

LISTE DES ABREVIATIONS COMMUNES ET UNITES

AcOEt	Acétate d'éthyle
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
COSY	COrrrelated SpectroscopY
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ESI	Electro Spray Ionisation « ionisation par électronébulisation »
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
i-PrOH	Isopropanol
MeOH	Méthanol
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
ROESY	Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
ppm	partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
t_R	Temps de rétention
TOCSY	TOtal Correlated SpectroscopY
UV	Ultra-Violet

SOMMAIRE

DEDICACES-----	II
REMERCIEMENTS -----	III
LISTE DES ABREVIATIONS COMMUNES ET UNITES-----	V
SOMMAIRE -----	VI
INTRODUCTION -----	1
CHAPITRE I - ASPECTS BOTANQUES ET PHYSICOCHEMISQUES DES EUPHORBIACEAE-----	2
I - CLASSIFICATION DE LA FAMILLE DES EUPHORBIACEAE -----	2
I-1 – <i>Le genre Jatropha</i> -----	2
I-2- <i>Jatropha integerrima</i> -----	2
II- TRAVAUX ANTERIEURS -----	3
II-1- <i>Constituants chimiques</i> -----	3
a- Les tanins -----	3
b- Les flavonoïdes -----	3
c- Autres produits-----	4
II-2 - <i>Recherches ethnopharmacologiques</i> -----	4
CHAPITRE II - LES CYCLOPEPTIDES NATURELS -----	5
GENERALITES -----	5
I- LES CYCLODIPEPTIDES OU DICETO – 2,5 - PIPERAZINES. -----	5
II- LES CYCLOTRIPEPTIDES -----	6
III– LES CYCLOTETRAPEPTIDES-----	6
IV- LES CYCLOPENTAPEPTIDES -----	7
V- LES CYCLOHEXAPEPTIDES -----	8
VI- LES CYCLOHEPTAPEPTIDES -----	8
VII- LES CYCLOOCTAPEPTIDES -----	9
VIII- LES CYCLONONAPEPTIDES ET HOMOLOGUES SUPERIEURS -----	10
CHAPITRE III - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES CYCLOPEPTIDES DU LATEX DE <i>JATROPHA</i> -----	12
I- COLLECTE DU MATERIEL VEGETAL -----	12
II- EXTRACTION ET ISOLEMENT DES CYCLOPEPTIDES -----	12
III- SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES -----	12
III-1- <i>Chlore/ortho-tolidine</i> -----	13
a- Chloration -----	13
b- Révélation -----	13
III-2- <i>Chromatographie sur colonne d'exclusion stérique</i> -----	13
III-3- <i>Chromatographie sur colonne de gel de silice SiO₂</i> -----	14
III-4- <i>Séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)</i> -----	14
IV- DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET DE LA CHIRALITE-----	15
V– CYTOTOXICITE SUR LES CELLULES CANCEREUSES DU NASOPHARYNX HUMAIN KB -----	15
CONCLUSION-----	16

CHAPITRE IV - ETUDE SEQUENTIELLE DE PEPTIDES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE -----	18
I- GENERALITES -----	18
II- SEQUENÇAGE DE PEPTIDES CYCLIQUES-----	18
II-1- Spectre de masse ESI-Q-TOF de intégerrimacyclopeptide A-----	21
II-2- Fragmentation de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ -----	21
II-3-Séquençage de intégerrimacyclopeptide B -----	23
CONCLUSION-----	25
 CHAPITRE V - SEQUENÇAGE DES CYCLOPEPTIDES PAR RMN 2D -----	26
I- DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE INTEGERRIMACYCLOPEPTIDE A-----	26
I-1- Analyse des spectres -----	26
I-2- Attributions des signaux de ^{13}C -----	28
I-3- Détermination de la séquence par HMBC -----	30
I-4- Séquençage de intégerrimacyclopeptide A selon la stratégie de Wüthrich -----	32
I-5- Détermination de la structure primaire de intégerrimacyclopeptide B -----	33
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES -----	38
BIBLIOGRAPHIE-----	40

INTRODUCTION

La découverte de nouveaux médicaments est liée aux produits naturels isolés de plantes, sources importantes de substances biologiquement actives, soit sous leur forme native soit comme modèles pour la synthèse de nouvelles molécules.

