas calculated and experimental ECD spectra were used to define the absolute configurations. These compounds were active against 3D7 and W2 *Plasmodium falciparum* strains with IC_{50} values between 0.55 and 1.81 μ M. In vitro cytotoxicity against WI38 human fibroblasts and the human cervical cancer cell line HeLa (WST-1 assay) showed that these compounds were also cytotoxic, but no hemolytic activity was observed for the extract and pure compounds. An in vivo antimalarial assay was performed on the major cyclohexenone using *P. berghei*-infected mice at a dose of 15 mg/kg/day ip. The assay revealed growth inhibition of 59.1 and 69.5% at days 5 and 7 postinfection, respectively, although some toxicity was observed. Zebrafish larvae were used as a model to determine the type of toxicity, and the results showed cardiac toxicity. The methanol extract was also studied, and it displayed moderate antiplasmodial properties in vitro. This extract contained the known flavonoids, quercetin, 3'-O-hydroxysulfonylquercetin, quercitrin, and isoquercitrin as well as ellagic acid, which showed high to low activity against the 3D7 *P. falciparum* strain.



Malaria is caused by *Plasmodium*, a protozoan parasite transmitted by anophelid mosquitoes, and was responsible for 438 000 deaths worldwide in 2015, according to the last World Malaria report.¹ The resistance of parasites to available and affordable medicines has become a widespread problem in exposed countries, making the search for new antimalarial compounds essential. As the immeasurable therapeutic potential of plants is well-established,² natural products could be an interesting source of new antimalarial drugs. Indeed, according to Newmann and Cragg, more than 60% of the antiparasitic drugs discovered between 1981 and 2014 were unaltered natural products (12.5%), natural product derivatives (31.3%), or synthetic drugs with a natural product

pharmacophore (18.8%).³ The endemic plants of the Mascarene Islands appear to be good candidates for study because of their scarcity; most of them are being pharmacologically studied for the first time, increasing the chances for the discovery of new active compounds.

Poupartia borbonica J.F. Gmel is a dioecious endemic plant from the Mascarene Islands and belongs to the genus *Poupartia* in the Anacardiaceae family, as verified in accordance with the International Plant Names Index. The genus is dedicated to the

Received: November 7, 2016

botanist, physician, and anatomist François Poupart (1661–1709), who described many new *Poupartia* species, including *P. borbonica*.⁴

This plant, commonly known in Reunion Island as “Bois blanc rouge” (“red white wood”), is used in traditional medicine to induce a contraceptive effect.⁵ In the past, it was also used to treat nephritis and boils.⁶ Indeed, the bark of *P. borbonica* has an allegedly diuretic effect.⁷ As far as can be established, the leaves of *P. borbonica* have not been either phytochemically or pharmacologically studied. Preliminary work (Table 1) demonstrated that several extracts of this plant possess interesting in vitro antiplasmodial activities. This study was designed to determine the compounds responsible for this activity.

RESULTS AND DISCUSSION

Different extraction solvents of dried and pulverized *P. borbonica* leaves were tested to select the starting point of the bioassay-guided fractionation. The resulting extracts were tested against the *P. falciparum* 3D7 strain (Table 1).

Table 1. Antiplasmodial Activity of the Extracts of *P. borbonica* Leaves against *P. falciparum*

extraction solvent	yield (% m/m)	IC ₅₀ (μg/mL) n = 3
EtOAc	1.66	2.43 ± 0.5
n-hexane	1.13	3.28 ± 0.2
CH ₂ Cl ₂	1.05	3.25 ± 0.7
MeOH	19.04	16.23 ± 4.3

First, the methanol extract, obtained with a much higher yield, was phytochemically investigated to determine its major compounds. Five known phenolic compounds were isolated: ellagic acid and the four flavonoids, isoquercitrin, quercitrin, 3'-O-hydroxysulfonylquercetin, and quercetin, which showed high to low activity against the *P. falciparum* strain. The structures of these known compounds, except 3'-O-hydroxysulfonylquercetin, were elucidated by comparison of their ¹H NMR and UV spectra and HPLC retention behaviors against standard compounds.

The major compound of this extract was 3'-O-hydroxysulfonylquercetin, a rare flavonoid inorganic ester. It was isolated by preparative HPLC using a mobile phase containing TFA (0.05%). When the solvent of the fraction was removed under vacuum in a rotary evaporator at a temperature < 30 °C, degradation of the 3'-O-hydroxysulfonylquercetin to quercetin was observed based on the HPLC retention time. The acid of the mobile phase was then changed to HOAc (0.1%) and eventually to formic acid (0.1%). However, this mobile-phase modification did not preclude hydrolysis of the hydroxysulfonyl ester. To avoid this problem, the TFA was removed from the fraction directly by liquid/liquid extraction using Et₂O, and the aqueous fraction was then lyophilized. The instability of these types of compounds is the main reason why they are not often isolated. However, sulfate conjugation of flavonoid compounds has been widely observed in many plant families⁸ to facilitate their storage.⁹ Hydroxysulfonylquercetin compounds have been reported in the Asteraceae genus in the species *Oenanthe crocata*, *Flaveria bidentis*, and *Flaveria choloraefolia*,^{8,10} as well as in *Cuphea carthagenensis* (Lythraceae).¹¹

The structure of 3'-O-hydroxysulfonylquercetin was established by comparison with spectra recorded for a quercetin standard by mass spectrometry, ¹H NMR, and UV data

analysis. 3'-O-Hydroxysulfonylquercetin was assigned the formula C₁₅H₁₀O₁₀S from the [M + H]⁺ ion at m/z = 381.5998 in the ESI-HR-TOF-MS data (calcd for C₁₅H₁₀O₁₀S, 381.9995). The presence of an ion at m/z 383.5998 (5.05%) confirmed the presence of a sulfur atom. UV data analysis confirmed the presence of an auxochrome group and a modification of the quercetin B-ring. Similar UV spectra have been described by O'Leary and co-workers.¹² The position of the hydroxysulfonyl group was deduced from the chemical shift of H-2' compared to a quercetin standard.

Quercetin is a natural flavonoid found in a wide range of plants and is known to have multiple therapeutic properties, such as anticancer, anti-inflammatory, antiobesity, and antimicrobial activities, as reviewed by D'Andrea¹³ and by Gupta et al.¹⁴ Even though data concerning the antiplasmodial activity of quercetin have shown that this flavonoid inhibits the growth of different *P. falciparum* strains,¹⁴ its clinical application may be limited because of its low solubility in aqueous media. On the other hand, it has been shown that increasing the solubility of quercetin by preparing aminoalkylated analogues improved its antiplasmodial activity.¹⁵ The presence of a sulfate group on quercetin may act similarly by increasing solubility.

The antiplasmodial activities of both 3'-O-hydroxysulfonylquercetin and quercetin were evaluated on the *P. falciparum* 3D7 strain. The IC₅₀ value of quercetin was assessed in this study at 17.54 ± 3.9 μM, in agreement with reported data.¹⁶ The 3'-O-hydroxysulfonylquercetin was found to be less active, with an IC₅₀ value of 40.58 ± 8.1 μM. This decrease in activity, despite the higher solubility compared to quercetin, may be due to the steric bulk of the B-ring. In contrast, an aminoalkylated group added to the A-ring of quercetin increased its antiplasmodial activity.¹⁵ Isoquercitrin and ellagic acid, whose antiplasmodial activities corresponded to reported data,^{16,17} were also tested. Their IC₅₀ values were calculated to be 42.34 ± 5.4 μM and 2.6 ± 0.98 μM, respectively.

The crude EtOAc extract was found to exhibit the highest activities. Fractionation of the EtOAc extract on an open column led to eight fractions, A to H. Evaluation of the antiplasmodial activity of these fractions showed that fractions E and G were the most active, with IC₅₀ values of 0.38 and 0.72 μg/mL, respectively.

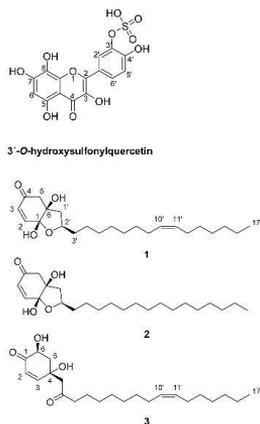
Purification of fractions E and G using preparative HPLC afforded three compounds 1–3, which were identified using NMR and LC-MS analysis (Chart 1). Their IR spectra showed a broad OH absorption band at 3383 cm⁻¹ and a strong absorption band of a conjugated carbonyl moiety at 1667 cm⁻¹. The three compounds were not separable by TLC but were separable by reverse-phase HPLC, even though the difference in retention times between 1 and 2 was small.

Compound 1 was assigned the formula C₂₃H₁₈O₄ from the [M + H]⁺ ion at m/z = 379.2845 by HR-ESI-TOF-MS analysis (calcd for C₂₃H₁₈O₄ = 379.2848). ¹³C APT NMR and edited-HSQC experiments indicated the presence of 1 methyl, 5 methine (including 4 olefinic), 14 methylene, and 3 carbons with no attached protons, including a carbonyl function. Examination of the COSY spectrum showed that most of the methylenes were involved in an alkyl chain bearing one of the two olefinic functionalities and terminated by Me-17'. The other end of this spin system consisted of methylene H-1', methine H-2', and methylene H-3'. Both H-1' and H-5 correlated with the deshielded C-1 and C-6 resonances. The former had a chemical shift that was characteristic of a hemiketal. Additionally, the deshielded C-2' resonance

B

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.1d01019
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

Chart 1



suggested that it was bonded to an oxygen. Because only two protons of hydroxy groups were visible in the ^1H NMR spectra and neither correlated to C-2' in the HMBC spectrum, it was deduced that C-1 and C-2' were linked through an ether bond, with C-1 bearing an additional hydroxy group, in accordance with its chemical shift. The more shielded C-6 was thus connected to both C-1' and C-5 and to a hydroxy group. This was in accordance with the observed HMBC cross-peaks of both hydroxy protons and C-6. The 1-OH proton also correlated with C-2, whose proton was part of an olefinic spin system that included H-3 as per the COSY spectrum. H-2 further exhibited an HMBC cross-peak with C-4, while H-3 correlated with C-5, suggesting a six-membered ring comprising C-1 through C-6. The remaining HMBC cross-peaks were consistent with the proposed bicyclic structure. TOCSY experiments with increasing mixing times indicated that the acyclic olefinic group was closer to the terminal methyl group than the bicyclic functionality. Its position was inferred from the literature, as all known Anacardiaceae cyclohexenones possess $\Delta^{10(11)}$ double bonds. This position was confirmed by an intense ion at m/z 145 observed in the GC-EI-MS spectrum of an α,β -bis(methylthio)-derivative of compound 1, obtained by a DMDS derivatization procedure. The (*Z*) configuration of the $\Delta^{10(11)}$ olefinic moiety was confirmed by comparison of the chemical shifts of C-9' and C-12' with literature values.⁸ Thus, the structure of compound 1 was defined as (2*R*,3*aR*,7*aR*)-2-[(*Z*)-pentadec-8-en-1-yl]-3*a*,7*a*-dihydroxy-2,3,3*a*,7*a*-tetrahydrobenzofuran-5(4*H*)-one, and named Poupartone A.

The NMR spectra of compound 2 indicated that it featured the same fused ring structure as 1 with a saturated aliphatic chain, while its HR-ESI-TOF-MS sodium adduct ion at m/z = 403.2812 indicated the presence of two more protons for a formula of $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4$ (calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}]^+$, 403.2824). The broad multiplets of the aliphatic methylene protons

integrated for two more protons than in compound 1. Thus, the structure of compound 2 was assigned as (2*R*,3*aR*,7*aR*)-2-pentadecyl-3*a*,7*a*-dihydroxy-2,3,3*a*,7*a*-tetrahydrobenzofuran-5(4*H*)-one, and named Poupartone B.

