

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

## THESE DE DOCTORAT EN CHIMIE MOLECULAIRE OPTION CHIMIE ORGANIQUE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PAR

**BEDIE MBOW**

**TITRE :**

DETERMINATION STRUCTURALE ET ETUDE DES  
PROPRIETES FLUORESCENTES ET PHOTOCHIMIQUES DE  
METABOLITES ISOLES A PARTIR DE *HARALDIOPHYLLUM*  
*SP.*, *GUIERA SENEGALENSIS* ET *EUNICELLA LABIATA*

*Le 1<sup>er</sup> Aout 2015 devant la commission d'examen :*

|                              |  |  |                                    |
|------------------------------|--|--|------------------------------------|
| <b>Président :</b>           | M. Mohamed<br>Lamine Gaye                                | Professeur   | FST/UCAD                           |
| <b>Rapporteurs :</b>         | M. Lamine Cissé<br>M. Djibril Fall<br>M. Aboubacary Sène | Maître de Conférences<br>Professeur<br>Maître de Conférences | FST/UCAD<br>FMPOS/UCAD<br>FST/UCAD |
| <b>Examineur</b>             | M. Alphonse Tine   | Professeur   | FST/UCAD                           |
| <b>Co-Directeur de thèse</b> | M. Atanasse Coly   | Professeur   | FST/UCAD                           |
| <b>Directeur de thèse</b>    | M. Ibrahima Ndiaye                                       | Maître de Conférences  | FST/UCAD                           |

*Année universitaire 2014-2015*

## *DEDICACES*

Je dédie ce travail de recherches à tous ceux qui, de près ou de loin, pour les sacrifices consentis, pour leurs conseils, leurs critiques, leurs remarques et suggestions m'ont aidé à bien mener à terme cette thèse.

Par peur d'en oublier certains, excusez-moi de ne pouvoir les citer ici.

Toutefois, je ne peux m'empêcher de penser à certains membres de ma famille notamment à :

- Mon regretté père Ndiassé Mbow qui nous a quitté non sans nous avoir inculqué les vertus de la foi, de la bravoure et de l'abnégation,
- Ma maman Bineta Mbow, une dame travailleuse et discrète, une maman exemplaire,
- Ma femme et mes enfants, Mohamed et ses frères et sœurs.
- Mes frères et sœurs qui ont partagé mes bonheurs et ressentiments,
- Mes oncles qui n'ont ménagé aucun effort pour me mettre dans d'excellentes conditions de travail et de réussite
- Mes cousins et cousines
- Mes promotionnaires et amis d'enfance.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Groupe de Recherches sur les Substances Bioactives (GRSB), et au Laboratoire de Photochimie et d'Analyse (LPA), du département de chimie sous la codirection de Monsieur Ibrahima NDIAYE Maître de conférences (UCAD), de Monsieur Atanasse COLY Professeur (UCAD) et Monsieur Alphonse TINE Professeur (UCAD). Je ne peux donc commencer mes remerciements sans penser de prime abord à ces trois éminents professeurs qui ont bien accepté de m'accueillir au sein de leurs laboratoires respectifs et de m'y avoir appris des techniques physico-chimiques et d'extraction des produits naturels me permettant de bien dérouler les différentes expériences. Je leur dois une fière chandelle et leur exprime ma profonde gratitude.

Une mention spéciale au Docteur Ibrahima NDIAYE, avec qui j'ai cheminé pendant plusieurs années. J'ai découvert en lui, tout au long de cette collaboration le plaisir du travail, et la passion de la recherche. Je lui serai toujours redevable.

Je tiens à remercier le Professeur Mohamed Lamine Gaye, d'avoir bien contribué à ma formation et de bien vouloir accepter de présider ce jury. Vous êtes une référence dans cette faculté car vous ne ménagez aucun effort pour l'émergence des jeunes chercheurs.

Mes remerciements vont également à l'endroit de Monsieur Mamadou Lamine CISSE maître de conférences, son assistance a été d'un grand apport dans la réalisation de certaines expériences. Merci par ailleurs d'avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ma reconnaissance au Professeur Djibril FALL d'avoir bien accepté de juger ce travail, merci de votre contribution.

Sans oublier Monsieur Aboubacary SENE maître de conférences d'avoir accepté de juger ce travail. Votre contribution a été d'une importance capitale.

Je pense également à tous les membres des deux laboratoires, assistants, docteurs, et doctorants, particulièrement Monsieur Diégane Diéne THIARE, leurs conseils prodigués à mon endroit et leur assistance m'ont été très utiles.

## SUMMARY

The work presented in this thesis concerns structural elucidation and photochemical study of biomolecules isolated from a seaweed (*Haraldiophyllum sp.*), a gorgon (*Eunicella labiata*) and a terrestrial herb (*Guiera senegalensis*). The study of the photodegradation of almazole D and C which are highly fluorescent indole alkaloids, isolated from *Haraldiophyllum sp* reveals greater stability of almazole D towards light . During the irradiation of the almazole D, there is the photochemical conversion of almazole D into almazole C after decarboxylation. This conversion confirms the new revised structure of the almazole D proposed by an American team. A new scheme of almazoles biogenesis of this alga was proposed. From the crude extract of *Guiera senegalensis*, we have isolated and identified a naphthopyran whose photochemical properties have been determined and stability towards light studied after irradiation. From the gorgon *Eunicella labiata*, we identified from the crude extract over twenty saturated and polyunsaturated fatty acids by mass spectroscopy coupled with HPLC. We also identified a C<sub>20</sub> polyunsaturated fatty acid having a hydroxyl and two conjugated double bonds and a series of seven ceramides with acyl chain derived from arachidonic acid.

## ABREVIATIONS

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**FC** : Flash Chromatographie

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance.

**DEPT** : Distortionless Enhanced Polarization Transfer

**UV** : Ultra Violet

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**ESI** : Electro-Spray Ionisation

**FAB** : Fast Atomic Bombardment

**IE** : Impact électronique

**COSY** : COrelated SpectroscopY

**HOHAHA** : HOmonuclear HArtman-HAhn spectroscopy

**ROESY** : Rotating fram Overhauser Effect SpectroscopY

**INADEQUATE** : Incredible Natural Abondance Double QUAntum Transfert Experiment

**HETCOR** : HETeronuclear CORrelated spectroscopy

**COLOC** : COrrelation via LOng range Coupling

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Coherence

**HMBC** : Heteronuclear Multiple Bond Coherence

**HMQC** : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

**t<sub>R</sub>** : Temps de rétention

**Rdt** : Rendement

**d** : Densité du produit par rapport à l'eau

**C** : Concentration molaire

**λ<sub>ex</sub>** : Longueur d'onde d'excitation

**λ<sub>em</sub>** : Longueur d'onde d'émission

$I_F$  : Intensité de fluorescence  
 $I_{\text{solvant}}$  : Intensité de fluorescence du solvant  
 $I_{\text{cor}}$  : Intensité de fluorescence de corrigée  
 $r$  : Coefficient de corrélation  
 $k$  : Constante de vitesse de réaction  
 $t_{1/2}$  : temps de demi-réaction  
**LD** : Limite de Détection  
**LQ** : Limite de Quantification  
**DSR** ; Déviation Standard Relative  
**LDA** : Limite de Détection Absolue  
**Tr** ; Taux de récupération  
**J** : Constante de couplage  
 $\delta$  : Déplacement chimique

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Extracteur au soxhlet.....  | 7  |
| <b>Figure 2</b> : Schéma de principe d'une chaîne de montage HPLC.....  | 13 |
| <b>Figure 3</b> : Diagramme de Jablonsky .....  | 24 |
| <b>Figure 4</b> : Schéma de principe et organes du spectrofluorimètre .....                                       | 26 |
| <b>Figure 5</b> : Diagramme d'isolement des métabolites secondaires .....   | 32 |
| <b>Figure 6</b> : Diagramme d'isolement de l'Almazole .....   | 34 |
| <b>Figure 7</b> : Spectre d'excitation et d'émission de l'almazole D dans l'éthanol.....                          | 38 |
| <b>Figure 8</b> : Spectres d'excitation et d'émission de l'almazole C dans l'éthanol .....                        | 39 |
| <b>Figure 9</b> : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazole D en fonction du pH de la solution.....  | 40 |
| <b>Figure 10</b> : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazole C en fonction du pH de la solution..... | 41 |
| <b>Figure 11</b> : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazole D en fonction du solvant.....           | 42 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 12</b> : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazole C en fonction du solvant.....                             | 43 |
| <b>Figure 13</b> : Evolution du spectre d'émission de l'almazole D avec le temps d'irradiation ..                                   | 45 |
| <b>Figure 14</b> : Spectre de l'almazole D irradié superposé à celui de l'almazole C non irradié ...                                | 46 |
| <b>Figure 15</b> : Mécanisme de décarboxylation de l'almazole D en almazole C.....  | 47 |
| <b>Figure 16</b> : Evolution du spectre d'émission de l'almazole C avec le temps d'irradiation ..                                   | 48 |
| <b>Figure 17</b> : Schéma de biogénèse de l'almazole A et B à partir de l'almazole C.....   | 48 |
| <b>Figure 18</b> : Nouveau schéma de biogénèse des almazoles et de leurs précurseurs.....   | 50 |
| <b>Figure 19</b> : Courbe de variation $\text{Ln}(I_0/I) = f(t)$ de l'almazole D dans l'éthanol.....                                | 53 |
| <b>Figure 20</b> : Variation $(I_0/I - 1)$ en fonction du temps d'irradiation de l'almazole D dans une solution aqueuse pH=10 ..... | 53 |
| <b>Figure 21</b> : Courbe de calibration de l'almazole D dans l'éthanol et dans l'eau à pH=10 ....                                  | 55 |
| <b>Figure 22</b> : Calibration de l'almazole C dans l'éthanol et dans l'eau à pH=10 .....   | 55 |
| <b>Figure 23</b> : Déplacement des longueurs d'onde en fonction du pH pour l'almazole D.....  | 56 |
| <b>Figure 24</b> : Diagramme d'isolement des métabolites secondaires du <i>Guiera senegalensis</i> ....                             | 69 |
| <b>Figure 25</b> : Spectre RMN du proton du naphtopyranone .....  | 72 |
| <b>Figure 26</b> : Spectre d'excitation et d'émission du dihydronaphtopyranone.....   | 74 |
| <b>Figure 27</b> : Effet du pH sur l'intensité de fluorescence du naphtopyranone.....   | 75 |
| <b>Figure 28</b> : Histogramme représentant l'effet du solvant sur le signal de fluorescence du naphtopyranone.....                 | 76 |
| <b>Figure 29</b> : Courbe de calibration du naphtopyranone dans le méthanol.....  | 77 |
| <b>Figure 30</b> : Effet de l'irradiation UV sur les spectres d'émission du naphtopyranone dans le méthanol.....                    | 78 |
| <b>Figure 31</b> : Courbe de la cinétique de photodégradation du naphtopyranone dans le méthanol.....                               | 79 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 32</b> : Diagramme d'isolement des composés isolés à partir de Eunicella sp .....   | 93  |
| <b>Figure 33</b> : Chromatogramme d'isolement du composé 2 de Eunicella sp.....   | 93  |
| <b>Figure 34</b> : Spectre RMN du proton du composé 2 (CDCl <sub>3</sub> ) .....  | 97  |
| <b>Figure 34a</b> : Spectre RMN du proton du composé 2 (CDCl <sub>3</sub> ) : agrandissement entre 0 et 3 ppm du spectre de la figure 34..... | 97  |
| <b>Figure 34b</b> : Spectre RMN du proton du composé 2 (CDCl <sub>3</sub> ) : agrandissement entre 4 et 7 ppm du spectre de la figure 34..... | 98  |
| <b>Figure 35</b> : Spectre RMN COSY <sup>1</sup> H <sup>1</sup> -H du composé 2 (CDCl <sub>3</sub> ).....                                     | 98  |
| <b>Figure 36</b> : Spectre RMN du <sup>1</sup> H de la série de céramides (CDCl <sub>3</sub> ).....   | 110 |
| <b>Figure 36a</b> : Spectre RMN du <sup>1</sup> H de la série de céramides (CDCl <sub>3</sub> ) : agrandissement entre 3 et 7 ppm .....       | 111 |
| <b>Figure 36b</b> : Spectre RMN du <sup>1</sup> H de la série de céramides (CDCl <sub>3</sub> ) : agrandissement entre 5 et 6 ppm .....       | 111 |
| <b>Figure 36c</b> : Spectre RMN du <sup>1</sup> H de la série de céramides (CDCl <sub>3</sub> ) : agrandissement entre 3,4 et 4,4 ppm .....   | 112 |
| <b>Figure 36d</b> : Spectre RMN du <sup>1</sup> H de la série de céramides (CDCl <sub>3</sub> ) : agrandissement entre 0 et 2,4 ppm .....     | 112 |
| <b>Figure 37</b> : Spectre RMN COSY <sup>1</sup> H <sup>1</sup> -H de la série de céramides (CDCl <sub>3</sub> ) .....                        | 113 |
| <b>Figure 38</b> : Schéma de biosynthèse des céramides.....   | 116 |

### LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Paramètres analytiques de fluorescence de l'almazole D (10 <sup>-5</sup> M) dans différents solvants.....       | 42 |
| <b>Tableau 2</b> : Paramètres analytiques de fluorescence de l'almazole C (10 <sup>-5</sup> M) dans différents solvants.....       | 43 |
| <b>Tableau 3</b> : Paramètres cinétiques de la photodégradation de l'almazole D (10 <sup>-5</sup> M) dans différents solvants..... | 52 |
| <b>Tableau 4</b> : Paramètres analytiques des droites de calibration des almazoles D et C.....                                     | 56 |
| <b>Tableau 5</b> : Valeurs de δ (ppm) et J(Hz) de la RMN du proton du naphtopyranone.....  | 71 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 6</b> : Variation de la fluorescence en fonction du solvant .....  | 75  |
| <b>Tableau 7</b> : Classification simplifiée des cnidaires .....  | 84  |
| <b>Tableau 8</b> : Quelques cœlentérés de la côte Sénégalaise .....   | 85  |
| <b>Tableau 9</b> : Acides gras saturés .....  | 89  |
| <b>Tableau 10</b> : Acides gras insaturés .....   | 90  |
| <b>Tableau 11</b> : Déplacements chimiques $\delta$ du spectre RMN du proton de l'acide gras polyinsaturé.....                  | 99  |
| <b>Tableau 12</b> : Acides gras identifiés dans la gorgone.....   | 101 |
| <b>Tableau 13</b> : Sous-classes de sphingolipides.....   | 105 |
| <b>Tableau 14</b> : Déplacements chimiques $\delta$ et constantes de couplage J du spectre RMN de proton du sphingolipide ..... | 114 |

# SOMMAIRE

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....  | 1  |
| <b>PREMIERE PARTIE</b>  |    |
| <b>GENERALITES SUR LE MATERIEL ET TECHNIQUES MISES EN ŒUVRE</b>   |    |
| <b>A ) CARACTERISTIQUES TECHNIQUES DU MATERIEL UTILISE</b> .....  | 4  |
| <b>B ) TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT</b> .....   | 5  |
| B.1 EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE .....  | 5  |
| B.2 EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE .....   | 6  |
| B.3 EXTRACTION PAR UN FLUIDE SUPERCRITIQUE.....   | 8  |
| <b>C ) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ANALYSE ET DE PURIFICATION</b> .....   | 9  |
| C.1 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE NORMALE .....  | 9  |
| C.2 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE .....  | 10 |
| C.3 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) .....  | 11 |
| C.4 CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE .....   | 12 |
| <b>D) METHODES SPECTROSCOPIQUES D'ANALYSE STRUCTURALE ET DE DETERMINATION DES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES</b> ..... | 16 |
| D.1 SPECTROSCOPIE DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE....   | 16 |
| D.1.1 Principe de la RMN .....  | 16 |
| D.1.2 La RMN bidimensionnelle .....   | 18 |
| D.2 SPECTROSCOPIE DE MASSE .....  | 19 |
| D.2.1 Impact électronique (IE) .....  | 19 |
| D.2.2 Ionisation par la méthode (FAB).....  | 20 |
| D.2.3 Ionisation par électrobulisisation (ESI).....   | 20 |
| D.3 LA SPECTROFLUORIMETRIE .....  | 21 |
| D.3.1 La fluorescence .....   | 21 |
| D.3.2 La phosphorescence.....   | 24 |

|  |    |
|--|----|
| D.3.3 Analyse spectrofluorimétrique .....  | 25 |
| <b>DEUXIEME PARTIE</b>   |    |
| <b>ETUDE DE LA FLUORESCENCE ET DES PROPRIETES PHOTOCHEMIQUES<br/>DES ALMAZOLES C ET D .....</b>                        |    |
|  | 28 |
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | 28 |
| <b>CHAPITRE I : TRAVAUX ANTERIEURS SUR LES METABOLITES<br/>SECONDAIRES DE L'ALGUE HARALDIOPHYLLUM SP .....</b>         |    |
|  | 29 |
| I.1. EXTRACTION ET ISOLEMENT .....   | 29 |
| I.2. METABOLITES SECONDAIRES IDENTIFIES .....  | 35 |
| <b>CHAPITRE II : ETUDES DES PROPRIETES FLUORESCENTES ET<br/>PHOTOCHEMIQUES DES ALMAZOLES C ET D .....</b>              |    |
|  | 37 |
| II.1. PREPARATION DES SOLUTIONS MERES .....  | 37 |
| II.2. RECHERCHE DES LONGUEURS D'ONDE D'EXCITATION ET<br>D'EMISSION .....   | 38 |
| II.2.1. Spectres d'excitation et d'émission de l'almazole D .....  | 38 |
| II.3. OPTIMISATION DES PARAMETRES ANALYTIQUES .....  | 39 |
| II.3.1 Effet du pH sur l'almazole D .....  | 40 |
| II.3.2 Effet du pH sur l'almazole C .....  | 41 |
| II.3.3 Effet du solvant .....  | 41 |
| II.4 IRRADIATION DE L'ALMAZOLE D .....   | 44 |
| II.4.1 Analyse des résultats de l'irradiation .....  | 44 |
| II.4.2. La conversion photochimique de l'almazole D en almazole C et révision de la<br>structure de l'almazole D ..... | 45 |
| II.5. IRRADIATION DE L'ALMAZOLE C .....  | 47 |
| II.5.1 Analyse des résultats de l'irradiation .....  | 47 |
| II.5.2 Proposition d'un nouveau schéma de biogénèse des almazoles A-D<br>et de leurs précurseurs .....                 | 49 |
| II.6. CINETIQUE DE PHOTODEGRADATION .....  | 51 |
| II.7. PROCEDURE DE DETERMINATION DES ALMAZOLES EN ANALYSE<br>CHIMIQUE .....  | 53 |

|  |    |
|--|----|
| II.7.1. Calibration de l'almazole D dans l'éthanol et dans l'eau .....                                 | 54 |
| II.7.2. Calibration de l'almazole C dans l'éthanol et dans l'eau .....                                 | 55 |
| II.8. DEPLACEMENTS DES LONGUEURS D'ONDE EN FONCTION DE LA<br>VARIATION DU pH .....                     | 56 |
| <b>CONCLUSION</b> .....  | 58 |
| <b>TROISIEME PARTIE</b>  |    |
| <b>ETUDE DE LA FLUORESCENCE ET DES PROPRIETES PHOTOCIMIQUES<br/>D'UN NAPHTOPYRANONE</b> .....          |    |
| <b>INTRODUCTION</b> .....  | 60 |
| <b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE GUIERA SENEGALENSIS</b> .....                                       | 61 |
| I.1 DEFINITION ET DESCRIPTION BOTANIQUE.....   | 61 |
| I.2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET ADAPTABILITES .....  | 61 |
| I.3 ETUDE CHIMIQUE, PHARMACOLOGIQUE ET TOXICOLOGIQUE .....   |    |
| I.4 UTILISATION EN MEDECINE TRADITIONNELLE.....  | 64 |
| I.5 METABOLITES SECONDAIRES ISOLES DE GUIERA SENEGALENSIS.....   | 65 |
| <b>CHAPITRE II : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU NAPHTOPYRANONE<br/>DE GUIERA SENEGALENSIS</b> .....    |    |
| II.1 ISOLEMENT .....   | 68 |
| II.2 IDENTIFICATION.....   | 70 |
| <b>CHAPITRE III : ETUDES DES PROPRIETES FLUORESCENTES ET<br/>PHOTOCIMIQUES DU NAPHTOPYRANONE</b> ..... |    |
| III.1 RECHERCHE DES LONGUEURS D'ONDE D'EXCITATION ET<br>D'EMISSION .....                               | 73 |
| III.2. OPTIMISATION DES PARAMETRES ANALYTIQUES .....   | 74 |
| III.2.1 Etude de l'effet du pH .....   | 74 |
| III.2.2 Etude de l'effet du solvant.....   | 75 |
| III.3. PARAMETRES ANALYTIQUES DES DROITES D'ETALONNAGE .....   | 76 |
| III.4. IRRADIATION DU NAPHTOPYRANONE .....   | 77 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>CONCLUSION</b> .....   | 80  |
| <b>QUATRIEME PARTIE</b>   |     |
| <b>ISOLEMENT ET ETUDE STRUCTURALE DE BIOMOLECULES ISOLEES</b>                       |     |
| <b>D'UNE GORGONE DE LA COTE SENEGALAISE, <i>EUNICELLA LABIATA</i></b> .....         | 81  |
| <b>INTRODUCTION</b> .....   | 82  |
| <b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES COELENTERES</b> .....                           | 83  |
| I .1 CLASSIFICATION .....   | 85  |
| I .2 CŒLENTERES DE LA COTE SENEGALAISE .....  | 86  |
| I .3 MORPHOLOGIE ET LIEU DE RECOLTE DU MATERIEL BIOLOGIQUE .....                    | 87  |
| <b>CHAPITRE II : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS</b> .....              | 87  |
| II.1 GENERALITES SUR LES ACIDES GRAS .....  | 88  |
| II. 1.1 Acides gras saturés .....   | 88  |
| II. 1. 2 Acides gras insaturés .....  | 89  |
| II. 1. 3 Acides gras essentiels .....   | 91  |
| II. 1. 4 Biosynthèse des acides gras .....  | 91  |
| II.2 EXTRACTION ET SEPARATION .....   | 94  |
| II.3 DETERMINATION STRUCTURALE DE L'ACIDE GRAS POLYINSATURE 2.....                  | 100 |
| II.4 ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS DE L'EXTRAIT BRUT DE<br>LA GORGONE ..... | 100 |
| <b>CHAPITRE III : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SPHINGOLIPIDES</b> .....          | 101 |
| III.1 GENERALITES SUR LES SPHINGOLIPIDES .....                                      | 101 |
| III.2 EXTRACTION ET SEPARATION .....  | 106 |
| III.3 DETERMINATION STRUCTURALE DES SPHINGOLIPIDES .....                            | 106 |
| III.4 BIOSYNTHESE DES CERAMIDES DU PRESENT TRAVAIL .....                            | 114 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>CONCLUSION</b> .....                 | 117 |
| <b><i>CONCLUSION GENERALE</i></b> ..... | 118 |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....              | 121 |

# INTRODUCTION GENERALE

Les métabolites secondaires forment une famille de composés extrêmement variés sur le plan structural avec des milliers de molécules d'origine marine ou terrestre isolés et incorporant plusieurs centaines de squelettes carbonés. Ils ont un rôle essentiellement écologique. La synthèse et le stockage de ces molécules au sein des organismes marins ou des plantes terrestres sont une réponse chimique aux multiples interactions liées à la survie des espèces. L'implication des métabolites secondaires au niveau de ces interactions entre l'organisme et le biotope est souvent due à leur forte activité contre les agents pathogènes, ou leur toxicité contre les prédateurs [1-3]. Cette activité biologique est à l'origine de l'extraordinaire développement de la chimie des produits naturels et celle d'origine marine en particulier. En effet, l'étude de ces produits naturels a conduit à l'isolement et à l'identification de plusieurs molécules possédant une activité thérapeutique notable. Parmi une multitude d'exemples, on peut citer le cas du célèbre antipaludique, l'artémisinine qui est une lactone sesquiterpénique endoperoxydique isolé d'une plante chinoise (*Artemisia annua*). A partir d'une algue rouge des côtes Sénégalaises, ont été isolées de nouvelles classes d'alcaloïdes indoliques, almazole C et almazole D (schéma 1) qui présentent aussi une forte fluorescence [4,5]. L'almazole D possède en plus une forte activité antibactérienne [5].

Dans le cadre du présent travail, nous avons aussi isolé et identifié à partir d'un échantillon de *Guiera senegalensis* du Sénégal, le 5-méthylflavasperone très fluorescent, qui est un naphtopyranone déjà isolé d'une collection de *Guiera senegalensis* récolté en Guinée Bissau.[6,7].

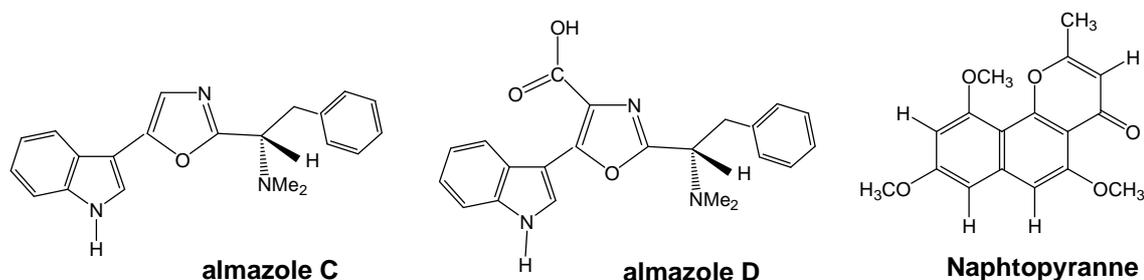


Schéma 1

Pour les almazoles **C** et **D**, la fluorescence est probablement due à la présence du noyau indolique alors que pour le naphtopyranone, elle est liée à la présence du cycle naphthalène lié au cycle pyranone.

Notre objectif est d'étudier les propriétés photochimiques de ces métabolites secondaires, bioactifs et très fluorescents, car ces propriétés constituent la "carte d'identité" de chaque molécule.

Le choix porté sur ce thème est d'autant plus pertinent que ni les almazoles **C** et **D**, ni le naphtopyranone n'ont fait l'objet d'étude de propriétés fluorescentes.

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de l'almazole **D** peut motiver une étude des propriétés photochimiques pouvant permettre de suivre en cas d'usage pharmacologique, la molécule ou ses dérivés présents dans les liquides physiologiques (urine, sérum, etc.).

L'étude des propriétés fluorescentes portera sur les almazoles **C** et **D** isolés à partir de *Haraldiophyllum sp* qui est une algue rouge des côtes Sénégalaises, et sur un naphtopyranone isolé de *Guiera senegalensis*.

Cette thèse sera structurée en quatre parties :

◆ Dans la première partie, nous présentons les généralités sur le matériel et les techniques d'extraction, de chromatographie et de spectroscopie mises en œuvre.

◆ La deuxième partie sera consacrée à l'étude des propriétés fluorescentes et photochimiques des almazoles **C** et **D**, puis à l'optimisation des conditions analytiques en étudiant l'effet du pH puis celui du solvant. La stabilité des molécules vis-à-vis de la lumière sera aussi étudiée en les irradiant par la lumière UV.

◆ Dans la troisième partie, nous allons étudier les propriétés fluorescentes et photochimiques d'un naphtopyranone et par la suite optimiser les conditions analytiques.

◆ La quatrième partie fera l'objet de l'isolement et l'étude structurale de biomolécules isolées d'une gorgone, *Eunicella Labiata* de la cote Sénégalaise.

## **PREMIERE PARTIE**

**GENERALITES SUR LE MATERIEL  
ET LES TECHNIQUES D'ANALYSES MISES EN OEUVRE**

## **A/ CARACTERISTIQUES TECHNIQUES DU MATERIEL**

### **UTILISE**

- ◆ La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur des plaques de verre couvertes d'une couche de silice, prête à l'emploi (Si 60 F<sub>254</sub> (0,25mm)) ; RP-18 (0,25mm) ; CN (0,25mm). Ces plaques sont obtenues chez "Merck".
- ◆ La « flash » chromatographie (FC) a été réalisée en phase normale sur gel de silice (Si 60, 15-25 μm) et en phase inverse sur de petites colonnes lichrolut RP-18 ou sur lichroprep RP-18, 15-25μm (Mereck).
- ◆ La chromatographie sur colonne a été réalisée sur gel de silice (Si 60, 63-200 μm).
- ◆ La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été effectuée sur un Hitachi L 6200 « Intelligent Pump » muni d'un détecteur L 300 photo diode. Nous avons utilisé selon le cas des colonnes Si 60, RP-18, ou CN. Le débit a été fixé à 5 ml / mn alors que le spectrophotomètre UV a été réglé à 215, 225, ou 254 nm.
- ◆ Toutes les évaporations ont été effectuées sous pression réduite et à une température ne dépassant pas 50° C.
- ◆ Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN XL-300 (299,94 MHz pour le proton et 75,45 MHz pour le carbone) et sur un BRUCKER de 400 MHz (400MHz pour le proton et 100 MHz pour le carbone). Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en ppm relativement au tétraméthylsilane comme référence interne (0,0 ppm) et au solvant : CDCl<sub>3</sub> [δ (H) 7,25 ; δ (C) 77] ; (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO [δ (H) 2,5 ; δ (C) 39,5] ; C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> [δ (H) 7,15 ; δ (C) 128]. Les constantes de couplage en Hz sont déterminées par des expériences de découplage de spins. Les multiplicités en RMN du Carbone 13 ont été établies dans chaque cas à l'aide d'un DEPT.
- ◆ Les spectres de masse par impact électronique ont été enregistrés sur un spectromètre KRATOS MS 80. Les spectres de masse par ESI ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Esquire-LC équipé d'une source d'ionisation par électro nébulisation.

- ◆ Les spectres d'émission et d'excitation ont été obtenus à l'aide d'un spectrofluoromètre Kontron, modèle SFM-25 (Zurich, Suisse) relié à un ordinateur et piloté, par le logiciel LCWIN. Une cuve parallélépipédique en quartz ( Labo moderne France) comprenant cinq faces polies (trajet optique, 1cm) a été utilisée pour les mesures.
- ◆ Le système d'irradiation est composé d'une lampe à haute pression de mercure, Osram 200Watts HBO avec une alimentation Oriol modèle 8500. Ce dispositif photochimique inclut une lampe et une lentille de quartz appropriées pour concentrer les radiations sur la cuve contenant la solution placée à 60cm de la lampe au mercure.
- ◆ Les mesures de pH ont été effectuées avec un pH-mètre Consort modèle pro7.
- ◆ Des micropipettes pipetman de 5 à 1000 $\mu$ L (Gibson, France) ont été utilisées pour le prélèvement des échantillons à diluer. Les mesures expérimentales ont été traitées avec un logiciel spécialisé : Microcal Origine, version 6.0, qui permet également de tracer les courbes.

## **B) TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT**

Selon l'état physique des milieux entre lesquels l'échange de soluté se fait, on peut distinguer trois modes d'extraction : l'extraction solide-liquide, liquide-liquide et l'extraction par un fluide supercritique.

### **B.1 EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE**

L'extraction liquide-liquide est une opération qui permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides généralement non-miscibles. Elle est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution contenant les constituants à séparer (solutés) dans des appareils destinés à mélanger les deux phases comme l'ampoule à décantier.

Le solvant extrait sélectivement un ou plusieurs des solutés pour conduire à un mélange appelé extrait. La phase résiduelle épuisée en solutés est appelée raffinat.

L'utilisation d'un procédé liquide-liquide requiert deux opérations successives :

- Une mise en contact intime des deux liquides durant un temps suffisant à l'obtention de l'équilibre pendant lequel le ou les solutés sont transférés dans le solvant d'extraction. Il faut noter qu'à l'équilibre, le rapport des concentrations du soluté dans l'extrait et le raffinat, appelé coefficient de partage ou de distribution, donne une mesure de l'affinité relative du soluté pour les deux phases.
- Après leur contact, on procède à la séparation des deux phases (extrait et raffinat).

L'extraction liquide-liquide est une méthode de choix pour la séparation de liquide lorsque la distillation ou la cristallisation ne sont pas possibles ou trop difficiles. Pour améliorer l'efficacité de l'extraction, il est préférable d'effectuer plusieurs extractions en série avec de petites portions de solvant d'extraction, plutôt que d'effectuer une seule extraction avec un grand volume.

## **B.2 EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE**

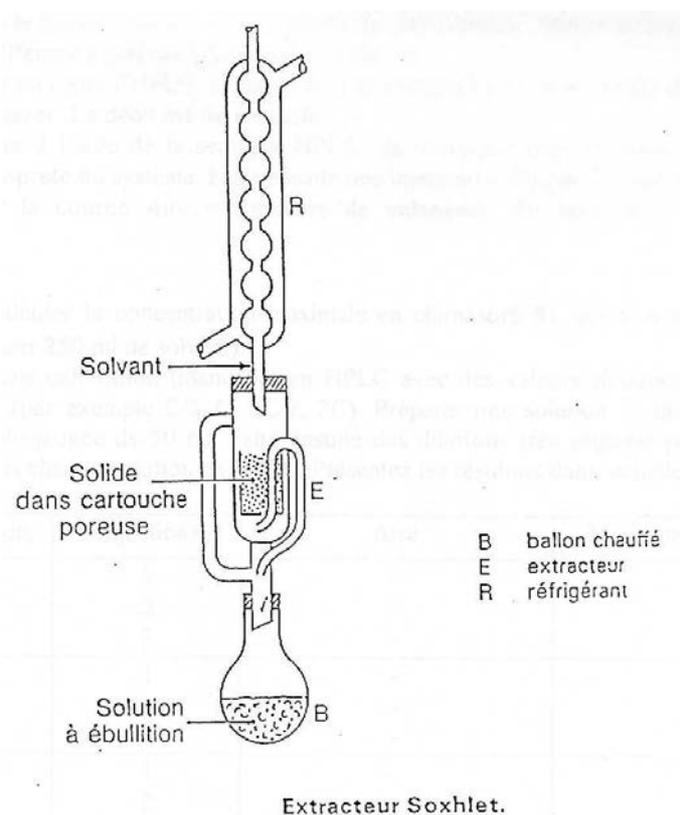
L'extraction solide-liquide est une opération qui permet d'extraire un ou plusieurs constituants d'un échantillon souvent mis sous forme de poudre pour faciliter l'opération. Parmi les principales méthodes d'extraction solide-liquide, on distingue la macération, la décoction, l'infusion et l'extraction au Soxhlet.

- **La macération** : C'est un procédé qui consiste à laisser séjourner pendant un temps suffisamment long un solide dans un liquide pour en extraire les composés solubles. C'est une méthode qui peut se faire de manière continue, le solvant pouvant être renouvelé plusieurs fois. Elle est souvent utilisée pour les composés sensibles à la chaleur.

- **La décoction** : C'est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un échantillon végétal placé dans l'eau bouillante. Il faut donc que ces substances ne soient pas thermolabiles.

- **L'infusion** : C'est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un échantillon végétal placé dans l'eau bouillante qu'on laisse refroidir aussitôt.

- **L'extraction au soxhlet** : C'est un procédé mixte dans lequel l'échantillon à extraire, placé dans une cartouche poreuse, est macéré dans l'extracteur E, alors que la solution est chauffée à ébullition dans le ballon B. Sous l'effet de l'ébullition, les vapeurs de solvant montent dans le tube à vapeur de E et arrivent au réfrigérant R où elles se condensent pour tomber ensuite dans la cartouche placée dans l'extracteur E. Une fois l'extracteur rempli de solvant, le trop plein, par effet de capillarité, provoque un siphonage qui envoie le solvant dans le ballon et le cycle recommence. Ce procédé permet une économie du solvant. Par contre, il ne convient pas aux composés thermolabiles



**Figure 1 : L'extracteur au soxhlet**

### **B.3 EXTRACTION PAR UN FLUIDE SUPERCRITIQUE**

Un fluide est dit supercritique lorsque ce fluide est chauffé au-delà de sa température critique et lorsqu'il est comprimé au dessus de sa pression critique. Les propriétés physiques d'un fluide supercritique (densité, viscosité, diffusivité) sont intermédiaires entre celles d'un liquide et d'un gaz.

Les fluides supercritiques comme le CO<sub>2</sub> supercritique (température critique : 31°C ; pression critique : 73 bars) possèdent les excellentes propriétés de solubilité des solvants organiques. Ainsi ils sont utilisés pour extraire les parfums, les principes actifs de plantes médicinales, décaféiner le café ou dénicotiner le tabac etc... La principale différence entre l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par un solvant conventionnel est dans la méthode de récupération du solvant. En diminuant la pression, le fluide supercritique perd son pouvoir de dissolution et le produit extrait précipite. Cette extraction peut être :

- une extraction liquide-fluide supercritique
- une extraction solide-fluide supercritique

Il faut noter que c'est une méthode propre, avec des rendements d'extraction très élevés et le fluide peu cher, non inflammable, non toxique, peut être récupéré et réutilisé.

C'est ainsi qu'après la récolte en plongée sous-marine ou en marée basse, le matériel biologique est trié puis lavé à l'eau pour enlever le sel, le sable et tous les autres déchets organiques et minéraux.

Par la suite, le matériel frais ou séché à l'abri du soleil est macéré pendant quelques semaines dans un solvant organique tel que l'éthanol, le méthanol, l'acétone ou le mélange chloroforme / méthanol. Après filtration, le solvant est évaporé et le résidu traité avec de l'eau est soumis à une extraction avec de l'acétate d'éthyle. Le résidu obtenu est ensuite soumis à une série de chromatographie sur colonne, flash chromatographie, pour procéder au fractionnement des composés.

Les chromatographies sus indiquées sont faites en phase normale avec la silice (Si 60) ou en phase inverse avec la silice modifiée (RP-18).

Les fractions obtenues sont ensuite soumises à une autre série de chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour isoler et purifier les métabolites secondaires. La HPLC est faite soit en phase normale, soit en phase inverse avec différents types de colonne: Si 60, RP-18, CN, NH<sub>2</sub>.

Pour éviter la formation d'artéfact, toutes les évaporations sont faites au maximum à 50 °C et les différentes fractions sont toujours conservées au congélateur.

Les rendements ont été calculés par rapport à la masse du matériel biologique après extraction

## **C/ METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ANALYSE ET DE PURIFICATION**

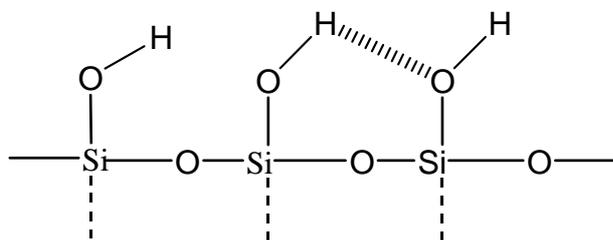
La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases : l'une mobile, l'autre stationnaire ou fixe. Les quatre principaux types de chromatographie sont: l'adsorption, le partage, chromatographie par ionisation et chromatographie par exclusion.