Parmi ces substances naturelles, les cyclopeptides constituent un groupe important car ils sont doués de propriétés biologiques variées. Ils sont biosynthétisés pour la plupart d'organismes vivants, microorganismes, plantes et animaux. La gramicidine S est un cyclopeptide antibactérien produit par différentes souches de *Bacillus*, alors qu'à partir d'un champignon phytopathogène *Alternaria tenuis* a été isolée la tentoxine impliquée dans les interactions toxiques. Un autre champignon microscopique *Tolypocladium inflatum* a produit la cyclosporine A qui joue un rôle important dans les phénomènes de rejet de greffes d'organes.

L'isolement des premiers cyclopeptides des plantes supérieures a débuté avec la découverte des hétérophyllines A et B par Tan et *al.*. Depuis, plusieurs composés de 1 à 31 résidus ont été isolés de plusieurs familles de plantes : Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Labiateae, Rhamnaceae et Rubiaceae.

Dans le genre *Jatropha*, des peptides cycliques de 6, 7, 8 et 9 résidus ont été isolés avec les travaux de Baraguey et *al.* et de Horsten et *al.*

Pour notre contribution à l'étude des cyclopeptides des plantes, nous avons procédé dans ce travail de DEA à l'isolement et à la purification des cyclopeptides du latex de *Jatropha integerrima* et deux produits nouveaux de 7 et 8 résidus amino acides ont été obtenus. Les séquences ont été réalisées par spectrométrie de masse en tandem (MS / MS) et par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions, homo et hétéronucléaire (^1H et ^{13}C). Tous les peptides isolés ont ensuite été soumis à des tests biologiques afin de déterminer leurs propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales.

CHAPITRE I - ASPECTS BOTANQUES ET PHYSICOCIMIQUES DES EUPHORBIACEAE

I - CLASSIFICATION DE LA FAMILLE DES EUPHORBIACEAE

La famille des Euphorbiaceae appartient à l'ordre des Euphorbiales, à la sous classe des Dialypétales et à la classe des Dicotylédones. Cette famille hétérogène est représentée par des arbres, arbustes et des espèces cactiformes. Elle est caractérisée par des carpelles soudés et fermés, des fleurs unisexuées, des fruits généralement tricoques. La famille des Euphorbiaceae est composée de 8 000 à 10 000 espèces (Kerharo J. et Adam J.G., 1974) dont 85 espèces ont été décrites au Sénégal (Berhaut J., 1975).

Certaines espèces sont exploitées pour leurs valeurs nutritionnelle et industrielle et d'autres sont utilisées dans la pharmacopée traditionnelle. *Jatropha multifida* et *Euphorbia pulcherima* sont utilisés comme plantes ornementales alors que *Hevea brasiliensis* fournit du caoutchouc. *Ricinus communis* fournit de l'huile de Ricin et le manioc, *Manihot esculenta*, est un aliment largement consommé en Afrique.

I-1 – Le genre Jatropha

Le genre *Jatropha* comprend environ 160 espèces originaires d'Amérique centrale et du sud. Les plus connues sont :

- *Jatropha curcas* : la graine fournit une huile utilisée comme biocarburant et comme colorant.
- *Jatropha gossypifolia* : l'huile est purgative et la racine est utilisée contre la lèpre.
- *Jatropha podagrica* et *Jatropha integerrima* : plantes ornementales très utilisées.
- *Jatropha multifida* ou arbre corail : les feuilles sont consommées au Mexique.

I-2- Jatropha integerrima

Encore appelée *Jatropha hastata* en raison de la forme des feuilles qui sont hastées. Elle est originaire des Antilles plus particulièrement de Cuba. Cette espèce se trouve dans de

nombreuses régions : USA, Afrique. Elle est cultivée pour son utilisation comme plante ornementale. C'est un arbuste toujours vert pouvant atteindre 3 m de haut caractérisé par des feuilles persistantes, simples et fasciculées, une inflorescence habituellement constituée en 4 à 5 fleurs à base commune et des fleurs lumineuses en groupe, rotationnelles symétriques rouges.



II- TRAVAUX ANTERIEURS

II-1- Constituants chimiques

Ces travaux ont permis de mettre en évidence des substances chimiques variées portant sur les différentes parties de la plante.

a- Les tanins

Plusieurs auteurs ont signalé la présence de tanins dans les parties antérieures de la plante (feuilles, fleurs).

b- Les flavonoïdes

Ils ont été isolés de l'extrait hydroalcoolique de la plante totale.

c- Autres produits

De nombreux autres produits naturels ont été isolés de *Jatropha integerrima* tels que les acides aminés, les stérols, les alcaloïdes et les monoterpènes.