Compound 3 has the same molecular formula as 1, given its HR-ESI-TOF-MS ion at m/z = 379.2843. However, while the aliphatic chain was the same as in compound 1, its spectra differed from the two former compounds with respect to the cyclic part of the molecule. A two-proton spin system of the olefinic moiety and a three-proton spin system comprising H-6 and H-5 were evident in the ^1H NMR spectrum. The H-6 resonance was deshielded, indicating C-6 substitution by a hydroxy group. Both H-5 and H-3 showed HMBC cross-peaks with the C-1 carbonyl. Additional HMBC cross-peaks, including H-2/C-4 and H-6/C-4, completed a six-membered ring with the deshielded C-4 carrying the aliphatic chain and an additional hydroxy group. H-1' exhibited HMBC cross-peaks with both C-4 and the C-2' carbonyl carbon. A spin system starting from H-3' constituted the remainder of the aliphatic chain. Thus, compound 3 was found to be a 2'-oxo analogue of 4,6-dihydroxy-4-[(10'*Z*)-heptadecenyl]cyclohexenone,¹⁸ and its structure was defined as (4*S*,6*R*)-4,6-dihydroxy-4-[(*Z*)-2-oxoheptadec-10-en-yl]-cyclohexen-2-enone, and named Poupartone C. The key correlations observed in the HMBC and COSY NMR spectra of compounds 1–3 are shown in Figure 1.

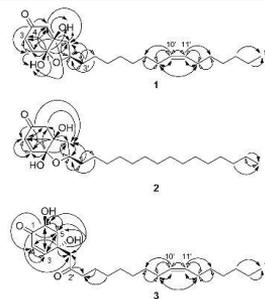


Figure 1. Key correlations observed in the HMBC (↔) and COSY (↔) NMR spectra of compounds 1–3.

The absolute configurations of compounds 1–3 were established by comparison of their experimental electronic circular dichroism (ECD) and ^{13}C NMR data with those predicted using the DFT/ ω B97XD/6-31+G(d,p) method. The modified probability (DP4+) method was used, which differs from the DP4 method by the inclusion of unscaled data and the use of higher levels of theory for the NMR calculation procedure.¹⁹ On the basis of geometrical considerations, four possible isomers were conceivable: 1*S*,6*R*,2'*R*/1*R*,6*S*,2'*S*; 1*S*,6*R*,2'*S*/1*R*,6*S*,2'*R*; 1*S*,6*S*,2'*R*/1*R*,6*R*,2'*S*; and 1*S*,6*S*,2'*S*/1*R*,6*R*,2'*R* (Figure 2).

The comparison of experimental and calculated NMR spectra allowed the determination of the relative configuration of 1 and 2 as (1*S*,6*S*,2'*S*/1*R*,6*R*,2'*R*) with a DP4+ probability of 100%. The (1*R*,6*R*,2'*R*) absolute configuration was then assigned by comparing the experimental and calculated ECD

C

DOI: 10.1021/jncs.1n00001.d011019
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

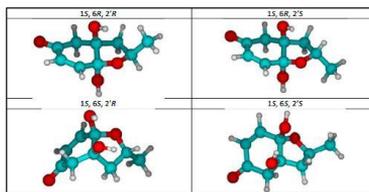


Figure 2. Diagram of the most stable configurations of the four isomers of compound 1.

spectra at the TDA/RI-B2GP-PLYP/de2-TZVPP/SMD level in MeOH (Supporting Information).

The comparison of the experimental and calculated NMR spectra of compound 3 allowed the definition of the relative configuration as (4*R*,6*S*/4*S*,6*R*) with a DP4+ probability of 100%. The (4*S*,6*R*) absolute configuration was then assigned by comparing the experimental and calculated ECD spectra at the TDA/RI-B2GP-PLYP/de2-TZVPP/SMD level in MeOH.

The compounds from the EtOAc extract were tested in vitro on the parasitic protozoa *P. falciparum*, and all showed high levels of activity against both chloroquine-sensitive strain W2 and chloroquine-resistant strain 3D7 (Table 3) with $IC_{50} < 2$ mM.

This class of compounds was previously observed in the Anacardiaceae family in *Tapirira guianensis* and showed antiprotozoal and antibacterial activities.²⁴ One of the compounds, described by Roumy et al. as 1,2',4,5-tetrahydro-1-[10'*Z*-heptadecenyl]-2-cyclohexene, had a much lower activity level (86.4 ± 2.6 μ g/mL on *P. falciparum*).²¹ Thus, it seems there is a positive effect on activity by the presence of a C-1 carbonyl and of an oxidation on C-2' for compound 3. Similar observations can also be established for compounds 1–2 possessing $\Delta^{2(3)}$ double bonds, as the compound devoid of this double bond, 1,3,4,6-tetrahydro-1,2'-epoxy-6-[10'*Z*-heptadecenyl]cyclohexane, is less active, with an IC_{50} on *Plasmodium falciparum* F32 strain of 101.3 ± 3.8 μ M.²¹ Other cyclohexenone derivatives were also described in *Tapirira obtusa*,²² as well as in *Pistacia vera*.²³

The cytotoxic activities of these types of compound were highlighted in *Tapirira guianensis*.¹⁸

A Chinese patent (CN 1733748 A, Feb 15, 2006) was filed for a compound that has a structure similar to that of compound 1 but with a longer side chain and a different configuration of the bicyclic system. It was obtained from extracts of *Choerospondias axillaris*, a plant from the Anacardiaceae, and possesses cell cycle inhibitory and apoptosis inducer effects allowing its use as an antitumor and anticancer agent.²⁴ This finding was a factor in the decision to analyze the cytotoxicity of 1–3.

These results show that compounds 1–3 are the bioactive compounds responsible for the activity of the EtOAc extract of the leaves of *P. borbonica* but also for the cytotoxicity which is similar to related compounds.²¹ Compound 1 has the most promising activity but is also the most cytotoxic, with an SI of 1.76 on the *P. falciparum* 3D7 strain and W138 cells. However, the antiplasmodial activity was not due to hemolysis, because neither the extract nor the isolated compounds induced red blood cell lysis at the highest concentration tested.

Using the method described by Deharo and Ginsburg,²⁰ the cyclohexenones 1–3 explain almost 50% of the activity of the EtOAc crude extract against *P. falciparum* (compound 1: 21.5%; compound 2: 21.4%; compound 3: 2.9%). As compound 1 was the most abundant, an in vivo antimalarial assay was performed using *P. berghei*-infected mice. Compound 1 showed an inhibition of 59.1 and 69.5% of parasitic growth at days 5 and 7 postinfection, respectively (Figure 3). Compound 1 significantly reduced parasitemia compared to the negative control. However, it was not devoid of toxicity, and despite the reduction of parasitemia, mice started to die on day 7.

Zebrafish larvae were used as a model to observe the toxicity of compound 1. The embryonic development of zebrafish is rapid, and the optical transparency of the embryos is convenient for investigating the causes of lethality.²⁵ It is also possible to observe developmental effects of a drug. Even if zebrafish cannot replace rodent models, they are useful for rapidly determining the toxicity of a drug in the early stages of an investigation. Embryos were dechorionated because the chorion has a protective function and isolates the embryo physically and chemically from external environmental conditions.²⁶ In the first step of analysis, logarithmic concentration series were used for range-finding. During the period of 24 h postfertilization (hpf) to 72 hpf, it was observed that all embryos died within 1 day after introduction of 10 μ g/mL of compound 1. The second part of the test enabled more detailed observations of toxicity at a range of specific drug levels. After the first treatment doses, all embryos died at doses of 10, 5, or 3 μ g/mL. At these concentrations, the embryos disintegrated, suggesting high contact toxicity. Neither 2.5 nor 2 μ g/mL doses induced disintegration, but a few (5%) of the embryos developed bradycardia. No toxicity was observed at 1 μ g/mL. Cumulative mortality was observed at 48 and 72 hpf, after two and three treatment doses, respectively. The 2.5 μ g/mL concentration dose was lethal for all embryos at 48 hpf. At 2 μ g/mL, 60% of the embryos died at 48 hpf, while the survivors developed a large decrease in pericardial function and body axis deformation and died at 72 hpf after the third dose. In contrast, at 72 hpf, no significant mortality or morphological modifications were observed in embryos treated with 1 μ g/mL.

The toxicity results from using a zebrafish embryo model may be an indication of the toxicity observed in mice. Indeed, although their cardiac morphology is simpler than the mammalian one, many features of the zebrafish heart are similar to those of mice.²⁷

In conclusion, the bioguided fractionation of an extract of the leaves of *P. borbonica* led to the isolation of three new alkyl cyclohexenone derivatives (1–3) that could explain, at least in part, the antiplasmodial activity of the EtOAc crude extract. These compounds showed high in vitro antiplasmodial activities, without any hemolysis, on the chloroquine-sensitive *P. falciparum* strain as well as on the resistant strain and displayed some toxicity. The in vivo assays performed on mice confirmed the high antimalarial activity of compound 1, even if toxicity was recorded from day 7. Regarding the toxicity test on the zebrafish embryo model, compound 1 seems to be responsible for heart failure. The mechanisms of action of these high potential antiplasmodial cyclohexenones, as well as elucidation of their structure–activity relationships, still need to be investigated. Ellagic acid, which is known to have high antiplasmodial activity,^{17,28} seems to be the compound that explains the major part of the activity of the methanol crude extract, even if other compounds may act in synergy or have an

D

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.1c01109
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

Table 2. NMR Data of Compounds 1–3 (δ in ppm, Multiplicity (J in Hz) and HMBC Correlations)

position	1		2		3	
	¹³ C, type	H (J in Hz)	H (J in Hz)	¹³ C, type	H (J in Hz)	H (J in Hz)
1	103.5, C	6.65 (d, J = 10.2)	6.66 (d, J = 10.1)	108.4, C	3.5, 1'	200.7, C
2	147.4, CH	5.83 (dd, J = 10.2, 0.7)	5.83 (dd, J = 10.1, 0.4)	147.3, CH	1	126.3, CH
3	127.5, CH	2.70 (dd, J = 15.9, 0.7)	2.57 (d, J = 16.1)	127.3, CH	5	5.95 (dd, J = 10.2, 2.1)
4	198.3, C	2.57 (d, J = 15.9)	2.70 (dd, J = 16.1, 0.4)	198.2, C	2, 5	6.90 (dd, J = 10.2, 2.0)
5	48.4, CH ₂	2.57 (d, J = 15.9)	2.57 (d, J = 16.1)	48.2, CH ₂	3, 1'	2.50 (ddd, J = 12.9, 4.9, 9.1)
6	79.9, C	4.65 (s)	not stable	79.7, C	6.5	1.86 (dd, J = 12.5, 9.1)
1-OH	372 (s)	not stable	not stable	not stable	4.51 (dd, J = 9.1, 4.9, 2.0)	3
6-OH	44.3, CH ₂	2.14 (dd, J = 13.2, 6.7)	2.15 (dd, J = 13.1, 6.7)	44.2, CH ₂	5	4.51 (dd, J = 9.1, 4.9, 2.0)
1'	1.62 (dd, J = 13.2, 8.5)	1.62 (dd, J = 13.1, 8.4)	not stable	48.7, CH ₂	2.64 (d, J = 14.7)	2.59 (d, J = 14.7)
2'	77.6, CH	4.28 (ddd, J = 13.2, 8.5, 6.7)	4.28 (ddd, J = 13.1, 8.4, 6.7)	77.4, CH	2, 5, 1', 3'	2.02, C
3'	37.0, CH ₂	1.50 (m); 1.40 (m)	1.51 (m); 1.39 (m)	36.9, CH ₂	1'	45.6, CH ₂
4'	26.6, CH ₂	1.25–1.35 (br m)	1.24–1.34 (br m)	26.5, CH ₂	2', 5', 6', 7'	24.1, CH ₂
5'-8'	30.1–30.7, CH ₂	1.25–1.35 (br m)	1.24–1.34 (br m)	30.44, 30.43 (2x), 30.41 (2x), 30.33 (2x), 30.32 (2x), 30.1, CH ₂	4'	2.97 (d, J = 8.5)
9'	28.03, CH ₂	2.02 (m)	1.24–1.34 (br m)	28.03, CH ₂	6', 7', 8', 10', 11'	1.47 (m)
10'	131.03, CH	5.35 (m)	1.24–1.34 (br m)	131.03, CH	6', 7', 8', 9', 10', 11'	1.23–1.34 (br m)
11'	130.98, CH	5.35 (m)	1.24–1.34 (br m)	130.98, CH	7', 8', 9', 10', 11'	2.02 (m)
12'	27.98, CH ₂	2.02 (m)	1.24–1.34 (br m)	27.98, CH ₂	10', 11'	5.35 (m)
13'-14'	30.5, 29.9, CH ₂	1.25–1.35 (m)	1.24–1.34 (br m)	30.5, 29.9, CH ₂	12', 15', 16'	5.35 (m)
15'	32.7, CH ₂	1.25–1.35 (m)	1.24–1.34 (br m)	32.7, CH ₂	17'	2.02 (m)
16'	23.6, CH ₂	1.25–1.35 (br m)	1.24–1.34 (br m)	23.6, CH ₂	17'	1.23–1.34 (br m)
17'	14.6, CH ₂	0.88 (t, J = 7.3)	0.88 (t, J = 7.1)	14.5, CH ₂	17'	1.23–1.34 (br m)

^aIn CD₂CN/methanol-d₄, 1:1, referenced to CD₂CN residual peak. ^bIn methanol-d₄, referenced to TMS. ^cIn CD₂CN, referenced to solvent residual peak.