Dans le cadre de ce travail, nous avons surtout fait de la chromatographie d'adsorption qui peut se présenter sous deux formes, dépendant de la nature de la phase mobile mais surtout de la phase stationnaire :

### **C.1 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE NORMALE**

Cette chromatographie est caractérisée par des interactions de type dipôle-dipôle ou par des liaisons hydrogène entre la partie polaire du soluté et la phase stationnaire qui est polaire. En effet, cette phase stationnaire est constituée de la silice (SiO<sub>2</sub>) appelée aussi gel de silice car elle est souvent hydratée.

On peut utiliser aussi comme phase stationnaire l'alumine ou des polymères organiques. A la surface de la silice, il y'a des groupements silanol (Si-OH) et siloxane (Si-O-) qui lui confèrent un caractère acide et polaire (schéma 2).

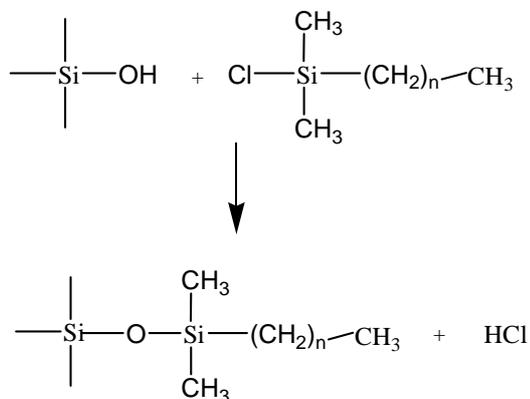


**Schéma 2**

Ces groupements silanols sont donc des sites actifs qui donnent des liaisons hydrogène très fortes avec les solutés polaires. La surface est donc hydrophile. Ainsi les solutés polaires sont retenus plus longtemps par la phase stationnaire et sont élués après les solutés apolaires. Comme phase mobile, on utilise des solvants apolaires très hydrophobes comme l'hexane.

## C.2 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE

La chromatographie en phase inverse « reversed phase » ou RP est l'inverse de la chromatographie en phase normale. Dans ce cas la phase stationnaire se caractérise par son apolarité. Elle est constituée de la silice sur laquelle des chaînes alkylées de longueur variable (C<sub>2</sub> à C<sub>18</sub>) sont greffées au niveau des groupements silanol, ce qui donne des supports de polarité différente (Schéma 3). La chaîne confère à la silice un caractère hydrophobe.



**n = 17 : Octadécylsilane (RP-18)**

**n = 7 : Octylsilane (RP-8)**

**Schéma 3**

La phase mobile est très polaire et hydrophile. On utilise souvent un mélange eau / acétonitrile ou eau / méthanol. Les molécules hydrophobes vont établir des interactions avec la phase stationnaire et sont ainsi adsorbées. Quand on augmente la concentration du solvant organique dans la phase mobile, son hydrophobicité sera plus importante que celle de la phase stationnaire, et les molécules hydrophobes seront désorbées. Ainsi contrairement à la phase normale, plus un soluté est apolaire plus il sera retenu par la phase stationnaire et sera donc élué après les solutés polaires. Des groupements moyennement polaires peuvent être utilisés en phase normale ou inverse.

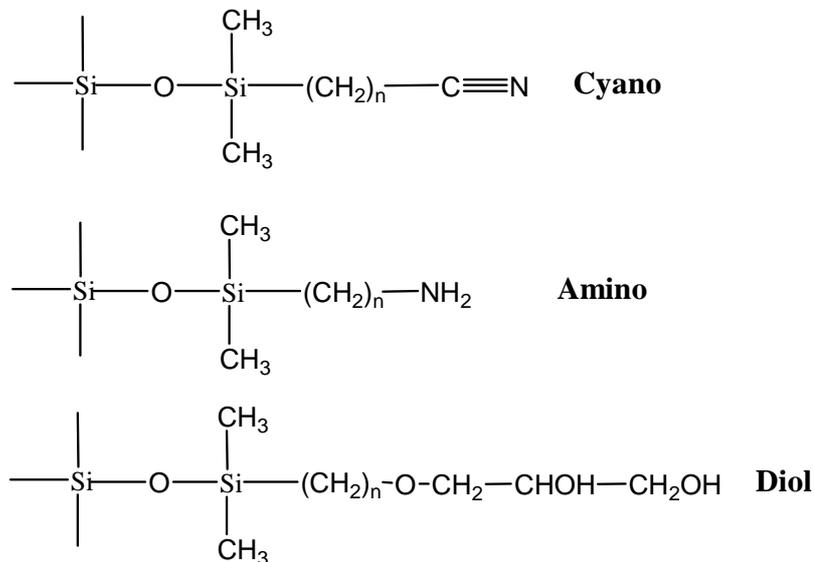
En phase normale ou inverse, plusieurs techniques sont utilisées pour faire de l'analyse qualitative et quantitative.

### **C.3 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)**

C'est une chromatographie d'adsorption où le support est étalé en couche mince sur une plaque de verre ou une feuille semi-rigide de plastique ou d'aluminium.

- 0,25mm, pour l'analytique
- 2mm, pour la préparative
- 0,5mm, pour la préparative (la résolution est meilleure que pour 2mm, mais les quantités déposées seront beaucoup plus faibles).

L'adsorbant le plus utilisé est la silice 60 (diamètre des pores 60 Å). Les plaques incorporent un indicateur fluorescent qui est un silicate de zinc activé par le manganèse pour l'UV proche (254 nm) et un pigment fluorescent inorganique pour l'UV lointain (365 nm). Après dépôt de l'échantillon, la plaque est placée dans une cuve où se trouve le solvant d'éluion. Celui-ci monte par capillarité entraînant les substances qui migrent à une vitesse qui dépend de leur polarité et de celle du solvant. En plus des plaques non modifiées (Si 60), il existe des plaques modifiées (RP-18, RP-8, CN, NH<sub>2</sub>, diol).



**Schéma 4**

## C.4 CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

C'est une chromatographie d'adsorption où le support solide est dans une colonne en verre munie d'un robinet. C'est une chromatographie par gravité qui se fait souvent à la pression atmosphérique.

La séparation est liée à la différence d'adsorbabilité des divers composants du mélange. Les composés les plus adsorbés par la phase stationnaire migreront moins rapidement au travers de la colonne.

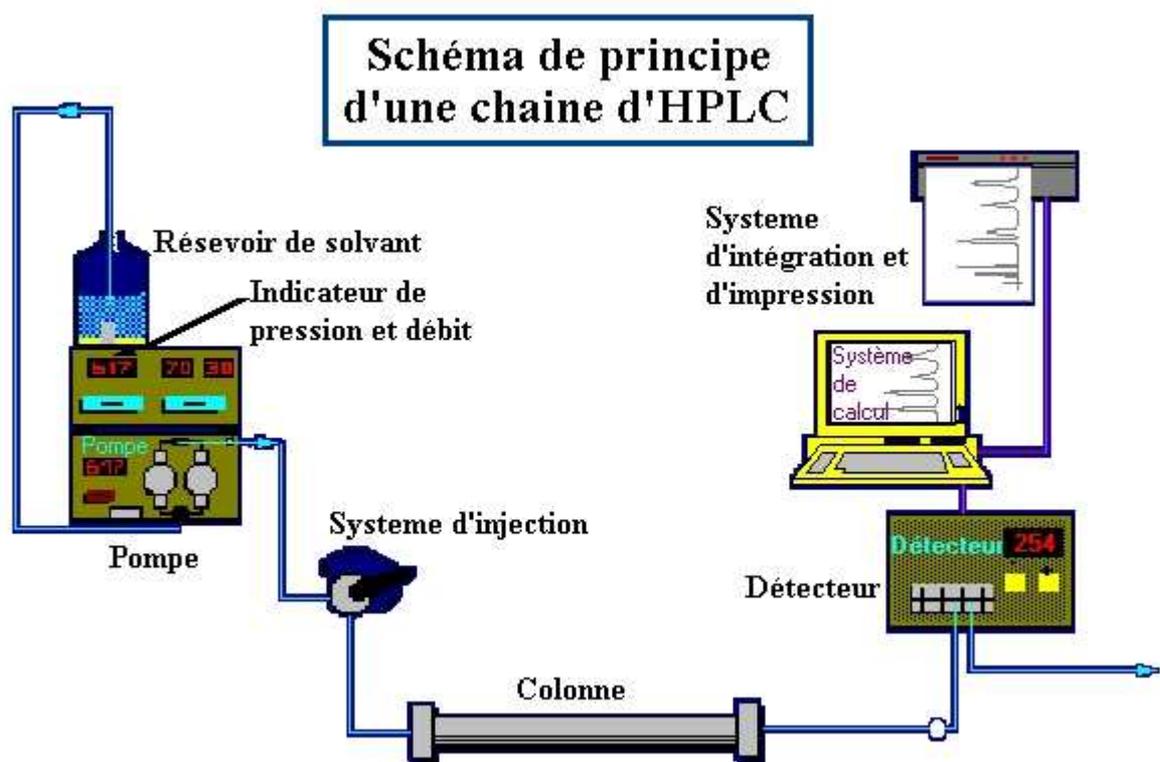
## C.5 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

C'est une chromatographie d'adsorption où l'écoulement de l'éluant à travers la colonne est obtenu grâce à une forte pression. Si la CCM et la colonne interviennent surtout dans le fractionnement, la HPLC permet d'isoler les métabolites à l'état pur.

Avec les différentes phases stationnaires actuellement disponibles, aussi bien en phase normale, inverse ou moyennement polaire, c'est une technique de pointe, efficace et très commode pour séparer et accéder à des substances très pures.

Au moyen d'une seringue, l'échantillon à analyser, dissout dans un solvant est introduit dans l'injecteur. Il est ensuite poussé dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie, par un liquide appelé phase mobile sous haute

pression au moyen d'une pompe appropriée. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. A la sortie de la colonne, les différents solutés sont visualisés par un pic grâce à un détecteur approprié couplé à un enregistreur. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. Chaque pic correspond à la sortie d'un produit, dont le temps de rétention ( $t_R$ ), qui est le temps écoulé entre l'injection et la détection, peut être déterminé à partir du chromatogramme.



*Figure 2 : Schéma de principe d'une chaîne de montage HPLC.*

◆ Les différentes parties de la HPLC sont :

- *Un réservoir de solvant* : il contient la phase mobile en quantité suffisante. En mode isocratique à savoir 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse, un

seul flacon d'éluant est utilisé. En mode gradient, qui se fait avec une variation du pourcentage des solvants constituant l'éluant, plusieurs flacons de solvant de polarité différente sont utilisés pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

- **La pompe** : elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant et de son pourcentage dans le mélange de solvant constituant l'éluant. Elle permet de travailler en mode isocratique et en mode gradient. Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques ml à plusieurs ml/min.

- **L'injecteur** : Il existe plusieurs types d'injecteurs :

- Injecteur à seringue : on injecte au moyen d'une seringue l'échantillon dans la colonne.
- injecteur à boucles d'échantillonnage : permet la répétabilité du volume

d'injection. Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

- **La colonne** : Une colonne est un tube fabriqué avec un matériau inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

- **Détecteurs** : Il existe plusieurs types de détecteurs dont les principaux sont :

- Détecteur à absorption UV visible
- Détecteur à indice de réfraction
- Détecteur UV à barrette de diodes
- Détecteur à fluorescence

- Détecteur de type spectrométrie de masse (MS)
- Détecteur électro-chimique

Parmi ceux-ci, les plus utilisés sont les détecteurs à UV, à indice de réfraction et à fluorescence. Le détecteur est couplé à un enregistreur qui permet d'avoir le chromatogramme.

#### ◆ Différents types de chromatographies en phase liquide :

##### • *Chromatographie d'adsorption*

---

Dans cette chromatographie, la phase stationnaire consiste en une matière solide à grand pouvoir d'adsorption, tel que l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium, les gels de silice. Les composants sont simplement plus ou moins retenus à la surface de la phase stationnaire par adsorption physique. C'est une technique qui prend en compte la polarité des composants.

##### • *Chromatographie de partage*

---

Dans cette chromatographie les solutés sont séparés en fonction de leur affinité avec les phases stationnaire et mobile. L'affinité dépend de la polarité des solutés et des phases. En mode normal la phase stationnaire est polaire, en mode inverse elle est apolaire. Il y a deux types de chromatographie de partage :

- liquide - liquide : la phase stationnaire consiste en une très fine couche de liquide répartie par adsorption physique à la surface du matériau support le plus inerte possible. Les composants sont séparés comme dans une extraction liquide – liquide sauf que la répartition des composants se fait lors du passage dans la phase liquide et non par agitation.
- liquide - solide ou liquide - phase greffée : la phase stationnaire consiste en une espèce organique liée par des liaisons chimiques à la surface des particules du matériau support.

##### • *Chromatographie par échange d'ions*

---

La phase solide est une résine insoluble munie de groupes fonctionnels capable de se dissocier. Ce sont habituellement, des groupes acide sulfonique ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) pour les échangeurs de cations et ammoniums quaternaires ( $\text{N}(\text{R})_4$ ) pour les échangeurs d'anions.

#### • *Chromatographie chirale*

---

Cette technique consiste à former des liaisons non covalentes entre les énantiomères du substrat et l'absorbant chromatographique chiral, donnant ainsi des complexes diastéréoisomères ayant des affinités de liaisons différentes donc séparables. Elle sert donc en particulier à séparer des énantiomères.

## **D/ METHODES SPECTROSCOPIQUES D'ANALYSE STRUCTURALE ET DE DETERMINATION DES PROPRIETES PHOTOCIMIQUES**

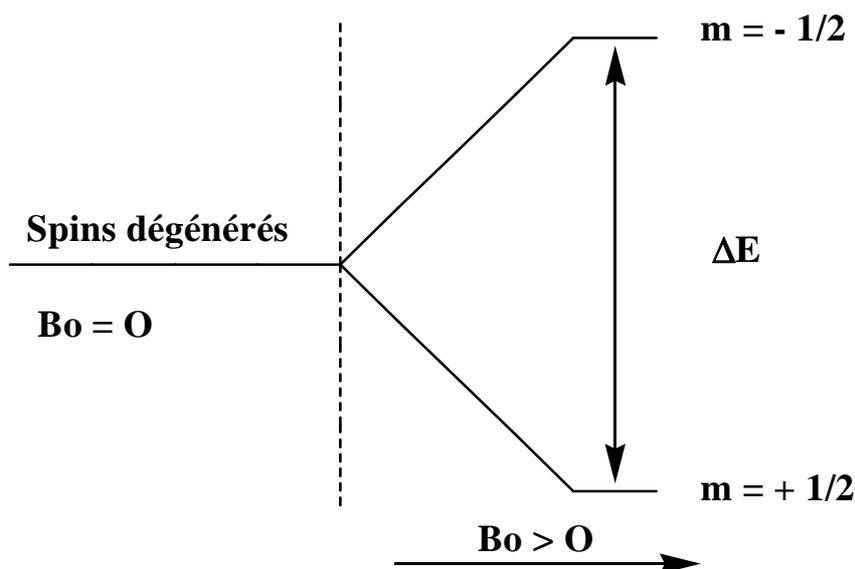
Après isolement et purification des métabolites secondaires, des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) combinées avec les données de la masse ont permis d'établir la structure des différents composés isolés.

Après l'identification structurale, plusieurs expériences de spectrofluorimétrie ont permis de déterminer les propriétés fluorescentes et photochimiques des molécules fluorescentes isolées.

### **D.1 SPECTROSCOPIE DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE**

#### ***D.1.1 Principe de la RMN***

La RMN est basée sur le principe de l'absorption du rayonnement électromagnétique par la matière. Quand des noyaux à spins non nuls, possédant un moment magnétique sont placés dans un champ d'induction magnétique  $B_0$  de grande intensité, ils peuvent prendre des orientations qui correspondent à des niveaux d'énergie séparés par une valeur  $\Delta E$ , caractéristique du noyau et de  $B_0$  (schéma 5).



### Schéma 5

Plus le champ  $B_0$  augmente, plus  $\Delta E$  augmente.

$$\Delta E = h \nu = h \gamma B_0$$

$\gamma$  = rapport gyromagnétique

$h$  = constante de Planck

La fréquence de résonance des protons ( $\nu = f(B_0)$ ) se situe pour un champ magnétique de 1,4 T à 60 MHz, ce qui correspond à une onde radio de  $\lambda = 5\text{m}$ .

La RMN consiste à réaliser des transitions au moyen d'un rayonnement électromagnétique entre les niveaux d'énergie. Pour un noyau, la résonance a lieu à des fréquences qui dépendent de son environnement magnétique. Ceci correspond à son déplacement chimique ( $\delta$ ) exprimé en ppm.

Entre deux noyaux, il peut exister une interaction mutuelle, indépendante de  $B_0$ , plus ou moins intense selon la distance et l'orientation. Ceci correspond à la constante de couplage ( $J$ ) exprimée en Hz.

Le signal RMN du carbone 13 est 6400 fois plus petit que celui du proton. Cette faible sensibilité du  $^{13}\text{C}$  est liée à la faible valeur du rapport gyromagnétique  $\gamma$  caractéristique de chaque isotope et de la faible abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  (1,08%).

### ***D.1.2 La RMN bidimensionnelle***

La RMN 2D qui appartient autant à la spectroscopie à transformée de Fourier qu'à celle à impulsion, repose sur une succession de quatre intervalles de temps : préparation, évolution, temps de mixage et détection. Il existe plusieurs applications de la RMN 2D dont les suivantes :

- **COSY (CORrelated SpectroscopY)**: Elle concerne les couplages scalaires homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . C'est l'expérience de RMN 2D la plus utilisée. D'autres corrélations homonucléaires sont parfois utilisées dans certains cas particuliers ;

**HOHAHA (HOMonuclear HARTman-HAHn spectroscopy)** pour les couplages  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  entre noyaux directement couplés ou liés à travers une succession de couplages pouvant aller jusqu'à 5 ;

- **ROESY (Rotating fram Overhauser Effect SpectroscopY) ; INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfert Experiment)** pour les corrélations  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . C'est une expérience très peu utilisée à cause de la faible sensibilité.

- **HETCOR (HETERonuclear CORrelated spectroscopy)** : Cette séquence permet de corrélérer les signaux de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  directement liés ( $^1J_{\text{CH}}$ ).

- **COLOC (CORrelation via LOng range Coupling)** : Cette séquence permet une bonne corrélation entre les carbones quaternaires et les protons voisins. Cependant, elle ne donne pas de bons résultats pour les corrélations longue distance concernant des carbones protonés. En raison de la faible sensibilité (10 à 20 mHz) pour enregistrer un spectre, d'autres techniques comme les hétérocorrélations de déplacement chimique en détection inverse sont utilisées.

La détection inverse ou indirecte consiste à obtenir les paramètres RMN (déplacement chimique, constante de couplage) d'un noyau peu sensible comme le  $^{13}\text{C}$ , en observant le signal RMN d'un autre noyau beaucoup plus sensible comme le proton. Les séquences utilisées actuellement sont :

- ✓ HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) : Cette séquence est utilisée pour les corrélations directes ( $^1J_{CH}$ ) ;
- ✓ HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**oherence) : Cette expérience est plus sensible que le COLOC pour étudier les couplages longue distance ;
- ✓ HMQC (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence) : Elle est aussi utilisée pour les couplages directs ( $^1J_{CH}$ ). Elle a l'avantage d'être plus sensible que l'expérience HETCOR.

## D.2 SPECTROSCOPIE DE MASSE

La spectroscopie de masse permet de déterminer le poids moléculaire des molécules et peut faciliter après une exploitation judicieuse des ions fragments, la détermination structurale. Le principe de la masse est de bombarder une molécule avec un faisceau d'électrons ayant une énergie suffisante pour provoquer sa fragmentation.

Plusieurs sources d'ionisation existent : l'impact électronique (IE), le bombardement par des atomes neutres (FAB) « Fast Atomic Bombardment », l'ionisation par électrospray ou électronébulisation (ESI) « Electro-Spray Ionisation ». Le choix d'une méthode dépend de la stabilité de la molécule, de sa taille, de l'état physique et de la volatilité.

### D.2.1 Impact électronique (IE)

Le produit est volatilisé dans la chambre d'ionisation, ainsi les molécules en phase gazeuse sont bombardées par un faisceau d'électrons de l'ordre de 70 eV. Ceci entraîne l'arrachement d'un ou plusieurs électrons et la formation de l'ion moléculaire selon l'équation suivante :



On observe aussi la formation de plusieurs ions fragments positifs. L'ion moléculaire et les ions fragments sont ensuite accélérés à l'aide d'une différence de potentiel avant de traverser le système dispersif constitué d'un champ magnétique et

d'un champ électrique radial. Celui-ci sépare les ions en fonction du rapport masse / nombre de charge ( $m / z$ )

### ***D.2.2 Ionisation par la méthode FAB***

Cette méthode convient pour les composés polaires avec des groupements fonctionnels acides ou basiques. L'échantillon dissout dans une matrice qui est généralement l'alcool méta-nitrobenzylique est déposé sur une cible bombardée par un faisceau d'atomes neutres (Ar, Xe), accélérés et de grande énergie cinétique. Les ions sont extraits à l'aide d'un champ d'extraction, accélérés et analysés par l'analyseur de masse.

### ***D.2.3 Ionisation par électro-ébulisation (ESI)***

C'est une méthode d'ionisation douce permettant la formation d'ions à pression atmosphérique et non à vide poussé, permettant ainsi un couplage efficace HPLC / SM. C'est une technique qui s'applique aussi bien à des composés basiques ou acides, qu'à des molécules ne contenant aucun site ionisable. Elle peut être utilisée en mode ions positifs ou ions négatifs.

L'échantillon en solution souvent dans le méthanol est admis dans la source par infusion directe à l'aide d'une pompe à seringue ou par couplage avec une HPLC (phase normale ou inverse) à travers une aiguille en acier inoxydable. Un potentiel de - 3,5kV est appliqué à l'électrode cylindrique (l'aiguille étant reliée à la terre) pour la détection d'ions positifs. Un potentiel de - 4,5kV à + 40V est appliqué à l'entrée et à la sortie du capillaire en verre respectivement. Les potentiels sont inversés pour la détection d'ions négatifs. Le liquide est pulvérisé depuis la pointe de l'aiguille et les gouttes formées sont dispersées par un flux chaud d'azote appliqué à contre courant. Les ions formés par évaporation du solvant par le gaz séchant sont entraînés à travers le capillaire dans une chambre où un vide partiel est établi, formant un faisceau d'ions supersoniques. Finalement, ceux-ci sont filtrés à travers l'écumoire et dirigés par des lentilles électrostatiques vers l'analyseur de masse. L'application d'un champ électrique élevé à la pointe de l'aiguille de

l'électrospray produit une séparation partielle des ions positifs et négatifs. En mode positif, les ions positifs sont accumulés à la surface de la pointe du liquide du capillaire et les ions négatifs sont amassés à l'intérieur du liquide. La technique de la double masse (SM / SM) permet de fragmenter sélectivement un ion en sortie de source. C'est donc une technique complémentaire pouvant donner des résultats intéressants.

## **D.3 LA SPECTROFLUORIMETRIE**

### ***D.3.1 La fluorescence***

Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement (quelques nanosecondes) sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve alors généralement dans un état électroniquement excité, souvent un état singulet, que l'on note S1. Le retour à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières : soit par fluorescence, soit par phosphorescence ou alors par désactivation non radiative.

La fluorescence est caractérisée par l'émission d'un photon de manière très rapide. Cette rapidité s'explique par le fait que l'émission respecte une des règles de sélection de l'émission de photons de la mécanique quantique qui est  $\Delta S = 0$ , ce qui signifie que la molécule reste dans un état singulet.

L'absorption d'énergie appropriée se traduit par une bande d'absorption correspondant à des raies très serrées en général mal résolues, correspondantes aux variations simultanées de l'énergie de rotation et de vibration.

Lors du processus d'absorption, le spin de l'électron qui subit la transition ne se retourne pas. Une partie de l'énergie acquise est dissipée sous forme de vibration. Les spectres d'absorption et d'émission ne coïncident pas. Les molécules non rigides perdent facilement toute l'énergie par relaxation vibrationnelle. Pour les molécules organiques, la fluorescence concerne essentiellement les composés cycliques portant des liaisons  $\pi$  conjuguées.

Les solutions fluorescentes cessent de luire aussitôt qu'on cesse de les éclairer. Cependant, une certaine analogie avec la phosphorescence a fait supposer depuis longtemps que la fluorescence n'est pas un phénomène instantané, que la réémission de lumière dure peut-être un temps plus long après l'excitation. Les tentatives faites, au moyen de phosphoscopes très rapides, pour observer directement une persistance d'émission, dans le cas de solutions fluorescentes typiques, n'ont rien donné et ont simplement montré que si une telle persistance existe, sa durée est inférieure à 1/50 000 seconde. La méthode d'Abraham-Lemoine permet d'atteindre les durées d'émission des corps fluorescents. Elle a été utilisée par F. Gottling dont les conclusions paraissent contestables [9] et par E. Gaviola qui a obtenu pour ces durées, des valeurs de l'ordre de  $10^{-8}$ s, mais encore assez incertaines [10].

La découverte d'une polarisation partielle de la lumière réémise par les solutions fluorescentes est venue jeter un jour nouveau sur cette question, en prouvant que, conformément à certaines suggestions théoriques, la durée de luminescence était inférieure à  $10^{-7}$  s, probablement même à  $10^{-8}$ , sans être nulle [11].

Les recherches récentes, en relation avec la théorie des quanta, ont conduit à penser que la fluorescence est un phénomène discontinu, lié à des transformations moléculaires momentanées d'activation et de désactivation (10). D'une façon plus précise, on représente ainsi le mécanisme de la fluorescence :

Si toutes les molécules de la substance fluorescente étaient identiques et ne possédaient que deux états stationnaires parfaitement définis, les lumières absorbée et réémise devraient être identiques, et toutes deux monochromatiques d'après la loi fondamentale qui relie la fréquence aux variations d'énergie. Il en est bien ainsi dans le cas de la résonance optique des vapeurs métalliques monoatomiques; mais, dans le cas des solutions fluorescentes, l'absorption et l'émission s'étendent sur d'assez larges intervalles de fréquence, et la bande d'émission, quoique toujours voisine de la bande d'absorption, correspond en moyenne à des fréquences plus faibles (règle

de Stokes). Pour expliquer ces caractères, on peut supposer que les molécules fluorescentes absorbent, en plus de l'énergie nécessaire à une activation électronique déterminée, une certaine quantité d'énergie variable, servant à augmenter leur activité de rotation et d'oscillation, les mouvements correspondants étant d'ailleurs mal définis par suite de l'entraînement possible des molécules voisines du solvant; une molécule ainsi excitée subirait aussitôt une évolution très rapide lui faisant reprendre une activité de rotation et d'oscillation en équilibre avec l'agitation thermique du milieu, l'excès d'énergie correspondant se transformant en chaleur, si bien qu'au moment du retour à l'état normal, l'énergie disponible serait un peu inférieure à l'énergie initialement absorbée. De plus, les molécules fluorescentes dissoutes sont certainement déformées de façon irrégulière par les molécules de solvant qui les entourent (effets Stark intenses), ce qui peut aussi contribuer à l'étalement des bandes d'absorption et d'émission. Quoi qu'il en soit, les molécules absorbant et émettant dans des états distincts, on peut comprendre qu'il existe une certaine différence de fréquence entre la lumière absorbée et la lumière réémise, tandis que la conception classique d'un résonateur électrique avait été impuissante à rendre compte de cette différence.

Le caractère essentiel de l'état moléculaire excité correspondant à une fluorescence est la possibilité de retour spontané à l'état normal avec émission de lumière. Il ne faut pas en conclure pourtant que toute régénération soit nécessairement accompagnée d'une émission lumineuse. S'il en était ainsi, le nombre de quanta de lumière réémis serait toujours égal au nombre de ceux qui ont été absorbés, or il est souvent beaucoup plus petit. Le retour à l'état normal peut donc, en général, se produire aussi sans qu'il y ait rayonnement, l'énergie libérée se transformant alors en énergie cinétique et finalement en chaleur.

La fluorescence couvre un vaste domaine d'applications pratiques. On peut citer entre autres les colorants traceurs, dans le domaine de l'électronique (colorants lasers, concentrateurs solaires, capteurs de fibres optiques ...) ou bien dans les domaines de l'immunologie, de la biochimie, de la biologie cellulaire, de la

neurochimie et de la chimie analytique. Bien évidemment ce sont les propriétés spectrales développées par ces molécules organiques qui régissent leur domaine d'utilisation.

### D.3.2 La phosphorescence :

La phosphorescence est caractérisée par un retour à l'état fondamental différent et plus complexe. Après la phase d'absorption, avec le transfert d'électron de  $S_0$  à  $S_1$ , et si la relaxation vibrationnelle est assez lente, on assiste à un retournement de spin de l'électron conduisant à un état triplet  $T_1$  plus stable. La transition n'est pas permise par le modèle quantique, mais elle est rendue possible par le couplage spin-orbite. Cependant, la transition est plus lente à s'effectuer (quelques secondes). Suit alors une émission de photon pour retourner à l'état fondamental. Le diagramme énergétique de Jablonski (figure 3) permet de rendre plus visible les transitions entre les différents niveaux électroniques, dont le phénomène de retour à l'état fondamental par fluorescence et phosphorescence.

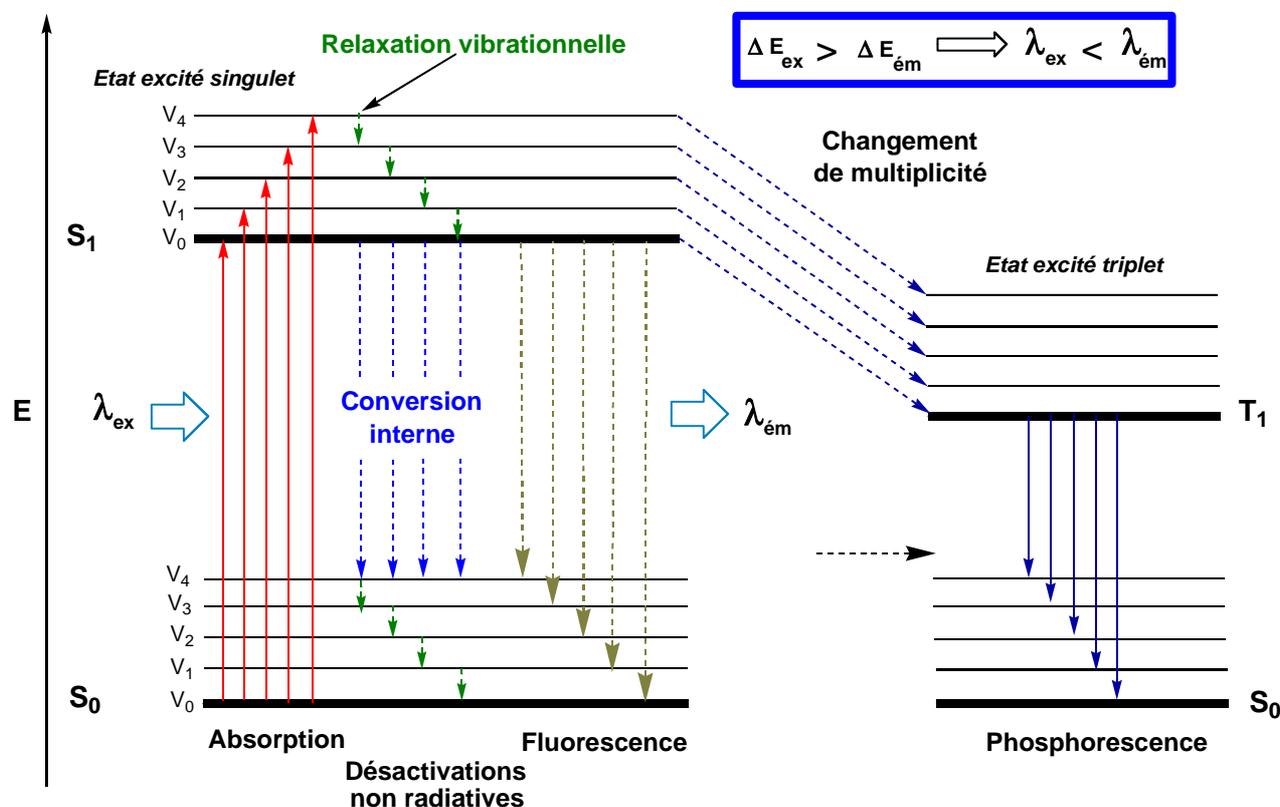


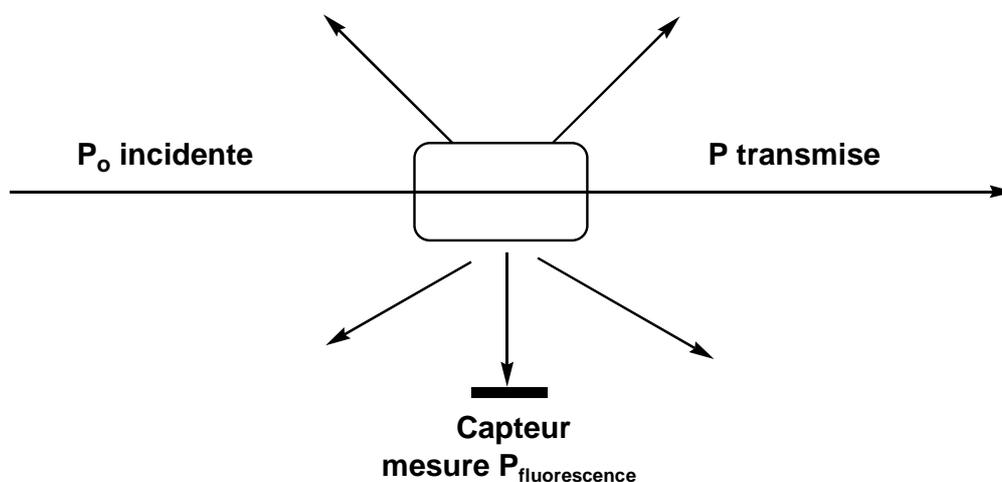
Figure 3 : Le diagramme de Jablonsky

Lorsque la molécule se trouve dans un état excité suite à l'absorption d'un photon, elle retourne au plus bas niveau d'énergie de l'état excité par relaxation (transfert d'énergie avec le solvant suite notamment à des collisions). La durée de vie de ces relaxations vibrationnelles non radiatives est de l'ordre de  $10^{-12}$  seconde.

La molécule revient ensuite dans l'état fondamental soit par conversion interne ou externe (choc avec d'autres molécules) soit par émission de lumière.

### *D.3.3 Analyse spectrofluorimétrique*

L'absorption de photon par les molécules, donc leur excitation s'accompagne de désexcitation qui peut être radiative. C'est ce rayonnement de fluorescence envoyé dans toutes les directions qu'on analyse en fluorimétrie. Cette technique peut être appliquée à des molécules naturellement fluorescentes ou rendues fluorescentes par dérivatisation. On mesure généralement la puissance rayonnée par fluorescence suivant un angle de  $90^\circ$  par rapport au faisceau incident (Schéma).



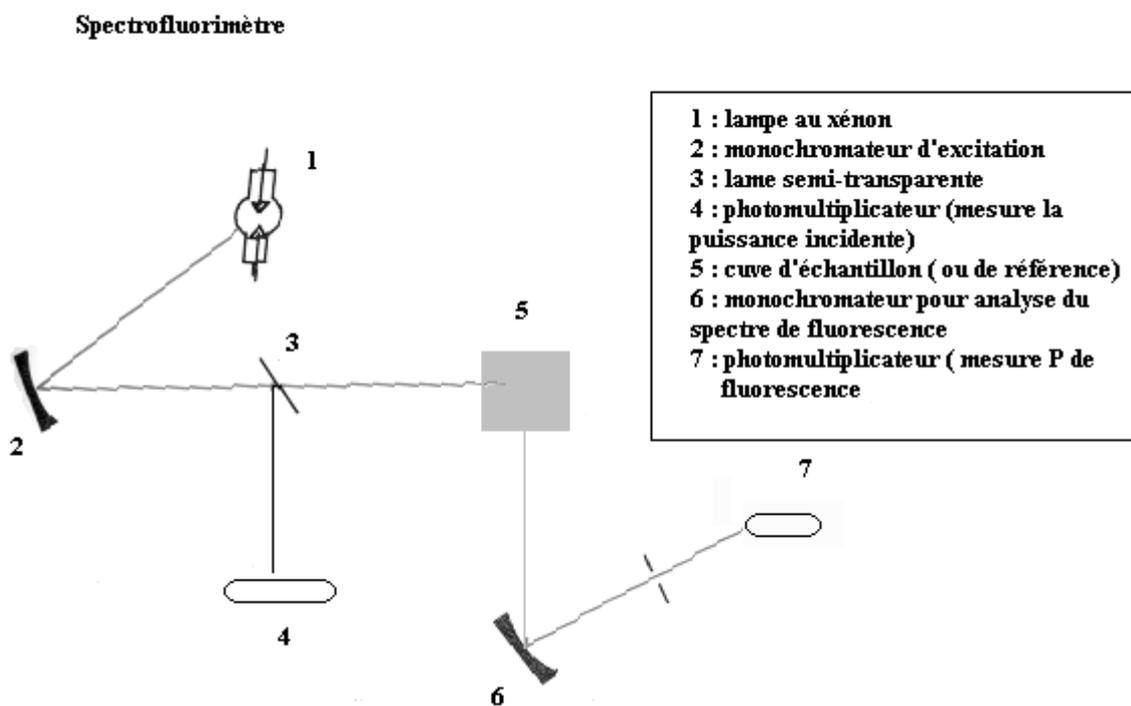
### **Schéma 6**

La fluorimétrie permet :

- Une analyse qualitative car les longueurs d'ondes d'excitation et celles d'émission sont caractéristiques des substances étudiées.
- Une analyse quantitative car dans certaines conditions (solutions diluées)  $P_{\text{fluorescence}}$  est proportionnelle à la concentration.

La figure 4 suivante représente la configuration usuelle et simplifiée des différents composants d'un spectrofluorimètre qui sont généralement constitués :

- i) D'une source lumineuse (lampe à arc au xénon) ;
- ii) D'un monochromateur ou filtre d'excitation ;
- iii) D'un compartiment à échantillon ;
- iv) D'un monochromateur ou filtre d'émission ;
- v) D'un détecteur photomultiplicateur ou photodiode.



*Figure 4 : Schéma de principe et organes du spectrofluorimètre*

## **DEUXIEME PARTIE**

### **ETUDE DES PROPRIETES FLUORESCENTES ET PHOTOCIMIQUES DES ALMAZOLES C ET D**

#### **CHAPITRE I : TRAVAUX ANTERIEURS SUR LES METABOLITES SECONDAIRES DE L'ALGUE *HARALDIOPHYLLUM SP***

#### **CHAPITRE II : ETUDES DES PROPRIETES FLUORESCENTES ET PHOTOCIMIQUES DES ALMAZOLES C ET D**

## INTRODUCTION

A partir de l'algue *Haraldiophyllum sp* récoltée en marée basse sur les rochers des Almadies situés près de Dakar (Sénégal), le Dr I. Ndiaye de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar a isolé et identifié 15 métabolites secondaires dont 8 qui sont nouveaux et certains, comme les almazoles présentent de nouveaux squelettes [4-5, 13-14].