La richesse de *Jatropha integerrima* en produits chimiques divers justifie les nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques.

II-2 - Recherches ethnopharmacologiques

De nombreuses propriétés biologiques (antidiarrhéiques, anti-infectieuses et antibactériennes) ont été décrites pour les différentes parties de la plante. Le décocté de la plante entière est proposé dans le traitement des diarrhées et de la dysenterie. L'extrait hydroalcoolique des feuilles et des tiges est actif sur *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* et sur certains parasites tels que le *Plasmodium falciparum*. Une activité anti-inflammatoire (traitement de brûlure) et une activité coagulante de l'extrait aqueux ont été décrites par Adjanouhoune.

CHAPITRE II - LES CYCLOPEPTIDES NATURELS

GENERALITES

Les cyclopeptides naturels sont des composés doués de propriétés biologiques comme antibiotiques, comme toxines, comme hormones mais aussi comme agents de transport ionique (Ovchinnikov et *al.*, 1975). Des travaux antérieurs ont fait apparaître des propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales et une activité immunomodulatrice en particulier immunosuppressive. Ces composés sont aussi caractérisés par une diversité de leurs séquences (nature des acides aminés impliqués, taille des cycles, mode d'enchaînement séquentiel) et par une variété de leurs structures tridimensionnelles. Nous allons décrire brièvement les principaux types de cyclopeptides naturels, leur répartition dans les organismes vivants et leurs intérêts biologiques en les classant par la taille du cycle peptidique. Il convient de noter la variété des organismes producteurs, microorganismes bactéries et champignons, plantes, invertébrés terrestres et marins. Les cyclopeptides naturels sont formés selon les organismes producteurs, soit uniquement d'acides aminés protéinogènes donc de la série *L*, soit d'alternance d'acides aminés *D* et *L*, soit encore d'acides aminés non protéinogènes de structures variées.

I- LES CYCLODIPEPTIDES OU DICETO – 2,5 - PIPERAZINES.

Les cyclopeptides formés de deux acides aminés comportent deux liaisons amides et sont aussi appelés dicéto-2,5-pipérazines. Ils sont souvent biosynthétisés par des champignons filamenteux et dans de nombreux organismes marins (éponges). Ils sont souvent des phytotoxines ou des mycotoxines (Prasar, 1995).

Le représentant typique est la gliotoxine, mycotoxine produite par plusieurs champignons pathogènes tels *Gliocladium virens* et *Aspergillus fumigatus*.

La gliotoxine présente dans sa structure un pont disulfure et se caractérise par une diversité de propriétés biologiques : antifongique, antibactérienne, antivirale et immunomodulatrice, mais sa toxicité empêche son utilisation thérapeutique (Waring et *al.*, 1996, Haraguchi et *al.*, 1997).

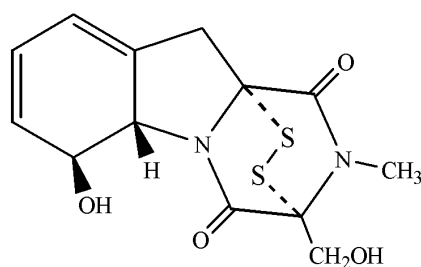


Figure 1 : Structure de la gliotoxine

II- LES CYCLOTRIPEPTIDES

La plupart des cyclotripeptides décrits dans la littérature sont en réalité des cyclopeptides alcaloïdes produits soit par des plantes de la famille des Rhamnaceae comme la frangulanine de *Zizyphus lotus*, ou d'éponges marines comme l'euryпамide A de *Microciona eurypa*.