Table 3. Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Compounds 1–3 and the EtOAc Extract

samples	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μg/mL)		cytotoxicity IC ₅₀ (μg/mL)		selectivity index (SI)		hemolysis (%)
	W2	3D7	HeLa	WI38	WI38/W2	WI38/3D7	
1	0.21 ± 0.010	0.34 ± 0.040	0.80 ± 0.120	0.60 ± 0.380	2.86	1.76	<1%
	0.55 ± 0.003	0.90 ± 0.015	2.10 ± 0.316	1.58 ± 1.000			
2	0.37 ± 0.050	0.69 ± 0.200	1.44 ± 0.340	1.04 ± 0.500	2.81	1.51	<1%
	0.97 ± 0.130	1.81 ± 0.520	3.77 ± 0.890	2.73 ± 1.300			
3	0.48 ± 0.040	0.43 ± 0.160	1.31 ± 0.430	1.01 ± 0.820	2.10	2.34	<1%
	1.27 ± 0.105	1.13 ± 0.420	3.45 ± 1.130	2.66 ± 2.160			
EtOAc extract	1.78 ± 0.390	2.43 ± 0.500	3.37 ± 0.350	3.23 ± 0.350	1.81	1.33	<1%
artemisinin	0.010 ± 0.002	0.004 ± 0.001	NT	NT			NT
	0.035 ± 0.007	0.014 ± 0.004					
camptothecin	NT	NT	0.080 ± 0.015	0.030 ± 0.011			NT
			0.230 ± 0.043	0.086 ± 0.032			

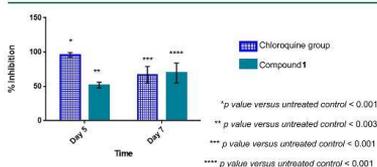


Figure 3. In vivo parasitemia inhibition in mice infected by *Plasmodium berghei* and treated intraperitoneally with 15 mg/kg/d of compound 1.

additive action. The moderate antiplasmodial activity of 3'-O-hydroxysulfonylquercetin is described here for the first time, as is the suggestion that the B-ring of quercetin plays an important role in that activity.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. The UV spectra were recorded in MeOH on a Hitachi U-2910 spectrophotometer. The ECD spectra were recorded in MeOH at 25 °C using a Jasco J-810 spectrophotometer. The FT-IR spectra were measured on a Frontier PerkinElmer spectrophotometer equipped with an ATR module. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃CN and/or MeOH-*d*₄ on a Bruker AVANCE 1 500 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe. 2D experiments were performed using standard Bruker microprograms. LC/MS was performed on a Thermo Scientific LTQ orbitrap XL mass spectrometer with ESI source in positive mode with an RP select B LiChrospher 60 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. All solvents used were analytical grade (Merck, Hohenbrunn, Germany). A Varian ProStar chromatography system with diode array detector was employed to profile the extracts. A Varian ProStar chromatography equipped with a Büchi fraction collector C-660 unit was used to accomplish the preparative isolation. The following columns were employed: Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), PFP Luna (250 mm × 4.6 mm, 10 μm), RP select B LiChrospher 60 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). GC-MS analysis of compounds 1 and 3 was performed with a Jeol JMS-T100GCV (EI-TOFMS, positive ion mode) apparatus fitted with an Rtx-5 capillary column (Restek -5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane), using the same conditions described by Mansour et al.²⁸

Analytical TLC was performed on precoated Si gel 60 F₂₅₄ (Merck, Hohenbrunn, Germany) plates. After development (*n*-hexane/EtOAc/HOAc, 14:6:0.3), the dried plates were observed under 254 nm and sprayed with sulfuric vanillin and heated for 15 min at 110 °C to analyze the EtOAc extract and isolated compounds. TLC plates for the MeOH extract were developed with EtOAc/formic acid/HOAc/H₂O

(100:11:11:26) and sprayed with NP-PEG [Natural Product Reagent (1% diphenylboryloxyethylamine in MeOH) and polyethylene glycol 4000 (5% polyethylene glycol 4000 in EtOH)]. The dried plates were examined under ultraviolet light (366 nm).

Plant Material. The male plants were collected on Reunion Island and identified by H. Thomas (Parc National de La Réunion). Voucher specimens (no. RUN 028E, TCN-P022F) were deposited in the Herbarium of the University of Reunion Island. The leaves were air-dried at room temperature with no direct sunlight and then pulverized using an electrical grinder. Extracts were prepared with 5 g of powdered dried material and then macerated three times in 50 mL of solvent (MeOH, EtOAc, *n*-hexane, or CH₂Cl₂) for 30 min with constant shaking at room temperature. The filtrates were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure at 40 °C.

The leaves of *P. borbonica* were air-dried (200 g), pulverized, and extracted by maceration with EtOAc (2 L, 30 min ×3) at room temperature. After filtration, the solvent was evaporated at low temperature (<40 °C) under pressure. The resulting dried extract (1.0 g) was defatted using a two-phase solvent system, *n*-hexane/MeOH/CH₃CN (60:5:3.5), as described by Roumy et al.²¹ The biologically active lower phase was dispersed in EtOAc and subjected to open silica column chromatography, eluting with a gradient of EtOAc and CH₂Cl₂ from 5:95 to 100:0. A total of 67 fractions were collected and analyzed by analytical TLC and grouped into 8 subfractions (A-H) on the basis of the TLC profiles. The biologically active fractions E and G (53 mg) were grouped on the basis of their HPLC profiles and subjected to a preparative HPLC column (30 cm × 2.5 cm) using a LichroPrep RP-18 (25–40 μm, Merck) support. The flow rate was 30 mL/min with a binary solvent system of formic acid 0.1% in H₂O and MeOH (40:60 to 0:100 v/v in 30 min). Compounds 1–3 were eluted between the 15th and 25th minute. Further purification of compound 3 was performed by preparative TLC eluted with *n*-hexane/EtOAc/HOAc (14:6:0.3).

Isolation of the Phenolic Compounds in the MeOH Extract of *P. borbonica* Leaves. Leaves of *P. borbonica* were air-dried (100 g), pulverized, and extracted by maceration with MeOH (1 L, 30 min ×3) at room temperature. After filtration, the solvent was evaporated at a temperature below 40 °C under pressure. The resulting dried (18 g) extract was fractionated by preparative HPLC with a LichroPrep RP-18 (25–40 μm, Merck, Hohenbrunn, Germany) support column using a gradient of trifluoroacetic acid (0.05%) and CH₃CN (100:0 to 60:40 v/v). Fractions containing 3'-O-hydroxysulfonylquercetin were washed 6 times with 30 mL of Et₂O to remove trifluoroacetic acid. The same procedure was performed without TFA to obtain ellagic acid.

In Vitro Antiplasmodial Activity. Continuous in vitro cultures of asexual erythrocyte stages of *P. falciparum*, chloroquine-sensitive strain 3D7 (originally isolated from a patient living near Schipol airport in The Netherlands), and chloroquine-resistant strain W2 (originally isolated from a Lao refugee in 1980)^{30,31} were maintained following the procedure of Trager and Jensen.³² The host cells were human red blood cells (A+). The culture medium comprised RPMI 1640 (Gibco,

F

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.1c01019
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

Fisher Scientific, Loughborough, U.K.) containing NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM), and L-glutamine. The medium was supplemented with 1.76 g/L of glucose (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium), 44 mg/mL of hypoxanthin (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium), 100 mg/L of gentamycin (Gibco, Fisher Scientific, Loughborough, U.K.), and 10% human pooled serum (A+), as described by Bero et al.³³ Strains were obtained from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, MR4.

Solutions of crude extracts were prepared in DMSO at 10 mg/mL. The highest concentration of solvent to which the parasites were exposed was 1%. At this concentration, the extract did not show any toxicity to *P. falciparum*. The solutions of tested extracts and compounds were diluted in medium; each test sample was applied in a series of eight 2-fold dilutions in a 96-well plate and tested in triplicate. The parasitemia was 2%, and the hematocrit was 1%, as described by Murebwayire et al.³⁴ Parasite growth was estimated after 48 h incubation by the determination of lactate dehydrogenase (pLDH) activity, according to the methods described by Makler et al.³⁵ Artemisinin (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium) at an initial concentration of 100 ng/mL was used as positive control in all experiments. IC₅₀ values were calculated from graphs.

In Vitro Cytotoxic Activity. Assays were performed on HeLa cells to evaluate the cytotoxicity potential of crude extracts and isolated compounds. Compounds were tested in 96-well microplates using the tetrazolium salt WST-1 (Roche Diagnostics Belgium, Vilvoorde, Belgium) colorimetric assay based on the cleavage of the reagent by mitochondrial succinate-tetrazolium reductase in living cells. Cells (6000) were seeded per well in 200 μ L of medium supplemented with adequate concentrations of the tested drugs. After 48 h of incubation, 10 μ L of WST-1 was added to each well. After 30 min at 37 °C, the plates were shaken, and absorbance values were recorded at 450 nm. The absorbance values were expressed in percentage terms compared to untreated control cells. IC₅₀ values were calculated from graphs. The HeLa cells were obtained from the Laboratory of Medical Chemistry, GIGA, ULg.

Selectivity Index. The selectivity index was calculated as the ratio between the cytotoxic activity on W138 cells (IC₅₀) and 3D7 or W2 antiparasitic activities (IC₅₀).

In Vitro Hemolytic Activity. Hemolysis assays were performed according to a reported procedure³⁷ with EtOAc crude extract and isolated compounds. A red blood cell suspension (A+, 10% in PBS (v/v)) was incubated with extract or isolated compounds in triplicate. The final concentrations were 100 μ g/mL for the extract and 10 μ g/mL for each isolated compound (DMSO < 1%). After agitation at room temperature for 1 h, the mixtures were centrifuged for 5 min at 2000 rpm, and 150 μ L of each supernatant was transferred to a 96-microwell plate to measure the absorbance (OD) at 550 nm with a microplate reader. The positive control was Triton X-100 1% (v/v) (corresponding to 100% red blood cell lysis) and PBS as the negative control (corresponding to 0% red blood cell lysis). The percentage of red blood cell lysis (*H*) was calculated as follows: $H = (\text{OD}_{550 \text{ nm sample}} - \text{OD}_{550 \text{ nm PBS}}) / (\text{OD}_{550 \text{ nm Triton X-100 1\% (v/v)}} - \text{OD}_{550 \text{ nm PBS}})$.

Cytotoxic Activity on the Zebrafish Larva. Adult zebrafish (*Danio rerio*) were maintained while fulfilling the criteria of the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals at the University of Liège. They were maintained at 28 °C on a 14 h day/10 h night period, and fertilized eggs were collected, washed with sterile water, and placed in Petri dishes. Larvae were collected, and chorions were removed. Tests were performed in two steps; the first one to determine the range of concentrations to be used to determine LC₅₀ during the second step, by a narrower geometric series, as described by Shaikat et al.³⁶ Geometric series were performed in duplicate. First, logarithmic concentrations were tested (10 to 0.001 μ g/mL). Second, the range of tested concentrations was narrowed and included only between 10 and 1 μ g/mL. Compound 1 was in DMSO solution and was diluted with the medium used for zebrafish. The DMSO final higher concentration was 0.4%. Twenty-five embryos were used per condition in a 6-well plate. Each well contained 5 mL of the treatment dose, which was replaced once daily for 3 days. The embryos were

observed each day until 72 hpf. Twenty-five embryos were used as control, and 25 others were used to control the solvent (DMSO, 0.4%).