Ces composés se caractérisent par la présence du très rare oxazole 2,5-disubstitué par C5' à un noyau indole et par C2' à un groupement N,N-diméthylphénylalanine (Schéma 1).

La configuration absolue a été déterminée à partir de la synthèse biomimétique de l'almazole C [4]. L'almazole D n'a pas été synthétisé, cependant nous avons noté la préparation des almazoles A et B par photolyse du N-acyl isoxazol-5(2H) one [15]. Nous remarquons que ces composés présentent une forte fluorescence (autour de 470 nm en excitant à 365nm dans CH<sub>3</sub>OH) due très certainement à la présence du noyau indole. On peut noter que cette fluorescence est en rapport avec l'aspect brillant de l'algue et la variation de sa couleur en fonction de la profondeur de l'eau en marée basse : rose vers 1m et rouge près de la surface (0,2 – 0,3m).

L'évaluation de l'activité biologique indique que l'almazole D est le premier composé bioactif de la famille des almazoles. Il présente une forte activité antibactérienne contre les germes de Gram-négatif tel que *Serratia marcescens* et *Salmonella typhi* XLD [5].

L'activité antibactérienne et les propriétés fluorescentes de ces composés qui représentent les premiers membres d'une nouvelle classe d'alcaloïdes indoliques, justifient une étude fluorimétrique approfondie et comparative des almazoles D et C naturels.

# CHAPITRE I

## TRAVAUX ANTERIEURS SUR LES METABOLITES SECONDAIRES DE L'ALGUE *HARALDIOPHYLLUM SP*

### I.1 EXTRACTION ET ISOLEMENT

L'algue *Haraldiophyllum sp.* a été récoltée en marée basse aux Almadies ( au nord de Dakar). Aussitôt après la récolte, elle a été placée dans l'éthanol, pour 3 mois d'homogénéisation. Après filtration, on récupère l'extrait éthanolique et 203 g de résidu sec. Après évaporation de l'alcool, le résidu repris avec un peu d'eau est extrait à l'hexane puis à l'acétate d'éthyle. Le résidu issu de l'acétate d'éthyle (1,5 g) est soumis à une flash chromatographie en phase normale (Si60, 75 $\mu$ m) avec gradient d'élution (fractions de 40 ml). Celle-ci démarre avec le mélange hexane/acétate d'éthyle (95 : 5) et sera poursuivie jusqu'à la fraction 18 en faisant varier la proportion de l'hexane : 2(90 : 10) ; 3(85 : 15) ; 4(75 : 25) ; 5(65 : 35) ; 6(50 : 50) ; 7(35 : 65) ; 8-12(25 : 75) ; 13-15(12 : 88) ; 16-18(0 : 100). A partir de la fraction 19 la chromatographie sera développée avec le mélange méthanol/acétate d'éthyle (10 : 90) et sera poursuivie jusqu'à la fraction 25 en faisant varier la proportion de l'acétate d'éthyle: 20(30 : 70) ; 21(50 : 50) ; 22(70 : 30) ; 23-24(90 : 10); 25(100 : 0). Les différentes fractions sont ensuite analysées par CCM (Si60 ou RP18). Les fractions présentant des spots similaires sont réunies puis le solvant évaporé. Les différents produits sont ensuite séparés et purifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

- Le résidu des fractions 6 à 9 soumis à une HPLC RP18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O ; 50 : 50) donne le **para-hydroxybenzaldéhyde** ( $t_R = 3,9$  min ; Rdt = 0,004 %), l'**indole-3-glyoxalate d'éthyle** ( $t_R = 8,2$  min ; Rdt = 0,006 %) et l'**indole-3-acétate d'éthyle** ( $t_R = 9,2$  min ; Rdt = 0,002 %).
- Le résidu issu des fractions 10 à 12 soumis à une HPLC RP18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 50 : 50) conduit à l'**alcool para-hydroxybenzylique** ( $t_R = 3$ mn 30; Rdt = 0,02 %) et à l'**indole-3-carbaldéhyde** ( $t_R = 4$ min 30 ; Rdt = 0,002 %).

- Le résidu issu des fractions 13 à 16 soumis à une HPLC-NH<sub>2</sub> (hexane/i-PrOH ; 90 : 10) conduit à **l'almazole A** ( $t_R = 9\text{min } 30$ ; Rdt total = 0,005 %) et **l'almazole B** (57) ( $t_R = 9\text{ min}$  ; Rdt = 0,002 %). Le résidu issu des fractions 17 à 20 soumis à une HPLC-NH<sub>2</sub> (hexane/i-PrOH; 85:15) conduit également à **l'almazole A** ( $t_R = 7,2\text{ min}$ ) et à **l'almazole C** ( $t_R = 12,2\text{ min}$  ; Rdt total = 0,05 %).
- Le résidu issu des fractions 21 à 23 est soumis à un autre flash chromatographie (Si60) avec gradient d'éluion en démarrant avec le mélange hexane/acétate d'éthyle (95 : 5) comme solvant d'éluion. On récupère 17 fractions de 40 ml en faisant varier la proportion de l'hexane de 5 %. Après analyse par CCM des fractions 1-17, les fractions présentant des spots similaires sont réunies et le solvant évaporé.
  - Le résidu issu des fractions 6-9 de cette "flash" chromatographie, soumis à une HPLC dans les mêmes conditions que pour les fractions 17 à 20 conduit à **l'almazole C**.
  - Le résidu issu de la fraction 10a conduit après HPLC-NH<sub>2</sub> (hexane : i-PrOH ; 75 : 25) à une première fraction contenant le **préalalmazole C** ( $t_R = 8\text{ min}$ ) ; ce produit sera ensuite purifié par HPLC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 60 : 40 pendant 10 min puis 80 : 20 ;  $t_R = 13\text{ min } 30$  ; Rdt = 0,002 %). La deuxième fraction qui sort à 19,5 min contient l'indole 3-acétamide qui sera par la suite purifié par HPLC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O ; 60 : 40;  $t_R = 3,5\text{ min}$  ; Rdt = 0,004 %).
  - Le résidu des fractions 11 -12, soumis à une HPLC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 62 : 38) conduit à la **N,N-diméthylphénylalaninamide** ( $t_R = 5,7\text{ min}$  ; Rdt = 0,015 %) et à **l'acide indole-3-carboxylique** ( $t_R = 3,7\text{ min}$  ; Rdt = 0,001 %).
- Le résidu des fractions 24-25 issues de la première flash chromatographie est soumis à une HPLC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O ; 20 : 80 pendant 10 min puis on élue avec CH<sub>3</sub>CN seul. On obtient ainsi le dipeptide **1** ( $t_R = 7,4\text{ min}$  ; Rdt = 0,004 %) et une autre fraction qui, soumise à une HPLC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 40 : 60) conduit au dipeptide N-alkylé **2** ( $t_R = 4\text{ min}$  ; Rdt = 0,0015 %).

L'algue *Haraldiophyllum* sp. a été récoltée une deuxième fois, toujours aux Almadies. Après séchage (310g), on extrait à froid avec le méthanol pendant 15

jours. Après filtration, on évapore le solvant. Le résidu repris avec 200 ml d'eau est extrait à l'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant, le résidu (4, 12g) est soumis à une "flash" chromatographie (Si60, 220 $\mu$ m) avec gradient d'élution (fractions de 40 ml). Celle-ci démarre avec le mélange hexane/acétate d'éthyle (100:0) et sera poursuivie jusqu'à la 20<sup>ème</sup> fraction en faisant varier la proportion de l'hexane de 5%. L'élution sera maintenue avec l'acétate d'éthyle seul jusqu'à la 30<sup>ème</sup> fraction. Ensuite on passe à des mélanges méthanol/acétate d'éthyle: 31(3 : 97) ; 32(5 : 95) ; 33(7 : 93) ; 34-43(10 : 90); 44-48(30 :70); 49 (40 :60); 50-54 (50:50); 55-56 (80:20); 57-78 (100:0). Les différentes fractions sont ensuite analysées par CCM (Si60 ou RP18). Les fractions 62-78 très fluorescentes après exposition sous la lampe UV (365 nm) sont réunies puis le solvant évaporé. Le résidu (144 mg) est soumis à une "flash" chromatographie RP-18 sans gradient d'élution (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 70 : 30). Les fractions 1a et 2a issues de cette "flash" chromatographie sont réunies puis le solvant évaporé. Le résidu soumis à une HPLC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; 60 : 40) conduit à l'**almazole D** ( $t_R$  = 3 min 30 ; 180 mg).

La grande partie de l'almazole D a été isolée de la phase aqueuse. Ainsi après évaporation complète de l'eau, le résidu est repris avec un minimum de méthanol. Le surnageant est récupéré puis le solvant évaporé. Le résidu ainsi obtenu est soumis à une flash chromatographie RP-18 avec gradient d'élution (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O: fraction 1(0:100) ; fractions 2 à 17 (on fait varier pour chaque fraction de 40 ml, la proportion de CH<sub>3</sub>CN de 2,5 %), puis on élue jusqu'à la fraction 27 avec CH<sub>3</sub>CN seul. Après analyse des fractions par CCM, nous remarquons qu'à partir de la fraction 15 seul l'almazole D sort de la colonne à l'état pur (475 mg, Rdt total = 0,21 %).

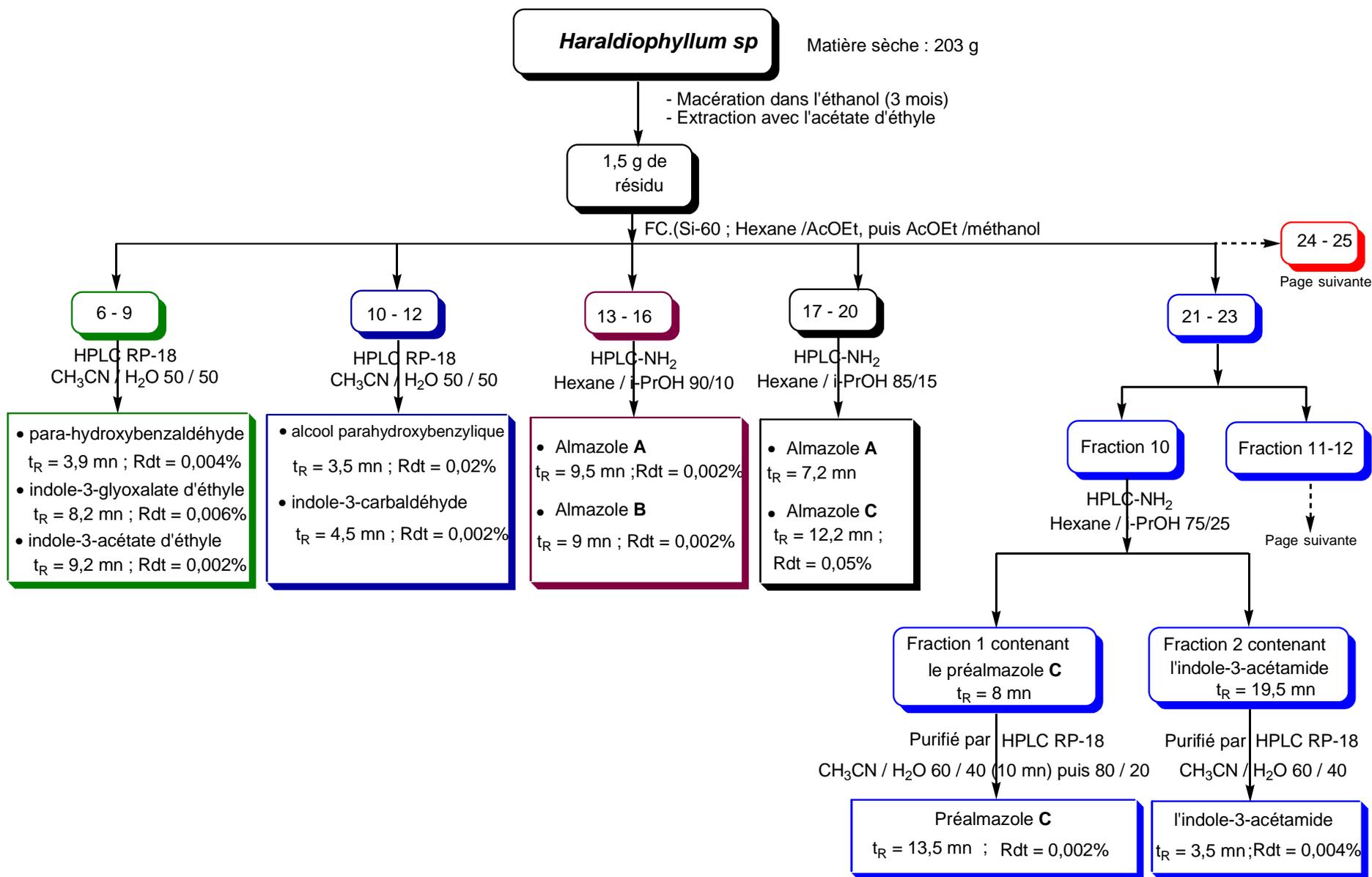
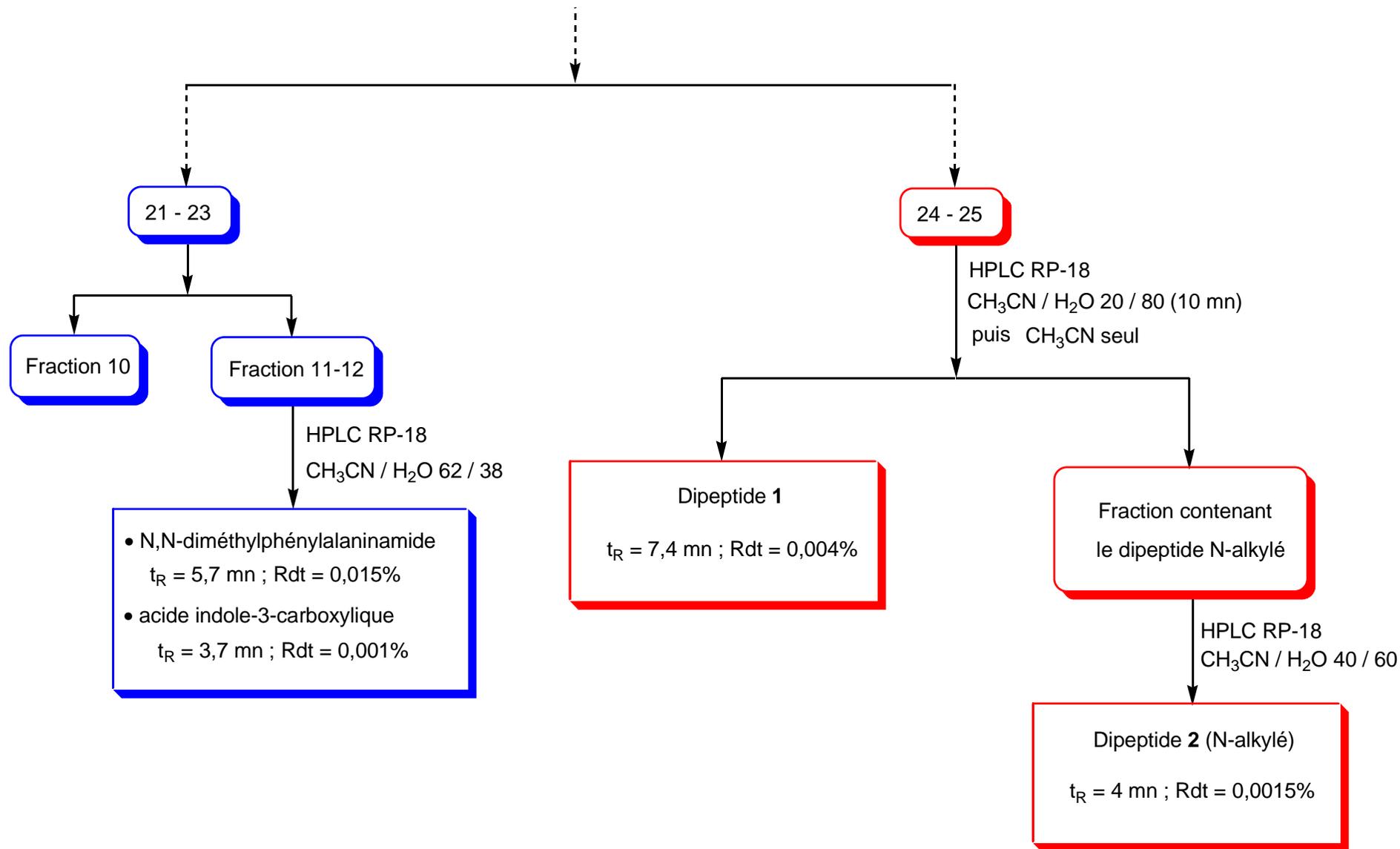


Figure 5: Diagramme d'isolement des métabolites secondaires



*Suite du diagramme*

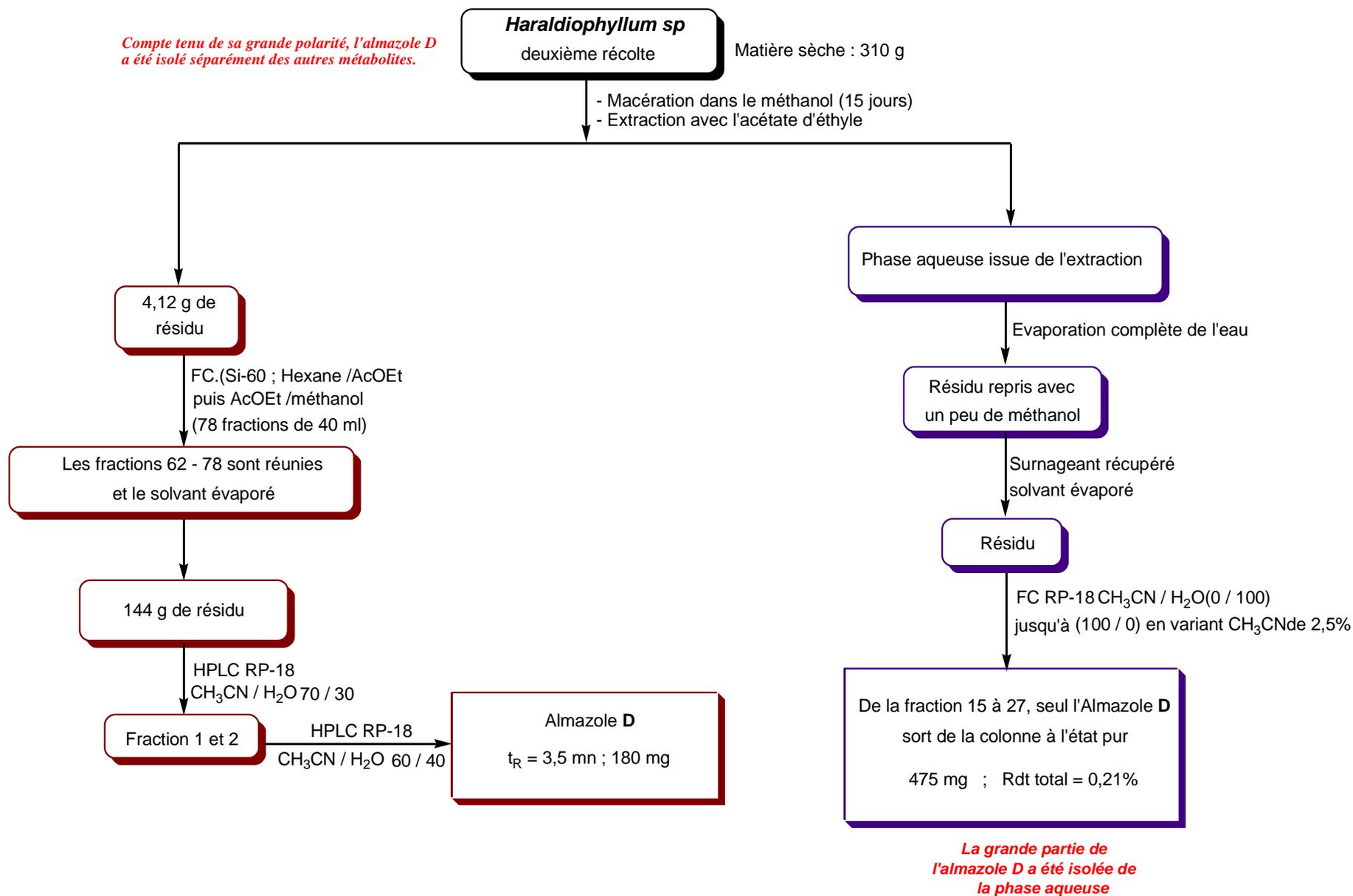
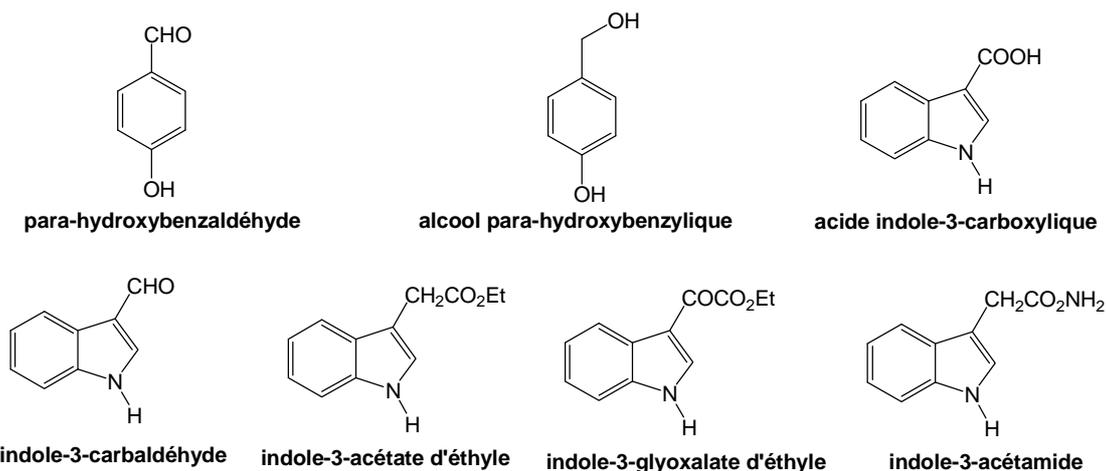


Figure 6 : Diagramme d'isolement de l'Almazole D

## I.2 METABOLITES SECONDAIRES IDENTIFIES

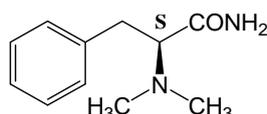
Cette algue présente un panorama chimique riche et varié avec des molécules aromatiques simples, des alcaloïdes originaux et de nouveaux dipeptides (schémas 7-10). I. NDIAYE a démontré la parenté biogénétique de ces molécules [14].

◆ Molécules benzéniques et indoliques simples mais biogénétiquement associées à la formation des almazoles et dipeptides.



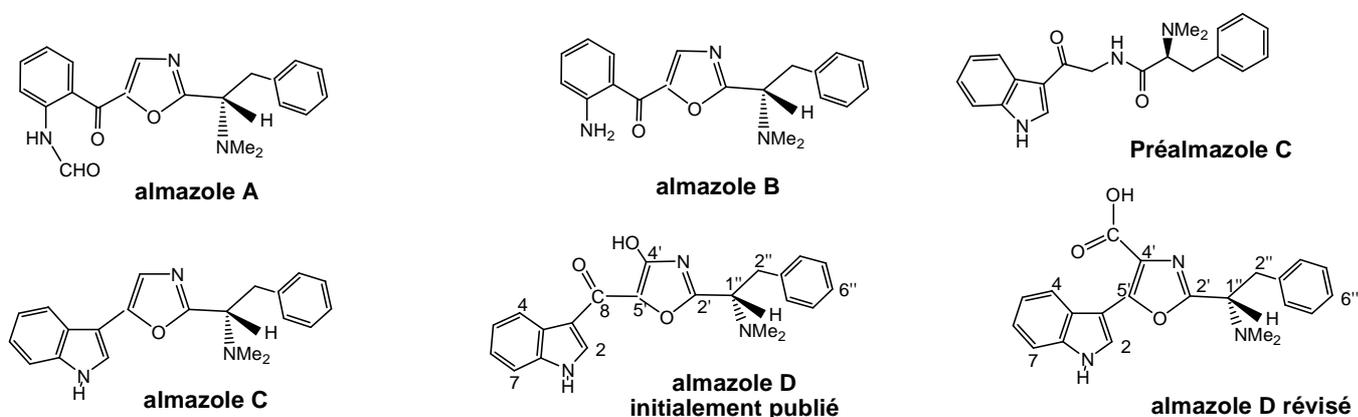
### Schéma 7

◆ La N,N-diméthylphénylalaninamide : Cette molécule est biogénétiquement liée au fragment N,N-diméthylphénylalanine des almazoles et dipeptides.



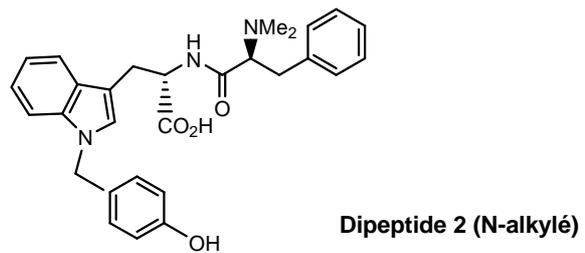
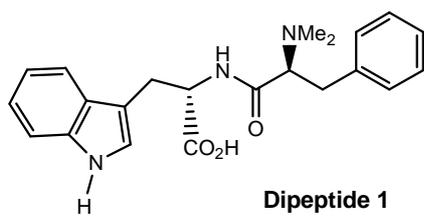
### Schéma 8

◆ Almazoles A-D et préalmazole C



### Schéma 9

◆ Deux dipeptides



**Schéma 10**

## CHAPITRE II

### ETUDE DES PROPRIETES FLUORESCENTES ET PHOTOCIMIQUES DES ALMAZOLES C ET D

#### II.1. PREPARATION DES SOLUTIONS MERES

a) **almazole D**  $C_{22}H_{21}N_2O_3$   $M = 375 \text{g.mol}^{-1}$

Pour trouver la densité de l'almazole D, nous avons divisé la masse de 100  $\mu\text{l}$  du produit par la masse du même volume d'eau. Ce qui nous donne  $d = 0,78$

Préparation des solutions mères :

Nous avons le rapport  $C = \frac{m\tau}{MV} = \frac{\rho\tau}{MV} = \frac{1000d\tau}{M} \times \frac{v}{V} \Rightarrow v = \frac{CMV}{1000d\tau}$

On fixe la concentration C de la solution à préparer et on note V le volume de cette solution.

Exemple :

Pour  $V = 50 \text{ml}$ , on a  $v = \frac{375 \times 50 \cdot 10^{-3}}{1000 \times 0,78 \times 1} \times C$

|                              |
|------------------------------|
| $v = 24,038 \cdot 10^{-3} C$ |
|------------------------------|

où  $V$  est le volume du produit ( almazole D ) à prélever et C est la concentration de la solution finale désirée.

Si  $C = 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$ ,  $v = 24,038 \mu\text{L}$  avec  $V = 50 \text{ml}$

b) **almazole C**  $C_{21}H_{21}N_3O$   $M = 331 \text{g.mol}^{-1}$

Le travail avec l'almazole C repris dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment nous permet d'avoir ces résultats:

$d = 0,73$   $v = 22,67 \cdot 10^{-3} C$  pour  $V = 50 \text{ml}$

Si  $C = 10^{-3} \text{mol/L}$ ,  $v = 22,67 \mu\text{L}$

## II.2 RECHERCHE DES LONGUEURS D'ONDE D'EXCITATION ET D'EMISSION

### II.2.1 Spectres d'excitation et d'émission de l'almazole D

Nous avons préparé 50 ml de solution, de concentration  $C=10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ .

#### a) Spectre d'excitation

Le spectre d'excitation (figure 7) est obtenu en fixant la longueur d'onde d'émission et en faisant varier la longueur d'onde d'excitation. En effet, le spectre d'excitation (obtenu avec un spectrofluorimètre) n'est pas toujours identique au spectre d'absorption (obtenu avec un spectrophotomètre) de la molécule à cause des artefacts instrumentaux (différences de paramètres entre ces appareils). Le spectre d'absorption permet toutefois une bonne approximation de la longueur d'onde d'excitation.

L'intensité d'émission est proportionnelle à l'amplitude du spectre d'excitation de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation.

Il faut par ailleurs noter que l'excitation du fluorophore à plusieurs longueurs d'onde ne change pas le profil de l'émission mais entraîne des variations de l'intensité de fluorescence qui correspond à l'amplitude du spectre d'excitation.

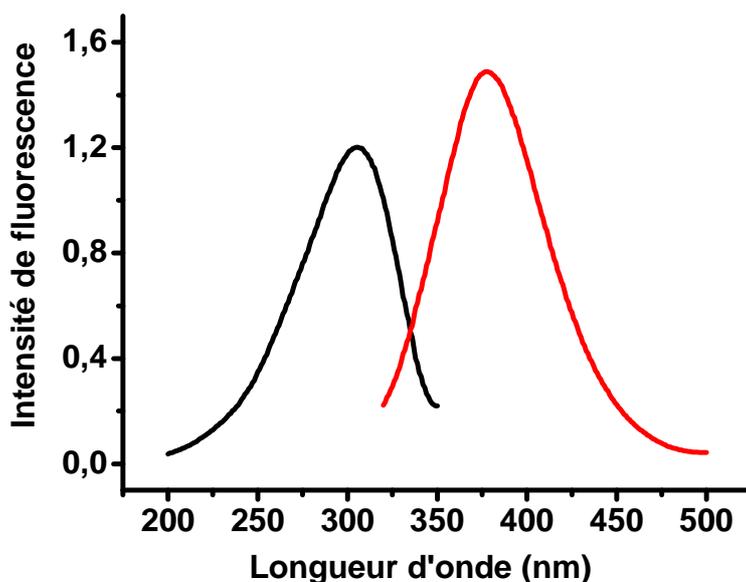


Figure 7 : Spectre d'excitation et d'émission de l'almazole D ( $10^{-5}M$ ) dans l'éthanol.

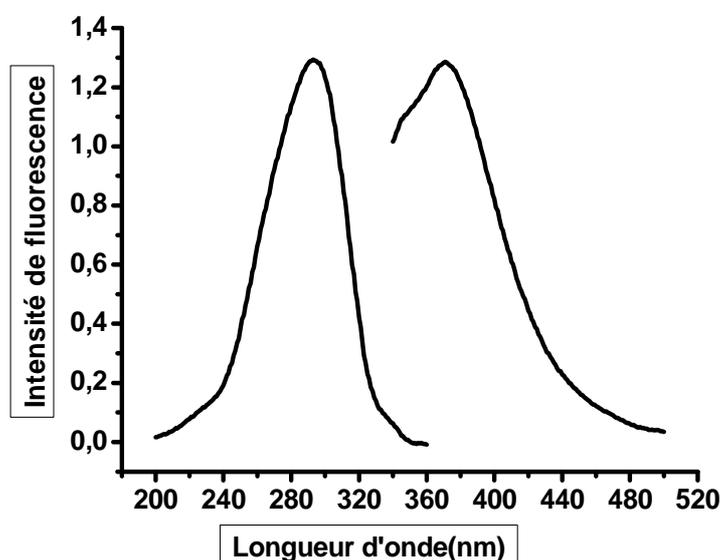
En fixant la longueur d'onde d'émission à 378 nm, le balayage pour l'excitation entre 200 et 360 nm nous révèle un pic intense à 306 nm (figure 7). En excitant à 306 nm, la bande d'émission est toujours la même à 378 nm.

En fixant la longueur d'onde d'excitation à 306 nm, le balayage entre 320 et 500nm pour l'émission met en évidence un pic intense à 378 nm (figure 7).

Les longueurs d'ondes suivantes sont finalement retenues comme longueurs d'ondes analytiques :  $\lambda_{ex} = 306 \text{ nm}$  et  $\lambda_{em} = 378 \text{ nm}$ .

### II.2.2 Spectres d'excitation et d'émission de l'almazole C

Nous avons préparé 50 ml de solution  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .



**Figure 8 : Spectres d'excitation et d'émission de l'almazole C ( $10^{-5}M$ ) dans l'éthanol**

En reprenant cette étude avec l'almazole C dans les mêmes conditions expérimentales, les longueurs d'ondes analytiques suivantes ont été finalement retenues :

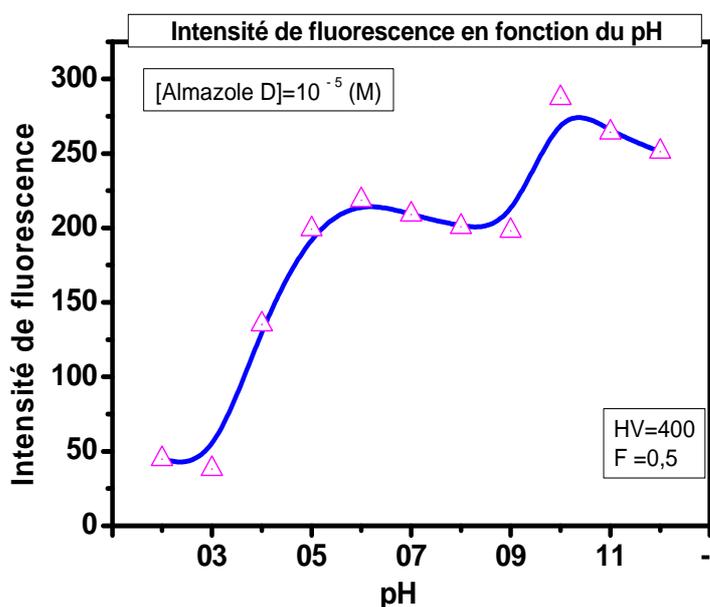
$\lambda_{excitation} = 293 \text{ nm}$  et  $\lambda_{émission} = 370 \text{ nm}$  (figure 8).

### II.3 OPTIMISATION DES PARAMETRES ANALYTIQUES

Le solvant, le pH, la structure et la concentration ont des effets non négligeables sur le signal de fluorescence. Ainsi avant toute étude analytique la prise en compte de tous ces facteurs est nécessaire [16-18].

- **Influence de la structure** : la planéité et la rigidité sont favorables à la fluorescence ; les composés insaturés comportant un système conjugué d'électrons  $\pi$  délocalisés sont en général fluorescents, contrairement aux molécules saturées qui subissent une predissociation dans l'UV lointain. Les groupements électro donneurs (-OH,  $\text{CH}_3\text{O}$ -,  $-\text{NH}_2$ , etc) tendent à exalter le signal de fluorescence, tandis que les groupes électro attracteurs ( $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{X}$ , etc) provoquent une extinction plus ou moins importante du signal.
- **Influence du solvant** : il exerce un effet sur l'intensité et la longueur d'onde de l'émission de fluorescence ; ainsi, les solvants polaires (alcools et esters) provoquent généralement une exaltation de la fluorescence contrairement aux solvants apolaires. De même, l'intensité de fluorescence change selon qu'on est en milieu acide ou basique (effet du pH).[19-20]

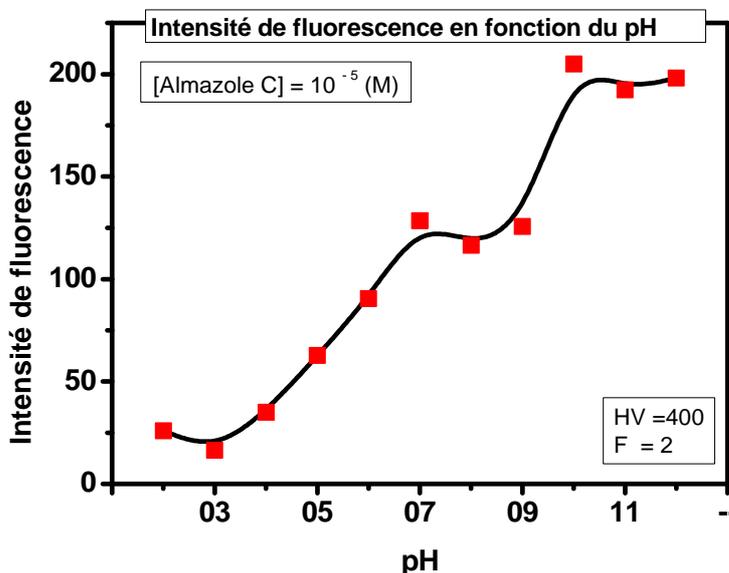
### II.3.1 Effet du pH sur l'almazole D



**Figure 9 : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazole D en fonction du pH de la solution.**

Le pH est un facteur qui affecte l'intensité de fluorescence. Ainsi en étudiant la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH on constate comme le montre la figure 9 que l'intensité de fluorescence est plus importante à  $\text{pH} = 10$ , donc en milieu alcalin.

### II.3.2 Effet du pH sur l'almazole C



**Figure 10 : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazole C en fonction du pH de la solution**

En reprenant l'étude avec l'almazole C dans les mêmes conditions nous remarquons que l'intensité de fluorescence est plus importante quand le pH = 10 donc toujours en milieu alcalin (figure 10).

Ces résultats expérimentaux nous permettent de conclure que ces deux molécules sont beaucoup plus fluorescentes en milieu basique, par conséquent toutes les études ultérieures faites sur ces molécules le seront en milieu basique.

### II.2.3 Effet du solvant

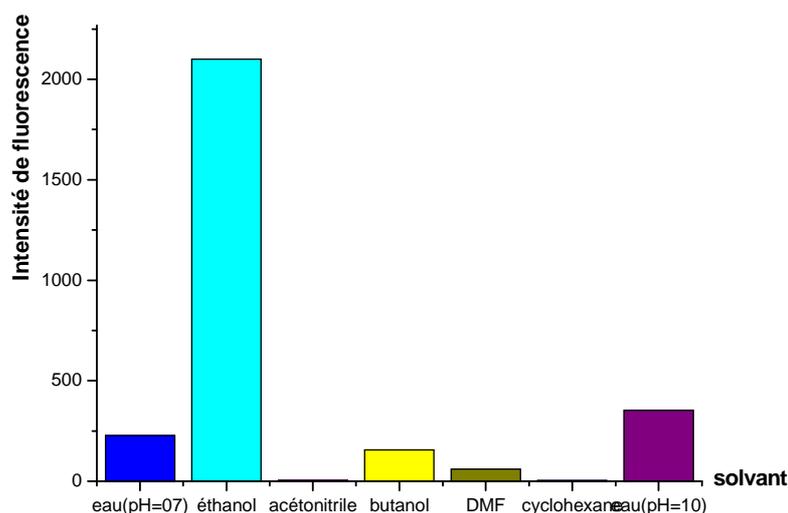
Dans cette partie, nous allons étudier l'effet du solvant sur l'intensité de fluorescence en relation avec son caractère protique ou aprotique mais aussi en fonction de sa polarité.

#### a) Effet du solvant sur l'almazole D

L'enregistrement de l'intensité de fluorescence de l'almazole D dans différents solvants conduit au tableau 1 ci dessous. Pour mieux visualiser l'impact du solvant sur l'intensité de fluorescence, nous l'avons représenté sous forme d'histogramme montrant nettement l'influence du solvant sur la fluorescence.