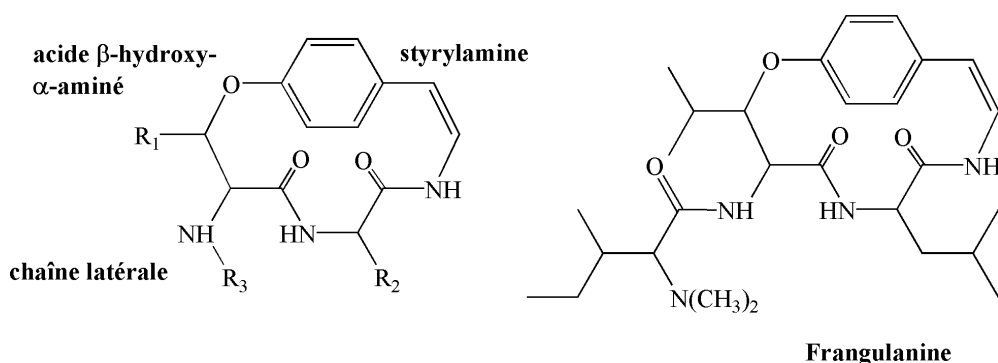


Figure 2: Motifs caractéristiques des cyclopeptides-alcaloïdes, exemple de la frangulanine

III- LES CYCLOTETRAPEPTIDES

Un nombre important de phytotoxines fongiques sont des tétrapeptides cycliques. C'est le cas de la tentoxine, peptide cyclique à quatre résidus possédant des acides aminés N-substitués incluant un α , β déshydroamino acide et portant des chaînes latérales alkylées et aromatisées (Meyer et al., 1975, 1983). Elle est produite par *Alternaria tenuis*, un champignon phytopathogène responsable de chlorose chez les plantes.

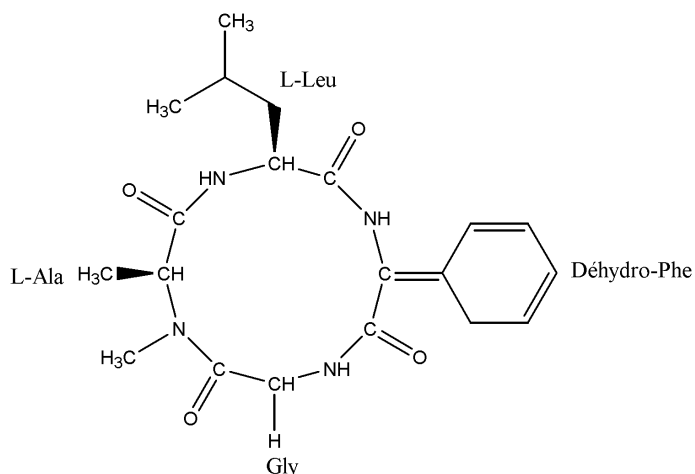


Figure 3 : Structure de la tentoxine

IV- LES CYCLOPENTAPEPTIDES

Plusieurs cyclopentapeptides ont été extraits des plantes de la famille des Caryophyllaceae et ont fait l'objet d'études biologiques et conformationnelles.

Ainsi, la pseudostellarine A, isolée des racines de *Pseudostellaria heterophylla*, présente une forte activité inhibitrice de la tyrosinase et de la production de mélanine (Morita et al., 1994 a et d). Les ségétalines G et H issues de graines de *Vaccaria segetalis* sont des peptides présentant une activité œstrogène chez le rat, activité qui est perdue par linéarisation du peptide (Morita et al., 1997).

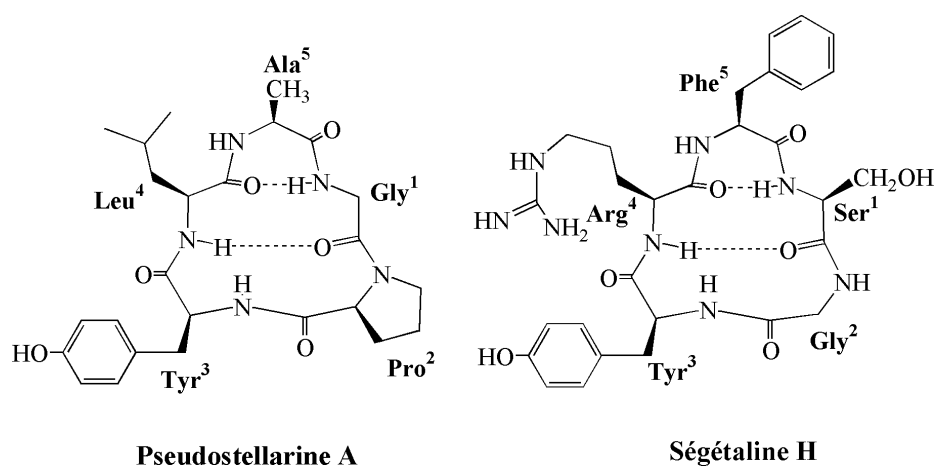


Figure 4 : Structure de la pseudostellarine A et de la ségétaline H (les traits discontinus représentent les liaisons hydrogène intramoléculaires)