Antiplasmodial Activity Testing in Vivo. The present study was approved by the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals at the University of Liège (no. 721) and was designed according to internationally recognized guidelines.

Female Swiss mice (10 weeks old, 25 \pm 2 g), obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France), were infested by the murine parasite *Plasmodium berghei* NK173, following the protocol described by Frédéric et al.³⁸ Groups of five mice were formed randomly. Parasitized red blood cells (2×10^7) were injected into each mouse by ip injection.

Compound 1 was tested using a protocol based on the 4-day suppressive test of Peters,³⁹ as recommended by the WHO.⁴⁰ The treatment dose (15 mg/kg ip, dissolved in 7% Tween 80 and 3% EtOH in sterile water) was given 4 h after infection (day 0) and was repeated once daily for the next 3 days. The parasitemia was evaluated by microscope using thin blood smears made from mouse-tail blood and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich, Machelen, Belgium) and determined by counting at least 500 erythrocytes. The vehicle solution was used as a negative control (7% Tween 80 and 3% EtOH in sterile water), and chloroquine was used as the positive control, at 4 mg/kg ip with the same vehicle. The percentage of inhibition of parasite growth was calculated by comparison of the parasitemia counted for the test group with the parasitemia of the negative control group at days 5 and 7.

Computational Methods. The quantum chemical calculations were performed using density functional theory (DFT). The molecular geometries were optimized by the DFT/ωB97XD/6-31+G(d,p) method. Chemical shifts were calculated for the obtained geometries by DFT/TPSSH/6-311+G (2d,p) and reoptimized taking into account the solvent by TDA/RI-B2GP-PLYP/def2-TZVPP/SMD. ECD spectra were calculated from the spectra of individual conformers according to their contribution calculated by Boltzmann weighting.

Poupartone A (1). Colorless oil; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (2.27); IR 3383 (br OH), 3000 (alkene) 2916, 2833, 1667 (C=O), 1450 (alkane) cm⁻¹; ¹H, ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, and methanol-d₄) see Table 2; HR-ESI-MS m/z : = 379.2845 [M + H]⁺ (calcd C₂₁H₂₉O₄, 379.2848).

Poupartone B (2). Colorless oil; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 210 (2.18); IR 3383 (br OH), 3000 (alkene) 2917, 2850, 1667 (C=O), 1467 (alkane) cm⁻¹; ¹H, ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) see Table 2; HR-ESI-MS m/z : = 381.299 [M + H]⁺ (calcd C₂₃H₃₁O₄, 381.299) and 403.2812 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₃H₃₁O₄Na, 403.2824).

Poupartone C (3). Colorless oil; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 200 (1.90); IR 3400 (br OH), 3000 (alkene) 2915, 2835, 1683, 1667 (C=O), 1450 (alkane) cm⁻¹; ¹H, ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, and methanol-d₄) see Table 2; HR-ESI-MS m/z : = 379.2843 [M + H]⁺ (calcd C₂₁H₂₉O₄, 379.2848).

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01019.

1D and 2D NMR spectra of compounds 1–3; experimental and calculated ECD spectra of compound 1; dose dependence of cytotoxic activity of 1 on zebrafish larva (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: Allison.ledoux@ulg.ac.be. Tel: +32-4366-4336.

ORCID

Allison Ledoux: 0000-0002-4052-6336

G

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01019
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank N. Bulté, D. Étienne, I. Ielciu, S. Lhoest, and J.C. van Heugen for their technical assistance and M.F. Herent for recording MS data in the Massmet platform (the equipment was obtained by funding from the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) (FRFC 2.4555.08 and 1.5128.11). E. Boyer, T. Hermann, and M. Felicite are acknowledged for the plant collection. The following reagents were obtained through BEI Resources Repository, NIAID, NIH: *Plasmodium falciparum*, strain 3D7, MR-102, contributed by Daniel J. Carucci and strain W2, MR-157, contributed by Dennis E. Kyle. This research was also supported by the European Commission and the Regional Council of Reunion Island: BIOMOL-TCN program (Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de Molécules Issues de la Biodiversité Terrestre, Marine et Microbienne de la Zone Sud-Ouest de l'Océan Indien), ERDF (European Regional Development Fund) and the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) (Grant No. T.0190.13).

REFERENCES

- World Health Organization (WHO). *World Malaria Report*; WHO: Geneva, Switzerland, 2015; p 280.
- Bero, J.; Frédérick, M.; Quetin-Leclercq, J. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 1401–1433.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–61.
- Maxime BURST, C. L. *Poupartia borbonica: Plan national d'actions 2012–2016: outils d'aide à la conservation des espèces végétales menacées d'extinction*; Conservatoire Botanique National de Mascarin: Saint-Leu, Réunion, 2011; p 106.
- Cordemoy, E. J. d. *Flore de l'île de la Réunion (Phanérogames, Cryptogames vasculaires, Muscinées): avec indication des propriétés économiques et industrielles des plantes*; P. Klincksieck: Paris, 1895; p 614.
- Lavergne, R. *Le Grand Livre des Tisaneurs et Plantes Médicinales Indigènes de l'île de la Réunion*; Orphie: Saint-Denis, 1996; Vol. 1.
- Adersen, A.; Adersen, H. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *58*, 189–206.
- Barron, D.; Varin, L.; Ibrahim, R. K.; Harborne, J. B.; Williams, C. A. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2375–2395.
- Varin, L.; Ibrahim, R. K. *Plant Physiol.* **1991**, *95*, 1254–8.
- Barron, D.; Ibrahim, R. K. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2362–2363.
- Krepesky, P. B.; Farias, M. R.; Cortés, S. F.; Braga, F. C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, *38*, 125–127.
- O'Leary, K. A.; Day, A. J.; Needs, P. W.; Mellon, F. A.; O'Brien, N. M.; Williamson, G. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 479–491.
- D'Andrea, G. *Fitoterapia* **2015**, *106*, 256–71.
- Gupta, A.; Birhman, K.; Raheja, L.; Sharma, S. K.; Kar, H. K. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2016**, *6*, 248–252.
- Helgren, T. R.; Sciotti, R. J.; Lee, P.; Duffy, S.; Avery, V. M.; Ighinoba, O.; Akoto, M.; Hagen, T. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 327–332.
- Murakami, N.; Mostaqul, H. M.; Tamura, S.; Itagaki, S.; Horii, T.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2445–7.
- Verotta, L.; Dell'Agli, M.; Giolito, A.; Guerrini, M.; Cabalion, P.; Bossio, E. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 603–7.
- David, J. M.; Chavez, J. P.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 287–9.
- Grimblat, N.; Zanardi, M. M.; Sarotti, A. M. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 12526–34.
- Ginsburg, H.; Deharo, E. *Malar. J.* **2011**, *10* (Suppl), S1.
- Roumy, V.; Fabre, N.; Portet, B.; Bourdy, G.; Acebey, L.; Vigor, C.; Valentin, A.; Moulis, C. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 305–11.
- Correia, S. D.; David, J. M.; David, J. P.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 781–4.
- Saitta, M.; Giuffrida, D.; La Torre, G. L.; Potorti, A. G.; Dugo, G. *Food Chem.* **2009**, *117*, 451–455.
- Cui, C.; Li, C.; Cai, B.; Han, B. Preparation and Application of Cyclohexenones Bicyclic Condensed Compound. CN1733748A, 2006.
- Gupta, R. C. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 1st ed.; Academic Press: Cambridge, 2016.
- Cotelli, F.; Andronico, F.; Brivio, M.; Lami, C. L. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **1988**, *99*, 70–78.
- McCollum, C. W.; Ducharme, N. A.; Bondesson, M.; Gustafsson, J. A. *Birth Defects Res. Part C* **2011**, *93*, 67–114.
- Mansour, M. P.; Holdsworth, D. G.; Forbes, S. E.; Macleod, C. K.; Volkman, J. K. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 659–674.
- Banzouzi, J. T.; Prado, R.; Menan, H.; Valentin, A.; Roumestan, C.; Mallie, M.; Pelissier, Y.; Blache, Y. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *81*, 399–401.
- Delemarre, B. J.; van der Kaay, H. J. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **1979**, *123*, 1981.
- Kaneko, O. *Origin of Some P. falciparum strains*. <http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/eng/Strain1.htm> (accessed Jun 13, 2016).
- Trager, W.; Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673–5.
- Bero, J.; Herent, M. F.; Schmeda-Hirschmann, G.; Frederich, M.; Quetin-Leclercq, J. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *149*, 176–83.
- Murebwayire, S.; Frederich, M.; Hannaert, V.; Jonville, M. C.; Duez, P. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 728–33.
- Mulder, M. T.; Ries, J. M.; Williams, J. A.; Bancroft, J. E.; Piper, R. C.; Gibbins, B. L.; Hinrichs, D. J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 739–741.
- Ali, S.; van Mil, H. G.; Richardson, M. K. *PLoS One* **2011**, *6*, e21076.
- Jansen, O.; Tits, M.; Angenot, L.; Nicolas, J. P.; De Mol, P.; Nikiema, J. B.; Frédérick, M. *Malar. J.* **2012**, *11*, 289.
- Frederich, M.; Jacquier, M. J.; Thepenier, P.; De Mol, P.; Tits, M.; Philippe, G.; Delaude, C.; Angenot, L.; Zeches-Hanrot, M. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1381–6.
- Peters, W.; Robinson, B. L. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1991**, *85*, 5–10.
- Fidock, D. A.; Rosenthal, P. J.; Croft, S. L.; Brun, R.; Nwaka, S. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 509–20.

H

DOI: 10.1021/jnpr00000a000
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

2. TRAVAUX SUR LE *POUPARTIA BORBONICA* NON DISCUTÉS DANS LE CADRE DE CE MÉMOIRE

“NMR Metabolomic analysis as a tool to identify antiplasmodial compounds in *Poupartia borbonica* extracts” Ledoux, A., Coelho Cristino Mamede, L. C., Jansen, O., Hae Choi, Y., & Frederich, M. (2018, May 23). 11èmes journées scientifiques du RFMF, Liège, Belgique **(Poster)**



NMR Metabolomic analysis as a tool to identify antiplasmodial compounds in *Poupartia borbonica* extracts

Ledoux Allison¹, Mamede Lucia¹, Jansen Olivia¹, Young Hae Choi², Frédéric Michel¹

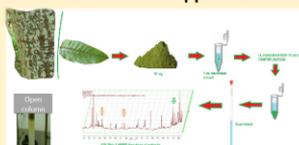
¹ CIRM, Laboratoire de pharmacognosie, Université de Liège, Av. Hippocrate 15, 4000 Liège, Belgique

² Division of Pharmacognosy, Section of Metabolomics, Institute of Biology, Leiden University, Leiden, The Netherlands

Backgrounds & Objectives

- ✓ Malaria = 429 000 deaths/2015 → multidrug resistance > → necessity of new compounds
- ✓ >60% of new antiparasitic drugs have plants origins → potential source for lead discovery!
- ✓ *Poupartia borbonica* = Plants from Mascarene Islands → contains antiplasmodial compounds
- ✓ Bioguided fractionation: long & expensive → Is it possible to use a NMR based metabolomic approach?