**Tableau 1 : Paramètres analytiques de fluorescence de l'almazole D ( $10^{-5}M$ ) dans différents solvants**

| Solvant            | $\lambda_{ex}(nm)^a$ | $\lambda_{em}(nm)^a$ | $\epsilon(25^{\circ}C)^b$ | $I_{cor}^c$ |
|--------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-------------|
| Eau (pH=07)        | 304                  | 378                  | 78,4                      | 236         |
| <b>Ethanol</b>     | 304                  | 378                  | 24,5                      | <b>2100</b> |
| Acétonitrile       | 320                  | 375                  | 37,5                      | 6           |
| butanol            | 358                  | 383                  | 17,5                      | 157         |
| DMF                | 317                  | 370                  | 37                        | 62          |
| Cyclohexane        | 328                  | 306                  | 2,02                      | 4           |
| <b>Eau (pH=10)</b> | 310                  | 363                  | 78,4                      | <b>354</b>  |



<sup>a</sup> Longueurs d'ondes analytiques d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ )

<sup>b</sup> Constantes diélectriques des solvants à 25°C.

<sup>c</sup> Intensité de fluorescence corrigée par rapport au signal du solvant.

**Figure 11 : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazole D en fonction du solvant**

Ces résultats expérimentaux montrent que l'intensité de fluorescence est grande avec les solvants protiques tandis qu'elle est faible en milieux aprotiques. La polarité du solvant n'a aucun effet sur l'émission de fluorescence de l'almazole D puisque l'éthanol possède la plus grande intensité malgré sa constante diélectrique relativement moyenne (tableau 1).

*b) Effet du solvant sur l'almazone C*

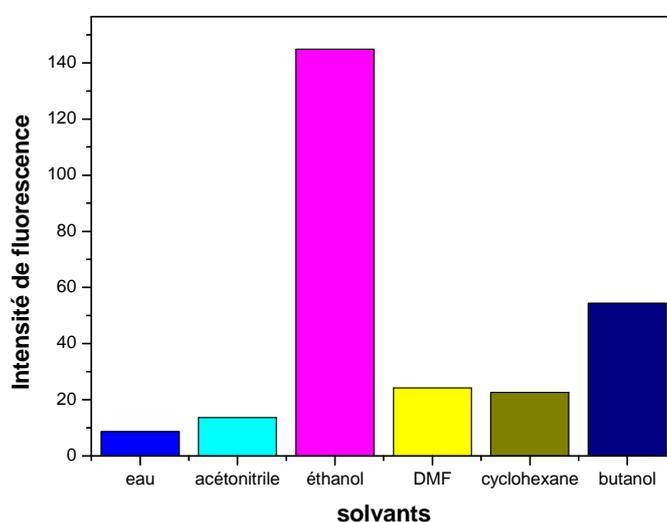
**Tableau 2 : Paramètres analytiques de fluorescence de l'almazone C (10-5M) dans différents solvants**

| Solvant        | $\lambda_{ex}(nm)^a$ | $\lambda_{em}(nm)^a$ | $\epsilon(25^\circ C)^b$ | $I_{cor}$    |
|----------------|----------------------|----------------------|--------------------------|--------------|
| Eau (pH=07)    | 291                  | 397                  | 78,4                     | 5,4          |
| Eau (pH=10)    | 287                  | 363                  | 78,4                     | 8,6          |
| <b>Ethanol</b> | 284                  | 292                  | 24,5                     | <b>144,8</b> |
| Butanol        | 290                  | 326                  | 17,5                     | 54,4         |
| Acétonitrile   | 282                  | 332                  | 37,5                     | 13,6         |
| Cyclohexane    | 288                  | 329                  | 2,02                     | 6,9          |
| <b>DMF</b>     | <b>296</b>           | <b>333</b>           | <b>37,0</b>              | <b>24,2</b>  |

<sup>a</sup> Longueurs d'ondes analytiques d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ )

<sup>b</sup> Constantes diélectriques des solvants à 25°C.

<sup>c</sup> Intensité de fluorescence corrigée par rapport au signal du solvant.



**Figure 12 : Variation de l'intensité de fluorescence de l'almazone C en fonction du solvant**

Comme le montrent les données du tableau 2, l'intensité de fluorescence est plus importante quand l'éthanol est utilisé comme solvant. Cette expérience vient

confirmer les résultats obtenus avec l'almazole D montrant effectivement que le caractère protique du solvant favorise une grande fluorescence.

D'autre part, nous observons aussi un important déplacement bathochrome à la fois des bandes d'excitation (de 13 à 68 nm) lorsqu'on passe de l'almazole C à l'almazole D. Une exception est le cas du cyclohexane pour lequel l'effet inverse (d'environ 20 nm) a lieu pour la longueur d'onde d'émission. L'almazole D est donc plus fluorescent que l'almazole C et l'éthanol semble être pour les deux composés le milieu idéal pour l'étude de la fluorescence.

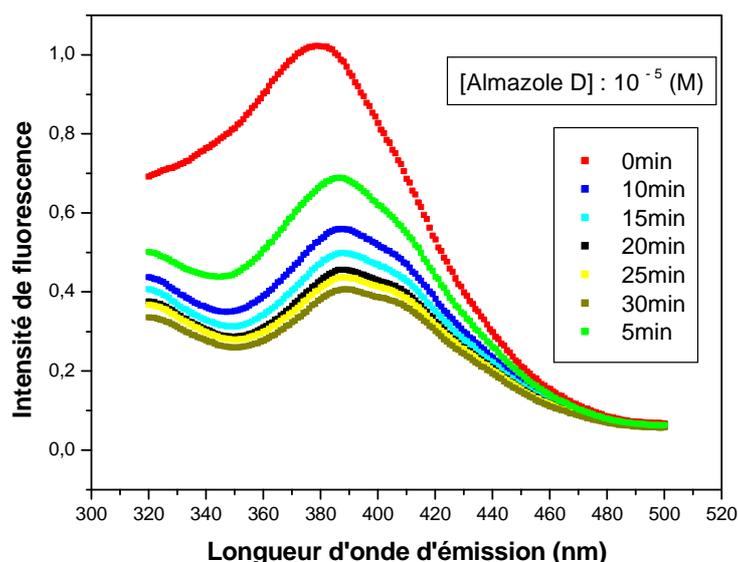
## **II.4 IRRADIATION DE L'ALMAZOLE D**

Dans ce paragraphe, nous nous proposons d'irradier le fluorophore dans le but d'étudier sa stabilité vis-à-vis de la lumière UV-Visible. A cet effet, nous utilisons un réacteur photochimique incluant une source de lumière équipée d'une lampe au mercure d'une puissance de 200W.

Les réactions de photolyse ont été effectuées en irradiant la solution placée dans la cuve avec la lampe pendant un temps donné et à des intervalles de 5 min. L'influence de la photolyse UV a été suivie en enregistrant les courbes d'intensité de fluorescence ( $I_F$ ) en fonction du temps d'irradiation UV ( $t_{irr}$ ). Toutes les études de photolyse ont été réalisées à température ambiante. Aucun dispositif de refroidissement n'était nécessaire car il n'y a pas eu de chaleur produite pendant l'irradiation. Toutes les mesures de fluorescence ont été corrigées en tenant compte du signal du solvant et réalisées dans les mêmes conditions de voltage (HV=400) et de sensibilité (facteur=1).

### ***II.4.1 Analyse des résultats de l'irradiation***

L'influence de la lumière UV sur le signal de fluorescence de l'almazole D a été suivie aux longueurs d'ondes analytiques d'excitation et d'émission dans l'éthanol.



**Figure 13 : Evolution du spectre d'émission de l'alazole D (dans l'éthanol) avec le temps d'irradiation**

Lorsque l'alazole D est irradié, le signal de fluorescence décroît progressivement avec l'augmentation du temps d'irradiation et se stabilise autour de 37% de la valeur initiale au bout de 30 min d'irradiation (figure 13). Ce signal de fluorescence résiduel trop élevé est dû à la formation d'un photoproduit fluorescent émettant à une longueur d'onde plus courte ( $\lambda_{\text{ém}}=292$  nm) par rapport à l'alazole D, et chevauchant la longueur d'onde analytique d'émission initiale de l'alcaloïde irradié.

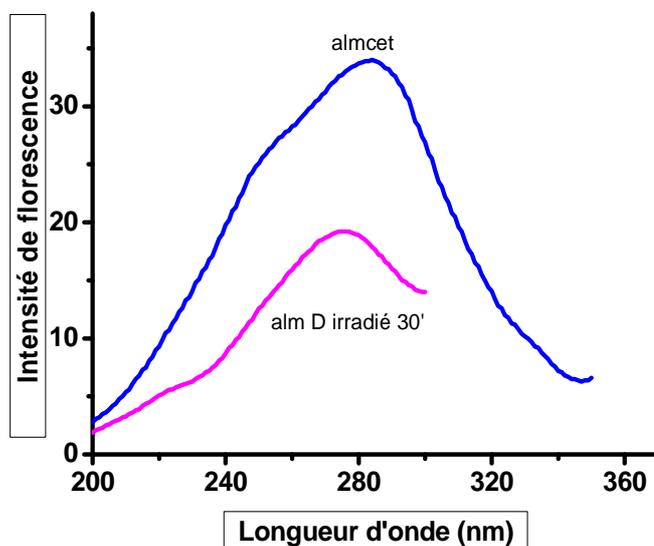
Par ailleurs, après 25 min d'irradiation de l'alazole D, nous avons étudié la stabilité des photoproduits à court et moyen terme. Nous observons aussi bien dans l'éthanol que dans l'eau une stabilité remarquable de ces photoproduits parce que l'étude cinétique montre une intensité de fluorescence constante au fil du temps.

#### **II.4.2 Conversion photochimique de l'alazole D en alazole C et révision de la structure de l'alazole D**

Après avoir irradié l'alazole D pendant 30 min, nous constatons un chevauchement avec une similitude de forme entre les spectres de l'alazole D irradié et celui de l'alazole C non irradié (figure 14).

Compte tenu du fait que les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont caractéristiques de chaque composé, on peut soutenir l'idée selon laquelle

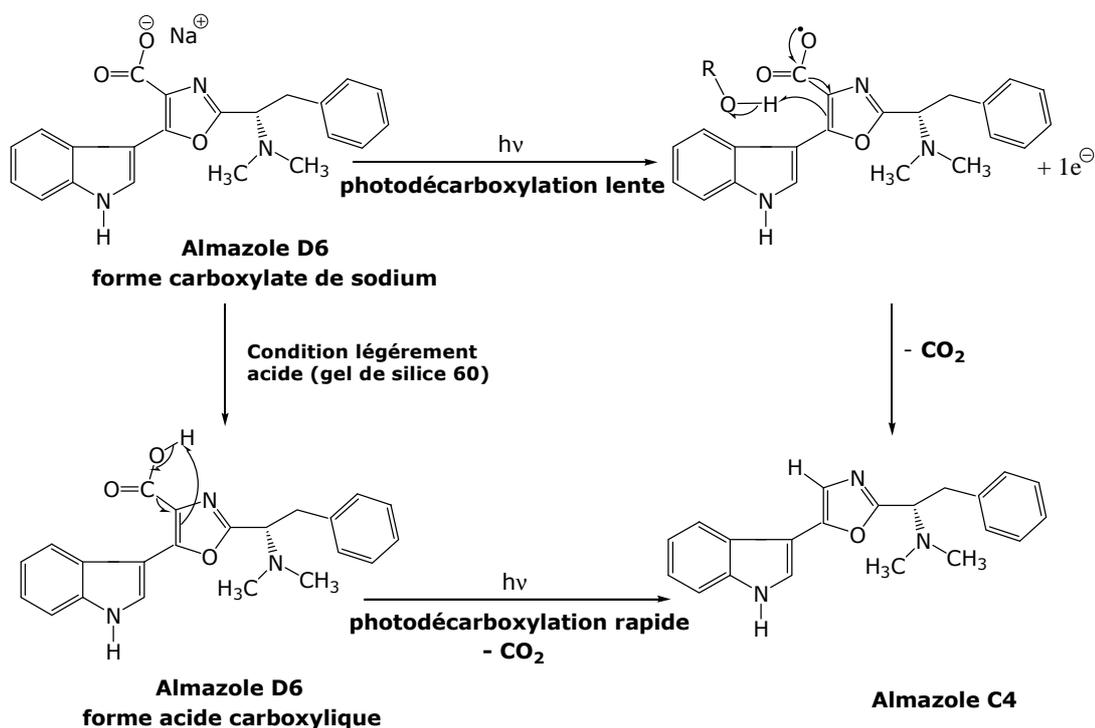
l'almazole D s'est converti photochimiquement en almazole C par décarboxylation.



*Figure 14 : Spectre de l'almazole D irradié (30 min dans l'éthanol ) superposé à celui de l'almazole C non irradié*

Cette décarboxylation suggère la présence d'un groupement carboxylate sur le carbone C4' de l'oxazole et l'absence de carbonyle entre l'indole et l'oxazole comme précédemment décrit [5]. Cette conversion confirme donc la nouvelle structure révisée de l'almazole D proposée par Tonsiengson et coll [21, 22]. Par ailleurs, nous avons pu noter que lors de son extraction, l'almazole D naturel était sous forme de carboxylate de sodium [4,5], ce qui s'est manifesté par une très grande solubilité dans l'eau car la totalité de l'almazole D naturel présent dans l'algue a été isolée à partir de la phase aqueuse issue de la partition eau/ acétate d'éthyle.

Ensuite, lors d'une tentative de purification de l'almazole D naturel, la fonction carboxylate s'est transformée en groupe acide carboxylique, ce qui s'est produit après l'avoir déposé sur une petite colonne remplie de gel de silice 60, puis élué avec du méthanol. Nous avons ainsi pu noter que la forme naturelle était plus résistante à la photodégradation dans les mêmes conditions d'irradiation (figure 15).

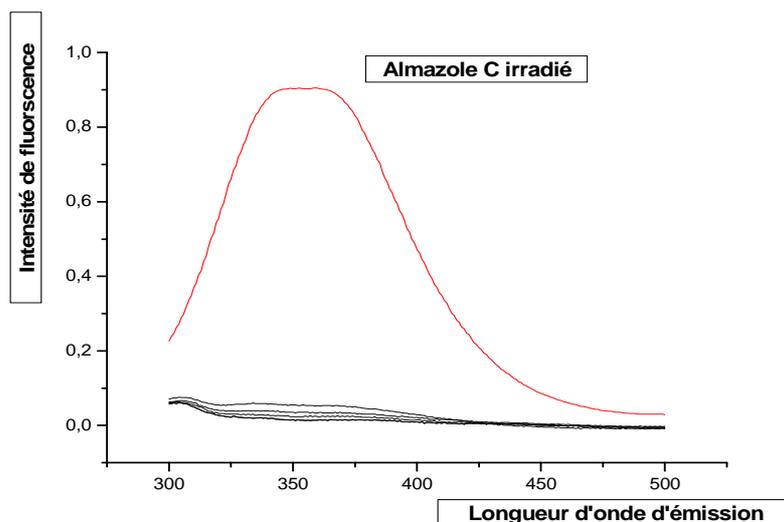


*Figure 15 : Mécanisme de décarboxylation de l'almazole D en almazole C.*

## II.5 IRRADIATION DE L'ALMAZOLE C

### II.5.1 Analyse des résultats de l'irradiation

Lorsque l'almazole C est soumis aux irradiations UV-Vis, nous observons dans les deux cas (éthanol et eau) une diminution drastique du signal de fluorescence avec le temps d'irradiation indiquant une photo décomposition relativement rapide de cet alcaloïde (figure 16).

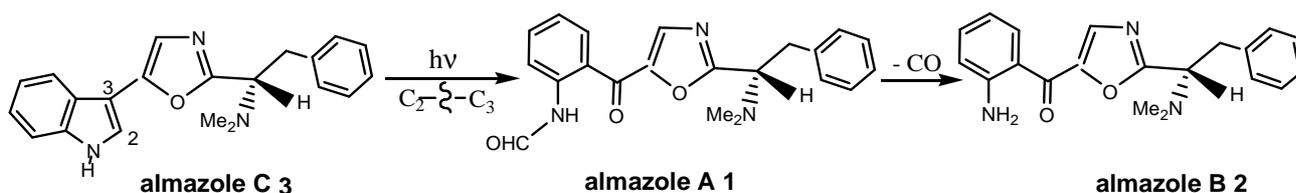


**Figure 16: Evolution du spectre d'émission de l'almazone C (dans l'éthanol) avec le temps d'irradiation.**

En effet, après un temps d'irradiation de 5 min, il ne reste plus que 6% environ de l'intensité de fluorescence de l'almazone C. En outre, ce signal de fluorescence résiduel continue de décroître lentement avec l'augmentation du temps d'irradiation. Aucune formation de photoproduits fluorescents n'a été observée puisqu'aucun changement dans le spectre d'émission ne s'est produit lors de l'irradiation.

La sensibilité de l'almazone C à la lumière est en accord avec l'isolement à partir du même échantillon d'algue des almazoles A et B [13].

En effet, l'almazone A qui est le précurseur de l'almazone B par déformylation [13] peut lui-même être issu d'une coupure oxydative de la liaison C2-C3 de l'indole après de longues expositions de l'algue aux rayons solaires (figure 17) [17]. On rappelle que l'algue vit sur les rochers entre 0,3 m et 1,2 m de la surface de l'eau. Elle est donc exposée en permanence aux rayons solaires.



**Figure 17 : Schéma de biogénèse de l'almazone A et B à partir de l'almazone C**

### ***II.5.2 Proposition d'un nouveau schéma de biogénèse des almazoles A, B, C, D et de leurs précurseurs***

Les résultats de l'irradiation des almazoles D et C montrent très clairement l'influence de l'irradiation solaire dans la biogénèse des almazoles A, B, C et D.

En effet, partant du L-tryptophane, on peut envisager deux possibles voies biogénétiques aboutissant à la biogénèse de l'almazole C (figure 18).

**Voie 1 :** Le L-tryptophane subit une oxydation au niveau du carbone 3 conduisant au 3-oxotryptophane. Celui-ci se condense en formant une liaison peptidique avec la N,N-diméthylphénylalanine dont la forme amide a été isolée de cette algue. Le couplage entre ces deux molécules conduit à un intermédiaire qu'on pourrait appeler "préalmazone D", non isolé de cette algue. Ce dernier subit une cyclisation après déshydratation pour donner l'almazole D qui est le métabolite largement majoritaire de cette algue.

Sous l'effet du rayonnement solaire auquel l'algue est exposée en permanence, l'almazole D peut subir une décarboxylation photochimique conduisant à l'almazole C.

**Voie 2 :** Le L-tryptophane subit une décarboxylation conduisant au tryptamine. Celui-ci sera oxydé au niveau du carbone 2. Le 2-oxotryptamine ainsi obtenu va se coupler avec la N,N-diméthylphénylalanine pour conduire au préalmazole C isolé de cette algue. Le préalmazole C subit ensuite une cyclisation après déshydratation pour donner l'almazole C.

La forte sensibilité à la lumière de l'almazole C, démontrée dans le présent travail, peut expliquer la rupture oxydative de la liaison C2-C3 de l'indole de l'almazole, ce qui a conduit à la formation de l'almazole A. Ce dernier subit une déformylation qui le transforme en almazole B.

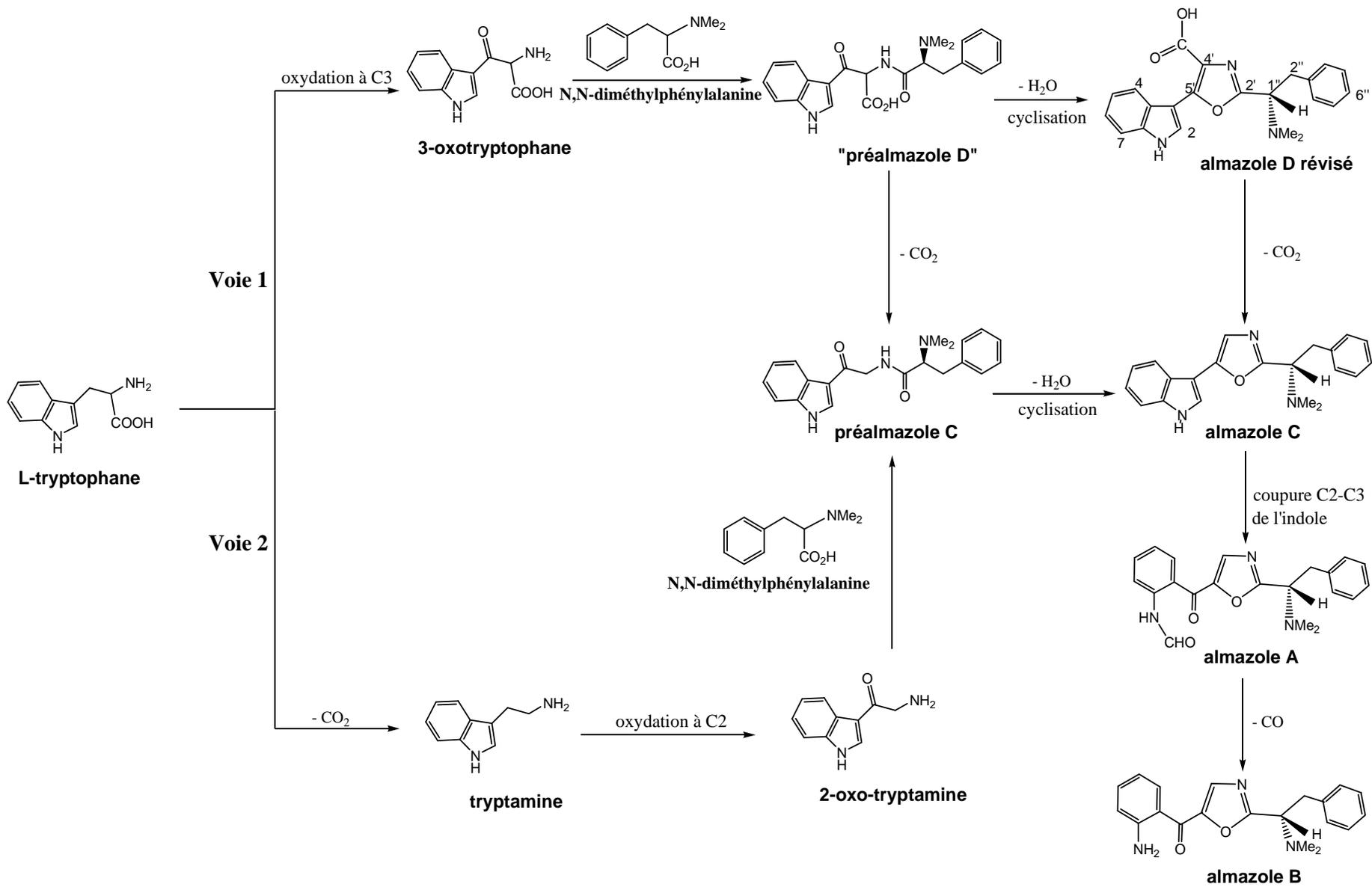


Figure 18: Nouveau schéma de biogénèse des almazoles et de leurs précurseurs

En dernière analyse, nous pouvons dire que la voie 2 où on observe l'isolement du préalmazole C, potentiel précurseur de l'almazone C, semble être possible. Cependant, la voie 1 est tout à fait possible voire même prioritaire sur la voie 2 pour trois raisons :

- L'obtention de l'almazone D portant une fonction carboxylique n'est possible uniquement que par la voie 1. Ainsi, la biogénèse du squelette carboné de l'almazone D ne peut s'expliquer que par cette voie.

- La transformation photochimique de l'almazone D en almazone C observée dans le présent travail.

- L'intermédiaire non isolé, le préalmazole D, peut conduire directement à l'almazone D après cyclisation, ou se transformer par décarboxylation en préalmazole C, isolé de l'algue et précurseur potentiel de l'almazone C.

## **II.6 Lois cinétiques et constantes de vitesse des réactions de photolyse des almazoles**

La vitesse de la réaction de photolyse est particulièrement rapide pour l'almazone C, par suite d'une chute brutale du signal de fluorescence durant les cinq premières minutes d'irradiation (figure 16). Cette photo réaction pourrait obéir à une cinétique apparente du premier ordre seulement pour les temps d'irradiation très courts

( $\leq 5$  min). En revanche, la vitesse de photolyse est beaucoup plus lente dans le cas de l'almazone D (figure 16) pour lequel des relations linéaires satisfaisantes (tableau 3) ont été obtenues pour les courbes cinétiques de photolyse.

En effet, nous avons utilisé deux types d'équations pour traiter ces courbes afin d'en fixer les paramètres temps de demi-réaction ( $t_{1/2}$ ) et la constante de vitesse de réaction ( $k$ ).

Ces équations sont respectivement :

- Pour une réaction d'ordre 1

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = kt \quad \text{et} \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} ;$$

- Pour une réaction d'ordre 2

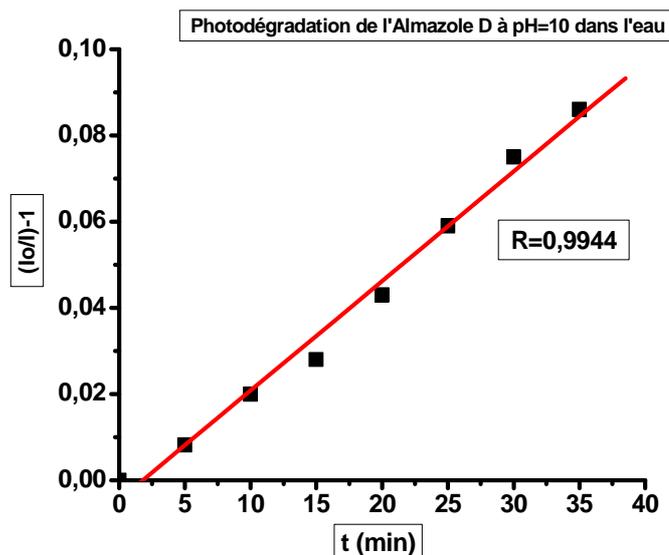
$$\frac{I_0}{I} = 1 + k[A]_0 t \quad \text{et} \quad t_{1/2} = \frac{1}{k[A]_0}$$

Dans ces relations,  $I_0$  et  $I$  représentent l'intensité de fluorescence à  $t=0$  et  $t > 0$ ,  $[A]_0$  la concentration initiale de l'almazone étudié. Pour ces deux équations, la précision du tracé a été évaluée par l'intermédiaire des valeurs en coefficient de corrélation ( $r$ ). L'équation cinétique ayant donné le meilleur alignement des points (c'est-à-dire  $r$  proche de l'unité) a été considérée comme la bonne, et les valeurs de  $k$  expérimentales ont été déterminées à partir de l'équation sélectionnée (tableau 3). La cinétique de photolyse dépend du solvant utilisé : elle est de premier ordre dans l'éthanol ( $t_{1/2} = 28,4$  min figure 19) tandis que dans une solution aqueuse (pH= 11), une cinétique du deuxième ordre est observée ( $t_{1/2} = 4,2$  min , figure 20).

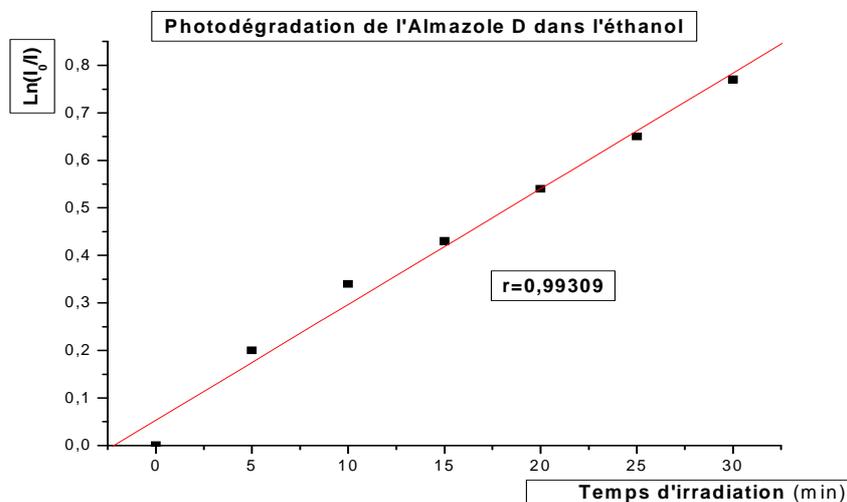
La cinétique du deuxième ordre dans l'eau montre que l'almazone D pourrait être persistant et majoritaire sous un environnement ensoleillé. Cela est confirmé par l'expérience qui indique que l'almazone D est de loin le métabolite secondaire majoritaire de l'algue *Haraldiophyllum* sp [5].

**Tableau 3 Paramètres cinétiques de la photodégradation de l'almazone D ( $10^{-5}$ M) dans différents solvants**

| Solvant   | $t_{1/2}$ (min) | $r^2$  | $K(\text{min}^{-1} \text{ ou } \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$ | ordre |
|-----------|-----------------|--------|--|-------|
| Ethanol   | 28,3            | 0,9852 | $(2,45 \pm 0,12) 10^{-2}$  | 1     |
| Eau pH=10 | 4,2             | 0,9905 | $(23,74 \pm 0,82) 10^3$  | 2     |



**Figure 19:** Variation  $\left(\frac{I_0}{I} - 1\right)$  en fonction du temps d'irradiation de l'almazole D ( $10^{-5}M$ ) dans une solution aqueuse pH=10



**Figure 20 :** Courbe de variation  $\text{Ln}(I_0/I) = f(t)$  de l'almazole D ( $10^{-5}M$ ) dans l'éthanol

## II.7 Procédure de détermination des almazoles en analyse chimique

Il est établi que l'almazole D est un composé bioactif avec une forte activité antibactérienne. Son utilisation probable en médecine nous amène à proposer ci-

après une précieuse méthode analytique pour la détermination de l'almazole D et l'un de ses produits de dégradation (almazole C) dans des échantillons biologiques (urine, sang ou sérum). A cette fin, nous avons établi les droites d'étalonnage dans deux milieux, l'eau (pH=10) et l'éthanol.

Des courbes de calibration linéaire ont été obtenues (figure 21 et 22) à partir desquelles nous avons déterminé les paramètres analytiques tels que les domaines de linéarité (DL), les coefficients de corrélation ( $r^2$ ), les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ainsi que la déviation standard relative (DSR) (tableau 4).

- La précision sur les droites est satisfaisante comme le montrent les coefficients de corrélation ( $r^2$ ) supérieurs à 0,99 ;
- Le domaine de linéarité (DL) est large puisqu'il s'étend sur environ deux ordres de grandeur en concentrations ;
- Les limites de détection sont relativement basses, variant de 7 à 56ng/ mL selon le solvant et le composé ;
- La déviation standard relative reste inférieure à 4,9% ce qui témoigne d'une bonne reproductibilité pour nos mesures.

Dans le but de vérifier l'applicabilité de la méthode analytique proposée à des échantillons réels, ces deux alcaloïdes ont été déterminés dans des échantillons d'urines fortifiées. Une procédure d'extraction liquide-liquide a permis d'obtenir des taux de récupération pour l'almazole D d'environ 57% et 64% respectivement dans le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Ce pourcentage est faible ce qui laisse supposer qu'une procédure d'extraction plus sophistiquée est nécessaire pour les échantillons de sang ou de sérum.

### ***2.7.1 Calibration de l'almazole D dans l'éthanol et dans l'eau***

Après avoir préparé la solution  $C=10^{-5}M$  en quantité suffisante, on remplit la cuve de 2,5ml en faisant varier le volume de produit à y ajouter de 50 $\mu$ L à 1600 $\mu$ L que l'on complète avec le solvant. C'est ainsi qu'on a pu obtenir le tableau suivant.

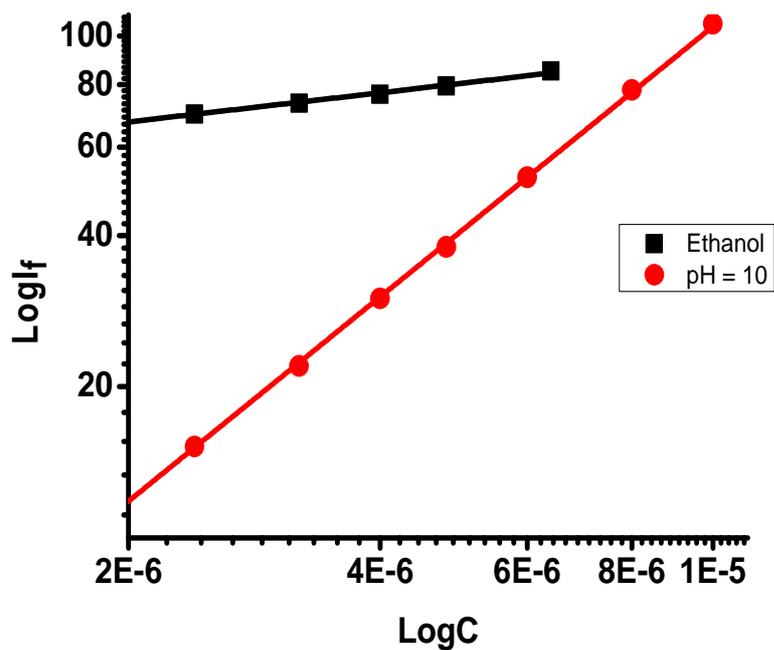


Figure 21: Courbe de calibration de l'almazole D dans l'éthanol et dans l'eau à pH=10

II-7-2 Calibration de l'almazole C dans l'éthanol et dans l'eau

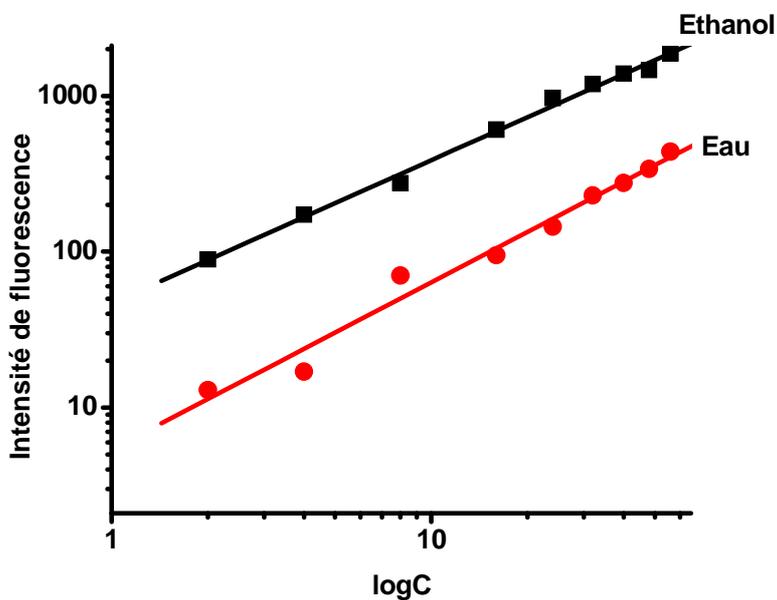


Figure 22 : Courbe de calibration de l'almazole C dans l'éthanol et dans l'eau à pH=10.

**Tableau 4: Paramètres analytiques des droites de calibration des almazoles**

**D et C**

| Composé           | Solvant | Domaine de linéarité (ng/mL) | (p - o) <sup>a</sup> | r <sup>2</sup> <sup>b</sup> | LD <sup>c</sup> (ng/mL) | LQ <sup>c</sup> (ng/mL) | DSR <sup>d</sup> (%) | Taux de récupération <sup>e</sup> (%) |
|-------------------|---------|------------------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| Almazole <b>D</b> | éthanol | 75-2400                      | (0,19314-2,92923)    | 0.9959                      | 7                       | 10                      | 1,5                  | 57 (chloroform)                       |
|                   | eau     | 75-3000                      | (1,34762-8,75461)    | 0.9999                      | 56                      | 136                     | 4,9                  | 64 (ethyl acetate)                    |
| Almazole <b>C</b> | éthanol | 66-2000                      | (0,93433-7,19785)    | 0.9915                      | 13                      | 48                      | 1,3                  | -                                     |
|                   | eau     | 66-2000                      | (1,20777-7,97075)    | 0.9929                      | 36                      | 97                      | 0,5                  | -                                     |

<sup>a</sup> pente et ordonnée à l'origine de la droite de calibration log-log.

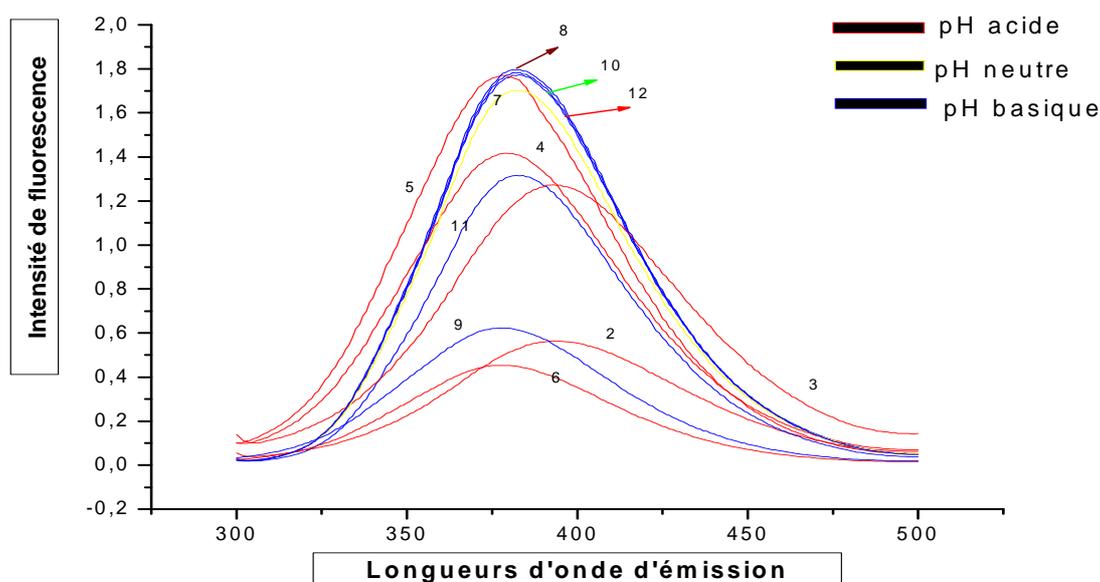
<sup>b</sup> Coefficient de corrélation;

<sup>c</sup> Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) comme étant la concentration de l'almazole qui correspond à un rapport signal/bruit égal à respectivement 3 et 10;

<sup>d</sup> Déviation standard relative (n = 6).

<sup>e</sup> Taux de récupération des alcaloïdes, ajoutés dans l'urine.

## II.8 DEPLACEMENTS DES LONGUEURS D'ONDE EN FONCTION DE LA VARIATION DU pH



**Figure 23: Déplacement des longueurs d'onde en fonction du pH de l'almazole**

**D**

L'objet de cette étude est de voir la sensibilité de la fonction carboxylate présente dans la molécule. L'enregistrement du spectre d'émission révèle le déplacement en milieu acide des longueurs d'onde, ce qui n'est pas le cas en milieu basique. Cette sensibilité de la fonction carboxylate présente dans la molécule d'almazone D, confirme ainsi une possible décarboxylation de la fonction carboxylate sous l'effet de la lumière conduisant à l'almazone C .