V- LES CYCLOHEXAPEPTIDES

De nombreux cyclohexapeptides ont été caractérisés chez les microorganismes, les invertébrés marins et les plantes supérieures. Ainsi, des cyclohexapeptides ne comportant que des acides aminés protéinogènes ont été isolés de la famille des Caryophyllaceae et des graines d'Annonaceae. A titre d'exemple nous citerons l'annomuricatine C et le cherimolacyclopeptide A isolés respectivement des graines d'*Annona muricata* (carosol) et d'*A. cherimola* (chérimolier). Ces deux composés sont doués d'une activité cytotoxique antitumorale sur les cellules cancéreuses KB. (Wélé et *al.*, 2002, 2005)

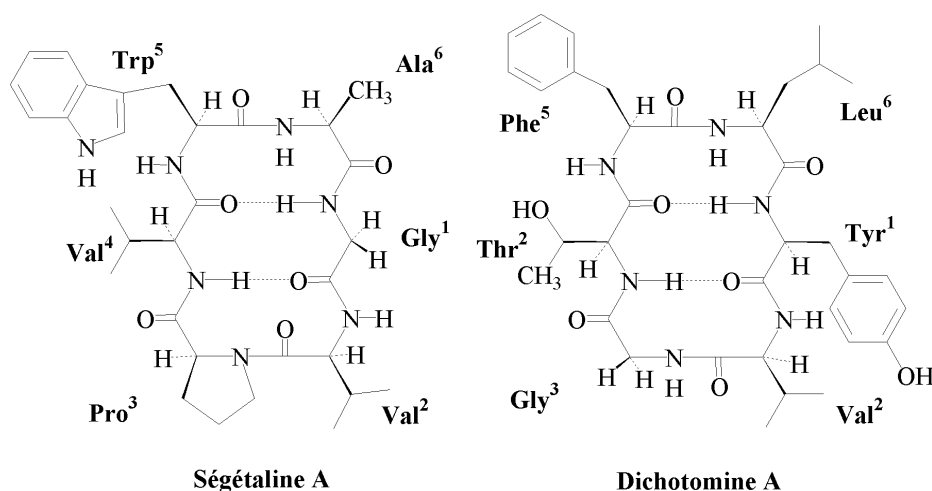


Figure 5 : Structures de la ségétaline A et de la dichotomine A isolées de *Vaccaria segetalis* et de *Stellaria dichotoma*.

VI- LES CYCLOHEPTAPEPTIDES

Les cyclopeptides de sept résidus forment une classe relativement importante et ont été isolés de microorganismes, d'organismes marins et de plantes supérieures. Plusieurs d'entre eux ont été isolés de la famille des Caryophyllaceae, des Euphorbiaceae et de la famille des Annonaceae. Le genre *Jatropha* de la famille des Euphorbiaceae renferme plusieurs heptapeptides. C'est le cas de la cyclogossine A de *Jatropha gossypifolia* (Horsten et *al.*, 1996) de la podacycline B de *Jatropha podagrica* (Van der Berg et *al.*, 1996), des mahafacyclines A et B de *Jatropha mahafalensis* (Baraguey et *al.*, 2000, 2001) et des pohlianines A et B de *Jatropha pohliana* (Auvin et *al.*, 1999). Une activité antipaludique modérée sur *Plasmodium falciparum* a été observée pour les mahafacyclines A et B et les pohlianines A et B avec des IC₅₀ respectivement de 16, 2,25 et 50 µg/ml.