Metabolomic approach



Bioassay guided fractionation approach



Results & Discussion

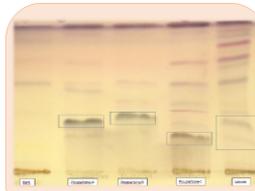
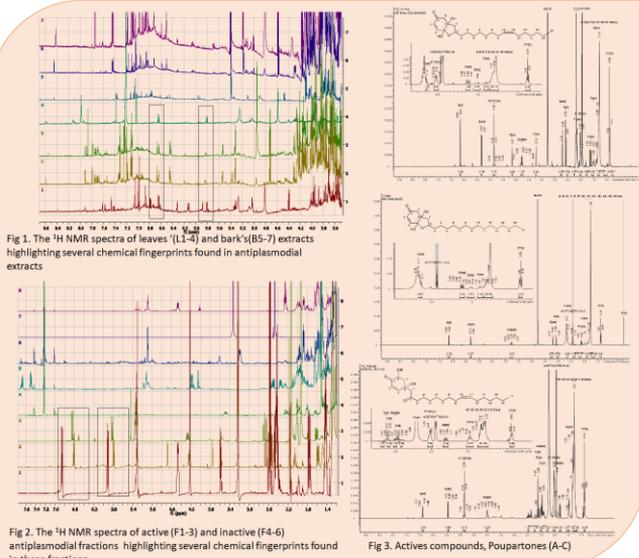


Fig 4. Exclusion of poupartones in the leaves confirmed by TLC

Product	<i>P. falciparum</i> (IC ₅₀ µg/mL)
L1	20,45
L2	48,23
L3	46,37
L4	36,35
B5	> 50
B6	> 50
B7	> 50
F1	0,38
F2	0,72
F3	0,67
F4	> 50
F5	> 50
F6	> 50

Fig 5. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions

Conclusion

Active compounds were discovered in the leaves by bioassay guided fractionation and a correlation between the metabolomic analysis and extracts activities was established. Thus, metabolomic can be used as a tool to identify several unique fingerprints belonging to active extracts' fractions. This strategy involved less sample preparation, biotests, and solvents. Existing databases could also be used to prevent lingering over known compounds.

Acknowledgements

Étienne D., Desdemoustier P., and Bulté N. are greatly acknowledged for technical support. I would like to thank Hermann T. and Felicite M. who collected the plant



CIRM ULIège

WEBSITE: www.cirm.uliege.be

CENTER FOR INTERDISCIPLINARY
RESEARCH ON MEDICINES

3. AUTRES PUBLICATIONS EN TANT QUE PREMIER AUTEUR

Beaufays*, C., Ledoux*, A., Jansen, O., bordignon, A., Zhao, S., Teijaro, C., Andrade, R., Quetin-Leclercq, J., & Frederich, M. (2018). *In vivo* antimalarial and antitrypanosomal activity of strychnogucine B, a bisindole alkaloid from *Strychnos icaja*. *Planta Medica*, 84, 881-885.

Ledoux A., Mareatefau H., Jansen O., Etienne D., Quetin-Leclercq J., Clerc P., Smadja J., & Frederich M. (2015). Phytochemical Profile and Biological Activity Evaluation of *Zanthoxylum heterophyllum* Leaves against Malaria. *Planta Medica Letters*, 2, 10-e11.

In vivo Antimalarial and Antitrypanosomal Activity of Strychnogucine B, a Bisindole Alkaloid from *Strychnos icaja**

Authors

Claire Beaufay^{1**}, Allison Ledoux^{2**}, Olivia Jansen², Annélie Bordignon², Senzhi Zhao³, Christiana N. Teijaro³, Rodrigo B. Andrade³, Joëlle Quetin-Leclercq¹, Michel Frédérick²

Affiliations

- 1 Pharmacognosy Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium
- 2 Laboratory of Pharmacognosy, CIRM, Université de Liège, Liège, Belgium
- 3 Department of Chemistry, Temple University, Philadelphia, PA, United States of America

Key words

strychnogucine B, antimalarial, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Strychnos icaja*, Loganiaceae, alkaloids, synthesis

received February 28, 2018

revised June 8, 2018

accepted June 12, 2018

Bibliography

DOI: <https://doi.org/10.1055/a-0644-2723>

Published online June 21, 2018 | *Planta Med* 2018; 84: 881–885 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York | ISSN 0032-0943

Correspondence

Prof. Dr. Frédérick Michel

Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Liège
Avenue de l'Hôpital 1, 4000 Liège, Belgium
Phone: + 32 43 66 43 30, Fax: + 32 43 66 43 32
M.Frederick@ulg.ac.be

Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/products>

ABSTRACT

Strychnogucine B is a bisindole alkaloid previously isolated from *Strychnos icaja* that possesses promising *in vitro* antiplasmodial properties. This compound was synthesized in four steps from (–)-strychnine. As no acute toxicity was observed at the highest tested cumulative dose of 60 mg/kg, its *in vivo* antimalarial activity was determined intraperitoneally at 30 mg/kg/d in a *Plasmodium berghei* murine model. In the Peters's 4-d suppressive test, this alkaloid suppressed the parasitaemia by almost 36% on day 5 and 60% on day 7 compared to vehicle-treated mice. In addition to this interesting antimalarial activity, it showed moderate *in vitro* antitrypanosomal activity but no *in vivo* activity in an acute *Trypanosoma brucei* model. It was also inactive *in vitro* on *Leishmania mexicana* promastigotes. This highlights its selective antimalarial efficacy and leads to further investigation to assess its potential as new antimalarial lead compound.

Introduction

According to the World Malaria Report [1], 445 000 malaria deaths were reported worldwide in 2016 with about 200 million people affected each year. Malaria is caused by a protozoan parasite, *Plasmodium* sp., and transmitted by female *Anopheles* mosquitoes. Parasite resistance toward available medicines such as chloroquine, mefloquine, but also artemisinin derivatives is gradually increasing, inducing malaria reemergence despite numerous

control efforts. Natural products are a validated source of potential new antimalarial drugs to overcome this key threat in the fight against this tropical disease. Indeed, natural biosynthesis produces a large variety of bioactive secondary metabolites with complex structures [2–4], with quinine and artemisinin remaining the best examples to date. Nevertheless, one main limitation of these natural compounds is their supply and efficient isolation in large amount. Semi- or total synthesis based on promising scaffolds represents a prime solution to this shortcoming [5].

* Dedicated to Professor Dr. Robert Verpoorte in recognition of his outstanding contribution to natural product research.

** These authors contributed equally to the work.

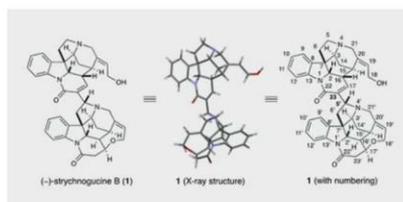
Strychnos icaja Baill. (Loganiaceae) is used as an ordeal poison in the Democratic Republic of Congo and also to treat malaria [6]. The study of their roots and other *Strychnos* species led to the identification of several new antiplasmodial alkaloids, giving information to validate the ethnopharmacological use. Among them, strychnogucine B (► Fig. 1), a tertiary quasi-symmetric bisindole alkaloid, showed one of the highest selective *in vitro* antiplasmodial activities, especially against a chloroquine-resistant strain (► Table 1) [7–9]. Nevertheless, because of the low isolated yields of alkaloids from *S. icaja*, only isosungucine was evaluated *in vivo* on the *Plasmodium vinckei petteri* strain and showed good effects [10]. Viewing these results, it seems interesting to evaluate the *in vivo* antimalarial activity of strychnogucine B, the most active (IC₅₀ 2–3 times lower than isosungucine) and selective alkaloid identified in *S. icaja*. Furthermore, it showed an insignificant interaction with the glycine receptor, in comparison to strychnine, which obviates the issue of strychnine-like poisoning [11].

The objective of this work was to test strychnogucine B *in vivo* to assess its potential as a new antimalarial lead compound for further drug development and also obtain some safety data. This highly active compound was also evaluated on other parasites, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei*, to define its anti-parasitic activity/selectivity. As its isolation furnished very low yields, a concise semisynthetic method in four steps from (–)-strychnine was used to yield enough material [12].

Results and Discussion

The acute toxicity of strychnogucine B given *i. p.* was evaluated according to the highest tolerated dose model [13]. Body weight, hematocrit, general aspect, and behavior remained stable. Moreover, main organ weight was unaltered compared to control (► Fig. 2), and macroscopic observations did not show any particular signs of toxicity. Overall, this alkaloid did not induce any acute toxic symptoms at a total *i. p.* cumulative dose of 60 mg/kg, meaning that the efficacy test can be performed at a maximum dose of 30 mg/kg without any risk of acute toxicity.

Given this and its selective *in vitro* antiplasmodial activity (IC₅₀ < 1 μM and selectivity index [SI] from 25 to 180, ► Table 1) [9], strychnogucine B was evaluated *in vivo* on *Plasmodium berghei* and its antimalarial activity is presented in ► Fig. 3. The classical 4-d suppressive test of Peters [14] was performed, which is the procedure recommended by the World Health Organization as the first-line screen for *in vivo* testing of potential antimalarial leads. In this test, strychnogucine B was administered *i. p.* for four successive days to malaria-infected mice. This administration mode was chosen in a first time to allow comparison with other tested bisindole alkaloids and to secure substantial bioavailability and action speed. At 30 mg/kg/d, parasitaemia was reduced on day 5 by 35.8% and on day 7 by 60.3% (with a *p*-value of 0.002 versus negative control) and survival was increased by at least 24 h for 80% of the mice. The parasitaemia in the chloroquine group on day 7 was reduced by 67% compared to the control, a similar very significant inhibition percentage than the tested compound. Nevertheless, at day 10, only 50% of the mice treated with strychnogucine B were still alive (0% in negative control and 100% in chloroquine group), implying that the dose should be adjusted.



► Fig. 1 Chemical structure of (–)-strychnogucine B.

Therefore, our results show that strychnogucine B possesses interesting antimalarial activity, both *in vitro* against different strains and *in vivo* against a chloroquine-sensitive murine strain. For its parent compound, isosungucine, previously tested on a *P. vinckei* model, parasitaemia reduction was observed earlier but apparently on a shorter period (75% and 47% on days 2 and 4, respectively) with only one mouse of six still alive at day 7. This can be related to activity (IC₅₀ two times higher = 1.32 μM *in vitro* on FCA 20), bioavailability, or metabolism differences but also *in vivo* model [10] and has to be explored in the future. Overall, these results enhance the drug development potential of strychnogucine B as it fills the criteria for lead candidate [15] but also strengthens the validation of *S. icaja* use in traditional medicine.

In the literature, many other indole alkaloids were identified in *Strychnos* species and other natural sources with strong antiplasmodial activity (IC₅₀ < 2 μM) and some were tested *in vivo* [16–19]. Among bisindole alkaloids, isostrychnopentamine (usambarine-type) was more active on the chloroquine-sensitive FCA 20 strain but less on the resistant W2 one than strychnogucine B (IC₅₀ = 0.12 and 0.15 μM compared to 0.62 and 0.09 μM, respectively). It also showed activity on all parasite stages with a preferential activity on the early ring stage at low concentration and did not accumulate in the digestive vacuole. Moreover, at day 5, an *i. p.* 30 mg/kg/d treatment significantly inhibits parasitaemia of 46% and 61.8% in *P. berghei* or *P. vinckei petteri*-infected mice, respectively [20]. This inhibition difference can be related to the different numbers of daughter parasites in mature schizonts, lower for *P. vinckei*, that will influence virulence. In comparison with strychnogucine B, isostrychnopentamine showed a higher inhibition at day 5, but parasitaemia at day 7 was not reported. Concerning survival, 40% versus 50% of mice were still alive at day 10, respectively. Antimalarial efficacy seems thus comparable on the *P. berghei* species. However, the α -epimer, strychnopentamine, was inactive in the same condition by oral and subcutaneous routes on this strain [21] even if it displayed similar *in vitro* antiplasmodial activities. The same result was observed for dihydrousambarensine (IC₅₀ = 0.032 μM on W2 strain, SI = 375, inactive *in vivo* at 30 mg/kg *i. p.* and *s. c.*), [7]. This can be due to the administration mode, different targets, structural interaction or mechanisms of action. The last bisindole alkaloid reported with strong antiplasmodial activity and tested *in vivo* is voacamine, less active *in vitro* on W2 strain than strychnogucine B (IC₅₀ =

► **Table 1** *In vitro* antiparasitic activities of strychnogucine B compared to reference compounds and its selectivity indices.