## CONCLUSION

Les deux almazoles C et D étant naturellement fluorescents, nous avons dans ce travail commencé par déterminer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission qui sont caractéristiques de chaque produit. L'optimisation des conditions analytiques a permis d'étudier la variation de la fluorescence en fonction du pH, du solvant, puis en fonction de la concentration, ce qui a permis de tracer les droites de calibration dont les valeurs des coefficients de corrélation justifient la fiabilité de notre méthode de dosage.

L'étude de la photodégradation des produits par irradiation révèle la stabilité de l'almazole D vis-à-vis de la lumière.

Par ailleurs, ce travail a permis de constater la transformation photochimique de l'almazole D en almazole C. Ceci nous a conduit à confirmer la révision de la structure de l'almazole D [23]. La sensibilité photochimique de ces deux composés est en accord avec la nature des métabolites secondaires isolés de cette algue. Ainsi, on peut envisager qu'après la biosynthèse de l'almazole D comme métabolite majoritaire, l'irradiation solaire peut transformer l'almazole D en almazole C par décarboxylation. Cependant, l'isolement du préalmazole C, précurseur biogénétique potentiel de l'almazole C, laisse supposer que l'almazole C peut être issu d'une voie biogénétique différente de celle de l'almazole D [5]. La sensibilité de l'almazole C à la lumière a permis également de confirmer que la coupure oxydative du pyrrole peut être faite après irradiation solaire, conduisant ainsi à l'almazole A puis B.

## **TROISIEME PARTIE**

### **ISOLEMENT, IDENTIFICATION PUIS ETUDE DES PROPRIETES FLUORESCENTES ET PHOTOCHEMIQUES D'UN NAPHTOPYRANONE**

#### **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE GUIERA SENEGALENSIS**

#### **CHAPITRE II : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU NAPHTOPYRANONE DE GUIERA SENEGALENSIS**

#### **CHAPITRE III : ETUDE ANALYTIQUE DU NAPHTOPYRANONE PAR FLUORESCENCE : EFFET DE L'IRRADIATION UV**

## INTRODUCTION

Les études déjà faites sur *le Guiera senegalensis* ont montré son importance sur le plan physiologique et son intérêt thérapeutique [24].

Bien que les propriétés thérapeutiques des extraits de *Guiera senegalensis* soient bien étudiées, les métabolites secondaires ou les biomolécules d'une manière générale n'ont pas fait l'objet d'études approfondies sur le plan biologique ou spectrofluorimétrique.

Etant donné que la molécule à étudier, isolée à partir de cette plante présente une fluorescence naturelle, et vu l'importance de la fluorescence sur le plan structural et médical, nous avons jugé opportun de faire une étude approfondie sur cette molécule.

# CHAPITRE I

## GENERALITES SUR LE GUIERA SENEGALENSIS

### I.1 DEFINITION ET DESCRIPTION BOTANIQUE

Plus connu sous le nom vernaculaire de Nguer en wolof, le *G. senegalensis* appartient à la famille des combrétacées. C'est un arbuste de 1 à 2 m de haut, rarement 3 m, à écorce grise aux rameaux duveteux et ayant les caractéristiques suivantes :

- Feuilles gris-vert, solitaires ou opposées, ovales à ovales allongées, de 2,5 à 6 cm sur 1,5 à 3,5 cm, sommet arrondi ou en mucron, base arrondie ou cordée, duveteuses sur les deux faces et criblées de glandes noires dessous, nervures latérales fines.
- Inflorescences en têtes globuleuses, jaune verdâtre, enfermées d'abord dans un involucre de bractées qui se séparent ensuite en 4 segments, portées par de courts pédoncules auxiliaires.
- Calice à 5 lobes criblés de points noirs, corolle de 5 pétales, et 10 étamines filiformes.
- Fruits allongés, de 3,5 cm de longueur, longuement velus argenté rose, rayonnant à plusieurs du bout d'un pédoncule commun, comme les pattes velues d'une araignée.

### I.2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET ADAPTABILITE

En Afrique, on trouve le guiera senegalensis au Sénégal, en Gambie, au Mali, au Niger et au Burkina Faso. Il est présent dans tout le Sénégal, des régions du fleuve jusqu'à la limite de la forêt bissao-guinéenne en Casamance maritime, et est très commun dans le Sahel où il forme des peuplements monospécifiques. Il envahit la plupart des jachères aux sols légers, mais existe aussi dans les limons des vallées passagèrement inondées (affluents de la Gambie). C'est une plante qui

stationne sur les sols lessivés, en jachères, formant dans le sous-bois des fourrées gris-vert comme de la mauvaise herbe. On le retrouve la plupart du temps sur les sols sableux, dans des endroits très secs, indiquant le surpâturage.

### **I.3 ETUDE CHIMIQUE, PHARMACOLOGIQUE ET TOXICOLOGIQUE**

Des essais préliminaires sur des échantillons du Burkina Faso ont montré que les tiges feuillées contenaient des traces d'alcaloïdes, des tanins, des catéchines, un principe aphrogène non hémolytique au 1/200 [24-26].

L'étude chimique dans ses grandes lignes, a été reprise en 1968, par Koumaré sur des échantillons de racines et de feuilles en provenance du Mali [27]. Les racines et feuilles sèches contiennent respectivement 6,8 et 8,6 % d'eau, 2,4% de cendres. Les cendres sont pauvres en métaux alcalins mais riches en alcalino-terreux. On trouve surtout Mg, Ca, Sr, Ti, Fe, Al et en quantités moindres, parfois à l'état de traces : Cu, Ni, Co, Zn. Il a mis en évidence des mucilages, des tanins galliques et catéchiques des flavonoïdes, des aminoacides et des alcaloïdes. Les acides aminés sont arginine, leucine, tyrosine, la lysine se trouvant en outre dans les feuilles.

Par la suite, Koumaré et coll. [28] ont obtenu 0,20% d'alcaloïdes bruts à partir des racines et 0,15% à partir des feuilles. Mais la chromatographie a montré qu'il y'en avait qu'un seul dans les feuilles et dans les racines.

En ce qui concerne la toxicité, Paris, lors des essais signalés ci-dessus, a constaté que l'infusion de tiges feuillées au 1/200 tue les paramécies en 30 min et entraîne dans le même temps la perte d'activité des Ides mélanotes. Chez la souris il n'est pas toxique par voie sous-cutanée à la dose de 10 g par Kg d'animal.

Koumaré dans sa thèse rend compte des résultats de sa large étude sur le *G. senegalensis* [27] :

- Au point de vue toxicité les extraits aqueux se révèlent dans l'ensemble peu toxiques, l'extrait de feuilles étant légèrement plus actif que l'extrait de racines chez des cobayes comme le lapin, le chien et moins actif chez la souris, le rat.

- L'embryotoxicité chez les rates est nulle par voie enterale et assez élevée par voie intra péritonéale ; chez la lapine, l'embryotoxicité s'affirme très précocement et avec intensité par voie intraveineuse. Il n'a pas été révélé de pouvoir tératogène à l'égard des espèces animales éprouvées.

- Les effets pharmacodynamiques observés intéressent le système nerveux central, l'appareil gastro-intestinal et des territoires divers.

- Les effets antitussifs à l'égard de la toux provoquée chez le rat sont nets, surtout avec les extraits de feuilles, de même que les effets cardiovasculaires. Les extraits sur le ventricule isolé de *Rana temporaria* se comportent, même à grande dilution, comme des dépresseurs tandis qu'à concentration suffisante ils déterminent l'arrêt du cœur en diastole ; chez le chien choralosé ils déterminent une hypotension brutale, mais brève, par mécanisme à prédominance centrale. Après administration par voie entérale, le pouvoir hypotenseur n'apparaît pas.

- En ce qui concerne l'action anti diarrhéique, l'auteur n'a pas obtenu de résultats positifs au cours de ses essais sur l'intestin isolé de cobayes de rats, ni sur l'animal entier sain. Par contre, les résultats obtenus sur des rats parasités par *Strongyloides ratti* sont nets : aux selles diarrhéiques succèdent des selles moulées cependant que l'on observe une expulsion de parasites. Ces résultats sont à rapprocher de nos propres observations sur l'efficacité du *G.senegalensis* dans certaines diarrhées tropicales et permettent d'envisager un mécanisme d'action anti diarrhéique d'origine infectieuse.

- Koumaré signale également le pouvoir anti-inflammatoire (des extraits de feuilles, en particulier) à l'égard de l'œdème provoqué et du granulome au pellet

de coton. Il a aussi recherché le pouvoir ocytocique qui s'est montré net in vitro, mais nul in vivo aux doses thérapeutiques.

#### **I.4 UTILISATION EN MEDECINE TRADITIONNELLE**

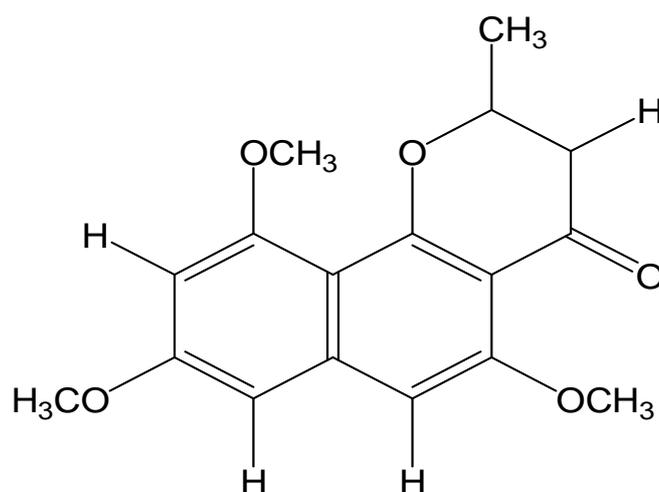
Les usages médicaux sont très nombreux : Les feuilles sont utilisées contre diverses maladies internes : lèpre (préventif), maladies dermatologiques, fortifiant ; sous forme de tisane diurétique : stomacale et antitussif ; une production artisanale de cette tisane agréable et curative mériterait une étude. Pilées avec de la bouillie de mil, des feuilles sont efficaces contre la diarrhée et stimulent la lactation. Les décoctions et les bains se prennent en cas de rhumes et de malaria.

Les racines et bois des rameaux sont utilisés pour les soins dentaires. La décoction de racines est utile contre la diarrhée, la dysenterie, etc. L'écorce a beaucoup d'usages. En science vétérinaire, on l'utilise pour régler la digestion et augmenter la lactation.

Comme insecticide, on peut noter que la fumée de branches éloigne les mouches des parcs à bestiaux. Cependant, il faut noter que certaines ethnies au Sénégal le tiennent en grand estime alors que d'autres ne lui concèdent qu'un intérêt limité voire même négligeable. On peut dire que dans les régions à forte utilisation (Cap-vert, Petite Cote, Cayor, Djolof, etc.) ces indications sont exactement les mêmes que celles du kinkéliba et on lui reconnaît principalement des propriétés béchiques, eupnéiques et fébrifuges. D'où sa prescription pour la toux, les états dyspnéiques, le paludisme, les pneumopathies, les bronchopaties. Il est d'ailleurs souvent associé à *Combretum micranthum* ou à *C. glutinosum*. Ce sont les feuilles qui sont généralement prescrites (et vendues sur les marchés) sous la forme de décocté : il y'a lieu de signaler à ce propos que chez les Diolas, grands fumeurs de pipe, la poudre de feuille est souvent mélangée au tabac dans un but thérapeutique. *G. senegalensis* est également recommandé pour le traitement des coliques et des diarrhées dysentériques (rameaux feuillés, écorces, racines) la syphilis, le bériberi, la lèpre, l'impuissance.

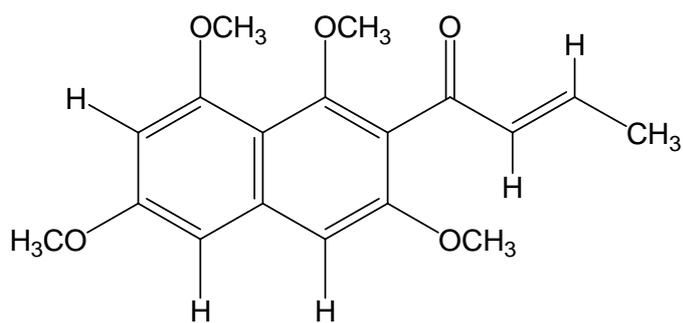
## I.5 METABOLITES SECONDAIRES ISOLES DE GUIERA SENEGALENSIS

Bien que ses propriétés thérapeutiques soient bien étudiées, les métabolites secondaires ou les biomolécules d'une manière générale de *Guiera senegalensis* n'ont pas fait l'objet d'études approfondies. Le composé ci-dessous, qui est un naphthopyranone triméthoxylé très fluorescent, a été isolé pour la première fois des feuilles de *Guiera senegalensis* du Soudan [29]

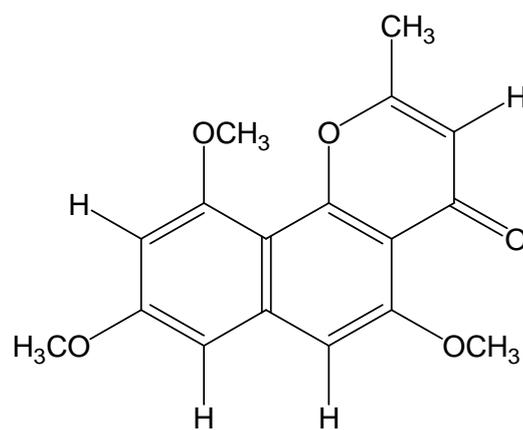


**méthyl dihydroflavaspérone**

Par la suite Silva et Coll. [6] l'ont isolé en même temps qu'un autre naphthopyranone présentant une insaturation supplémentaire entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> du cycle pyranone, d'une autre collection de *Guiera senegalensis* récoltée en Guinée Bissau. A partir de cette même collection, ces auteurs ont également isolé un naphthyl buténone tétraméthoxylé, publié sous le nom de guieranone (2E)-1-(1, 3, 6, 8-tétraméthoxy-2-naphtyl) but-2-én-1-one [6]. Il faut noter que le naphthopyranone a été identifié pour la première fois par F. Bucar et coll [7].



**naphthyl buténone ou guieranone**



**Naphtopyranone**

On signale que ce naphtopyranone très fluorescent a été isolé et identifié dans le cadre de ce travail à partir d'une collection de *Guiera senegalensis* récoltée à Taïba Ndiaye au Sénégal. C'est ce composé qui fera l'objet d'études photochimiques dans le cadre de ce présent travail.

## CHAPITRE II

### ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU NAPHTOPYRANONE DE GUIERIA SENEGALENSIS

#### II.1. Isolement

Le *Guiera senegalensis* a été récolté dans la commune de Taïba Ndiaye située dans la région de Thiès. Après séchage dans un endroit bien aéré à l'abri du soleil, les feuilles séchées (233 g) sont macérées dans le chloroforme au congélateur pendant 10 mois. Après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, on ajoute de l'eau au résidu puis on extrait avec l'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant, on récupère 1,70 g de résidu qui sera soumis à une première chromatographie sur colonne de silice (63-200  $\mu\text{m}$ ) avec gradient d'élution (fractions de 50 ml). La chromatographie démarre avec l'hexane / acétate d'éthyle (100 / 0), elle est ensuite développée en augmentant la quantité de l'acétate d'éthyle de 10% jusqu'à la fraction 15 ; les fractions 16 et 17 sont éluées avec l'acétate d'éthyle seul. De la fraction 18 à 26, on élue avec un mélange acétate d'éthyle / méthanol en faisant varier le pourcentage du méthanol de 5%. La fraction 27 est éluee avec du méthanol pur. Les différentes fractions sont ensuite analysées par CCM (Si 60). Les fractions présentant des spots similaires après observation des plaques à l'UV, sont réunies et le solvant évaporé. A partir de la fraction 22, on isole 170 mg d'un naphthopyranone qui manifeste une forte fluorescence quand on l'expose à l'UV avec la lampe à 365 nm.

Dans le but d'isoler d'autres composés, une série de chromatographie sur colonne a été développée à partir de certaines fractions issues de cette première colonne. On obtient ainsi plusieurs fractions contenant des métabolites pouvant être isolés et identifiés dans le cadre de travaux ultérieurs.

◇ Colonne 2 : La fraction 11(170 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de silice (63-200  $\mu\text{m}$ ) avec gradient d'élution (fractions de 50 ml). La chromatographie démarre avec l'hexane / acétate d'éthyle (100 / 0), elle est ensuite

développée en augmentant l'acétate d'éthyle de 5% jusqu'à la fraction 9 ; les fractions 10 à 13 sont éluées avec l'acétate d'éthyle seul. De la fraction 14 à 19, on élue avec un mélange acétate d'éthyle / méthanol en faisant varier le pourcentage du méthanol de 5%. La fraction 20 sera éluée avec un mélange 50 / 50. Les différentes fractions sont ensuite analysées par CCM (Si 60). Les fractions présentant des spots similaires après observation des plaques à l'UV, sont réunies et le solvant évaporé.

◇ Colonne 3 : Les fractions 12 et 13 (50 mg) issues de la colonne 1 sont réunies et soumises à une chromatographie sur colonne de silice (63-200  $\mu\text{m}$ ) avec gradient d'élution (fractions de 50 ml). La chromatographie démarre avec l'hexane pur, elle est ensuite développée jusqu'à la fraction 9 avec un mélange hexane / acétate d'éthyle en augmentant le pourcentage d'acétate d'éthyle de 5%. Les fractions 10 et 11 sont éluées avec l'acétate d'éthyle seul. De la fraction 12 à 15, on élue avec un mélange acétate d'éthyle / méthanol en faisant varier le pourcentage du méthanol de 10%. La fraction 16 sera éluée avec le méthanol pur. Les différentes fractions sont ensuite analysées par CCM (Si 60). Les fractions présentant des spots similaires après observation des plaques à l'UV, sont réunies et le solvant évaporé.

◇ Colonne 4 : Les fractions 7 à 9 (170 mg) issues de la colonne 1 sont réunies et le solvant évaporé. Le résidu obtenu est soumis à une chromatographie sur colonne de silice (63-200  $\mu\text{m}$ ) avec gradient d'élution (fractions de 50 ml). La chromatographie démarre avec l'hexane pur, elle est ensuite développée jusqu'à la fraction 9 avec un mélange hexane / acétate d'éthyle en augmentant le pourcentage d'acétate d'éthyle de 5%. La fraction 10 est éluée avec l'acétate d'éthyle seul. De la fraction 11 à 15, on élue avec un mélange acétate d'éthyle / méthanol en faisant varier le pourcentage du méthanol de 10% pour arriver à un mélange 50 / 50 à la fraction 15. La fraction 16 sera éluée avec le méthanol pur. Les différentes fractions sont ensuite analysées par CCM (Si 60). Les fractions présentant des spots similaires après observation des plaques sont réunies et le solvant évaporé.

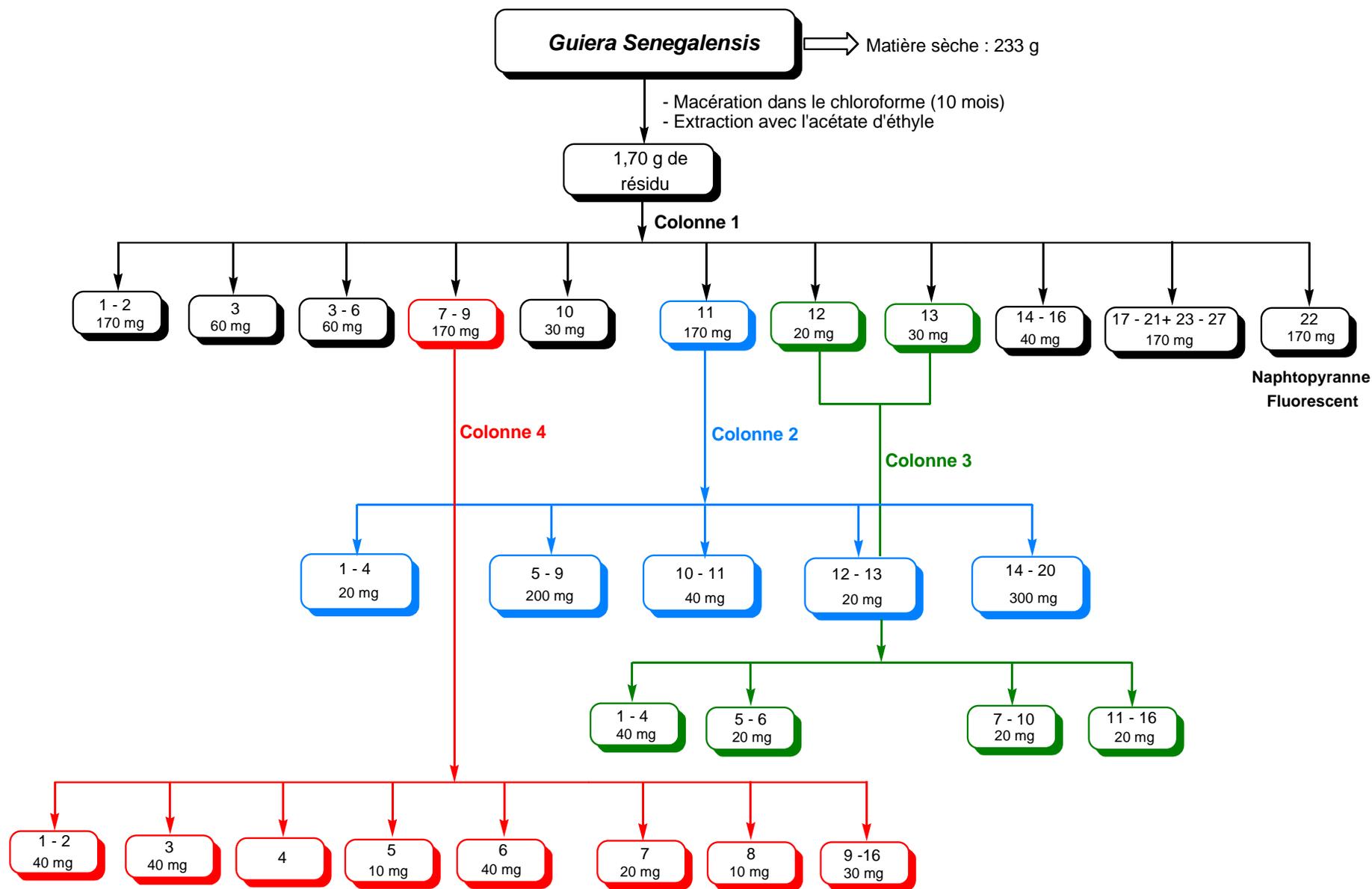


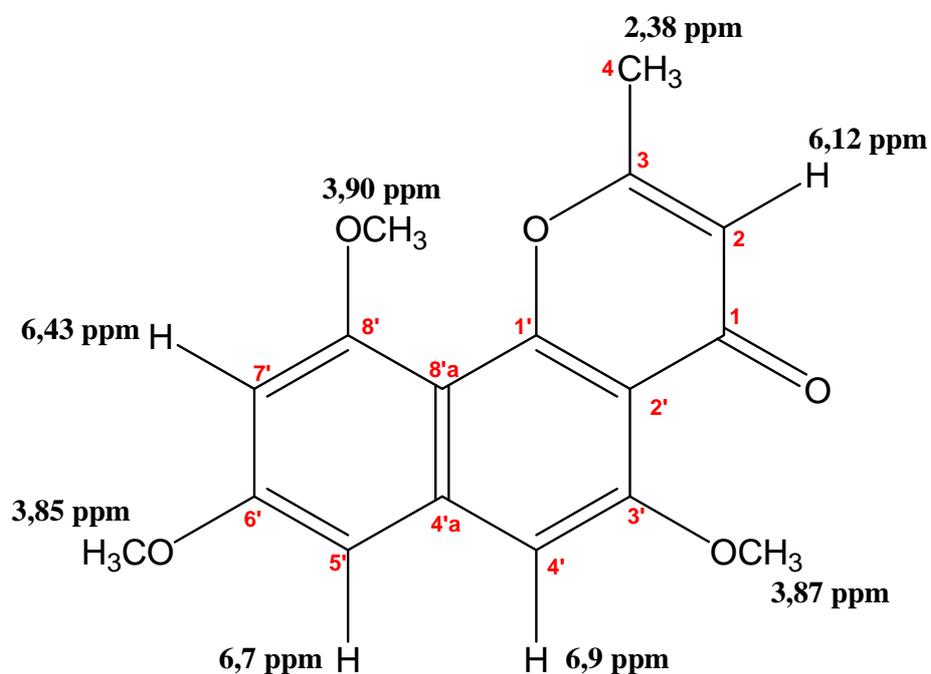
Figure 24: Diagramme d'isolement des métabolites secondaires du guiera senegalensis.

## II.2. Identification du naphtopyranone

A l'examen du spectre RMN du proton, nous remarquons la présence de signaux sous forme de singulets caractéristiques de 3 méthoxyles fixés sur des noyaux aromatiques et centrés à  $\delta = 3,85$  ppm ;  $3,87$  ppm et  $3,90$  ppm. Selon les données de la littérature [6,7]. Ces trois méthoxyles sont fixés respectivement sur les carbones C-6', C-3' et C-8'.

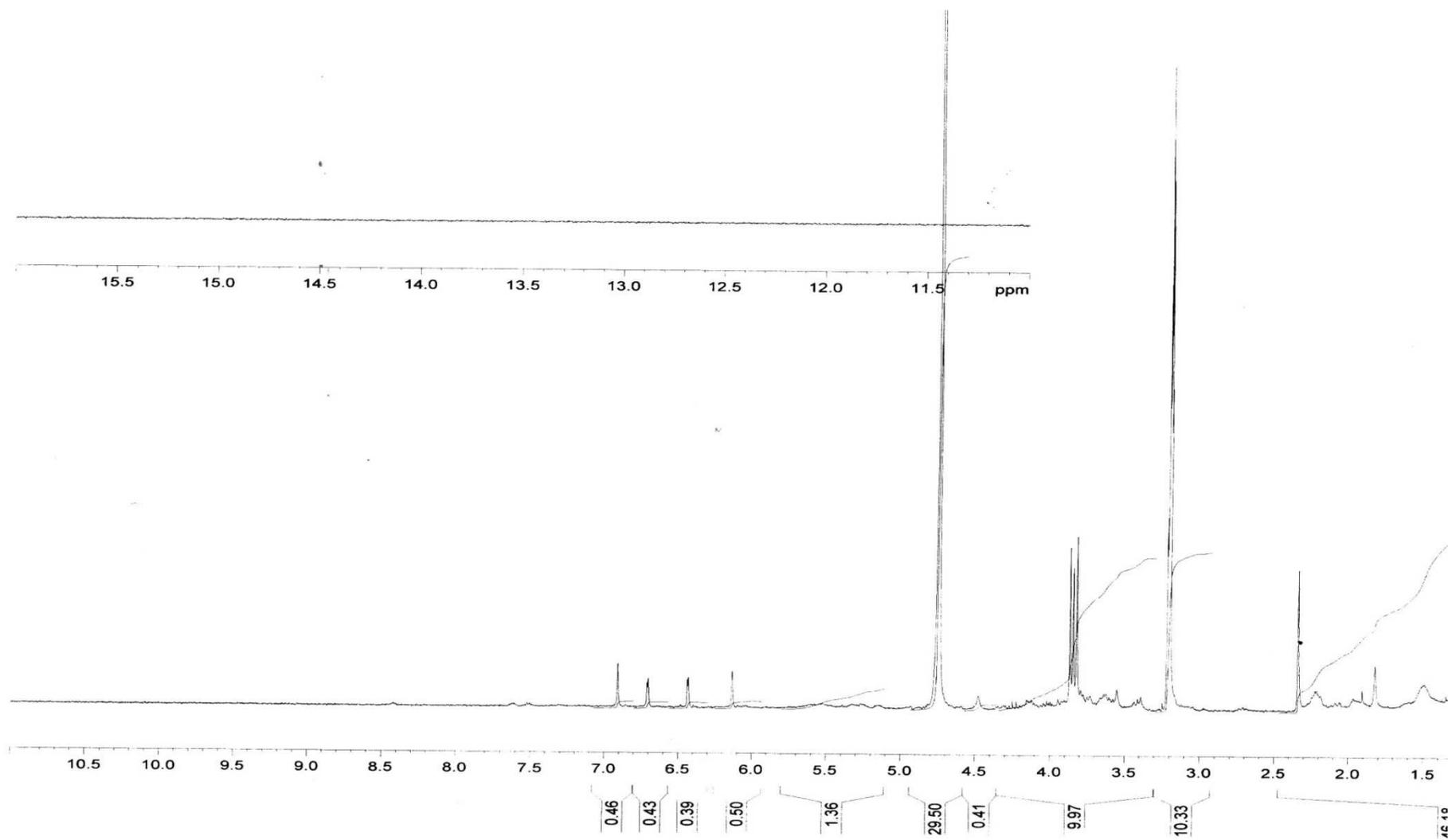
Nous observons aussi un singulet à  $2,38$  ppm caractéristique d'un méthyle fixé sur une double liaison (C-3) du cycle pyranne. Le spectre de RMN signale deux doublets à  $6,43$  ppm ( $2,2$  Hz) et  $6,7$  ppm ( $2,2$  Hz) qui correspondent à deux protons aromatiques en méta, attribuables respectivement à H-(C7') et H-(C5'). Nous observons également un singulet à  $6,9$  ppm attribuable au proton H-(C4') et un singulet à  $6,12$  ppm attribuable au proton H-(C2) du cycle pyranone.

A partir des données de la RMN et de la masse, nous pouvons établir la structure ci-dessous comme étant celle du naphtopyranone.



**Tableau 5 : Valeurs de  $\delta$  (ppm) et J(Hz) de la RMN du proton du naphtopyranone**

| <b>N° carbone</b>            | <b><math>^1\text{H}</math> <math>\delta</math> (ppm) (mult. ; J(Hz)) CD<sub>3</sub>OD</b> |
|------------------------------|---|
| <b>1</b>                     | --  |
| <b>2</b>                     | 6,12 (s)  |
| <b>3</b>                     | --  |
| <b>4</b>                     | 2,38 (s)  |
| <b>1'</b>                    | --  |
| <b>2'</b>                    | --  |
| <b>3'</b>                    | --  |
| <b>CH<sub>3</sub>O(C-3')</b> | 3,87 (s)  |
| <b>4'</b>                    | 6,9(s)  |
| <b>4'a</b>                   | --  |
| <b>5'</b>                    | 6,7 (d ; 2,2)   |
| <b>6'</b>                    | --  |
| <b>CH<sub>3</sub>O(C-6')</b> | 3,85(s)   |
| <b>7'</b>                    | 6,43 (d; 2,2)   |
| <b>8'</b>                    | --  |
| <b>CH<sub>3</sub>O(C-8')</b> | 3,90 (s)  |
| <b>8'a</b>                   | --  |



*Figure 25: Spectre RMN du proton du naphthopyranone*

## CHAPITRE III

### ETUDE ANALYTIQUE DU NAPHTOPYRANONE PAR FLUORESCENCE : EFFET DE L'IRRADIATION UV.

Bien que la chimie des naphtopyranones (préparation, propriétés et réactions) ait été largement étudiée par Merlini [30] et Schweizer [31] dans les années 1970, peu d'articles, dans la littérature, relatent leurs propriétés photochimiques. On souligne tout au plus l'aspect fluorescent de certains dérivés de naphtopyranone [29].

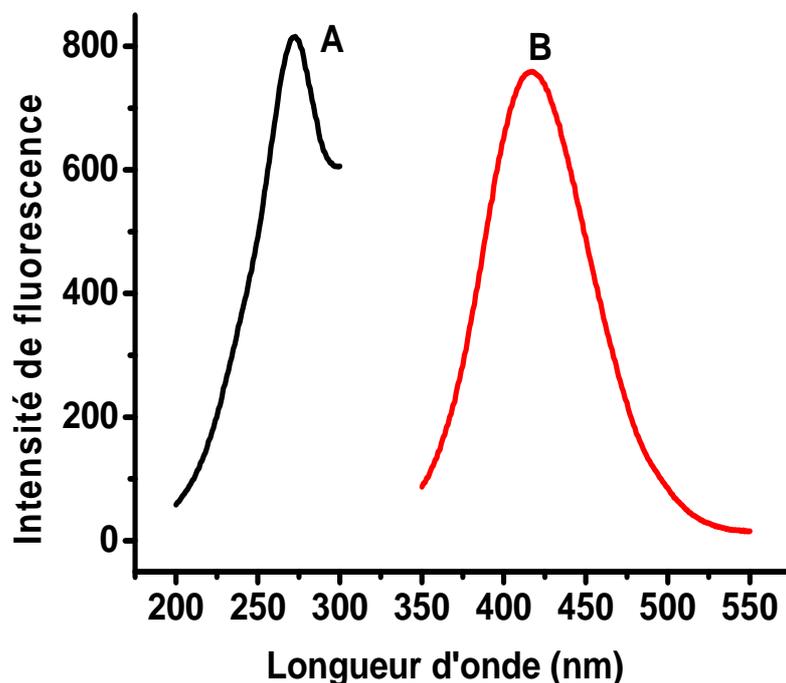
#### III.1 SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION DU NAPHTOPYRANONE

Nous présentons dans la figure 26 ci-dessous les spectres d'excitation et d'émission du naphtopyranone ( $10^{-3}\text{M}$ ) dans l'eau.

Le spectre d'excitation révèle la présence de deux pics mais il s'est avéré que le pic qui sort à 273 nm est plus intense que celui qui sort à 346 nm. Ainsi, cette longueur d'onde (273 nm) où l'intensité de fluorescence est plus intense sera retenue par la suite. L'excitation à ces deux longueurs d'onde aboutit à un même maximum de 417 nm pour le spectre d'émission.

Les longueurs d'ondes suivantes sont finalement retenues comme longueurs d'ondes analytiques :

$$\lambda_{\text{ex}} = 273 \text{ nm} \quad \text{et} \quad \lambda_{\text{em}} = 417 \text{ nm}$$

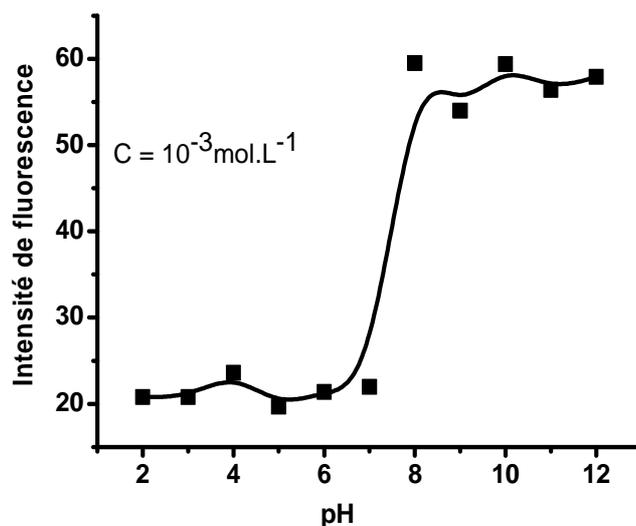


*Figure 26: spectre d'excitation et d'émission du naphtopyranone ( $10^{-3}M$ ) dans l'eau*

## III.2 OPTIMISATION DES PARAMETRES ANALYTIQUES

### III.2.1 Etude de l'effet du pH

Dans cette partie nous étudions la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH. Pour ce faire, nous utiliserons des concentrations appropriées de solutions d'acide chlorhydrique ou de soude pour faire varier la valeur du pH. La mesure du signal de fluorescence pour différentes valeurs de pH nous a permis de tracer la courbe suivante (figure 27).



**Figure 27: Effet du pH sur la l'intensité de fluorescence du naphthopyranone**

Comme le montre la figure, l'intensité de fluorescence est plus importante à pH >8 donc en milieu alcalin, où le signal est pratiquement constant sur une large gamme de pH entre 8-12. La valeur de pH=10 a été retenue comme valeur optimale.

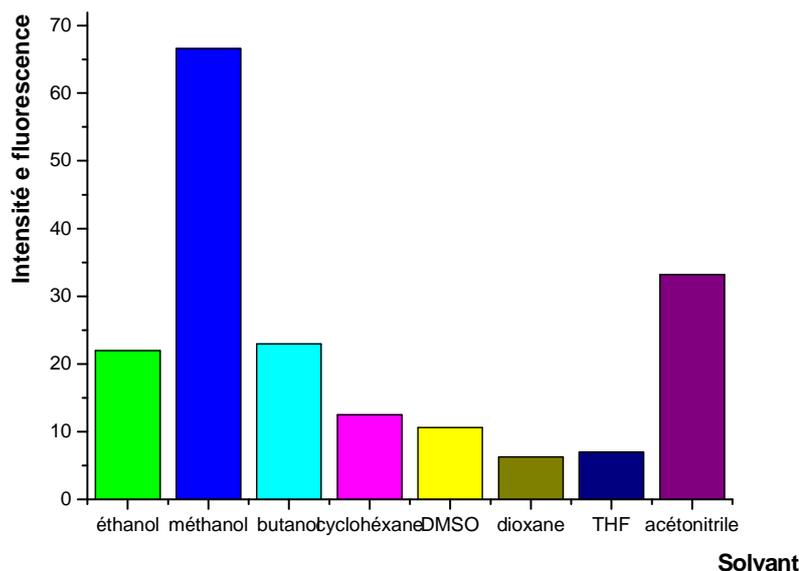
### III.2.2 Etude de l'effet du solvant

Nous avons rassemblé dans le tableau 6 les paramètres analytiques concernant l'influence de quelques solvants sur le signal de fluorescence du naphthopyranone.

**Tableau 6: variation de la fluorescence en fonction du solvant**

| Solvant      | $\lambda_{ex}$ | $\lambda_{em}$ | If   |
|--------------|----------------|----------------|------|
| méthanol     | 273            | 417            | 66,6 |
| Ethanol      | 273            | 417            | 22   |
| Acétonitrile | 273            | 417            | 33,2 |
| butanol      | 273            | 417            | 23   |
| DMSO         | 273            | 417            | 10,6 |
| Cyclohexane  | 273            | 417            | 12,5 |
| THF          | 273            | 417            | 7    |
| Dioxane      | 273            | 417            | 6,3  |

Nous remarquons qu'à l'exception du DMSO, la polarité du solvant favorise l'émission de fluorescence de ce composé. Comme dans le cas des almazoles, le méthanol semble être le milieu idéal pour l'étude des propriétés fluorimétriques de cette molécule (figure 28).

