

# **ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES CYCLOPEPTIDES DU LATEX DE *Jatropha***

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche et d'études de cyclopeptides d'origine végétale visant à mettre en évidence des peptides cycliques de structure originale et d'en évaluer des propriétés biologiques, comme antibiotique, antiparasitaire, cytotoxique et immunomodulateur.

Il a porté sur le latex de *Jatropha integerrima* Euphorbiaceae

## **I- COLLECTE DU MATERIEL VEGETAL**

Le latex (50 ml) a été collecté au niveau du jardin des plantes de l'Hôtel Méridien-Président et du jardin botanique de la Faculté des Sciences et Techniques, par incision au niveau des feuilles et des tiges en novembre 2004. Il se présente sous forme de liquide blanchâtre, un peu visqueux. Il est immédiatement conservé à froid à 8° C.

## **II- EXTRACTION ET ISOLEMENT DES CYCLOPEPTIDES**

Le latex de *Jatropha integerrima* est repris par 200 ml d'eau distillée. Le mélange eau + latex est introduit dans une ampoule à décanter contenant 250 ml d'acétate d'éthyle. Après agitation énergique, la phase organique (acétate d'éthyle) contenant les cyclopeptides est récupérée et évaporée à sec. Cette opération est répétée trois fois et a donné un extrait organique brut.

## **III- SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES**

La phase organique est évaporée à sec et est analysée par chromatographie sur couche mince (CCM). Les peptides sont repérés durant les différentes étapes de l'isolement et de purification par CCM sur gel de silice Merk 60F<sub>254</sub> (0,2 mm, support aluminium) avec comme solvant de migration un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90/10 ou 85/15). La détection des peptides cycliques se fait par la coloration au chlore/ortho-tolidine.

### **III-1- Chlore/ortho-tolidine**

Cette méthode de coloration permet de révéler les composés peptidiques par la formation d'une coloration bleue. Ce réactif est sélectif des substances contenant le groupement amide -NH-CO- qui donne une couleur bleue après conversion en chloramide. Il est utilisé pour révéler les cyclopeptides qui sont dépourvus des extrémités N-terminales libres.

Cette technique de coloration se déroule en deux étapes.

#### **a- Chloration**

La plaque est placée pendant 15 mn dans un milieu contenant du chlore formé *in situ* par la réaction de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré sur des cristaux de permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>).

#### **b- Révélation**

Après élimination de l'excès de chlore sur la plaque, celle-ci est immergée dans une solution aqueuse d'ortho-tolidine dont la composition est la suivante : 80 mg d'ortho-tolidine, 15 ml d'acide acétique, 0,5 mg d'iodure de potassium et compléter à 200 ml d'eau distillée.

### **III-2- CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'EXCLUSION STERIQUE**

La fraction brute de masse m=280 mg est dissoute dans 3 ml de méthanol. L'ensemble est soumis à une chromatographie sur colonne d'exclusion stérique sur gel de Séphadex LH20 (Pharmacia Biotech, limite d'exclusion pour M > 1000 Da).

L'élution est réalisée avec du méthanol. Les cyclopeptides sont des molécules de grande taille (600-1000 Da) et sont en général récupérés dans les fractions de tête. Cette étape permet d'éliminer une grande partie des molécules de petite taille et de réduire le nombre de chromatographie sur gel de silice. On procède parallèlement à une CCM pour identifier les fractions contenant les cyclopeptides par l'apparition de spots bleus sur le chromatogramme.

Il est judicieux à ce moment de faire une étude par RMN pour confirmer la présence de cyclopeptides dans ces fractions par l'observation des protons amides sur le spectre RMN. Les différentes fractions de tête contenant les cyclopeptides sont regroupées puis évaporées à sec. L'extrait peptidique obtenu est pesé  $m = 140$  mg.

### ***III-3- Chromatographie sur colonne de gel de silice SiO<sub>2</sub>***

Les conditions d'élution ont été déterminées au préalable sur CCM puis transposées pour la chromatographie sur colonne. La colonne est éluée avec un système de gradient de solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Il sera nécessaire de procéder à plusieurs chromatographies sur colonne gel de silice à cause de nombreuses autres substances qui sont extraites par l'acétate d'éthyle. Les fractions donnant des spots bleus, bien individualisés par CCM, avec o-tolidine comme système de révélation sont ensuite utilisées pour la CLHP. Une masse de 80 mg a été obtenue après chromatographie sur colonne gel de silice.