Parasite	IC ₅₀ in μM (95% confidence interval)		SI	
	Strychnogucine B	Positive control	W138	HCT-116*
<i>P. falciparum</i>:				
▪ FCA 20 Ghana	0.617*	0.020**	12.0	24.3
▪ FCB1-R Colombia	0.529*	0.032**	14.0	28.3
▪ W2 Indochina	0.085*	0.284**	87.1	176.4
<i>T. brucei brucei</i>	2.576 (1.596–4.159)	0.016 (0.007–0.034) ^b	2.8	5.6
<i>L. mexicana mexicana</i>	>20	0.089 (0.054–0.141) ^c	<0.4	<0.8

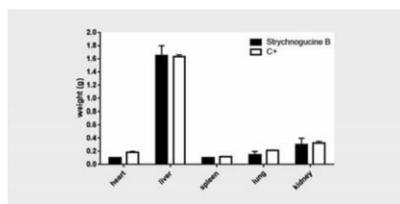
IC₅₀ in μM with the 95% confidence interval for newly reported activities and SI of strychnogucine B = IC₅₀ W138 or HCT-116/IC₅₀ parasite. *Data reproduced from Frédéric et al. (chloroquine-sensitive, moderately sensitive, and resistant lines respectively) [8, 9]. Reference drugs for positive control: ^achloroquine, ^bsuramine, and ^cpentamidine

0.411 μM) [18], and inducing 43% parasitaemia inhibition in *Plasmodium yoelii*-infected mice at 10 mg/kg/d *per os* on day 4 post-infection with some specificity for trophozoites and schizonts [22].

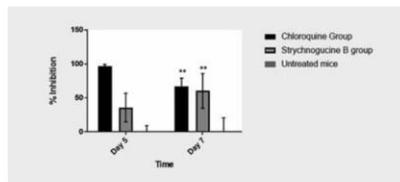
On this basis, it would now be very interesting to investigate the molecular targets affected by strychnogucine B, almost in accordance with the Lipinski's five rule (slightly higher molecular mass), and other related compounds that lead to *Plasmodium* death. For example, fluorescence localization and specific parasite stage assays would identify potential targets. Indeed, it could act with another mechanism than quinoline antimalarials as suggested by its significant higher activity on a resistant strain. The activity evaluation on chloroquine-resistant strain, with the *per os* route and in a cerebral malaria model could also give key information.

As protozoan parasites often share some biological features and face similar challenges [23], strychnogucine B activity was then evaluated *in vitro* on *T. brucei brucei* (African trypanosomiasis) and *L. mexicana mexicana* (cutaneous leishmaniasis). Selectivity index was also calculated compared to newly measured W138 cytotoxicity. The observed cytotoxicity is slightly higher than the previous reported one (IC₅₀ = 7.4 versus 15.5 μM , respectively) [9]. Its determination with a nonlinear regression on a larger concentration range (0.02–40 versus 1–20 μM , respectively), along with biological variability could explain this difference. This single value has also to be referred to positive control one (camptothecin IC₅₀ = 0.08 μM) to evaluate cells sensitivity. The compound was inactive on *Leishmania* promastigotes (IC₅₀ > 20 μM , SI < 0.4) and moderately active on *Trypanosoma* bloodstream forms (IC₅₀ = 2.58 μM , SI = 2.8). These activities along with the ones of reference drugs are summarized in the ► **Table 1**.

Strychnogucine B was also tested *in vivo* on an acute *T. brucei* model in mice. However, an *i.p.* treatment at 30 mg/kg for five consecutive days from the reappearance of detected parasitaemia did not induce any growth inhibition or life expectancy increase compared to the vehicle-treated mice. Conversely, all mice treated with suramine or diminazen acetate, two reference drugs (human and veterinary ones), were cured. However, these old drugs possess some limits as administration routes and alternatives with easier administration and wider activity are still needed



► **Fig. 2** Main organ weight in the highest tolerated dose assay (performed on two mice). Mean \pm standard deviation; C⁺ = vehicle-treated control mice.



► **Fig. 3** *In vivo* antimalarial activity of strychnogucine B on mice infected by *P. berghei*. Data are shown as mean \pm standard deviation of at least four mice per condition. The percentages of parasite growth inhibition were compared at days 5 and 7 (** $p < 0.01$).

[24, 25]. Another test with a lower infection and a less aggressive strain, for example the AnTAT 1.1E pleiomorphic one, could be tried to evaluate strychnogucine B antitrypanosomal activity, with an earlier treatment. Nevertheless, to our knowledge, it is the first reported bisindole alkaloid with *in vitro* antitrypanosomal activity.

Extracts from *S. icaja* could also be evaluated for antitrypanosomal activity, as this genus contains important antiparasitic potential. Thereby, another species of *Strychnos*, *Strychnos spinosa*,

traditionally used to treat African trypanosomiasis, was evaluated for its *in vitro* activities: leaves extract displayed strong to moderate activities (IC_{50} = 1.5 and 16.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on *T. brucei brucei* and *rhodesiense*, respectively) related to some identified active triterpenes [26, 27].

Concerning the antileishmanial activity, strychnogucine B was inactive on *L. mexicana* (IC_{50} > 20 μM), as were four macroline-pleiocarpamine bisindole alkaloids (IC_{50} > 50 μM) [28]. In accordance with these results, no notable docking scores with the 24 tested *Leishmania* proteins were reported for strychnogucine B in an *in silico* molecular docking study compared to the other evaluated indole alkaloids derived from plants [29]. Finally, a moderate activity on *L. amazonensis* promastigotes (IC_{50} = 24.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was described for *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. but activity seems to be related to another phytochemical class with an identified flavonoid, strychnobiflavone (IC_{50} = 3.2 μM , SI = 39.6 compared on murine macrophages and active on infected macrophages) [30].

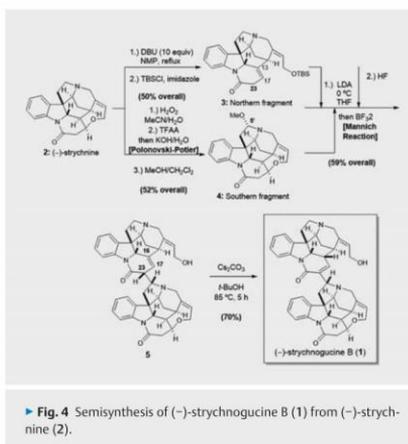
Materials and Methods

Strychnogucine B (**1**) is a natural product found in *S. icaja* as described previously by Frédérich et al. [9]. The one used for this *in vivo* study was prepared from commercially available strychnine [12]. The identity of the synthetic compound was assessed by comparison of HPLC chromatograms and ^1H NMR spectra with the isolated natural compound. Its purity was assessed by HPLC (> 95%). Spectrum and chromatogram are available as Supporting Information.

Semisynthesis of strychnogucine B from strychnine

The synthesis of bisindole alkaloid **1** is shown in ► Fig. 4. The successful realization of this goal required two subgoals. The first entailed access to two monoterpene indole fragments—northern fragment **3** and southern fragment **4**—each derived from commercially available (–)-strychnine (**2**) (Sigma-Aldrich, > 98%). The second included the strategic coupling of both fragments, in addition to functional group transformations to access (–)-strychnogucine B (**1**). Thus, when **2** was treated sequentially with 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene at 200 °C in deaerated *N*-methyl-2-pyrrolidone, then *t*-butyldimethylsilyl chloride and imidazole, northern fragment **3** was isolated in 50% overall yield. Alternatively, site-selective oxidation of (–)-strychnine (**2**) to access southern fragment **4** was realized with the venerable Polonovski-Potier reaction. Thus, treatment of **2** with H_2O_2 afforded strychnine *N*-oxide. Sequential treatment with trifluoroacetic anhydride, aqueous KOH, and methanolic dichloromethane afforded southern fragment **4** in 52% overall yield.

The coupling of fragments **3** and **4** was accomplished via a stereoselective Mannich reaction. Specifically, northern fragment **3** was first treated with lithium diisopropylamide to generate the lithium enolate. In tandem, southern fragment was activated with $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$. Addition of the former to the latter smoothly afforded the dimeric bisindole framework of target molecule **1** as a mixture of two diastereomers at C23. This fact was inconsequential as treatment of the intermediate with HF-Pyridine both removed the *t*-butyldimethylsilyl group and equilibrated the mixture to



► Fig. 4 Semisynthesis of (–)-strychnogucine B (**1**) from (–)-strychnine (**2**).

the thermodynamically more stable diastereomer **5**. The final task in the synthesis of **1** was the isomerization of the alkene from the C16–C17 position to the C23–C17 position. To this end, we reacted **5** with C_2CO_2 in deaerated *t*-BuOH at 85 °C to give (–)-strychnogucine B (**1**) in 70% yield. Spectral data for synthetic **1** (e.g., ^1H and ^{13}C NMR, IR), in addition to R_f value, were in complete agreement with natural (–)-strychnogucine B (**1**) as reported by Frédérich et al. (Fig. 15 and 25, Supporting Information) [9].

In vivo approvals

All animal husbandry and handling conditions were in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care and the Belgian Regulation. The present *in vivo* studies were designed according to the internationally recognized guidelines and approved by the ethics committee for the animals use at the University of Liège (n° 16/1873, February 24, 2017) and at the Health Sciences Sector of the Catholic University of Louvain (2017/UCL/MD/017, July 24, 2017).

In vivo acute toxicity

The assessment of the highest tolerated dose was based on a DNDI protocol and described in Beaufay et al. [31]. Four increasing doses of strychnogucine B were given *i. p.* to two female NMRI mice (6 wk, 29.8 ± 1.9 g, Envigo) every 2 h: 5–10–15–30 mg/kg. Samples were prepared from a stock solution of 9 mg/mL in sterile distilled water with 10% of two 80-EtOH (7:3). Control group received the vehicle. If nontoxic symptoms are observed (any health problem or behavioral changes, hematocrit, body, and main organs weights), 50% of the total injected dose can be used without toxicity risk in the acute *in vivo* antiparasitic efficacy test.

In vivo antiplasmodial assay

P. berghei NK173 strain was provided by Prof. Ph. Grellier (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France). It was maintained in mice by syringe passage. Female Swiss mice (10 wk age, 20 ± 2 g, Charles River Laboratories), were maintained under controlled conditions of temperature and illumination. Based on the protocol described by Frédéricich et al. [20], mice, randomly divided in group of five, were infected i.p. on day 1 with 150 μ L of infected mice blood (parasitaemia of about 50%), diluted two-fold in physiological saline. After 2 h, the treatment was started i.p. once daily for a total of four successive days, as described by Jansen et al. [32]. The treatment dose was prepared by dissolving strychnogucine B in tween 80 and EtOH (7:3) diluted at 10% in saline at 30 mg/kg/100 μ L, based on international guidelines for *in vivo* antimalarial activity in rodent malaria models [33]. On day 5 and 7, thin blood smears were made from mouse-tail blood. Slides were stained with Giemsa and the parasitaemia was determined under the microscope by counting at least 500 erythrocytes. Chloroquine diphosphate salt (Sigma-Aldrich, >98%) at 4 mg/kg (i.p.) was used as positive control and the vehicle as negative one. The inhibition of *Plasmodium* growth was calculated by parasitaemia normalization with the negative control values obtained for 80% responder mice (parasitaemia between 35% and 50%). All the parasitaemia and inhibition percentage values are given as supporting information (Table 1S). Statistical significance between treatments was set at $p < 0.05$ and analyzed with Student's *t*-test on GraphPad Prism.

Other antiparasitic assays

All *in vitro* assays were done as previously reported [34,35]. Strychnogucine B was evaluated in eight serial three-fold dilution from a DMSO stock solution of 4 mM (final concentration ranges: 20–0.009 and 40–0.018 μ M for antiparasitic and cytotoxicity assays, respectively). Suramine sodium and pentamidine isethionate salts (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$ and 98% of purity, respectively) were used as reference drugs with a stock solution at 2 mg/mL (final concentration range: 10–0.0046 μ g/mL). For cells assay on WI38, eight serial five-fold dilution of camptothecin (Sigma-Aldrich, approximately 95% of purity) was tested from a stock solution of 10 mg/mL (final concentration range: 25–0.0003 μ g/mL). The maximum used DMSO concentration (0.5%) was verified to be nontoxic in all biological assays. Antiparasitic tests were performed at least in triplicate with two wells/concentration and cytotoxicity, already reported, was evaluated once with three wells/concentration to calculate SI. The IC_{50} were calculated by nonlinear regression with GraphPad Prism 7.0 based on the sigmoidal dose-response curves (Fig. 3S, Supporting Information).