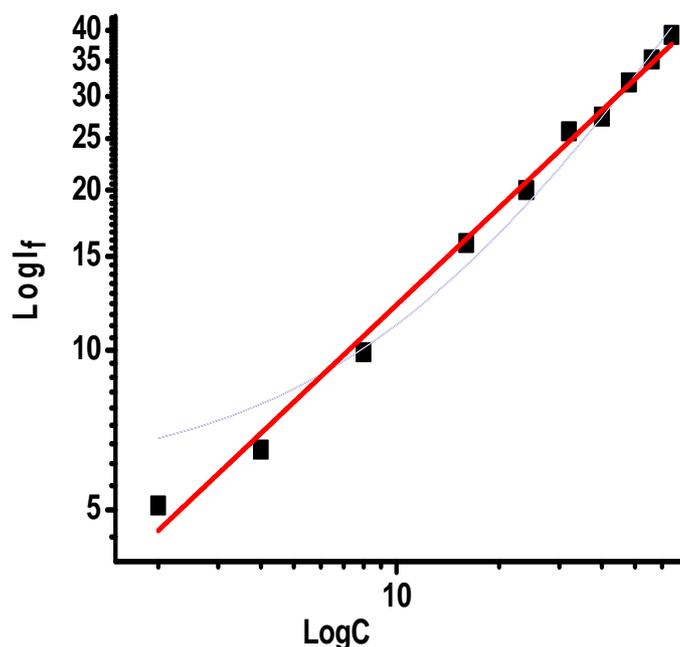


**Figure 28:** *Histogramme représentant l'effet du solvant sur le signal de fluorescence du naphthopyranone.*

### III.3 PARAMETRES ANALYTIQUES DES DROITES D'ETALONNAGE.

Après avoir optimisé les variables susceptibles d'influer sur la sensibilité de la méthode analytique proposée, nous allons établir la droite d'étalonnage à partir de laquelle nous évaluerons la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) conformément à la définition IUPAC.

La figure 29 ci-dessous permet de voir que les points expérimentaux du tracé log-log sont bien alignés comme l'atteste le coefficient de corrélation  $r^2 = 0,993$ .



*Figure 29: Courbe de calibration du naphtopyranne dans le méthanol.*

Nous avons trouvé pour la méthode analytique développée que :

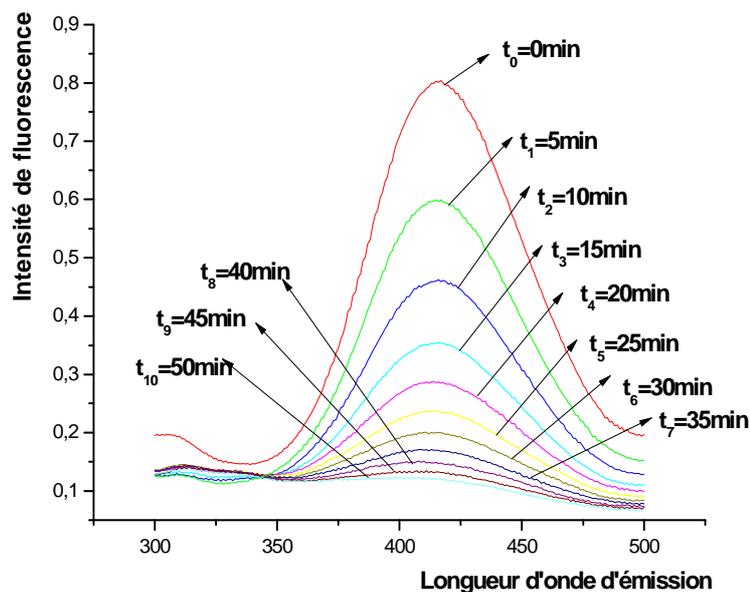
- . LD=27µg/ mL
- . LQ=250µg/ mL
- .  $r^2 = 0,993$

Nous en concluons que la méthode d'analyse est sensible mais pas assez pour rivaliser celle développée sur les almazoles.

### III.4 IRRADIATION DU NAPHTOPYRANONE

Dans ce paragraphe, nous nous proposons d'étudier l'influence des rayons UV sur l'émission de fluorescence du naphtopyranone. Cette étude va nous permettre d'évaluer le degré de stabilité vis-à-vis du rayonnement de ces molécules.

La figure 30 ci-dessous montre que le signal de fluorescence diminue progressivement avec le temps d'irradiation jusqu'à une extinction totale au bout de 50 min d'irradiation.

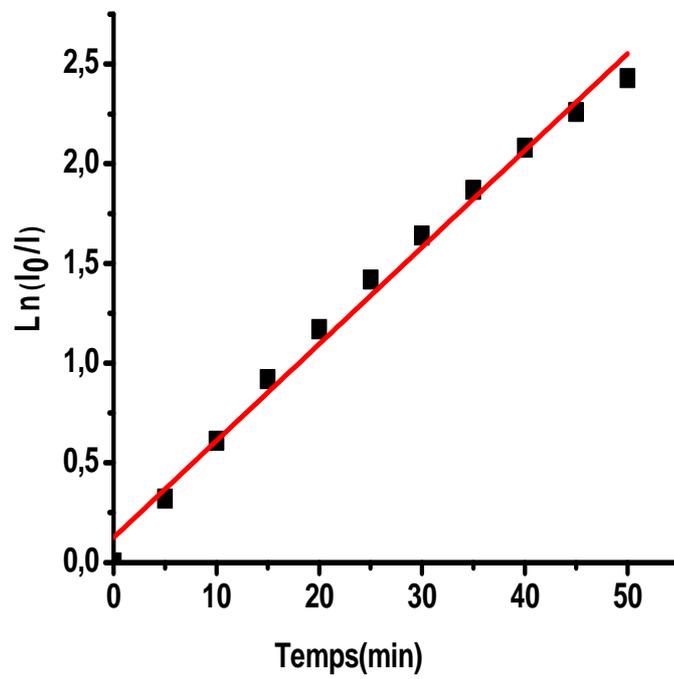


**Figure 30 : Effet de l'irradiation UV sur les spectres d'émission du naphthopyranone ( $10^{-3}M$ ) dans le méthanol.**

Cela démontre que le naphthopyranone est très sensible à la lumière. En utilisant les mêmes équations cinétiques établies pour étudier les almazoles ( Partie II, Chap II-6), nous constatons que cette molécule obéit à une cinétique de photodégradation du premier ordre dans le méthanol.

En effet, la courbe  $\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = f(t)$  est la seule équation trouvée valide (figure 31) avec un coefficient de corrélation  $r^2=0,9902$ .

La constante de vitesse  $k=4,85 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  et le temps de demi-réaction correspondant  $t_{1/2} = 14,3 \text{ min}$ . Cette photodégradation rapide nous interpelle sur le fait que ces molécules ne devraient pas être exposées lors des mesures fluorimétriques. En outre, la fluorescence apparait comme un outil efficace pour évaluer le degré de photodégradation de ces molécules dans l'environnement.



*Figure 31: Courbe de la cinétique de photodégradation du naphthopyranone ( $10^{-3}M$ ) dans le méthanol*

## CONCLUSION

Le *Guiera senegalensis* est une plante très répandue en Afrique de l'ouest et ayant des vertus thérapeutiques indéniables. Ainsi, à partir de l'extrait brut de la plante nous avons isolé puis purifié un naphthopyranone dont la structure a été déterminée à partir de méthodes spectroscopiques.

Nous avons par la suite développé une méthode d'analyse du naphthopyranone par la méthode de fluorescence. Nous avons trouvé des limites de détection relativement basses après une optimisation des paramètres analytiques. Enfin, l'irradiation du composé par des radiations UV montre qu'il se décompose très rapidement car le temps de demi-réaction de 14,3 min est relativement correct. La fluorescence apparait donc comme une méthode fiable d'évaluer les restes du naphthopyranone dans l'environnement.

## **QUATRIEME PARTIE**

### **ISOLEMENT ET ETUDE STRUCTURALE DE BIOMOLECULES ISOLEES D'UNE GORGONE DE LA COTE SENEGALAISE, *EUNICELLA LABIATA***

#### **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES COELENTERES**

#### **CHAPITRE II : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS**

#### **CHAPITRE III : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SPHINGOLIPIDES**

## INTRODUCTION

Le développement de la recherche sur les biomolécules marines donne de plus en plus satisfaction sur le plan médical et cela par la prise en compte de leur activité biologique. Parmi ces molécules, les métabolites secondaires qui constituent une famille de composés très hétéroclites, jouent un rôle important dans l'élaboration de nouveaux principes actifs. La recherche de nouvelles biomolécules doit son essor aux multiples applications thérapeutiques de ces composés.

Compte tenu des variations climatiques, hydrologiques, et géomorphologiques, la cote sénégalaise se présente comme une véritable zone de transition très riche en organismes marins [32,33] avec des espèces spécifiques. Par rapport aux nombreuses espèces de la flore et de la faune, très peu d'organismes ont été étudiés [34-36] C'est pourquoi nous nous proposons ici d'étudier les structures de quelques biomolécules isolées cette fois de la faune des cotes sénégalaises en vue d'étudier leurs propriétés physicochimiques.

# CHAPITRE I

## GENERALITES SUR LES COELENTERES

### I.1 CLASSIFICATION

Les cœlentérés sont des animaux marins qui possèdent sur la surface de l'épiderme diverses cellules spécialisées dans la capture des proies. Selon la nature des cellules, ils sont divisés en deux embranchements :

- **Les cténaires** : Sont voisins des cnidaires, mais sont différents au niveau des cellules prédatrices qui sont collantes et pas urticantes. Ils sont peu étudiés sur le plan chimique.

- **Les cnidaires** : Ce sont des animaux un peu plus évolués que les spongiaires. Ils sont en forme de sac avec une seule ouverture autour de laquelle est disposée une couronne de tentacules urticants et qui lui sert à la fois de bouche et d'anus.

Les cnidaires sont des animaux carnassiers qui paralysent leurs proies quand celles-ci viennent se frotter à leurs tentacules. Au moindre contact, les cellules urticantes se dévagent en projetant une épine dont le venin (histamine) paralyse la proie, laquelle est ensuite portée à la bouche au moyen des tentacules.

Les cnidaires peuvent être répartis en trois classes :

- ✓ Les hydrozoaires :

Ils sont pélagiques et s'observent le plus souvent sous la forme de polype, qui au cours d'une reproduction asexuée bourgeonne et donne naissance à une méduse sexuée. Les méduses produisent des œufs qui donnent des polypes.

- ✓ Les anthozoaires :

Appelés « animaux fleurs », ils sont benthiques, c'est à dire fixés sur un substrat rocheux ou sablonneux. Certains sont solitaires comme les anémones, d'autres

sont coloniaux et érigent un squelette calcaire comme les coraux. Le corps est cloisonné et le nombre de cloisons peut être égal à 6 ou un multiple de 6 : ce sont les hexacoralliaires (anémone de mer, palythoa), il peut être égal à 8 ou un multiple de 8 : ce sont les octocoralliaires (corail, gorgone).

✓ Les scyphozoaires :

Ces animaux passent la majeure partie du temps de leur cycle sous la forme méduse. Ils sont considérés comme des méduses vraies.

**Tableau 7 : Classification simplifiée des cnidaires**

| <i>Classe</i>    | <i>Sous-Classe</i> | <i>Ordre</i>                 | <i>Exemple type</i> |
|------------------|--------------------|------------------------------|---------------------|
| Hydrozoaires     | Hydroïdes          |                              | Hydre               |
|                  | Hydrocoralliaires  |                              |                     |
|                  | Siphonophores      |                              | Physalie            |
|                  | Anthoméduses       |                              | Hydroméduses        |
| Anthozoaires     | Octocoralliaires   | Stolonifères                 |                     |
|                  |                    | Alcyonacées                  | Alcyons             |
|                  |                    | Gorgonacées                  | Gorgones            |
|                  |                    |                              | Corail              |
|                  | Pennatulacées      | Plume de mer                 |                     |
|                  |                    |                              |                     |
| Hexacoralliaires | Zoanthaires        | Palythoa                     |                     |
|                  | Actinaires         | Anémone de mer<br>Madrepores |                     |
| Scyphozoaires    |                    |                              | Méduses             |

## I.2 COELENTERES DE LA COTE SENEGALAISE

Les hydroïdes sont bien représentés et particulièrement sur la côte de la région de Dakar.

Les octocoralliaires sont quant à eux, mal représentés sur la zone des marées. Cependant quelques espèces de gorgones sont signalées sur les roches de la côte Dakaroise vers 30 m de profondeur.

Les hexacoralliaires sont bien représentés par les palythoas qui couvrent de grandes surfaces rocheuses entre les Almadies et Yoff.

Nous présentons dans le tableau 8 quelques cœlentérés des côtes Sénégalaises.

*Tableau 8 : Quelques cœlentérés de la côte Sénégalaise*

| <i>Classe</i> | <i>Sous-classe</i> | <i>Ordre</i> | <i>Espèces</i>  |
|---------------|--------------------|--------------|---|
| Hydrozoaires  | Hydroïdes          |              | <i>Sarsia ophiogaster</i><br><i>Halocordyle disticha</i><br><i>Tubularia larynx</i><br><i>Halecium sessile</i><br><i>Turritopsis nutricula</i><br><i>Orthopyxis compressa</i><br><i>Clytia uniflora</i><br><i>Obelia dichotoma</i><br><i>Obelia geniculata</i><br><i>Dynamena disticha</i><br><i>Sertularia distans</i><br><i>Ventroma halecioides</i><br><i>Plumularia setacea</i><br><i>Plumularia setaceoides</i><br><i>Monetheca margaretta</i><br><i>Aglaophenia pluma</i> |

|              |                  |             |   |
|--------------|------------------|-------------|---|
| Anthozoaires | Octocoralliaires | Alcyonacées | <i>Alcyonium Sp</i>   |
|              |                  | Gorgonacées | <i>Leptogorgia piccola</i><br><i>Eunicella labiata</i>  |
|              | -----            |             | -----   |
|              | Hexacoralliaires | Zoanthaires | <i>Palythoa monodi</i><br><i>Palythoa variabilis</i><br><i>Palythoa senegalensis</i><br><i>Palythoa dartevellei</i> |
|              |                  | Actinaires  | <i>Actinia equina</i><br><i>Anemonia sulcata</i>  |

### I.3 MORPHOLOGIE ET LIEU DE RECOLTE DU MATERIEL BIOLOGIQUE

C'est une gorgone de 30 à 40 cm de hauteur de couleur beige. Elle a été récoltée en plongée sous marine (-40 m) à Ouakam près de Dakar.

Après la récolte, le matériel est soumis à différentes techniques physico-chimiques en vue d'identifier quelques biomolécules comme les acides gras et les sphingolipides.

## **CHAPITRE II**

### **ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS**

#### **II.1 GENERALITES SUR LES ACIDES GRAS**

Les acides gras sont des acides carboxyliques saturés ou insaturés à chaîne linéaire, généralement non ramifiée, parfois cyclique. Ils portent une chaîne carbonée de 4 à 32 carbones mais les plus importants portent entre 12 et 22 atomes de carbone. Le nombre de carbone de la chaîne est pair excepté un cas très particulier (l'acide isovalérien ou acide phocénique). C'est la chaîne carbonée qui confère aux acides gras leur caractère hydrophobe. Les propriétés physiques des acides gras dépendent de la longueur de la chaîne et du nombre d'insaturations présentes. Ainsi, il a été montré que la solubilité dans l'eau des acides gras est moindre quand la chaîne est longue et les insaturations nombreuses [37].

Les acides gras sont des constituants de la cellule au niveau de laquelle ils participent à la composition membranaire et peuvent servir en tant que matériel de réserve ou de précurseurs métaboliques [38]

Les acides gras constituent la substance de base des lipides qui sont une forme privilégiée de mise en réserve d'énergie, surtout chez les animaux où ils sont stockés dans les tissus adipeux.

Pour nommer ces composés le nom trivial est souvent utilisé à la place de la nomenclature systématique. Cependant deux numérotations coexistent :

- La numérotation systématique que les chimistes utilisent le plus souvent avec la fonction acide qui porte le numéro 1.
- L'autre numérotation est utilisée en diététique et permet de regrouper les acides gras insaturés en série. Dans ce cas, on identifie à partir de l'extrémité de la chaîne opposée au groupement COOH le numéro du carbone portant la première

insaturation : si ce chiffre est 3, 6, 7 ou 9, on dit que l'acide est de la série  $\omega 3$  (oméga 3),  $\omega 6$ ,  $\omega 7$  ou  $\omega 9$ .

Pour désigner les acides gras, on indique d'abord le nombre de carbone, puis le nombre de doubles liaisons et enfin leurs positions sur la chaîne.

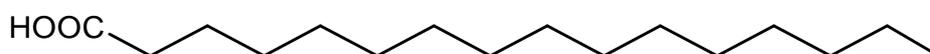
### II.1.1 Acides gras saturés

La formule générale est :  $C_nH_{2n}O_2$  n étant un nombre pair qui peut varier de 4 à 32.

La formule lipidique est  $C_n : 0$

- Acides gras à chaîne linéaire : Ils sont de loin les plus abondants dans la nature.

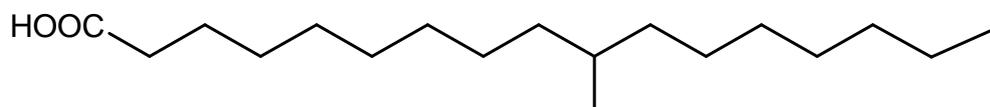
Acide palmitique:  $C_{15}H_{31}COOH$  (acide hexadécanoïque) ; formule lipidique :  $C16 : 0$



- Acides gras à chaîne ramifiée : Ils sont très rares dans la nature et portent une seule ramification.

Acide tuberculo stéarique présent dans le bacille de Koch à l'origine de la tuberculose :

$C_{17}H_{35}COOH$  (acide 10-méthyl heptadécanoïque) ; formule lipidique :  $C18 : 0$

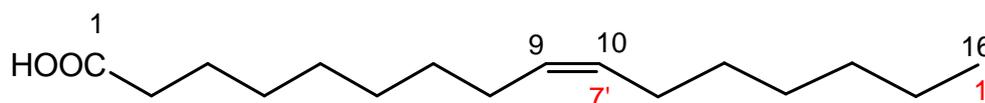


### II.1.2 Acides gras insaturés

Ils sont plus abondants que les acides gras saturés. Leur formule lipidique est :  $C_n : X \Delta a$  n = nombre de carbone ; X = nombre de double liaison éthylénique ; a est la position de la double liaison sur la chaîne.

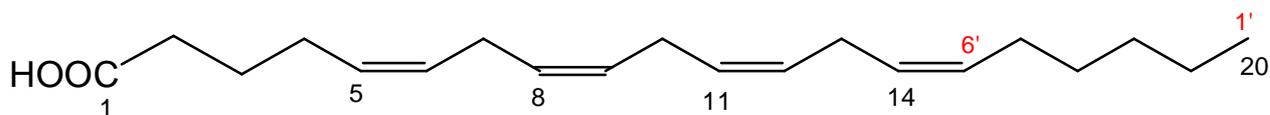
On peut aussi utiliser une autre formule codée avec trois parties : A : B (C) ; A = nombre de carbone ; B = nombre de double liaison éthylénique ; C représente le ou les numéro de carbone portant les doubles liaisons ou mettre la série  $\omega$  à la place de (C).

- Acide palmitoléique :  $C_{15}H_{29}COOH$  (acide Z-hexadéc- 9-énoïque)



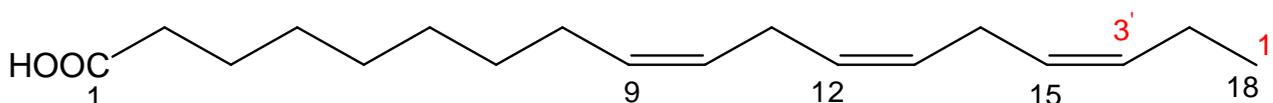
formule lipidique :  $C_{16} : 1 \Delta 9$  ou  $16 : 1 (9)$  ;  $16 : 1 \omega 7$

- Acide arachidonique :  $C_{19}H_{31}COOH$  (acide (5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tétraénoïque)



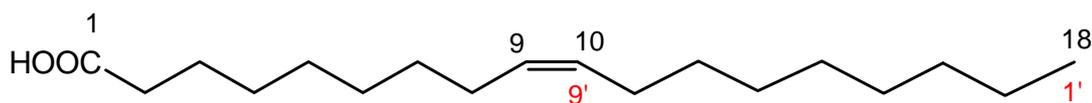
formule lipidique :  $C_{20} : 4 \Delta_{5,8,11,14}$  ou  $20 : 4 (5,8,11,14)$  ;  $20 : 4 \omega 6$

- Acide  $\alpha$ -linoléique :  $C_{17}H_{29}COOH$  (acide (9Z,12Z,15Z)-octadéca-9,12,15-triénoïque)



formule lipidique :  $C_{18} : 3 \Delta_{9,12,15}$  ou  $18 : 3 (9,12,15)$  ;  $18 : 3 \omega 3$

- Acide oléique :  $C_{17}H_{33}COOH$  (acide Z-octadéc-9-énoïque)



formule lipidique :  $C_{18} : 1 \Delta_9$  ou  $18 : 1 (9)$  ;  $18 : 1 \omega 7$

### II.1.3 Acides gras essentiels

Nous présentons dans les tableaux 9 et 10 ci-dessous quelques acides naturels, saturés et insaturés parmi les plus courants :

**Tableau 9 : Acides gras saturés [39]**

| ACIDES GRAS SATURES |    |                   |                      |                 |
|---------------------|----|-------------------|----------------------|-----------------|
| Longueur relative   | nC | Nom systématique  | Nom courant          | Localisation    |
| Chaîne courte       | 4  | n-butanoïque      | butyrique            | beurre          |
|                     | 6  | n-hexanoïque      | caproïque            | lait de chèvre  |
|                     | 8  | n-octanoïque      | caprylique           | lait de chèvre  |
|                     | 10 | n-décanoïque      | caprique             | lait de chèvre  |
| Chaîne moyenne      | 12 | n-dodécanoïque    | laurique (laurier)   | huile, graisses |
|                     | 14 | n-tétradécanoïque | myristique (muscade) | animales et     |

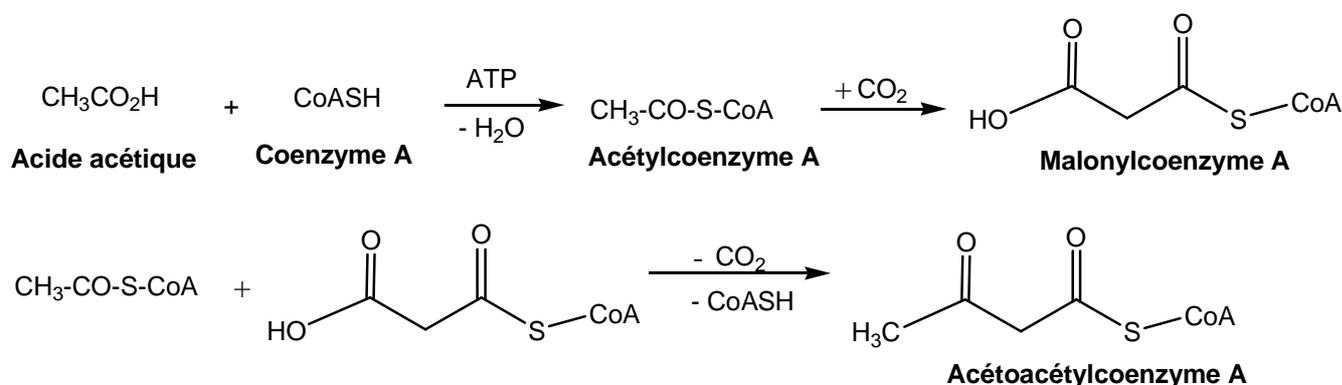
|               |    |                     |                      |  |
|---------------|----|---------------------|----------------------|--|
|               | 16 | n-hexadécanoïque    | palmitique (palmier) | végétales                                  |
|               | 18 | n-octadécanoïque    | stéarique (suif)     |  |
| Chaîne longue | 20 | n-eicosanoïque      | arachidique          | graines                                    |
|               | 22 | n-docosanoïque      | Béhénique            |  |
|               | 24 | n-tétracosanoïque   | lignocérique         |  |
|               | 26 | n-hexacosanoïque    | cérotique            | cires des plantes<br>bactéries<br>insectes |
|               | 28 | n-octacosanoïque    | montanique           |  |
|               | 30 | n-triacontanoïque   | mélissique           |  |
|               | 32 | n-dotriacontanoïque | lacéroïque           |  |

**Tableau 10 : Acides gras insaturés [40]**

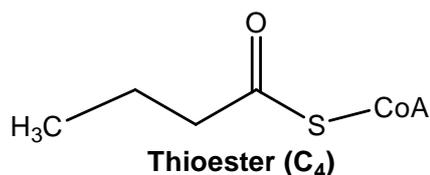
| <b>ACIDES GRAS INSATURES</b> |  |                               |                          |              |                     |
|------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------|--------------|---------------------|
| <b>nC</b>                    | <b>Nom systématique</b>                              | <b>Nom courant</b>            | <b>Formule lipidique</b> | <b>Série</b> | <b>Localisation</b> |
| 16                           | Z-hexadéc-9-énoïque                                  | palmitoléique                 | C16: 1(9)                | $\omega$ 7   | très répandu        |
| 18                           | Z-octadéc-9-énoïque                                  | oléique                       | C18: 1(9)                | $\omega$ 9   | très répandu        |
|                              | Z-octadéc-11-énoïque                                 | vaccénique                    | C18: 1(11)               | $\omega$ 7   | bactéries           |
|                              | (9Z,12Z)-octadéca-9,12-diénoïque                     | Linoléique                    | C18: 2 (9,12)            | $\omega$ 6   | graines             |
|                              | (9Z,12Z,15Z)-octadéca-9,12,15-triénoïque             | Linoléinique                  | C18: 3 (9,12,15)         | $\omega$ 3   | graines             |
| 20                           | (5Z,8Z,11Z,14Z)-éicosa-5,8,11,14-tétraénoïque        | Arachidonique                 | C20: 4 (5,8,11,14)       | $\omega$ 6   | animaux             |
|                              | (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-éicosa-5,8,11,14,17-pentaénoïque | EPA (Acide EicosaPentanoïque) | C20: 5 (5,8,11,14,17)    | $\omega$ 3   | huiles de poissons  |
| 24                           | Z-tétracos-15-énoïque                                | nervonique                    | 24: 1(15)                | $\omega$ 9   | cerveau             |

### II.1.4 Biosynthèse des acides gras

Le schéma général démarre par action de l'acide acétique sur un thiol (coenzyme A) [41]



La réduction de la fonction cétone de l'acétylcoenzyme A conduit à un thioester d'un acide carboxylique à 4 carbones:

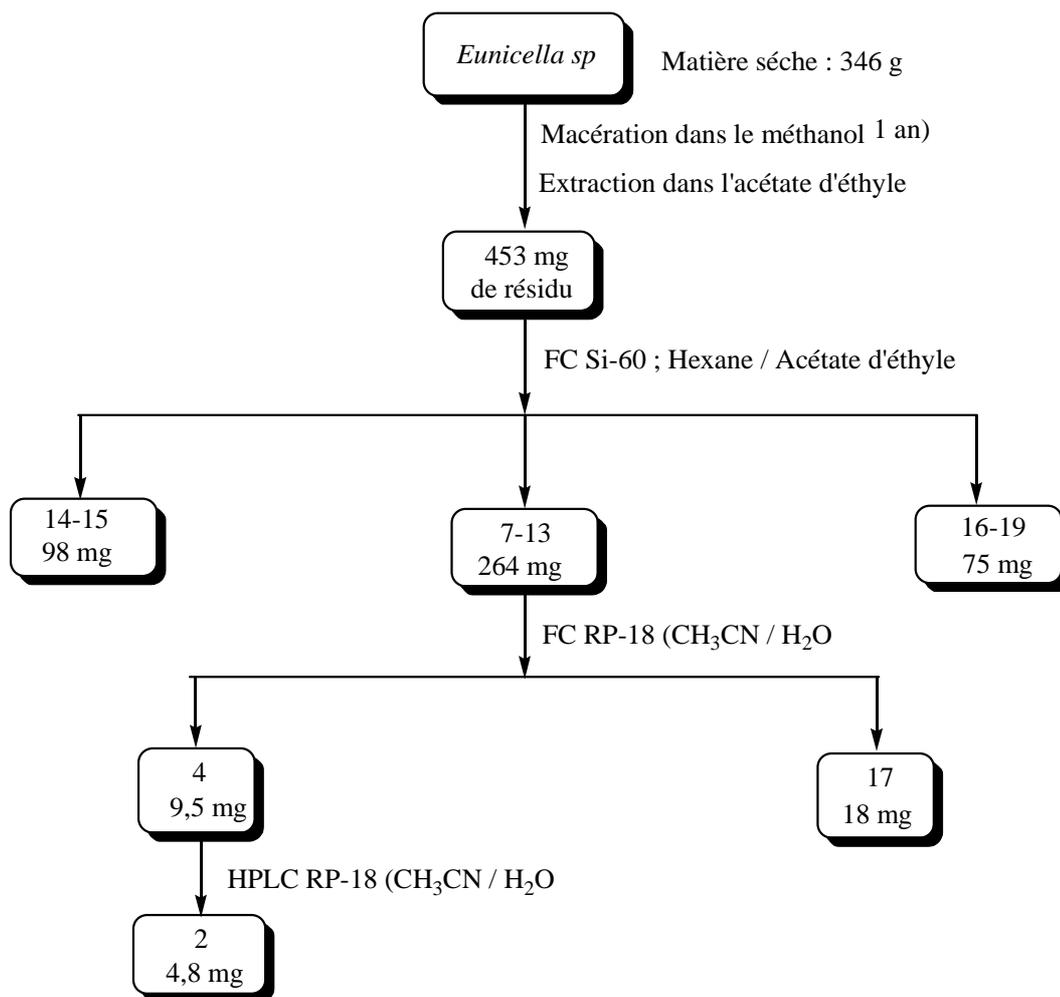


La répétition de ces différentes étapes augmente la chaîne de 2 carbones à chaque fois, ce qui conduit à la fin à un acide gras:  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{2n}\text{-COOH}$ . Cela explique aisément le nombre pair des atomes de carbone des acides gras naturels.

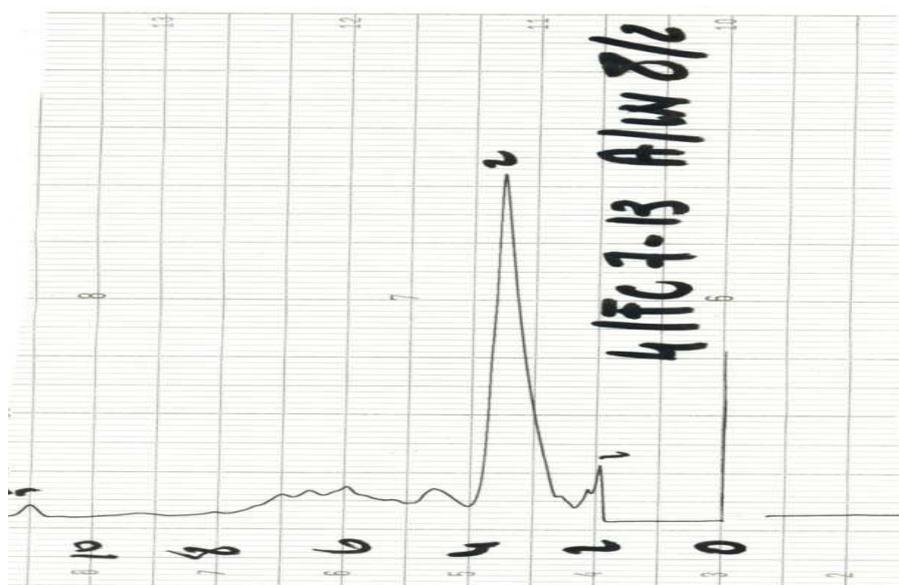
## II.2 EXTRACTION ET SEPARATION

Après la récolte, l'*Eunicella labiata* est lavé à l'eau douce afin d'éliminer les sels minéraux, le sable et autres débris animaux et végétaux puis séché à l'air. La matière sèche (346 g) est broyée puis macérée dans le méthanol au réfrigérateur pendant un an. Après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, on ajoute au résidu 250 ml d'eau, puis on l'extrait à l'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant, on récupère 453 mg de résidu qui sera soumis à une FC Si 60 (Hexane / acétate d'éthyle) avec gradient d'élution (fractions de 50 ml). Celle-ci démarre avec un mélange (90/ 10) elle est ensuite poursuivie en variant de 5 % la quantité d'acétate d'éthyle jusqu'à la fraction 19.

Les différentes fractions sont ensuite analysées par CCM (Si 60 ou RP 18). Les fractions présentant des spots similaires après observation des plaques à l'UV, sont réunies et le solvant évaporé. Les produits sont ensuite séparés et purifiés par «flash» chromatographie (FC) et chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le résidu issu de la fraction 7-13 (264 mg) est soumis à une FC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O) et gradient d'élution (fraction de 40 ml) nous conduisant aux deux fractions 4 (3,5 mg) et 17 (18 mg). La fraction 4 est soumise à une HPLC RP-18 dans un mélange CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O conduisant au composé **2** (m=4,8 mg ; t<sub>R</sub>=3,5 min) qui fera l'objet d'une étude structurale. Nous présentons ci-dessous les figures 32 et 33 qui représentent respectivement le diagramme d'isolement des différents composés et le chromatogramme issu de la HPLC du composé **2**.



**Figure 32 : diagramme d'isolement des composés isolés à partir de *Eunicella sp***

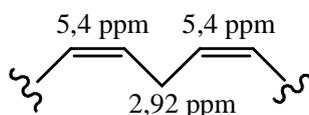


**Figure 33: Chromatogramme d'isolement du composé 2 de *Eunicella sp***

## II.3 DETERMINATION STRUCTURALE DE L'ACIDE GRAS POLYINSATURE 2

Le composé **2** est issu de la HPLC RP-18 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) de la fraction 4 obtenue après (FC) RP-18 ( CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) de la fraction 7-13 dérivée elle aussi après (FC) Si-60 de l'extrait brut de la gorgone.

L'examen du spectre RMN du proton (figure 34 ; 34a et 34b) révèle des signaux caractéristiques d'un acide gras polyinsaturé avec un multiplet complexe entre 5,4 et 5,5 ppm intégrant 5 protons oléfiniques et un autre multiplet à 2,92 ppm intégrant 2 protons. Ces données indiquent que la molécule est un acide gras portant au moins un fragment à 2 doubles liaisons de configurations cis séparées par un méthylène. Ce qui est conforme à la biogénèse. Le couplage entre les protons résonnant à 5,4 ppm (m) et 2,92 ppm (m) est confirmé par le spectre COSY (figure 35).



Le lien de ce fragment avec le carbone 19 est soutenu par le déplacement chimique des deux protons de C-19 à 2,04 ppm et la corrélation sur le spectre COSY de ce signal avec celui qui sort à 5,4 ppm. Le COSY signale aussi la corrélation du méthyle terminal qui résonne à 0,88 ppm avec le CH<sub>2</sub> à 2,04 ppm.

La présence du groupement hydroxyle OH sur C-12 est confirmée par le signal du proton tertiaire H-(C12) à 4,23 ppm et le signal caractéristique d'un méthylène sur C-13 dont les protons résonnent à 2,13 ppm et 2,37 ppm, indiquant ainsi la présence d'un système ABX. On remarque sur le COSY une nette corrélation entre le signal du proton tertiaire à 4,23 et un des protons de C-13 à 2,37 ppm et l'absence de corrélation avec le proton à 2,13 ppm. Cette différence est certainement liée à la configuration absolue du carbone asymétrique C-12. On

remarque par ailleurs que le signal qui résonnent à  $\delta = 1,7$  ppm, attribuable à **H**-(O) présente deux tâches de corrélation très nette avec les deux protons de C-13 qui sortent à 2,13 et 2,37 ppm.

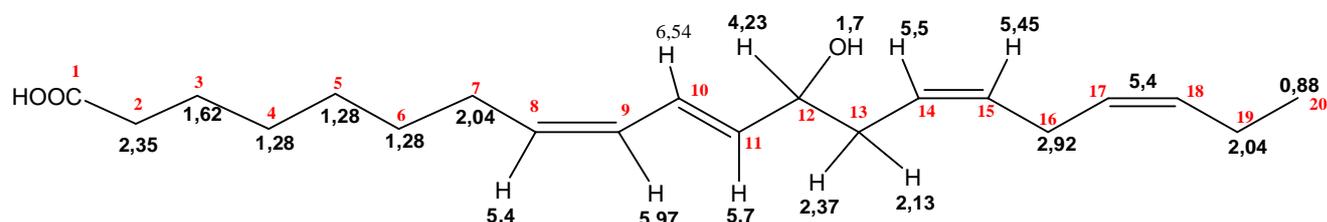
Le lien entre le méthylène sur C-13 et la double liaison éthylénique cis entre C-14 et C-15 est soutenu par les corrélations signalées par le COSY entre les protons à 2,13 ppm et 2,37 ppm respectivement avec des protons éthylénique à  $\delta = 5,5$  et 5,45 ppm attribuable aux carbone éthyléniques C-14 et C-15.

Le spectre RMN du proton révèle ensuite des signaux de protons oléfiniques indiquant la présence de deux doubles liaisons conjuguées au niveau de C-8 et C-10. En effet, à 5,7 ppm apparaît un doublet dédoublé attribuable à H-(C11) avec des constantes de couplage de 15Hz et 7Hz représentant respectivement le couplage avec H-(C10) et le proton tertiaire H-(C12). Ceci confirme d'une part le lien entre C-11 et C-12 portant le OH et d'autre part la configuration trans de la double liaison éthylénique entre C-11 et C-10. Ces couplages sont bien visibles sur le spectre COSY qui montre une nette corrélation entre H-(C11) résonnant à 5,7 ppm et H-(C10) résonnant à 6,54 ppm d'une part et entre le signal à 5,7 ppm et celui à 4,23 ppm attribuable au proton tertiaire H-(C12) d'autre part.