### ***III-4- Séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)***

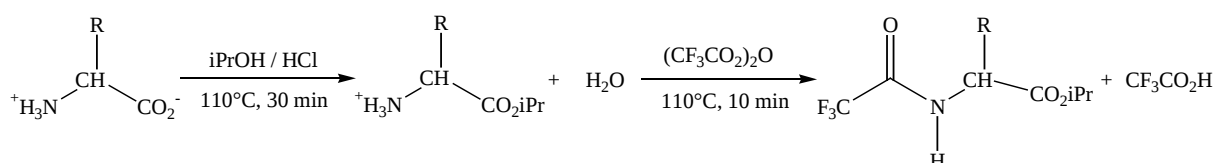
La fraction peptidique obtenue après chromatographie sur gel de silice SiO<sub>2</sub> ( $m = 80$  mg) est soumise à différentes étapes de chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse (surface non polaire et une phase mobile polaire) sur un appareil Merck équipé d'une pompe L-6200, d'un injecteur automatique AS-2000 muni d'une boucle d'injection de 100  $\mu$ l et d'un détecteur UV-L4000 réglé à 220 nm et connecté à un enregistreur GILSON NI. Les solvants utilisés sont préalablement dégazés par filtration sur une membrane nylon de 0,45  $\mu$ m. Les séparations sont réalisées sur colonne semi-préparative (débit 2 ml/min) de type Kromasil C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, longueur 250 nm, diamètre 7,8 mm, AIT France).

On effectue d'abord une chromatographie en gradient de concentration méthanol/eau (débit de 2 ml/min ; volume injecté 80  $\mu$ l, sensibilité 2,5 ou 1.0) afin de déterminer les conditions d'obtention des différents produits puis une chromatographie dans des conditions isocratiques (72/28) pour optimiser la purification.

Ainsi la fraction peptidique de *Jatropha integerrima* a donné deux peptides correspondants à deux pics chromatographiques observés sur le chromatogramme. Ces deux composés sont dénommés intégerrimacyclopeptide A (tr : 18,8 min ;  $m = 12$  mg) et intégerrimacyclopeptide B (tr : 20,5 min ;  $m = 7$  mg).

#### IV- DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET DE LA CHIRALITE

Les différents peptides cycliques ont été hydrolysés en milieu acide (HCl 6 N, 110 °C, 24 heures) puis les amino acides vont subir une estérification de la fonction carboxylique par l'alcool isopropylique et une condensation de la fonction amine sur l'anhydride trifluoroacétique.



**Figure 9:** Conversion des résidus en esters isopropyliques de N-trifluoroacétyl-aminoacides.

Les esters propyliques de N-trifluoroacétyl-aminoacides sont analysés par CPG et les différents acides aminés sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des acides aminés de référence dérivés dans les mêmes conditions ; le premier chiffre indique le temps de rétention de la série *D* et le deuxième chiffre correspond au temps de rétention de la série *L* : *L*-Gly (14,6) ; *DL*-Thr (14,5 ;15,2) ; *DL*-Ile (16,2 ;16,9) ; *DL*-Pro (18,0 ;18,2) ; *DL*-Ser (18,2 ;18,8) et *DL*-Leu (18,1 ;19,2).

Tous les acides aminés des deux peptides cycliques ont une configuration de type *L*. La composition en acides aminés d'intégerrimacyclopeptide A (*m/z* 766) a permis de noter la présence de trois résidus de Ile, de deux résidus de Leu, de deux résidus de Gly et d'une Ser, par contre intégerrimacyclopeptide B (*m/z* 651) est composé de deux résidus de Ile, de deux Gly, d'une Leu, d'une Thr et d'une Pro en relation avec les masses des différents peptides cycliques.

#### V– CYTOTOXICITE SUR LES CELLULES CANCEREUSES DU NASOPHARYNX HUMAIN KB

Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés sur des lignées cancéreuses du nasopharynx humain KB à l'institut de chimie des substances naturelles (ICSN-CNRS ; Gif-sur-Yvette) par une méthode colorimétrique décrite par Scudiero et *al.* La concentration (IC<sub>50</sub>) correspondant à 50% d'inhibition de la croissance cellulaire est déduite. Selon les auteurs Geran et *al.*, un composé pur ayant une IC<sub>50</sub> inférieure à 4 µg/ml est considéré comme actif.

## CONCLUSION

Intégerrimacyclopeptide A ( $0,46 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ ) et intégerrimacyclopeptide B ( $0,66 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ ) ont présenté une importante activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses du nasopharynx humain KB.