The *in vivo* antitrypanosomal activity was evaluated based on a DNDI protocol. Female NMRI mice (7–8 wk, 30.4 ± 4.6 g, Envigo) were inoculated i.p. on day 0 with 10^4 bloodstream forms of *T. brucei brucei* (strain 427) obtained from a parasitized mouse (100 μ L diluted in a PBS solution). The treatment was performed during five consecutive days from the reappearance of detected parasitaemia (day 3–7 post-infection). Strychnogucine B was administered i.p. at 30 mg/kg/d to five mice. The seven untreated mice received the previously cited vehicle and the positive control group were treated either with Suramin (Sigma, four mice) at

0.5 mg/kg/d or once with Veriben (Ceva, three mice) at a dose of 1.6 mg/kg diminazene diacetate. Parasitaemia was monitored almost every day along with precise daily individual observation. The Herbert and Lumsden matching method was used to estimate parasitaemia by counting at least three fields for each wet blood films from tail blood [36]. Animals were assessed for their survival time and level of infection compared to negative control.

Supporting Information

The 1H NMR spectrum and HPLC chromatogram of strychnogucine B (1) along with the *in vivo* percentage values and the dose-response curves for newly calculated IC_{50} values are available as Supporting Information.

Acknowledgements

Thanks are due to Maude Bourlet for *in vitro* tests and both UCL/ULg Animal House Facilities for technical assistance. This research was supported by the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) (Grant No.T.0190.13) in Belgium and by the National Science Foundation (CHE-1362461, CHE-1665145, CHE-1749198 and DEG-12262 to CNT) and Temple University in the United States.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] World Health Organization. World Malaria Report 2017. Available at <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>. Accessed January 1, 2018
- [2] Nogueira CR, Lopes LMX. Antiplasmodial natural products. *Molecules* 2011; 16: 2146–2190
- [3] Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 206–220
- [4] Bero J, Frédéricich M, Quetin-Leclercq J. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 1401–1433
- [5] Jampilek J. Design of antimalarial agents based on natural products. *Curr Org Chem* 2017; 21: 1824–1846
- [6] Memvanga PB, Tona GL, Mesia GK, Lusakibanza MM, Cimanga RK. Antimalarial activity of medicinal plants from the Democratic Republic of Congo: a review. *J Ethnopharmacol* 2015; 169: 76–98
- [7] Frederich M, Hayette MP, Tits M, De Mol P, Angenot L. *In vitro* activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2328–2331
- [8] Frédéricich M, Jacquier MJ, Thépenier P, De Mol P, Tits M, Philippe G, Delaude C, Angenot L, Zèches-Hanrot M. Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. *J Nat Prod* 2002; 65: 1381–1386
- [9] Frédéricich M, De Pauw MC, Prosperi C, Tits M, Brandt V, Penelle J, Hayette MP, DeMol P, Angenot L. Strychnogucines A and B, two new antiplasmodial bisindole alkaloids from *Strychnos icaja*. *J Nat Prod* 2001; 64: 12–16
- [10] Philippe G, De Mol P, Angenot L, Tits M, Frédéricich M. *In vivo* antimalarial activity of isosungucine, an indolomonoterpene alkaloid from *Strychnos icaja*. *Planta Med* 2007; 73: 478–479
- [11] Philippe G, Nguyen L, Angenot L, Frédéricich M, Moonen G, Tits M, Rigo JM. Study of the interaction of antiplasmodial strychnine derivatives with the glycine receptor. *Eur J Pharmacol* 2006; 530: 15–22

- [12] Zhao S, Tejjaro CN, Chen H, Sirasani G, Vaddypally S, Zdilla MJ, Dobreiner GE, Andrade RB. Concise syntheses of bis-*Strychnos* alkaloids (–)-sungucine, (–)-isosungucine, and (–)-strychnogucine B from (–)-strychnine. *Chem Weinh Bergstr Ger* 2016; 22: 11593–11596
- [13] Joset JR, Brun R, Wenzler T, Kaiser M, Yardley V. Drug Screening for Kinetoplastids Diseases: A Training Manual for Screening in Neglected Diseases. 2009. Available at <https://www.ndi.org/2009/media-centre/scientific-articles/scientific-articles-hat/drug-screening-for-kinetoplastid-diseases-a-training-manual-for-screening-in-neglected-diseases/>. Accessed June 20, 2018
- [14] Peters W, Robinson BL. The chemotherapy of rodent malaria. XLVI. Reversal of mefloquine resistance in rodent *Plasmodium*. *Ann Trop Med Parasitol* 1991; 85: 5–10
- [15] Pink R, Hudson A, Mouriès MA, Bendig M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 727–740
- [16] Tchinda AT, Jansen O, Nyemb JN, Tits M, Dive G, Angenot L, Frédéric M. Strychnoballionine, an unsymmetrical bisindole alkaloid with an unprecedented skeleton from *Strychnos icaja* roots. *J Nat Prod* 2014; 77: 1078–1082
- [17] Tchinda AT, Ngoni ARN, Tamze V, Jonville MC, Cao M, Angenot L, Frédéric M. Antiplasmodial alkaloids from the stem bark of *Strychnos malacocladus*. *Planta Med* 2012; 78: 377–382
- [18] Frederich M, Tits M, Angenot L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 11–19
- [19] Girardot M, Deregnaucourt C, Deville A, Dubost L, Joyeau R, Allorge L, Rasoanaivo P, Mambu L. Indole alkaloids from *Muntafara sessilifolia* with antiplasmodial and cytotoxic activities. *Phytochemistry* 2012; 73: 65–73
- [20] Frederich M, Tits M, Goffin E, Philippe G, Grellier P, De Mol P, Hayette MP, Angenot L. *In vitro* and *in vivo* antimalarial properties of isostrychnopentamine, an indolomonoterpene alkaloid from *Strychnos usambarensis*. *Planta Med* 2004; 70: 520–525
- [21] Wright CW, Bray DH, O'Neill MJ, Warhurst DC, Phillipson JD, Quetin-Leclercq J, Angenot L. Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis*. *Planta Med* 1991; 57: 337–340
- [22] Ramanitrahambola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Federici E, Palazzino G, Galeffi C, Nicoletti M. Biological activities of the plant-derived bisindole voacamine with reference to malaria. *Phytother Res* 2001; 15: 30–33
- [23] Pollitt LC, MacGregor P, Matthews K, Reece SE. Malaria and trypanosome transmission: different parasites, same rules? *Trends Parasitol* 2011; 27: 197–203
- [24] Babokhov P, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF, Iriemenam NC. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathog Glob Health* 2013; 107: 242–252
- [25] da Silva Oliveira GL, de Freitas RM. Diminazene aceturate – an antiparasitic drug of antiquity: advances in pharmacology & therapeutics. *Pharmacol Res* 2015; 102: 138–157
- [26] Hoet S, Opperdoes F, Brun R, Adjakidjé V, Quetin-Leclercq J. *In vitro* antitrypanosomal activity of ethnopharmacologically selected Beninese plants. *J Ethnopharmacol* 2004; 91: 37–42
- [27] Hoet S, Pieters L, Muccioli GG, Habib-Jiwan JL, Opperdoes FR, Quetin-Leclercq J. Antitrypanosomal activity of triterpenoids and sterols from the leaves of *Strychnos spinosa* and related compounds. *J Nat Prod* 2007; 70: 1360–1363
- [28] Pan L, Terrazas C, Muñoz Acuña U, Ninh TN, Chai H, Carcache de Blanco EJ, Soejarto DD, Satoskar AR, Kinghorn AD. Bioactive indole alkaloids isolated from *Alstonia angustifolia*. *Phytochem Lett* 2014; 10: 54–59
- [29] Ogungbe IV, Ng JD, Setzer WN. Interactions of antiparasitic alkaloids with *Leishmania* protein targets: a molecular docking analysis. *Future Med Chem* 2013; 5: 1777–1799
- [30] Lage PS, de Andrade PHR, Lopes Ade S, Chávez Fumagalli MA, Valadares DG, Duarte MC, Pagliara Lage D, Costa LE, Martins VT, Ribeiro TG, Filho JD, Tavares CAP, de Pádua RM, Leite JPV, Coelho EAF. *Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective *in vitro* antileishmanial activity. *Evid Based Complement Altern Med* 2013; 2013: 304354
- [31] Beaufay C, Hérent MF, Quetin-Leclercq J, Bero J. *In vivo* anti-malarial activity and toxicity studies of triterpene esters isolated from *Keetia leucantha* and crude extracts. *Malar J* 2017; 16: 406
- [32] Jansen O, Tits M, Angenot L, Nicolas JP, De Mol P, Nikiema JB, Frédéric M. Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound. *Malar J* 2012; 11: 289
- [33] Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 509–520
- [34] Bero J, Hannaert V, Chataigné G, Hérent MF, Quetin-Leclercq J. *In vitro* antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 998–1002
- [35] Bero J, Ganfon H, Jonville MC, Frédéric M, Gbaguidi F, DeMol P, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J. *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. *J Ethnopharmacol* 2009; 122: 439–444
- [36] Herbert WJ, Lumsden WH. *Trypanosoma brucei*: a rapid matching method for estimating the host's parasitemia. *Exp Parasitol* 1976; 40: 427–431

Complimentary and personal copy for

Allison Ledoux, Hinerava Maraetefau, Olivia Jansen,
Delphine Etienne, Joëlle Quetin-Leclercq, Patricia Clerc,
Jacqueline Smadja, Michel Frédérich

www.thieme.com

Phytochemical Profile and Biological
Activity Evaluation of *Zanthoxylum
heterophyllum* Leaves against Malaria

DOI 10.1055/s-0035-1545821
Planta Med Lett 2015; 2: e10–e11

**OPEN
ACCESS**

Publishing House and Copyright:

© 2015 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 2199-157X

Any further use
only by permission
of the Publishing House

 **Thieme**

Phytochemical Profile and Biological Activity Evaluation of *Zanthoxylum heterophyllum* Leaves against Malaria

Allison Ledoux¹, Hinerava Maraetefau¹, Olivia Jansen¹, Delphine Etienne¹, Joëlle Quetin-Leclercq², Patricia Clerc³, Jacqueline Smadja³, Michel Frédérick¹

¹ Laboratoire de Pharmacognosie, University Liege, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), Liège, Belgium

² Pharmacognosy Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

³ Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNA), Université de la Réunion, Saint Denis, France

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antiplasmodial properties of *Zanthoxylum heterophyllum*, an endemic plant from the Mascarene Islands. *In vitro* antiplasmodial activity of ethyl acetate and dichloromethane crude extracts obtained from leaf samples collected on Reunion Island was evaluated on the *Plasmodium falciparum* 3D7 chloroquine-sensitive strain using a colorimetric method. The major active compound was identified by chromatographic and spectroscopic methods. The best antiplasmodial activity was obtained for the ethyl acetate extract (15 µg/mL < IC₅₀ < 50 µg/mL). The major compound was identified as a sanshool derivative, an alkylamide compound that has moderate antimalarial activity (IC₅₀ = 11.3 µg/mL). This is the first report of the presence of a sanshool derivative in *Z. heterophyllum*. The moderate antiplasmodial activity of hydroxy-γ-isosanshool was demonstrated for the first time.

Key words

Zanthoxylum heterophyllum · Rutaceae · malaria · antiplasmodial activity · Réunion Island · sanshool

Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/products>

According to the last World Malaria Report [1], there were an estimated 627 000 malaria deaths worldwide in 2012. Malaria is caused by a parasite *Plasmodium* sp. and transmitted by *Anopheles* mosquitoes. The problem of parasite resistance towards available medicines such as chloroquine is increasing. Natural products could play an important role in the discovery of new antimalarial drugs. Indeed, the vegetal kingdom is an important source of new pharmacological active compounds, especially for the search of new antimalarial drugs as reviewed by Bero and al. [2]. *Zanthoxylum heterophyllum* Sm. is an endemic plant from Reunion Island, which belongs to the Rutaceae family [3]. In the traditional pharmacopoeia of the island, *Z. heterophyllum*, commonly named "poivrier des hauts", is used for the treatment of backaches [4]. As far as we know, pharmacological properties of this plant have not been studied before, except in a paper where methanol leaf and stem extracts showed free radical scavenging properties [5]. Nevertheless, some *Zanthoxylum* species are known to have antiplasmodial properties, such as *Zanthoxylum chalybeum* [6] and *Zanthoxylum zanthoxyloides* [7].