Nous remarquons aussi la présence dans le spectre RMN du proton d'un doublet dédoublé à  $\delta = 6,54$  ppm avec des constantes de couplage de 15Hz et 11Hz représentant respectivement le couplage trans avec H-(C11) et un autre avec H-(C9) qui résonne à 5,97 ppm. Ceci est confirmé par le COSY qui montre la corrélation entre le proton sortant à 6,54 ppm et celui à 5,97 ppm. La présence de la double liaison C9 , C8 se manifeste avec le signal à 5,97 ppm qui apparaît sous forme d'un pseudo triplet ( $J=11\text{Hz}$ ) à la place du doublet dédoublé et qui est attribuable à H-(C9) ; un signal à 5,4 ppm attribuable à H-(C8) et le spectre COSY qui signale une nette corrélation entre ces deux protons. La configuration cis de

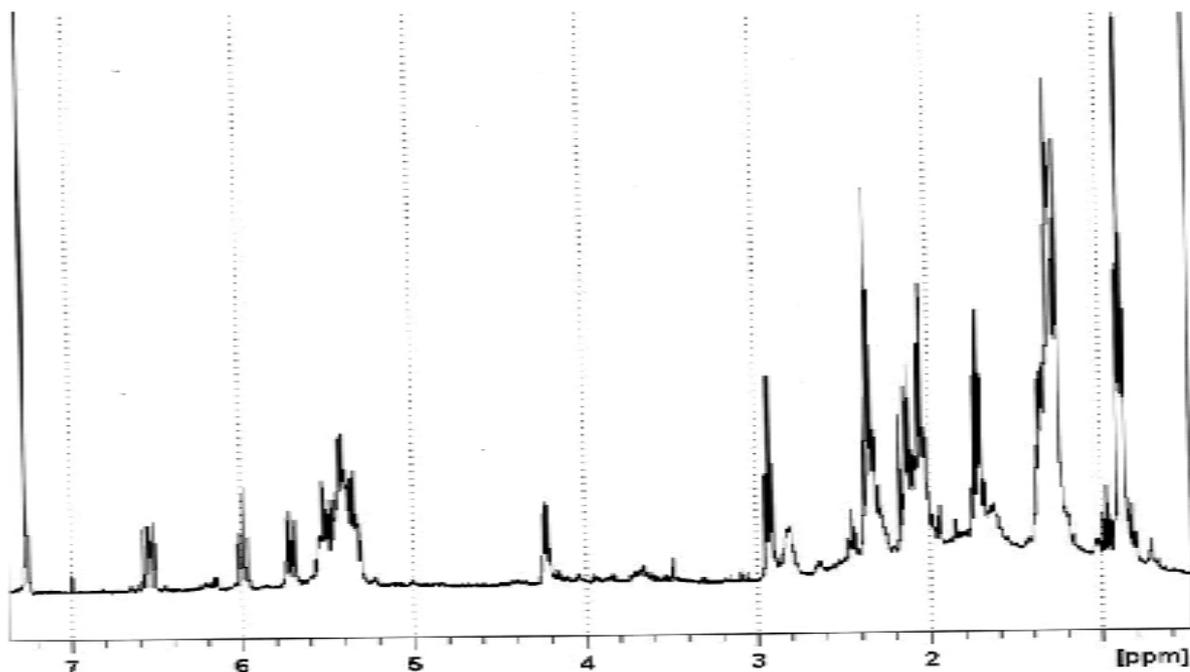
cette double liaison est soutenue par la constante de couplage de 11Hz et par le calcul des déplacements chimiques. Entre le carbone éthylénique C-8 et le groupement COOH se trouve une série de 6 CH<sub>2</sub> présentant entre eux une cascade de corrélation. En position  $\alpha$  de COOH se trouve deux protons résonnant à 2,35 ppm. Le couplage de ce CH<sub>2</sub> avec les deux protons de C-3 qui résonnent à 1,62 ppm est signalé par une nette tâche de corrélation sur le COSY. On remarque aussi une tâche de corrélation des deux protons de C-3 avec les protons méthyléniques des carbones 4, 5 et 6 qui résonnent à 1,28 ppm. Ceux -ci sont à leur tour couplés avec les deux protons de C-7 qui résonnent à 2,04 ppm du fait que ce carbone est fixé sur le carbone éthylénique C-8.

L'ensemble des données de la RMN présentées au tableau 11 et les résultats de la spectroscopie de masse par impact électronique qui révèle un pic moléculaire à  $m/z = 318$  permettent de proposer la structure ci-dessous pour le composé **2**.

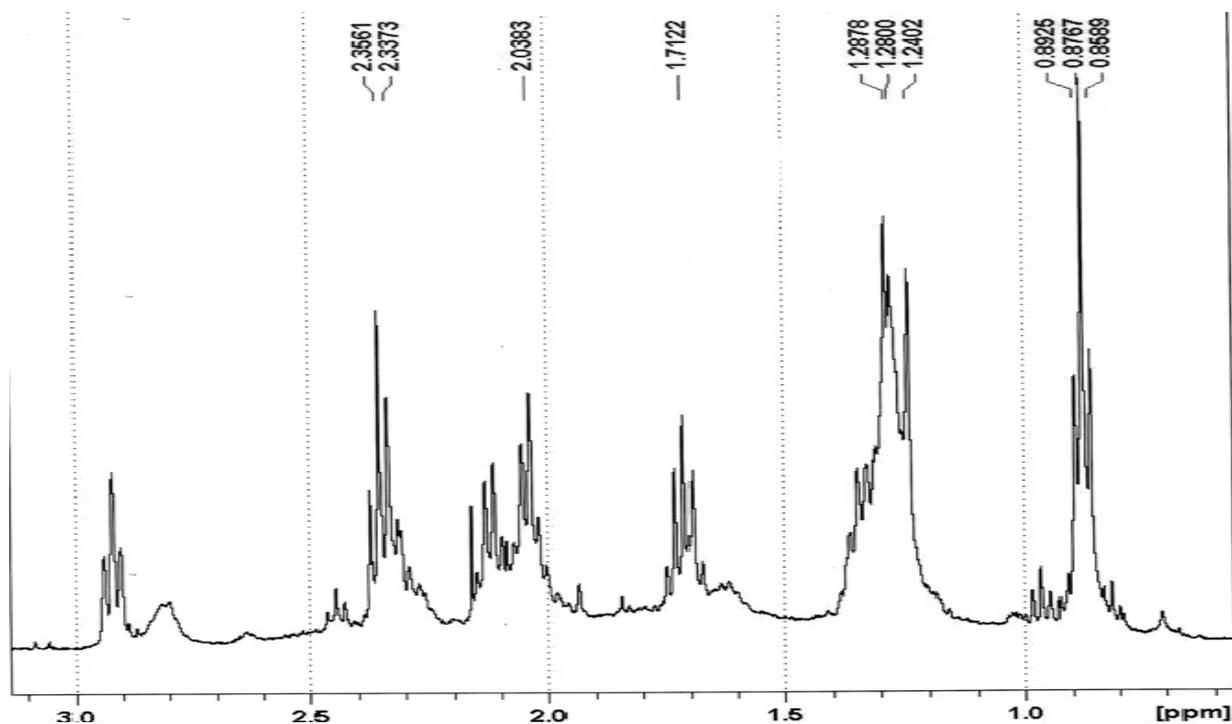


Acide (8Z), (10E), (14Z), (17Z) 12-hydroxyeicosatétra-8,10,14,17-énoïque **2**

C'est un acide gras un peu rare en raison de la double liaison conjuguée et de la présence du groupe hydroxyle. L'originalité de cette molécule est la configuration trans de la double liaison entre C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub> car la nature synthétise généralement des composés de configuration cis au niveau des doubles liaisons.



*Figure 34 : Spectre RMN du proton du composé 2 (CDCl<sub>3</sub>)*



*Figure 34a : Spectre RMN du proton du composé 2 (CDCl<sub>3</sub>) : agrandissement entre 0 et 3 ppm du spectre de la figure 34.*

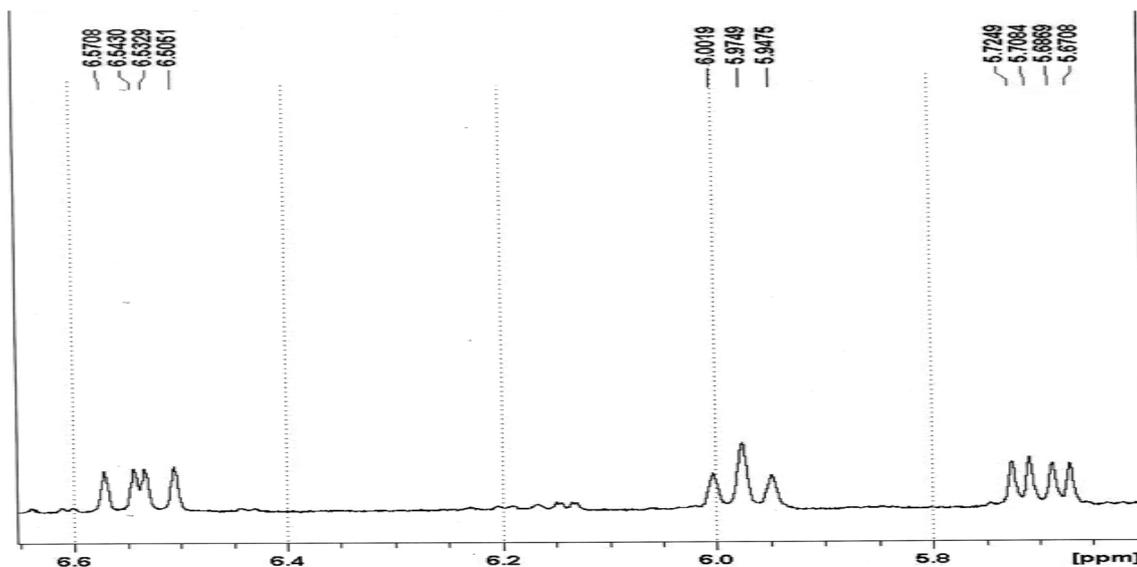


Figure 34b : Spectre RMN du proton du composé 2 ( $\text{CDCl}_3$ ) : agrandissement entre 4 et 7 ppm du spectre de la figure

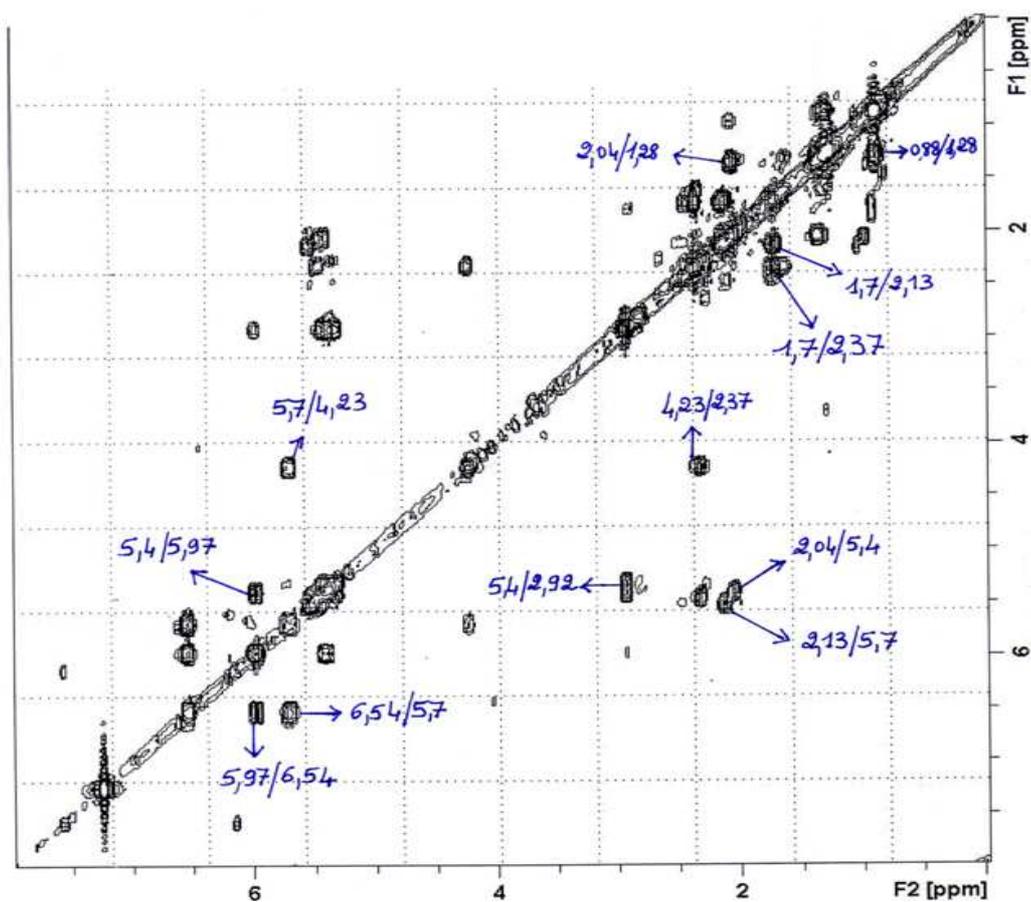


Figure 35 : Spectre RMN  $\text{COSY}^1 \text{H}^1\text{-H}$  du composé 2 ( $\text{CDCl}_3$ )

**Tableau 11 : Déplacements chimiques  $\delta$  du spectre RMN du proton de l'acide gras polyinsaturé**

| N° carbone | $^1\text{H } \delta$ (ppm) (mult. ; J(Hz)) $\text{CDCl}_3$            |
|------------|---|
| <b>1</b>   | --  |
| <b>2</b>   | 2,35 (t ; 7,5 Hz)   |
| <b>3</b>   | 1,62 (m)  |
| <b>4</b>   | 1,28 (m)  |
| <b>5</b>   | 1,28 (m)  |
| <b>6</b>   | 1,28 (m)  |
| <b>7</b>   | 2,04 (m)  |
| <b>8</b>   | 5,4 (m)   |
| <b>9</b>   | 5,97 (pseudo triplet ; 11 Hz)   |
| <b>10</b>  | 6,54 (dd ; $J_{10,11} = 15 \text{ Hz}$ ; $J_{10,9} = 11 \text{ Hz}$ ) |
| <b>11</b>  | 5,7 (dd ; $J_{11,10} = 15 \text{ Hz}$ ; $J_{11,12} = 7 \text{ Hz}$ )  |
| <b>12</b>  | 4,23 (m) ; HO-C(12) 1,7 (m)   |
| <b>13</b>  | 2,31 (m) ; 2,37 (m)   |
| <b>14</b>  | 5,5 (m)   |
| <b>15</b>  | 5,45 (m)  |
| <b>16</b>  | 2,92 (pseudo triplet ; 7 Hz)  |
| <b>17</b>  | 5,4 (m)   |
| <b>18</b>  | 5,4 (m)   |
| <b>19</b>  | 2,04 (m)  |
| <b>20</b>  | 0,88 (t ; 6,2 Hz)   |

## **II.4 ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS DE L'EXTRAIT BRUT DE LA GORGONE**

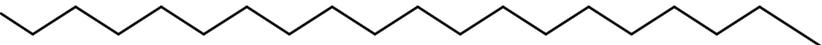
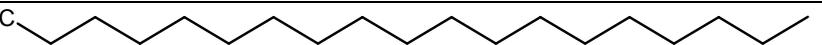
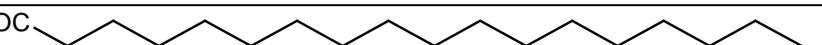
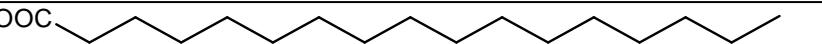
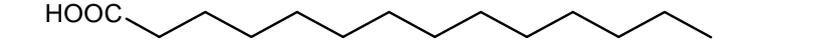
L'étude de la composition en acide gras saturés de l'extrait brut de la gorgone a été faite au moyen de la HPLC en phase inverse (RP-18) couplée à la spectroscopie de masse par électrospray (ESI). Cette méthode permet de travailler à des pressions compatibles avec la HPLC. L'élution a été faite avec un mélange CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (28mmol / l) (97:3).

Dans ce mode de fragmentation, les spectres sont bien reproductibles mais l'inconvénient est que l'ion moléculaire peut être absent du spectre.

Plusieurs acides gras saturés et insaturés, portant entre 14 et 20 atomes de carbone ont été identifiés. Excepté les acides gras saturés, les structures des autres acides qui portent des doubles liaisons pourraient être déterminées soit par comparaison des temps de rétention à ceux des échantillons authentiques, soit par ozonolyse réductrice et comparaison des fragments carbonylés avec des échantillons authentiques.

Nous présentons dans le tableau 12 ci-dessous les différents types d'acides gras présents dans la gorgone en tenant bien sûr compte du fait que la gorgone étant une espèce supérieure, donc le nombre d'atomes de carbone sera compris entre 14 et 20 pour les acides gras saturés et entre 16 et 20 pour les insaturés.

**Tableau 12 : Acides gras de la gorgone identifiés**

| Nombre de carbone | Masse | Nombre d'insaturation | Formule   |
|-------------------|-------|-----------------------|---|
| 20                | 312   | 0                     | HOOC    |
|                   | 304   | 4                     | 20 : 4  |
|                   | 302   | 5                     | 20 : 5  |
|                   | 300   | 6                     | 20 : 6  |
| 19                | 298   | 0                     | HOOC    |
|                   | 296   | 1                     | 19 : 1  |
|                   | 294   | 2                     | 19 : 2  |
|                   | 292   | 3                     | 19 : 3  |
|                   | 286   | 6                     | 19 : 6  |
| 18                | 284   | 0                     | HOOC  |
|                   | 282   | 1                     | 18 : 1  |
|                   | 280   | 2                     | 18 : 2  |
|                   | 278   | 3                     | 18 : 3  |
|                   | 276   | 4                     | 18 : 4  |
|                   | 274   | 5                     | 18 : 5  |
|                   | 272   | 6                     | 18 : 6  |
| 17                | 270   | 0                     | HOOC  |
|                   | 268   | 1                     | 17 : 1  |
| 16                | 256   | 0                     | HOOC  |
|                   | 250   | 3                     | 16 : 3  |
|                   | 248   | 4                     | 16 : 4  |
| 15                | 242   | 0                     | HOOC  |
| 14                | 228   | 0                     | HOOC  |

## **CHAPITRE III**

### **ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SPHINGOLIPIDES**

#### **III.1 GENERALITES SUR LES SPHINGOLIPIDES**

L'étude de la composition des lipides des organismes marins a fait l'objet de nombreux travaux [42, 43]. Il s'agissait à l'époque d'une étude chimique ayant pour base une classe bien déterminée de lipides (acides gras, stéroïls, etc.) à des fins taxonomiques. Cependant les informations concernant les lipides polaires sont relativement peu nombreuses.

Les lipides des organismes marins des côtes sénégalaises ont été étudiés [44, 45, 46, 47]. Cette étude a permis d'établir des critères taxonomiques tenant compte de la composition stéroïdique [48, 49].

Les sphingolipides sont des lipides complexes qui font partie intégrante de la structure membranaire des cellules et jouent un rôle de seconds messagers et de récepteurs [50,51]

Ils jouent également un rôle fondamental dans la régulation et d'autres mécanismes cellulaires. Il faut signaler que la dérégulation du métabolisme lipidique est à l'origine de nombreuses pathologies comme le diabète, l'obésité, l'hypertension ou la maladie d'Alzheimer.

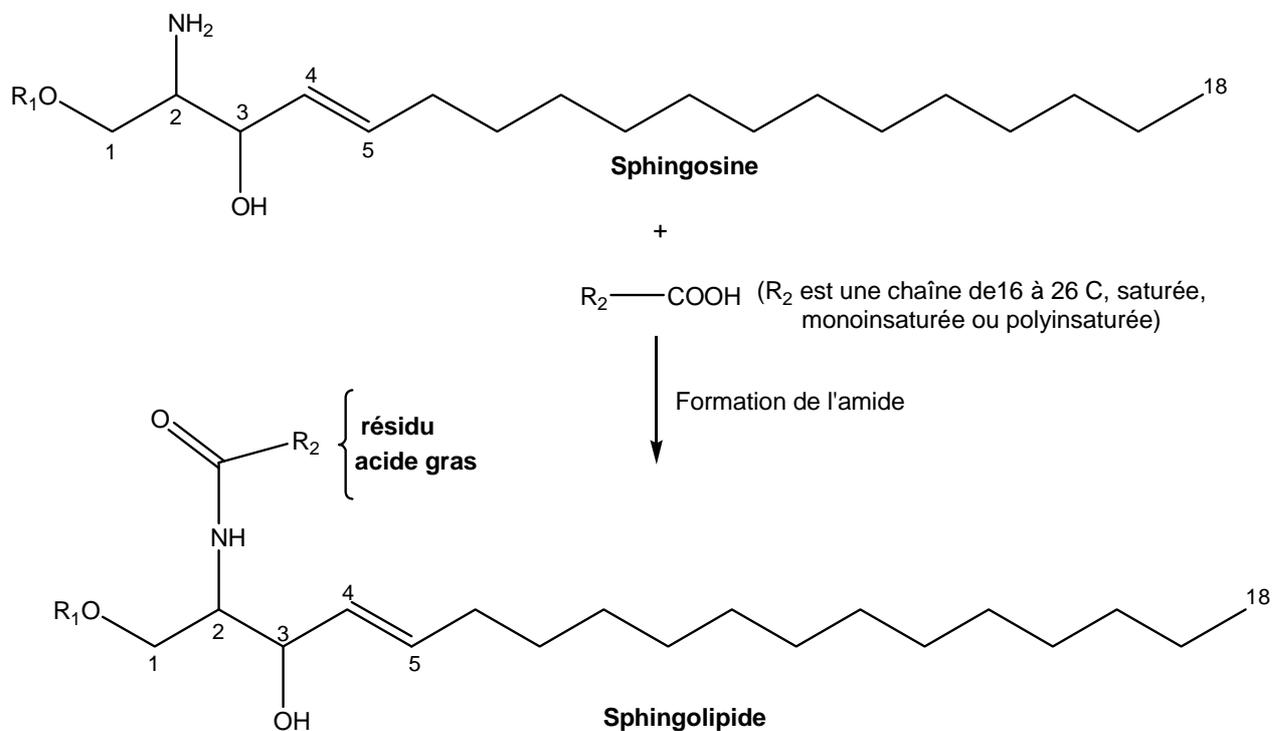
Les sphingolipides bioactifs telles que la céramide et la sphingosine-1-phosphate, participent aux voies de signalisation cellulaire pouvant conduire à la prolifération, la mort ou la différenciation cellulaire. Ces médiateurs sont impliqués dans les mécanismes physiopathologiques conduisant au développement de pathologies vasculaires, neurodégénératives et inflammatoires.

Ils ont été décrits pour la première fois en 1884 sous le nom de « sphingoid » par J.L.Thudichum qui a utilisé le préfixe sphingo en référence aux énigmes que le

sphinx posait aux voyageurs [52]. Le terme sphingolipide a ensuite été introduit par Carter et coll. en 1947 [53].

Ils constituent une classe de lipides portant une chaîne acyle issue d'un acide gras (C-16 à C-26) liée à une autre chaîne appelée base sphingoïde dont la plus abondante dans le règne animal est un C-18, par une fonction amide.

Ils sont donc synthétisés à partir de la sphingosine qui est un amino diol sur lequel l'action d'un acide gras va conduire à la fonction amide. La chaîne de l'acide gras peut être hydroxylée ou non en position  $\alpha$  du COOH. La chaîne de la base porte souvent 18-C mais elle peut varier de 14 à 24 carbone



Selon la nature de  $R_1$ , les sphingolipides peuvent donner plusieurs sous-classes dont certaines sont présentées dans le tableau 25 ci-dessous [54] :

$R_1 = H$  : *Céramides*

$R_1 =$  phosphocholine : sphingomyeline (mammifères) *phosphosphingolipides*

R<sub>1</sub> = phosphoéthanolamine : sphingomyeline (insectes) ***phosphosphingolipides***

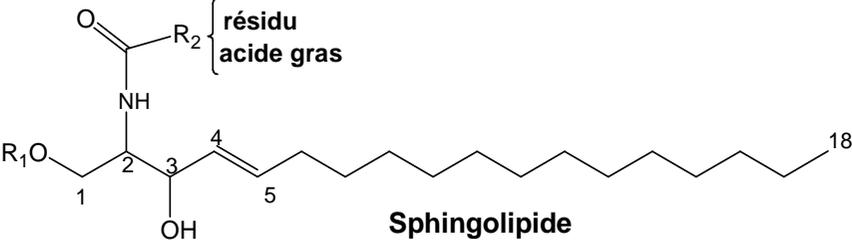
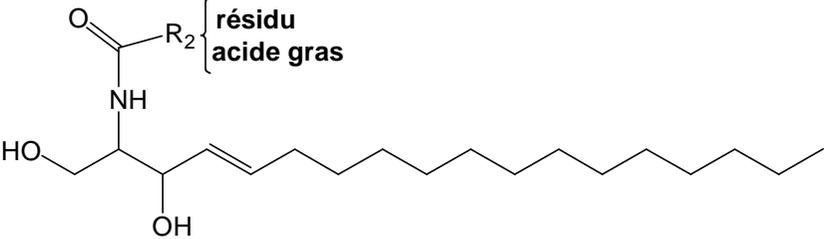
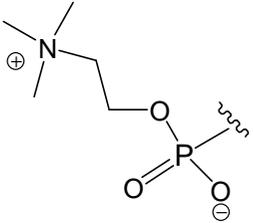
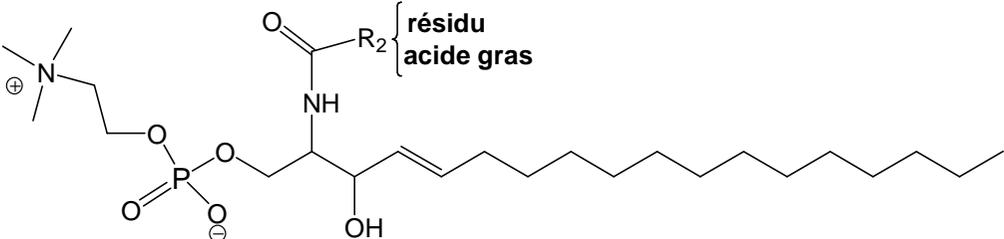
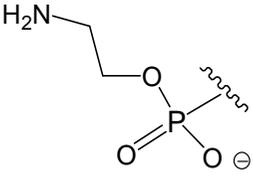
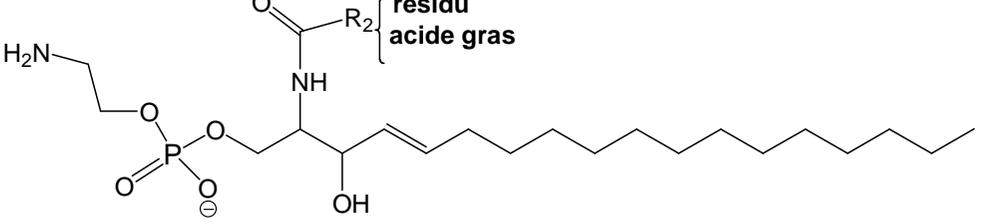
R<sub>1</sub> = résidu sucre simple : ***glycosphingolipides neutres*** (cérébrosides)

R<sub>1</sub> = plusieurs résidus sucre dont un qui est l'acide sialique : ***glycosphingolipides acides*** (gangliosides)

R<sub>1</sub> = H ; NH<sub>2</sub> libre : ***sphingoïde*** (sphingosine)

R<sub>1</sub> = phosphate ; NH<sub>2</sub> libre : ***sphingoïde*** (sphingoïde-1-phosphate)

**Tableau 13 : Sous-classes de sphingolipides**

| R <sub>1</sub>  | Sous-classes  | Structure  |
|---|---|--|
|   |   |  <p style="text-align: center;"><b>Sphingolipide</b></p> |
| H   | céramide  |   |
|  <p style="text-align: center;"><b>phosphocholine</b></p>       | Phosphosphingolipides<br>(sphingomyeline.<br>mammifères (38)) |    |
|  <p style="text-align: center;"><b>phosphoéthanolamine</b></p> | Phosphosphingolipides<br>(sphingomyeline.<br>insectes (39))   |   |

| <p style="text-align: center;"><b>Sphingolipide</b></p>                     |   |   |
|---|---|---|
| $R_1$   | Sous-classes  | Structure   |
| <p style="text-align: center;"><b><math>\beta</math>-Dglucopyranose</b></p> | <b>Glycosphingolipides</b><br>Neutres<br>(cérébrosides) | <p style="text-align: center;"><b>résidu sucre simple</b></p> |
| <p style="text-align: center;">acide sialique</p>                           | <b>Glycosphingolipides</b><br>acides<br>(gangliosides)  | <p style="text-align: center;">acide sialique</p>             |
| $R_1 = H ; NH_2$ libre  | Sphingosine   |   |
| $R_1 =$ phosphate ; $NH_2$ libre  | Sphingoïde-1-phosphate                                  |   |

## III.2 EXTRACTION ET SEPARATION

La fraction **17** contenant les sphingolipides est issue de la F.C. RP 18 (CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O) avec gradient d'élution (fraction de 40ml) de la fraction 7-13 (264 mg) (voir schéma d'isolement des biomolécules). La fraction **17** est à son tour soumise à différentes techniques physiques telles la RMN et la spectroscopie de masse couplée avec la HPLC (ESI) en vue de déterminer la structure des sphingolipides présentes dans la fraction.

## III.3 DETERMINATION STRUCTURALE DES SPHINGOLIPIDES

A l'examen du spectre de RMN du proton (figures 46 ; 46a-46d), nous remarquons un doublet résonnant à 6,28 ppm ( $J = 7,2$  Hz) caractéristique d'un proton amidique d'un céramide (NH-CO-) (40, 41, 42). Nous remarquons aussi la présence d'un système ABX avec les multiplets à 3,94 ppm et 3,65 ppm correspondant à des protons oxyméthyléniques (CH<sub>2</sub>-O) et le multiplet à 3,88 ppm attribuable au proton tertiaire du carbone C-2 lié à NH.

Cet enchainement est confirmé par le COSY (figure 47) qui révèle les corrélations suivantes : 3,65/3,94 ; 3,65/3,88 ; 3,88/6,28. La présence du groupement hydroxyle OH secondaire lié à C-3 est confirmée par le multiplet à 4,28 ppm dont le couplage avec le proton tertiaire à 3,88 ppm se manifeste par une nette corrélation sur le COSY.

Les signaux à 5,76 ppm et 5,5 ppm révèlent des signaux de résonance de protons portés par des atomes de carbone sp<sup>2</sup> dont leur corrélation est confirmée par le spectre COSY. Le calcul de la constante de couplage indique que la configuration de la double liaison est trans et conformément à la biogénèse.

Le COSY montre d'une part la corrélation entre le proton oléfinique à 5,5 ppm et le proton tertiaire à 4,30 ppm et d'autre part entre le proton oléfinique à 5,76 ppm et les protons méthyléniques à 2,1 ppm. Ces deux tâches de corrélation

permettent d'attribuer le signal à  $\delta = 5,5$  ppm à H-(C4), celui de 5,76 ppm à H-(C5) et les signaux à 2,1 ppm aux protons méthyléniques de C-6. Ceci confirme la position de la deuxième double liaison entre C-7 et C-8. En effet, le spectre de RMN du proton révèle les signaux caractéristiques de cette double liaison avec les multiplets à 5,5 et 5,37 ppm attribuables à deux protons dont la position trans peut être déduite du calcul de la constante de couplage (15 Hz). La tâche de corrélation entre le signal à  $\delta = 5,5$  ppm et 2,1 ppm d'une part et la tâche de corrélation entre le signal à  $\delta = 5,37$  ppm et 1,95 ppm d'autre part permettent d'attribuer les deux protons éthyléniques qui résonnent à  $\delta = 5,5$  ppm et 5,37 ppm respectivement à H-(C7) et H-(C8) et le signal à 1,95 ppm aux protons méthyléniques de C-9. Le lien entre le carbone C-8 qui porte le proton à 5,37 ppm et le reste de la chaîne est confirmé par la corrélation entre ce proton et les protons méthyléniques à 1,95 ppm.

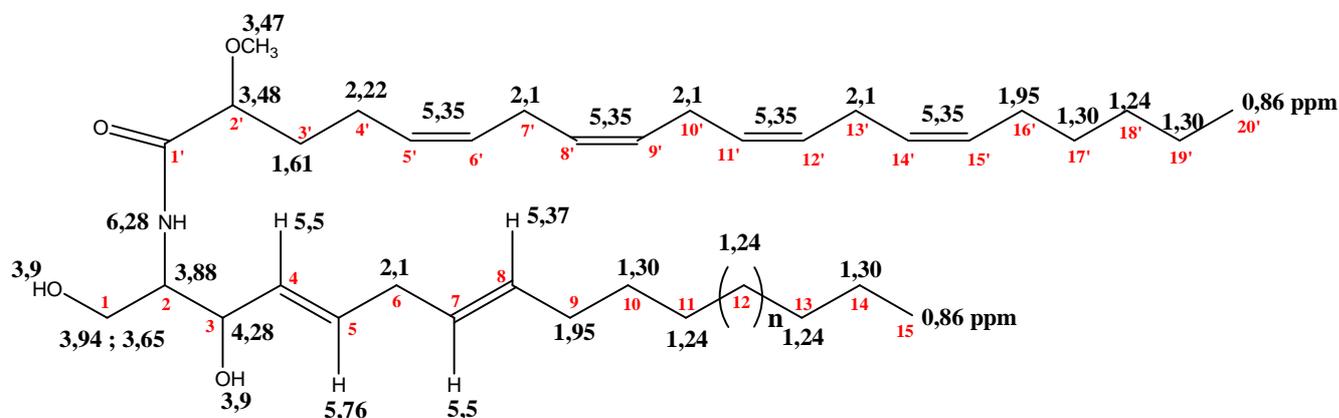
Pour le fragment restant de cette chaîne, nous observons sur le spectre COSY les corrélations suivantes qui sont en accord avec la structure proposée ci-dessous : 1,95/1,30 ; 1,30/1,24 ; 1,30/0,86.

La chaîne acyle se manifeste par la présence des signaux de 8 protons oléfiniques à 5,35 ppm de configurations cis conformément à la biogénèse. Ces quatre doubles liaisons sont alternées avec 3 méthylènes qui résonnent à 2,1 ppm. La corrélation entre ces protons est confirmée par le COSY. La corrélation entre les protons à 2,22 ppm liés à un carbone éthylénique et les signaux à 1,61 ppm, confirmée par le COSY, permettent d'attribuer ces signaux respectivement aux deux protons de C-4' et C-3'. L'examen du COSY indique aussi que les protons résonnant à 1,61 ppm sont couplés au proton du carbone lié au méthoxyle et qui sort à  $\delta = 3,48$  ppm donc attribuable à H-(C2') .

L'origine de ce méthoxyle qui résonne à 3,47 ppm n'est certainement pas naturelle et serait issue de la longue macération de cette gorgone dans le méthanol (1an). Les deux autres OH résonnent à 3,9 ppm sous forme d'un singulet.

La chaîne acyle se termine par un fragment saturé de cinq carbones indiquant ainsi que cet acyle est issu d'un acide gras  $\omega 6$ . L'enchaînement de ces carbones est confirmé par les tâches de corrélation déjà décrite sur l'autre chaîne : 1,95/1,30 ; 1,30/1,24 ; 1,30/0,86.

L'ensemble de ces données RMN présentées au tableau 26 et la spectroscopie de masse permettent de proposer cette structure correspondant à une masse molaire de 571 et qui constitue le premier terme d'une série de sept céramides homologues portant des ions moléculaires  $m/z = 571 ; 585 ; 599 ; 613 ; 627 ; 641 ; 655$ .

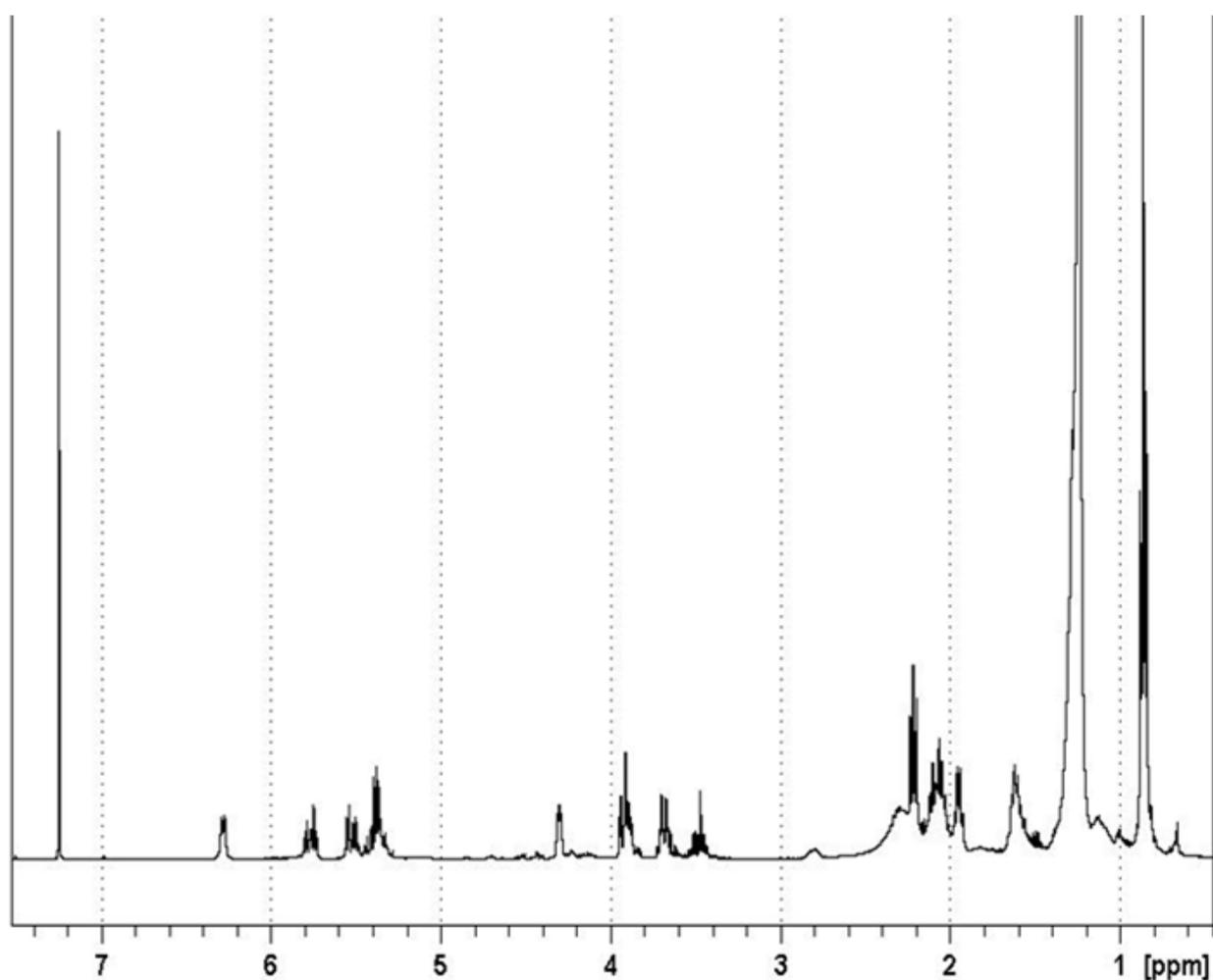


| n | Masse molaire | Formule brute      |
|---|---------------|--------------------|
| 1 | 571           | $C_{36}H_{61}NO_4$ |
| 2 | 585           | $C_{37}H_{63}NO_4$ |
| 3 | 599           | $C_{38}H_{65}NO_4$ |
| 4 | 613           | $C_{39}H_{67}NO_4$ |
| 5 | 627           | $C_{40}H_{69}NO_4$ |
| 6 | 641           | $C_{41}H_{71}NO_4$ |

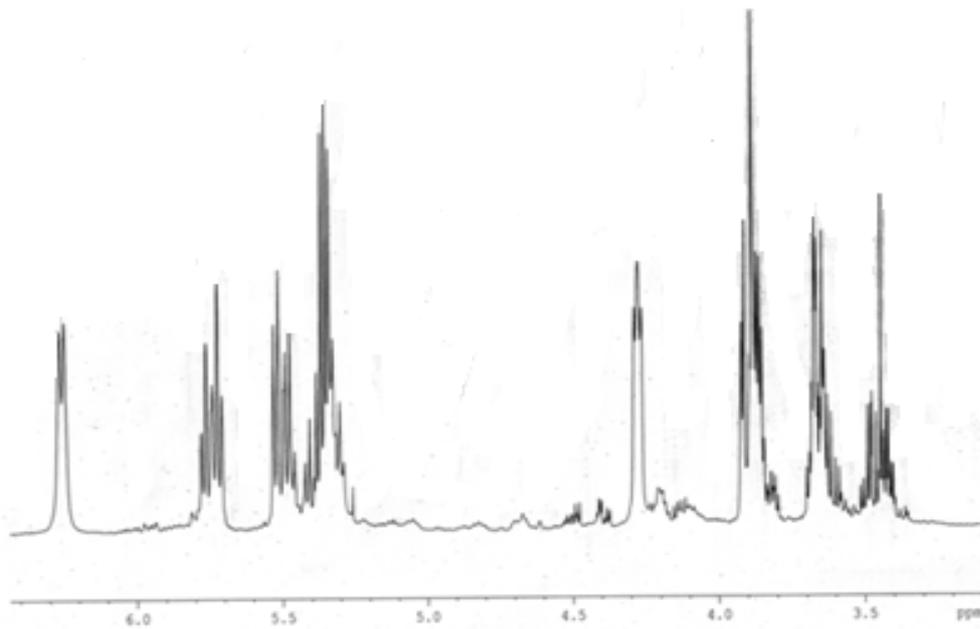
La chaîne acyle de ces céramides est issue de l'acide arachidonique hydroxylé sur le carbone C-2. Elle est donc dérivée d'un acide alpha hydroxylé polyinsaturé très active en dermatologie et cosmétologie [55]. Il faut noter que l'acide arachidonique est un constituant structural majeur des membranes en plus d'être un précurseur essentiel de nombreuses molécules bioactives (eicosanoïdes).