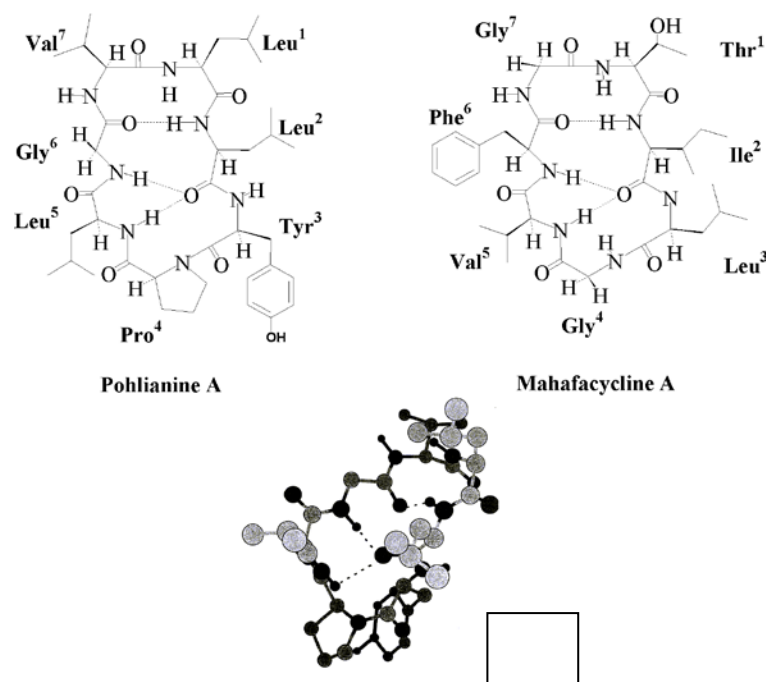


Figure 6 : Conformation privilégiée de la pohlianine A en solution dans le $DMSO-d_6$ (A) et de la mahafacycline A. Les traits en pointillés représentent les liaisons hydrogène intramoléculaires

VII- LES CYCLOOCTAPEPTIDES

Plusieurs cyclooctapeptides ont été isolés de graines de diverses espèces d'Annonaceae par le Docteur Alassane Wélé. C'est le cas des chérimolacyclopeptides A et B et de la cyclosénégaline B doués d'activité cytotoxique antitumorale sur les cellules cancéreuses KB.

Parmi les cyclooctapeptides, le cyclolinopeptide E ou *cyclo*(Pro-Leu-phe-Ile-Mso-Leu-Val-Phe) isolé de *Linum usitatissimum* a montré une activité immunosuppressive importante (Morita *et al.*, 1999).

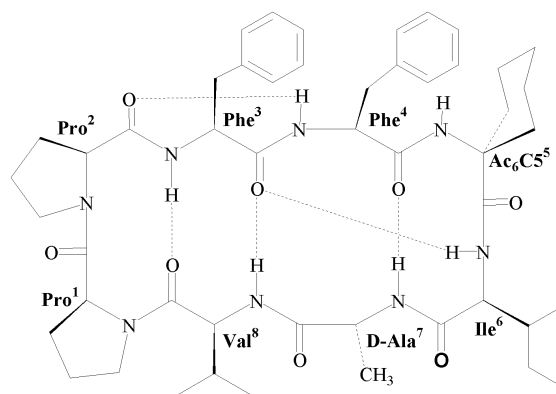


Figure 7 : Structure du peptide de synthèse, analogue du cyclolinopeptide a. les traits en pointilles représentent les liaisons hydrogènes intramoléculaires

VIII- LES CYCLONONAPEPTIDES ET HOMOLOGUES SUPERIEURS

Nous citerons dans cette rubrique, le chérimolacyclopeptide F, cyclonapeptide isolé des graines d'*Annona cherimola* (Wélé et *al.*, 2005).

Le cyclolinopeptide A, renfermant neuf résidus aminoacides, est doué d'une activité immunosuppressive qui est décrite comme comparable à celle de la cyclosporine A. C'est un peptide très hydrophobe dont la séquence est *cyclo*(Pro-Pro-Phe-Phe-Leu-Ile-Ile-Leu-Val) et qui a été isolé des graines du lin, *Linum usitatissimum*. La curcacycline B est un cyclononapeptide isolé du latex de *Jatropha curcas*, une Euphorbiaceae. Curieusement il augmente l'activité rotamase de cette protéine (Auvin et al., 1997).

Un cyclododécapeptide, la cycloléonurine, a été extrait de *Leonurus heterophyllus* et possède une activité immunosuppressive importante.

L'immunosuppresseur le plus important est la cyclosporine A (CSA), un cyclopeptide de onze résidus hydrophobes, isolé d'un champignon microscopique, *Tolypocladium inflatum* par le laboratoire SANDOZ. Elle est devenue un médicament immunosuppresseur majeur utilisé en clinique pour éviter les rejets de greffe d'organes. Sa structure a été déterminée en 1976. Elle inhibe l'activation des lymphocytes T cytotoxiques.