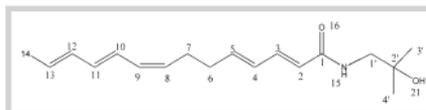


Fig. 1 Chemical structure of hydroxy-γ-isosanshool.

Results and Discussion

The major compound present in the ethyl acetate crude extract was identified as a sanshool derivative. Some sanshool derivatives were already described in *Zanthoxylum* sp., such as *Z. anthoxylum piperitum* [8] and *Z. anthoxylum integrifolium* [9]. By comparison of our NMR and MS data with literature data, it was identified as hydroxy-γ-isosanshool (Fig. 1), described by Chen et al. [9]. Ethyl acetate and dichloromethane crude extracts and hydroxy-γ-isosanshool (purity 90.58%) were tested *in vitro* against the *Plasmodium falciparum* 3D7 strain. In line with WHO guidelines and previous results from our team (Jansen et al. [10], Jonville et al. [11]), antiplasmodial crude extract activity was classified as follows: IC₅₀ ≤ 15 µg/mL, promising activity; IC₅₀ = 15–50 µg/mL, moderate activity; IC₅₀ > 50 µg/mL, weak activity; and at a level that cannot explain the existence of antiplasmodial activity in the plant: IC₅₀ > 100 µg/mL, inactivity. The dichloromethane crude extract showed weak activity (77.8 ± 7.3 µg/mL), the ethyl acetate extract showed moderate activity (38.0 ± 11.3 µg/mL), and hydroxy-γ-isosanshool showed moderate activity for a pure compound (11.3 ± 1.5 µg/mL). This is the first time that phytochemical and biological investigations are described for *Z. heterophyllum* and that hydroxy-γ-isosanshool, the major compound of the ethyl acetate extract, is described as an antiplasmodial compound. Our results indicate that this endemic plant has some potentialities as an antimalarial drug and that hydroxy-γ-isosanshool may play an important role in this activity.

Materials and Methods

Plant material: The leaves of *Z. heterophyllum* were collected on Reunion Island at Langevin and were identified by E. Boyer, Department of Biology, Université de la Réunion. A voucher specimen of the plant was deposited at the Université de La Réunion with the number RUN022F.

The leaves were oven-dried at 40 °C, ground following a standard process and then stored in a powder flask in an air-conditioned room.

Extraction and isolation: Dichloromethane and ethyl acetate crude extracts were obtained by macerating 5 g of dried leaves powder three times with 50 mL of solvent, under shaking for 30 min. After each maceration, the preparation was filtered and the residue was extracted under the same conditions. Filtrates obtained by each solvent were mixed and evaporated under reduced pressure.

The ethyl acetate crude extract was purified by preparative HPLC on a C-18 column using a binary solvent system with a flow rate of 30 mL/min: solvent A, acetonitrile, and solvent B, an HPLC grade aqueous solution of trifluoroacetic acid 0.05% (0–29 min, 10% A; 30–39 min, 40% A; 40–44 min, 60% A; 45–55 min, 80%

A). The preparative HPLC used was a Varian PrepStar 218 coupled with a DAD detector set at 408 nm (DAD ProStar 335 UV/Visible) and equipped with a fraction collector (440LC).

The purity of the major isolated compound was estimated on HPLC/UV/DAD using Hypersil ODS (C-18) columns (58 µm, 4.6 × 250 mm) with the same binary solvent system as described above, with a flow rate of 1 mL/min.

Identification: The major compound of the ethyl acetate fraction was identified by NMR and mass spectrometry. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II 500 with TCI cryoprobe (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz) in CD₃OD. 2D experiments were performed using standard Bruker microprograms. ESI-MS was obtained on a Micromass Q-TOF microspectrometer in positive electrospray.

Antiplasmodial assays: Continuous culture of the *P. falciparum* chloroquine-sensitive (3D7) strain was maintained following the method of Trager and Jensen [12]. The strain was obtained from MR4 (MRA 102, ATCC, Manassas, Virginia, USA).

Each extract was dissolved in DMSO (Sigma) at a concentration of 10 mg/mL. The *P. falciparum* culture was placed in contact with a set of eight twofold dilutions of each extract in medium (final concentrations ranging from 0.8 to 100 µg/mL and final DMSO concentration ≤ 1%) on two columns of a 96-well microplate for 48 h, as described by Jansen and al. [10]. Parasite growth was estimated by the determination of plasmodial lactate dehydrogenase activity as previously described [13]. Artemisinin (98%, Sigma-Aldrich) was used as a positive control (IC₅₀ 0.004 µg/mL). Each extract was tested in triplicate on three different plates (n = 3). IC₅₀ values were calculated by linear regression.

Supporting information

A chromatogram as well as ¹H and ¹³C NMR and EI-MS data of hydroxy-γ-isosanshool are available as Supporting Information.

Acknowledgements

This work was financially supported by the project FEDER BIOMOL.TCN (Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutracéutiques de molécules issues de la Biodiversité terrestre, marine et microbienne de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien) and partially by the F.R.S.-FNRS (grant N° T.0190.13). The authors wish to thank J.N. Wauters for his technical assistance and J.C. van Heugen for recording MS spectra. We thank MR4 for providing us malaria parasites contributed by D. Carucci.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 World Health Organization. World Malaria Report 2013. Geneva: WHO; 2013: 256
- 2 Bero J, Frédrich M, Quetin-Leclercq J. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 1401–1433
- 3 Coode M. 65. Rutacées. Flore des Mascareignes: la Réunion, Maurice, Rodrigues. Mauritius: The Sugar Industry Research Institute; 1979: 1–37
- 4 Lavergne R. Tisaneurs et Plantes Médicinales Indigènes – Ile de la Réunion. Saint Denis: Editions Orphie; 1990
- 5 Poullain C, Girard-Valenciennes E, Smadja J. Plants from Reunion Island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* 2004; 95: 19–26
- 6 Muganga R, Angenot L, Tits M, Frédrich M. Antiplasmodial and cytotoxic activities of Rwandan medicinal plants used in the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol* 2010; 128: 52–57
- 7 Adebayo JO, Kretzli AU. Potential antimalarials from Nigerian plants: a review. *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 289–302
- 8 Jang KH, Chang YH, Kim DD, Oh KB, Oh U, Shin J. New polyunsaturated fatty acid amides isolated from the seeds of *Zanthoxylum piperitum*. *Arch Pharm Res* 2008; 31: 569–572
- 9 Chen JS, Chen TL, Lin WY, Tsai II, Chen YC. Isobutylamides from the fruit of *Zanthoxylum integrifolium*. *Phytochemistry* 1999; 52: 357–360
- 10 Jansen O, Angenot L, Tits M, Nicolas JP, De Mol P, Nikiéma JB, Frédrich M. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. *J Ethnopharmacol* 2010; 130: 143–150
- 11 Jonville MC, Kodja H, Strasberg D, Pichette A, Ollivier E, Frédrich M, Angenot L, Legault J. Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. *J Ethnopharmacol* 2011; 136: 525–531
- 12 Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673–675
- 13 Kennogne M, Prost E, Harakat D, Jacquier MJ, Frédrich M, Sondengam LB, Zèches M, Waffo-Tégou P. Five labdane diterpenoids from the seeds of *Aframomum zambesiacum*. *Phytochemistry* 2006; 67: 433–438

received December 5, 2014
revised December 5, 2014
accepted February 4, 2015

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1545821>
Planta Med Lett 2015; 2: e10–e11
© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York ·
ISSN 2199-157X

Correspondence

Prof. Dr. Frédrich Michel
University of Liège
Laboratory of Pharmacognosy
Department of Pharmaceutical Sciences
Avenue de l'Hôpital 1
4000 Liège
Belgium
Phone: + 32 43 66 43 30
Fax: + 32 43 66 43 32
M.Frederich@ulg.ac.be

License terms



4. LISTE DES POSTERS

“Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial activity”. Ledoux A., Bordignon A., Campos P.-É., Grondin I., Smadja J., & Frederich M. (2015, July). Joint meeting of the GP-TCM Research Association, the TCM Chemistry Specialty Committee and the TCM Pharmaceutical Analysis Specialty Committee of the World Federation of Chinese Medicine Societies, Mons, Belgium.

“New antimalarial compounds isolated from *Poupartia borbonica*, a Mascarene Islands endemic plant”. *Planta Medica*, 82(S01), 1-S381, Ledoux A., Jansen O., St-Gelais A., Cieckiewicz E., Ielciu I.-I., Bialecki A., Bero J., & Frederich, M. (24-27 July 2016). Joint Natural Products Conference 2016, Copenhagen (**Résumé de poster publié**)

“Approche ethnobotanique des savoirs traditionnels et de l’utilisation des plantes médicinales appliqués à la période périnatale dans le Sud-Ouest de Madagascar” Ledoux A., Groeber S., Gallé J.-B., Jansen O., Frédéric M., & Nicolas J.-P. (2013, December 19). Territoires périurbains dans les pays du Sud, Colloque Pacodel.

“Metabolomics analysis of *Galium odoratum* (L.) Scop.: impact of the plant population origin and growth conditions”. Ledoux A., Martin B., De Tullio P., Tits M., Wauters J.-N., Choi Y. H., Bodson M., & Frederich M. (2015, July 16). 2ème Symposium international AFERP – STOLON, Lyon, France.

5. LISTE DES PUBLICATIONS EN TANT QUE CO-AUTEUR

Ielciu I.-I., Mouithys-Mickalad A., Franck T., Angenot L., Ledoux A., Păltinean R., Cieckiewicz E., Etienne D., Tits M. Crişan G., & Frederich M. (2018). Flavonoid composition, cellular antioxidant activity and (myelo) peroxidase inhibition of a *Bryonia alba* L. (Cucurbitaceae) leaves extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1--10.

Bordignon A., Frédéric M., Ledoux A., Campos P.-É., Clerc P., Hermann T., Quetin-Leclercq J., & Cieckiewicz E. (2017, July 10). *In vitro* antiplasmodial and cytotoxic activities of sesquiterpene lactones from *Vernonia fimbrillifera* Less. (Asteraceae). *Natural Product Research*, 1-4.

Issac M., Akin M., Gauvin-Bialecki A., De Voogd N., Ledoux A., Frédérick M., Kashman Y., & Carmeli S. (2017). Cyclotheonellazoles A–C, Potent Protease Inhibitors from the Marine Sponge *Theonella* aff. *swinhoei*. *Journal of Natural Products*, 80, 1110-1116.

Ebralidze L., Mskhiladze L., Ledoux A., Frédérick M., Bellahcene A., Bero J., Quetin-Leclercq J., & Bakuridze A. (2017). Anticancer, Antiplasmodial and Antitrypanosomal Activities of crude extracts of *Platanus orientalis*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(3), 170-175.

Jansen O., Tchinda A. T., Loua J., Esters V., Cieckiewicz E., Ledoux A., Toukam P. D., Angenot L., Tits M., Balde A. M., & Frederich M. (2017). Antiplasmodial activity of *Mezoneuron benthamianum* leaves and identification of its active constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, 203(March), 20--26.

Mskhiladze, L., Chinchradze, D., St-Gelais, A., Mshvildadze, V., Pichette, A., Ledoux, A., Tits, M., & Frédérick, M. (2016). Isolation and Identification of Steroid and Flavonoid Glycosides from the Flowers of *Allium gramineum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 8(4), 240-243.

Marquise N., Chevallier F., Nassar E., Frédérick M., Ledoux A., Halauko Y. S., Ivashkevich O. A., Matulis V. E., Roisnel T., Dorcet V., & Mongin F. (2016). Substituted azafluorenones: access from dihalogeno diaryl ketones by palladium-catalyzed auto-tandem processes and evaluation of their antibacterial, antifungal, antimalarial and antiproliferative activities. *Tetrahedron*, 72(6), 825-836.