La base sphingosine est constituée d'une chaîne qui varie de 15 à 20 carbones et porte une double liaison trans entre C-7 et C-8.

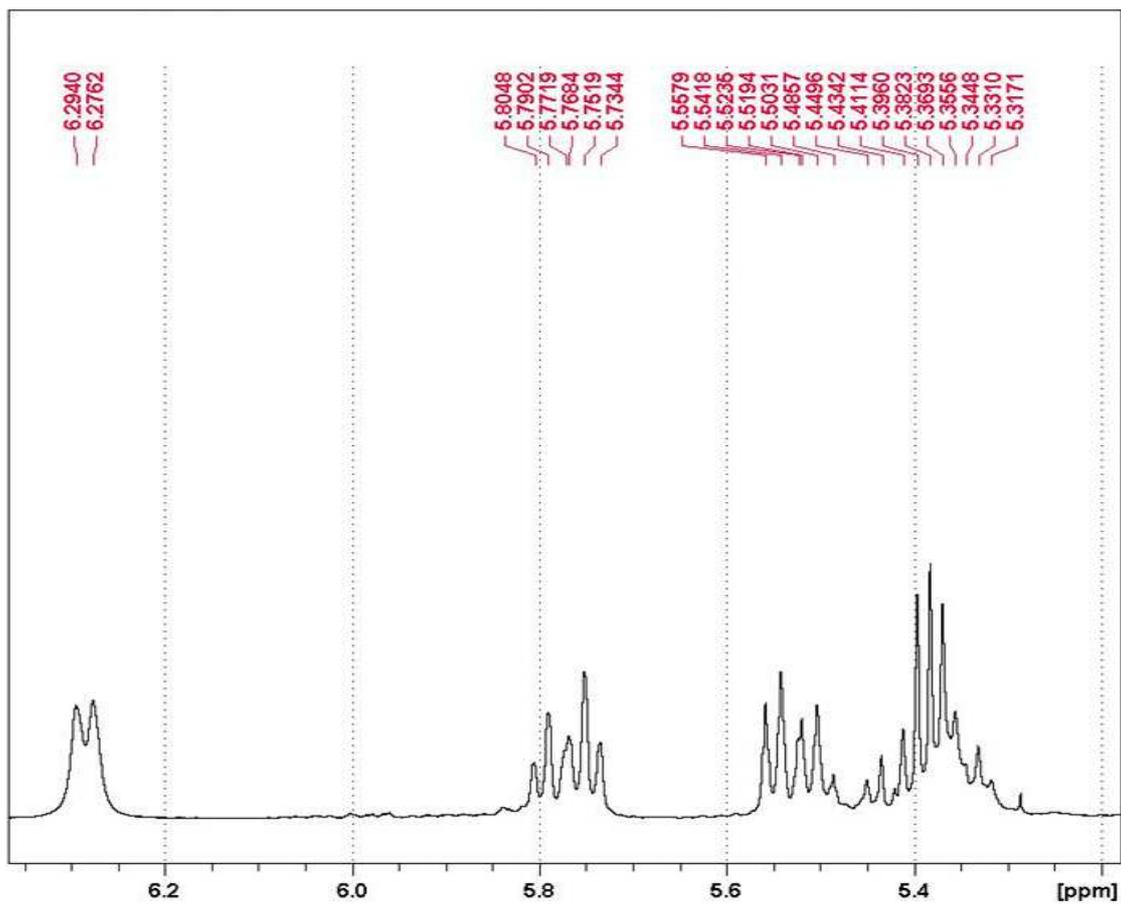
Les céramides d'origine marine ont été isolés de plusieurs espèces dont l'éponge dictyocérate *Ircinia variabilis* avec une base sphingosine de 22 carbones [56], l'éponge *Oceanapa cf. tenuis* [57] et du cnidaire *Alcyonium sp.* [58].



**Figure 36 : Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  de la série de céramides ( $\text{CDCl}_3$ )**



*Figure 36a*



*Figure 36b*

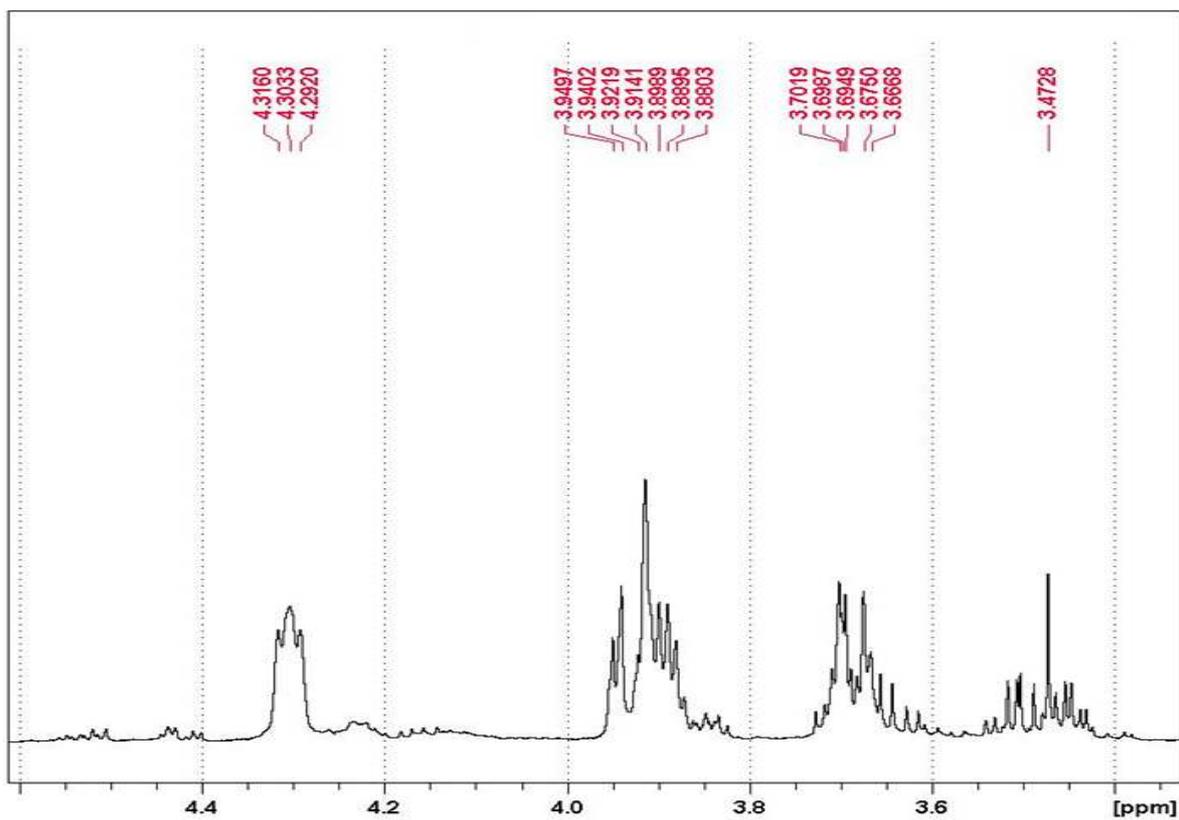


Figure 36c

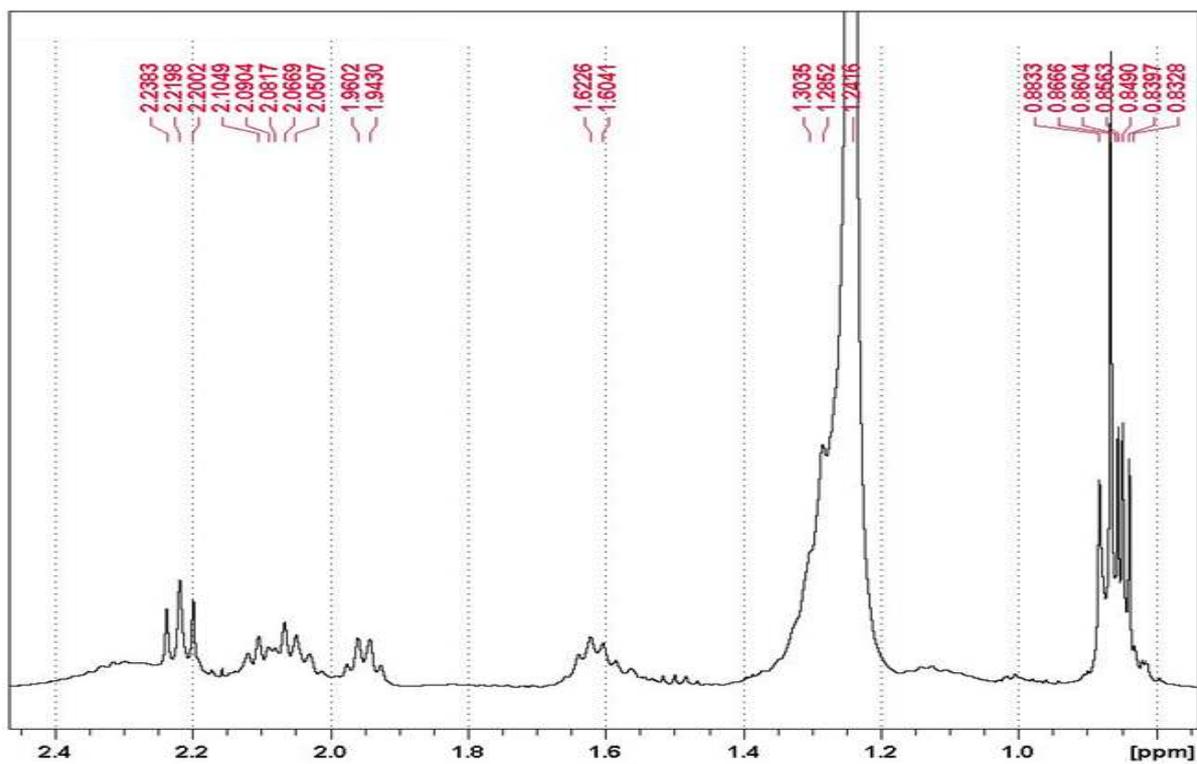


Figure 36d

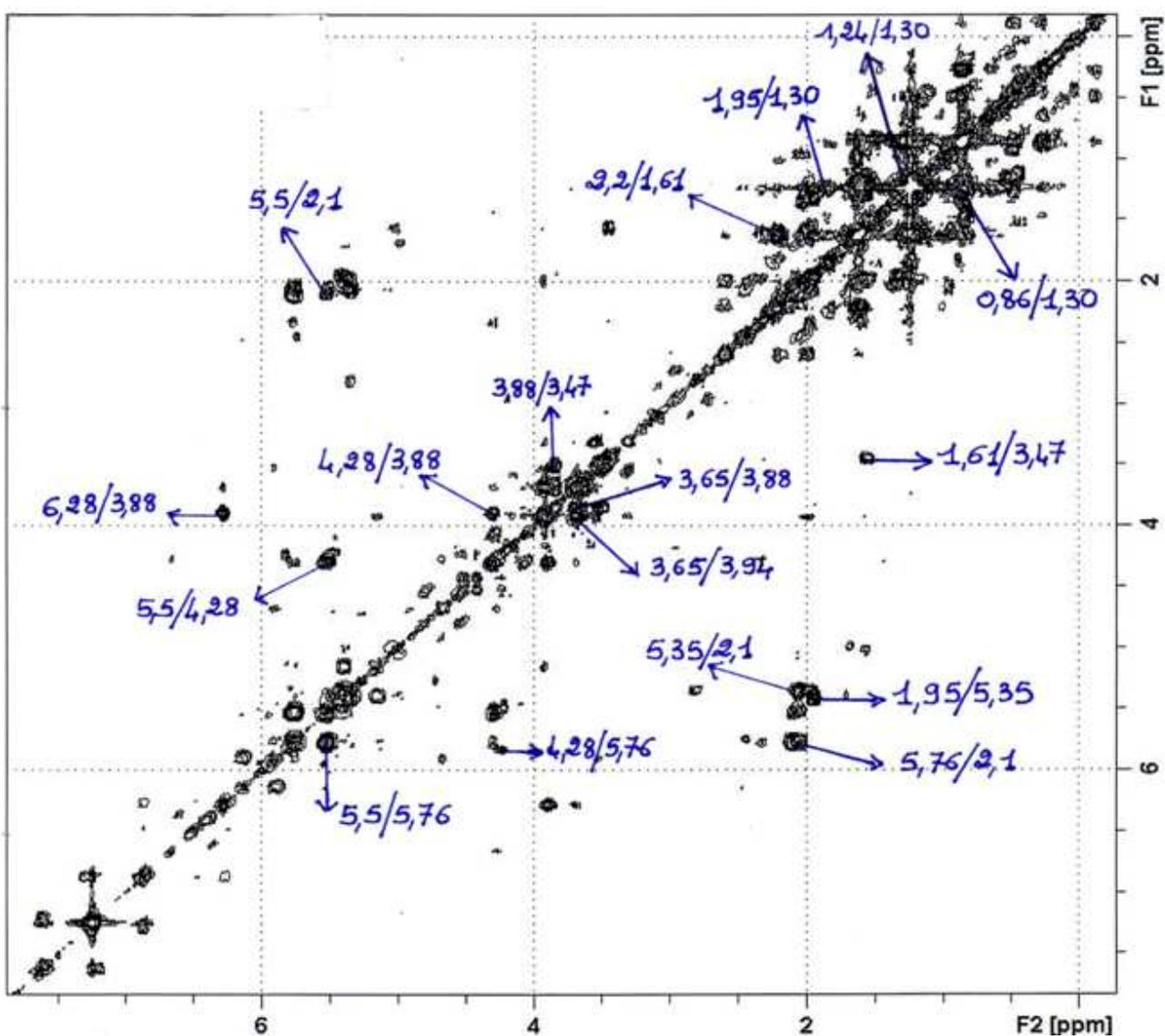


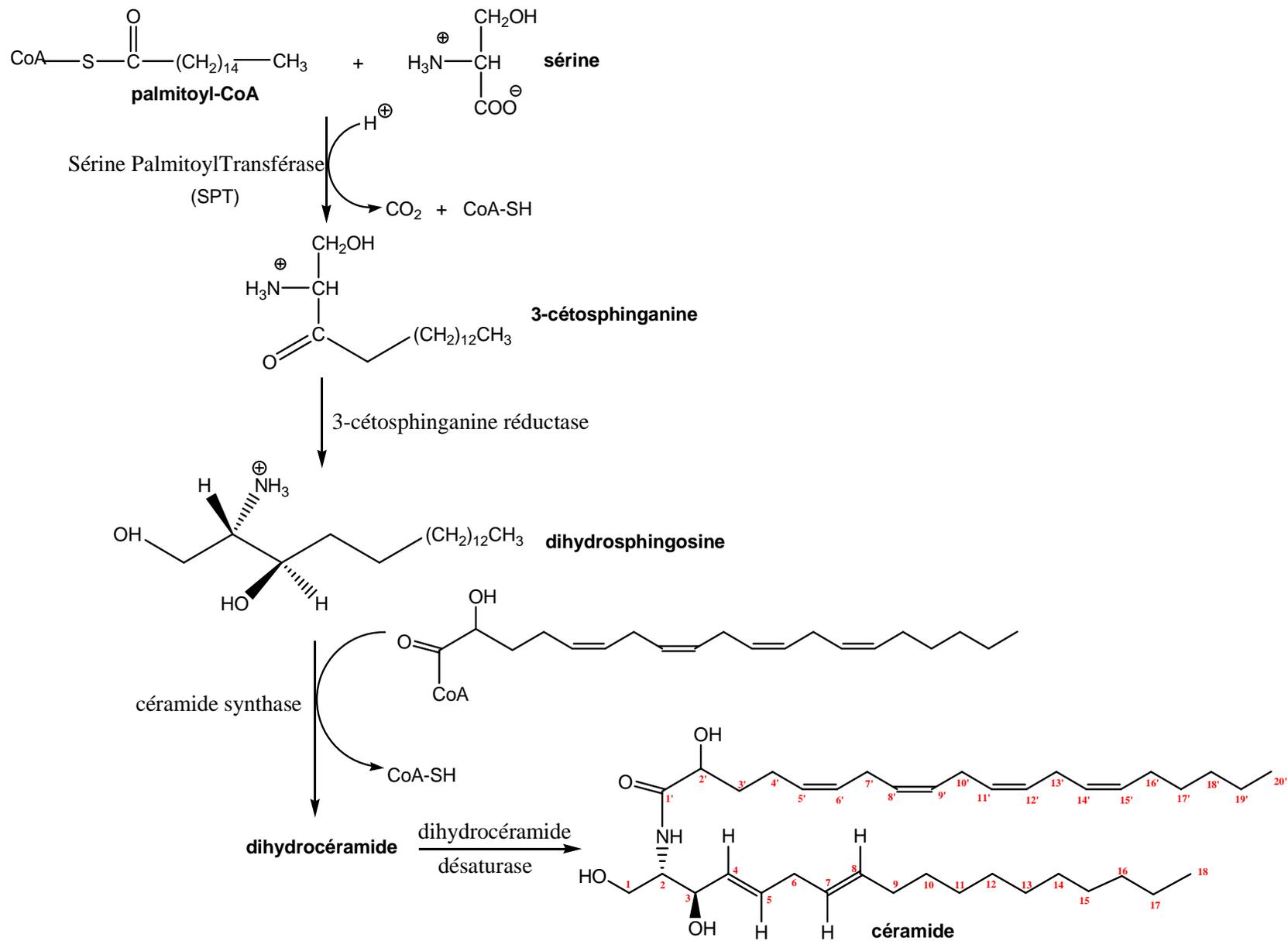
Figure 37 : Spectre de RMN COSY<sup>1</sup> H<sup>1</sup>-H de la série de céramides (CDCl<sub>3</sub>)

**Tableau 14 : Déplacements chimiques  $\delta$  et constantes de couplage  $J$  du spectre RMN de proton du sphingolipide**

| N° carbone<br>(Base<br>sphingosine) | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) (mult. ;<br>J(Hz)) $\text{CDCl}_3$ | N° carbone<br>(acyle)  | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) (mult. ;<br>J(Hz)) $\text{CDCl}_3$ |
|-------------------------------------|--|------------------------|--|
| <b>1</b>                            | 3,65 (m);3,94 (m) ; HO-(C1) 3,9 (m)                            | <b>OCH<sub>3</sub></b> | 3,47 (s)   |
| <b>2</b>                            | 3,88 (m)   | <b>2'</b>              | 3,48 (m)   |
| <b>3</b>                            | 4,30 ; HO-(C3) 3,9 (m)   | <b>3'</b>              | 1,61 (m)   |
| <b>4</b>                            | 5,5 (dd ; $J_{4,5} = 15$ Hz ; $J_{4,3} = 6,4$ Hz)              | <b>4'</b>              | 2,22 (m)   |
| <b>5</b>                            | 5,76 (td ; $J_{5,4} = 15$ Hz ; $J_{5,6} = 6$ Hz)               | <b>5'</b>              | 5,35 (m)   |
| <b>6</b>                            | 2,1(m)   | <b>6'</b>              | 5,35 (m)   |
| <b>7</b>                            | 5,5 (td ; $J_{7,8} = 15$ Hz ; $J_{7,6} = 6,4$ Hz)              | <b>7'</b>              | 2,1 (m)  |
| <b>8</b>                            | 5,37 (m)   | <b>8'</b>              | 5,35 (m)   |
| <b>9</b>                            | 1,95 (m)   | <b>9'</b>              | 5,35 (m)   |
| <b>10</b>                           | 1,30 (m)   | <b>10'</b>             | 2,1 (m)  |
| <b>11</b>                           | 1,24 (m)   | <b>11'</b>             | 5,35 (m)   |
| <b>12</b>                           | 1,24 (m)   | <b>12'</b>             | 5,35 (m)   |
| <b>13</b>                           | 1,24 (m)   | <b>13'</b>             | 2,1 (m)  |
| <b>14</b>                           | 1,30 (m)   | <b>14'</b>             | 5,35 (m)   |
| <b>15</b>                           | 0,86 ( t ; $J = 6,68$ Hz)                                      | <b>15'</b>             | 5,35 (m)   |
| <b>NH</b>                           | *6,28 (d ; $J_{\text{NH},3} = 7$ Hz)                           | <b>16'</b>             | 1,95 (m)   |
|                                     |  | <b>17'</b>             | 1,30 (m)   |
|                                     |  | <b>18'</b>             | 1,24 (m)   |
|                                     |  | <b>19'</b>             | 1,30 (m)   |
|                                     |  | <b>20'</b>             | *0,85(t ; $J = 6,48$ Hz)                                       |

### **III.4 BIOSYNTHESE DES CERAMIDES DU PRESENT TRAVAIL**

La biosynthèse démarre avec la condensation du palmitoyl-coenzyme A avec la sérine qui donne après décarboxylation la cétophosphinganine qui conduit à son tour au dihydrosphingosine après réduction de la fonction cétone. Ce dernier est ensuite acylé avec l'acylCoA de l'acide arachidonique conduisant ainsi à la dihydrocéramide. Celui-ci est ensuite transformé en céramide avec la dihydrocéramide désaturase.



**Figure 38 : Biosynthèse des céramides** [41] (schéma adapté à notre céramide)

## CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons isolé et identifié un acide gras polyinsaturé avec deux double liaisons conjuguées et un hydroxyle. Nous avons également isolé et établi la structure d'une série de sept céramides homologues dont la chaîne acyle est issue de l'acide arachidonique hydroxylé sur le carbone 2.

On peut noter ainsi que l'acylation de la sphingosine qui conduit à la céramide a été faite à partir d'un acide alpha hydroxylé polyinsaturé, très actif en dermatologie et cosmétologie.

La base sphingosine est constituée d'une chaîne qui varie de 15 à 20 carbones et porte une double liaison trans entre C-7 et C-8. Une des originalités de ce céramide est le fait que la chaîne acyle qui est généralement saturée ou mono-insaturée porte dans ce cas quatre doubles liaisons cis, ce qui est très rare.

A partir de l'extrait brut de la gorgone, nous avons identifié plus d'une vingtaine d'acides gras saturés et polyinsaturés. Si les structures des acides gras saturés peuvent être établies sans aucune difficulté, celles des acides gras polyinsaturés ne peuvent être déterminées qu'après avoir détecté la position des doubles liaisons des différents acides gras. A cet effet, on peut procéder soit par comparaison des temps de rétention à ceux des échantillons authentiques, soit par comparaison des fragments carbonylés avec des échantillons authentiques après ozonolyse réductrice. Ceci peut faire l'objet de travaux ultérieurs.

La présence dans cette espèce d'acides gras polyinsaturés nombreux et variés et des céramides dérivés d'alpha-hydroxyacide pourrait ouvrir des perspectives de recherches, pour accéder à des molécules bioactives, pouvant présenter un intérêt pharmacologique important

## CONCLUSION GENERALE

Nos travaux développés en quatre parties nous ont permis d'une part de conduire des études approfondies sur les propriétés photochimiques de substances naturelles très fluorescentes isolées d'une algue marine et d'une plante médicinale terrestre et d'autre part, d'isoler et d'identifier des lipides d'une gorgone de la côte sénégalaise.

Dans la première partie, nous avons présenté les généralités sur le matériel et les techniques mises en œuvre. Ainsi nous avons décrit les différentes techniques d'extraction, d'isolement, d'analyse et de purification chromatographique puis des méthodes spectroscopiques d'analyse structurale et de détermination des propriétés photochimiques.

Dans la deuxième partie nous avons procédé à l'étude des propriétés photochimiques de l'almazole D et l'almazole C qui sont des alcaloïdes indoliques très fluorescents isolés de *Haraldiophyllum sp.*

Nous remarquons que l'étude de la photodégradation des produits par irradiation révèle la plus grande stabilité de l'almazole D par rapport à l'almazole C vis-à-vis de la lumière. Au cours de l'irradiation de l'almazole D, on constate l'apparition d'un second pic superposable au spectre d'émission de l'almazole C. Confirmant ainsi la conversion photochimique de l'almazole D en almazole C après une réaction de décarboxylation. Cette conversion est un argument spectroscopique supplémentaire en faveur de la nouvelle structure révisée de l'almazole D proposée par une équipe américaine. Les résultats de l'irradiation des almazoles D et C montrent très clairement l'influence de l'irradiation solaire dans la biogénèse des almazoles A, B, C et D. A cet effet, un nouveau schéma de biogénèse des almazoles de cet algue a été proposé. Ainsi l'almazole D qui est le métabolite majoritaire peut avoir comme précurseur biogénétique un dipeptide modifié non isolé de l'algue, qu'on pourrait appelé "préalmazone D" et qui peut conduire aussi au réalmazone C par décarboxylation.

L'irradiation solaire peut transformer l'almazole D en almazole C par décarboxylation. Cependant, l'isolement du préalmazole C, précurseur biogénétique potentiel de l'almazole C, laisse supposer que l'almazole C peut être issu d'une voie biogénétique différente de celle de l'almazole D. La sensibilité de l'almazole C à la lumière a également permis de confirmer que la coupure oxydative du pyrrole peut être faite après irradiation solaire, conduisant ainsi à l'almazole A qui se transforme ensuite après déformylation en almazole B. Cette transformation chimique a été faite au laboratoire.

Dans la troisième partie, nous avons, à partir de l'extrait brut du *Guiera senegalensis* isolé puis purifié un naphthopyranone dont la structure a été déterminée à partir de méthodes spectroscopiques. Par la suite, les propriétés photochimiques de ce composé ont été déterminées. Après l'optimisation des conditions analytiques nous avons étudié la stabilité de la molécule vis-à-vis de la lumière par irradiation.

Dans la quatrième partie consacrée à la gorgone *Eunicella labiata*, nous avons identifié à partir de l'extrait brut plus d'une vingtaine d'acides gras saturés et polyinsaturés au moyen de la masse couplée avec la HPLC. Après isolement et purification par HPLC, nous avons identifié un acide gras polyinsaturé avec deux doubles liaisons conjuguées et un hydroxyle. Ce qui est rare. Nous avons également isolé et établi la structure d'une série de sept céramides homologues dont la chaîne acyle est issue de l'acide arachidonique hydroxylé sur le carbone 2.

Un extrait de ce travail issu de la deuxième partie a fait l'objet d'une publication dans une revue internationale.

## BIBLIOGRAPHIE

1. F. Pietra, «A Secret World. Natural Products of Marine Life », Birkäuser Verlag, Basel, **1990**.
2. Chem. Rev. Marine Natural Products Chemistry, **1993**, 93, N°5.
3. I. Ndiaye, « Intérêts Pharmacologiques des Métabolites Secondaires d'Origine Marine. Chance et Challenge pour l'Afrique ». Conférence plénière à la 2<sup>ème</sup> Journées de la Soachim. Dakar, Août **1996**.
4. G. Guella, I. Mancini, I. NDiaye, F. Pietra, *Helv.Chim. Acta*, **1994**, 77, 1999-2006.
5. I. NDiaye, G. Guella, I. Mancini, F. Pietra, *Tetrahedron lett.*, **1996**, 37, 3049-3050.
6. O. Silva and E. Gomes, journal of Natural Products, **2003**, 66 (3), 447-449.
7. F. Bucar, M. Resch, R. Bauer, M. Burits, E. Knauder, M. Schubert Zsilzvecz, *Pharmazie*, **1998**, 53, 875-878.
8. [www.biotech.spip.ac-rouen.fr](http://www.biotech.spip.ac-rouen.fr) (consulté le 04 Mars 2014)
9. F. Gottling, *Phys. Rev.*, t.27, (**1923**), p 566.
10. E. Gaviola, *Zts. F. Phys.*, t. 35, (**1926**), p. 748.
11. F. Weigert, *Verh.d. Deutch. Phys. Ges.*, t. 23 (**1920**), p. 100
12. [www.educnet.education.fr](http://www.educnet.education.fr)
13. I. NDiaye, G. Guella, G. Chiasera, I. Mancini, F. Pietra, *Tetrahedron lett.*, **1994**, 35, 4827-4830.
14. I. NDiaye, Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Physiques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, **1995**.
15. J. Khalafy, C.E.Svensson, R.H. Prager, M.W. Craig, *Tetrahedron lett.*, **1998**, 39, 5405-5408.
16. A. Coly. Détermination fluorimétrique et fluorimétrique induite photochimiquement de pesticides aromatiques et d'herbicides sulfonyles : effet des milieux organisés, Application analytique à la détermination des traces de pesticides dans l'environnement. Thèse d'Etat (**2001**) UCAD Sénégal.

17. P. Gagnaire, P. Jaulmes, R. Bugarel. Extraction et purification des espèces chimiques, Masson (Ed) Paris (1969)
18. M. Hess, H. Meier, B. Zeeh. Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Masson (Ed) Paris Milan Barcelone Cop (1997).
19. S.E, Douabalé. Contribution à la détermination du taux d'histamine par dosage du complexe orthophataldehyde-histamine en absorption électronique et en spectrofluorimétrie, DEA (2001) UCAD- Sénégal.
20. S.E. Douabalé, M. Dione, A. Coly, A. Tine. Contribution to the determination of histamine rate by measuring out histamine-orthophataldehyde complex in the absorption and fluorescence, *Talanta* 60/2-3 (2003), 581-590.
21. S. Tonsiengsom, PhD, Oregon State University, (2006).
22. F. Miyake, M. Hashimoto, S. Tonsiengsom, K. Yakushijin, D.A. Horne, *Tetrahedron*, (2010), 66, 4888-4893.
23. B. Mbow, I. Ndiaye, A. Coly, A. Tine, *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* (2014), 38, 15-21.
24. J. Kerharo, A. Bouquet, R. Heintz, Le wilinwiga des Mossis ( *Guiera senegalensis*) Lam., ses usages thérapeutiques indigènes et son application au traitement des diarrhées cholériformes. *Communic. soc. Pathol. Exot.*, 12 Novembre (1947). Publiés in *Acta Tropica*, (1948), 5 , n°4 , pp.345-348.
25. J. Kerharo, A. Bouquet, plantes médicinales et tropicales de la Cote d'ivoire, Haute Volta, Vugot dépositaire, Paris, (1950), Vol 1, 297.
26. J. CAIMENT-LE-BLONDE. contributions à l'étude des plantes médicinales d'AOF et d'AEF, Thèse doct.Pharm.,Paris, (1957).
27. M. Koumaré Contribution à l'étude pharmacologique du Nguer(*G.S-Lam.*, Combretacée). Théses doct. Pharm., Toulouse, (1968).
28. M. Koumaré, J. Gros, G. Pitet, Recherches sur les constituants chimiques du *Guiera senegalensis* ( *Combrétacées*). *Plantes Méd. Phytothér.*, (1968), 2 ,204-209.

- 29.** N. El Hadi Mahmoud and A. Sami Khalid, *Phytochemistry*, (1997), 46(4), 793-794.
- 30.** L. Merlini , “Advances in heterocyclic chemistry”. Ed. A.R. Katritzky and A.J. Boulton, New York : Academic Press, (1975), Vol. 18., 98;159.
- 31.** E.E. Schweizer, D. Meeder-Nycz, “The chemistry of heterocyclic compounds” ed. G.P. Ellis, New York : Willey, Vol. 31, (1977), 11;139.
- 32.** D. Leung-Tack, N° spécial « Environnement Africain » p. 118, Edit. J. M. Kornprobst, Enda T. M., Dakar, (1983).
- 33.** R. Sourie, Mémoires de l’Ifan, (1954), 38.
- 34.** I. Ndiaye, M. Diop, A. Samb, « Original Métabolites Isolated From Senegalese Species of Algae and Sponges » 6 th International Chemistry Conference in Africa: Chemistry in health, industry and the environment Accra (Ghana) 31 st July – 4 th August (1995).
- 35.** M. Aknin, Thèse de Doctorat d’Etat, Université d’Aix – Marseille III, (1991).
- 36.** M. Cissokho Diop, Thèse de Doctorat d’Etat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, (2003).
- 37.** J. Dumay, Contribution à l’analyse de lipides issus de biomasses marines en vue de la recherche de molécules à activité biologique. Diplôme de l’Ecole Pratique des Hautes Etudes. Paris, (2003), 22-37.
- 38.** J.E. Kinsella, Foods lipids and fatty acids : Importance in food quality, nutrition and health. *Food Technol.*, (1988), 124-145.
- 39.** [www.polyprepas.com](http://www.polyprepas.com) ( consulté le 04Mars 2014)
- 40.** C. Fasano, A. Hiol, J.P. Miolan, and J.P. Niel, Sphingolipids, vehicle for pathogenic agents and cause of genetic diseases. *Med Sci (Paris)*, (2006), 22, 411-415.
- 41.** [www.webpeda.ac-montpellier.fr](http://www.webpeda.ac-montpellier.fr) (consulté le 04Mars 2014)
- 42.** D. Joseph, *Progress Lipid Res.*, (1979), 18, pp. 1-30.
- 43.** P. Fishman , R. Brady, Biosynthesis and function of gangliosides ; *Science* (1976) ; 194 : 906-15.

44. E. Ayanoglu , S. Popov, J. Kornprobst , A. Aboucl-Biehara , C. Djerassi . *Lipids*, (1983), 18, pp. 830-836
45. G. Barnathan, J. Mirallès, E. Gaydou, N. Boury-Esnault, J. Korprobst, 27, pp. 79-784 (1992).
46. J. Mirallès, M. Diop, A. Ferrer, J. Korprobst, *Comp. Biochem. Physiol.*, (1989) 94B, pp. 91-97.
47. M. Diop, D. Leung-Taek, J. C. Breakman, J. Kornprobst, *Biochem.*, (1986), 14, 2, pp. 151-154.
48. J. Mirallès, M. Diop, A. Ferrer, J. Korprobst. *Comp. Biochem. Physiol.*, 893(2), pp. 209-212 (1988).
49. G. F. Gibbons, L. J. Goad, T. J. Goodwin, *Phytochemistry*, (1988), 7, pp.983-988.
50. R. Devillard, thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse III-Paul Sabatier, (2011).
51. S. Araki, T. Sakurai , T. Omata, A. Kawagushi, N. Murata N. *Jap. J. Phycol. (Sôrui)*, (1986), 34, pp. 94-100.
52. S.T. Pruett, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C.A. Haynes, M.C. Sullards, D.C. Liotta and A.H. Merrill, Jr., Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J. Lipid Res.*, (2008), 49, 1621-1639.
53. T. Hori, M. Sugita, « Sphingolipids in lower animals », *Progress in Lipid Research*, (1993), 32, 25-45.
54. J. H. Weil, *Biochimie Générale*, Masson (Ed) Paris, New-York, Barcelone, Milan, (1979), pp. 216-225
55. Edward E. Smissman et al., *JOU*. (1964), 29, 3517-3520.
56. F. Cafieri, E. Fattorusso, *Liebigs Ann.Chem.*, (1990), 1141
57. I. Mancini, G. Guella, C. Debitus, F. Pietra, *Helv. Chem. Acta.*, (1994), 77, 51.
58. M. Sissokho DIOP, A. Samb, *C. R. Chimie*, (2004), 7, 965-971.

## BEDIE MBOW

**TITRE : DETERMINATION STRUCTURALE ET ETUDE DES PROPRIETES FLUORESCENTES ET PHOTOCHEMIQUES DE METABOLITES ISOLES A PARTIR DE *HARALDIOPHYLLUM SP*, *GUIERA SENEGALENSIS* ET *EUNICELLA LABIATA***

**THESE DE DOCTORAT DE CHIMIE MOLECULAIRE (OPTION : CHIMIE ORGANIQUE)**

**DATE ET LIEU DE SOUTENANCE:** 01 Août 2015 à la FST/ UCAD

### *JURY*

|                              |   |  |                                    |
|------------------------------|---|--|------------------------------------|
| <b>Président :</b>           | M. Mohamed<br>Lamine Gaye                                   | Professeur   | FST/UCAD                           |
| <b>Rapporteurs :</b>         | M. Lamine Cissé<br>M. Djibril Fall<br>M. Aboubacary<br>Sène | Maître de Conférences<br>Professeur<br>Maître de Conférences | FST/UCAD<br>FMPOS/UCAD<br>FST/UCAD |
| <b>Examineur</b>             | M. Alphonse Tine  | Professeur   | FST/UCAD                           |
| <b>Co-Directeur de thèse</b> | M. Atanasse Coly  | Professeur   | FST/UCAD                           |
| <b>Directeur de thèse</b>    | M. Ibrahima Ndiaye  | Maître de Conférences  | FST/UCAD                           |

### *RESUME*

Le travail exposé dans cette thèse concerne l'isolement, l'identification structurale et l'étude des propriétés photophysiques d'une algue marine (*Haraldiophyllum sp.*), d'une gorgone (*Eunicella labiata*) et d'une plante médicinale terrestre (*Guiera senegalensis*). L'étude de la photodégradation de l'almazole D et C qui sont des alcaloïdes indoliques très fluorescents isolés de *Haraldiophyllum sp.*, révèle une plus grande stabilité de l'almazole D par rapport à l'almazole C vis-à-vis de la lumière. Au cours de l'irradiation de l'almazole D, on constate la conversion photochimique de l'almazole D en almazole C après une réaction de décarboxylation. Cette conversion confirme la nouvelle structure révisée de l'almazole D proposée par une équipe américaine. Un nouveau schéma de biogénèse des almazoles de cet algue a été proposé. A partir de l'extrait brut de *Guiera senegalensis*, nous avons isolé puis identifié un naphthopyranne dont les propriétés photophysiques ont été déterminées et la stabilité de la molécule vis-à-vis de la lumière étudiée après irradiation. A partir de la gorgone *Eunicella labiata*, nous avons identifié à partir de l'extrait brut plus d'une vingtaine d'acides gras saturés et polyinsaturés au moyen de la masse couplée avec la HPLC. Nous avons aussi identifié un acide gras polyinsaturé portant un hydroxyle et deux doubles liaisons conjuguées ainsi qu'une série de sept céramides homologues dont la chaîne acyle est issue de l'acide arachidonique.

**MOTS CLES:** almazoles, naphthopyranne, acides gras, céramides, Analyse par fluorescence, métabolites secondaires, *Haraldiophyllum sp*, *Guiera senegalensis*, *Eunicella labiata*.