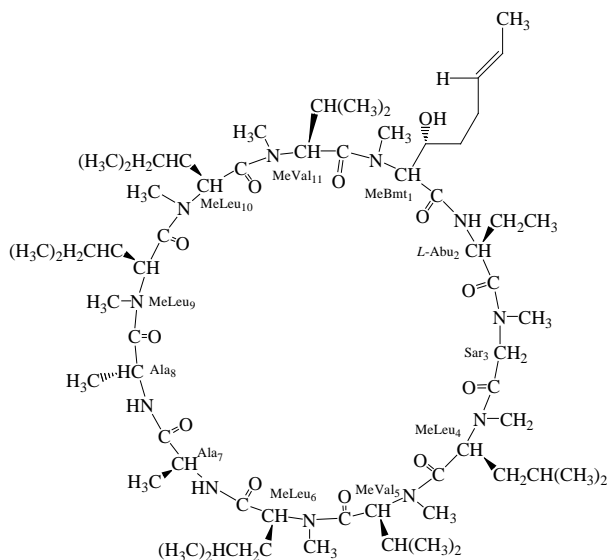


Figure 8 : Structure de la cyclosporine A

Récemment, à partir de deux familles de plantes, les Violaceae et les Rubiaceae, des cyclopeptides comportant un macrocycle d'environ trente (30) résidus et présentant des activités variées ont été isolés. Ce sont les varvpeptides A-H de *Viola arvensis* (Göransson et al., 1999), les cycloviolins A-D extraits de *Leonia cymosa* (Hallock et al., 2000), une autre Violaceae et qui ont présenté une activité anti HIV et les cycloviolacines O₁-O₁₁ de *Viola odorata*. Ces cyclopeptides renferment six cystéines formant trois ponts disulfures. Ces peptides ont de grandes analogies de séquences avec des peptides isolés des Rubiaceae tel le cyclopsychotride A (Withesup et al., 1994), un peptide cyclique de 31 résidus isolé de *Psychotria longipes* qui inhibe la liaison de la neurotensine à son récepteur, telles les circulines A et B issues de l'arbre tropical *Chassalia parvifolia* et qui inhibent la réplication et les effets cytopathogènes du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Gustafson et al., 1994). Parmi les cyclopeptides à large macrocycle et avec des conformations particulières, il convient de mentionner la microcine J25, cyclopeptide de 21 résidus présentant une forte activité antibactérienne et isolé de l'entérobactérie *Escherichia coli* (Blond et al., 2001).

Ce survol bibliographique, non exhaustif, montre les grandes variétés des cyclopeptides naturels : variétés des séquences hydrophobes ou plus ou moins polaires, variétés de la taille des cycles de 2 à 31 résidus et variétés des activités biologiques. Remarquablement ils sont biosynthétisés par de nombreuses classes d'organismes : microorganismes, invertébrés marins et organismes supérieurs dont les plantes.

CHAPITRE III - 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 60F₂₅₄ (0,2 mm, support aluminium) avec comme solvant de migration un mélange CH₂Cl₂/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 (KMnO₄).

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 SiO₂

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 CH₂Cl₂/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 SiO₂ ($m = 80$ 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 μ 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 μ m. Les séparations sont réalisées sur colonne semi-préparative (débit 2 ml/min) de type Kromasil C₁₈ (5 μ m, longueur 250 mm, 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 μ 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.

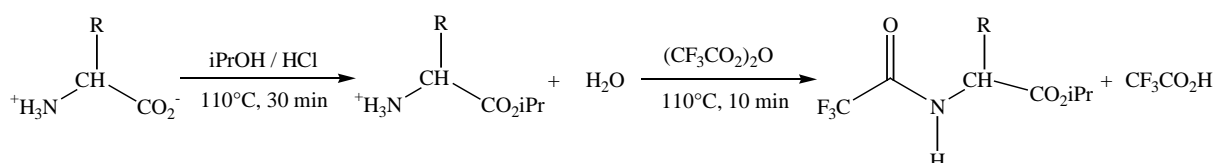


Figure 9: Conversion des résidus en esters isopropyliques de N-trifluoroacétyl-aminoacides.

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).

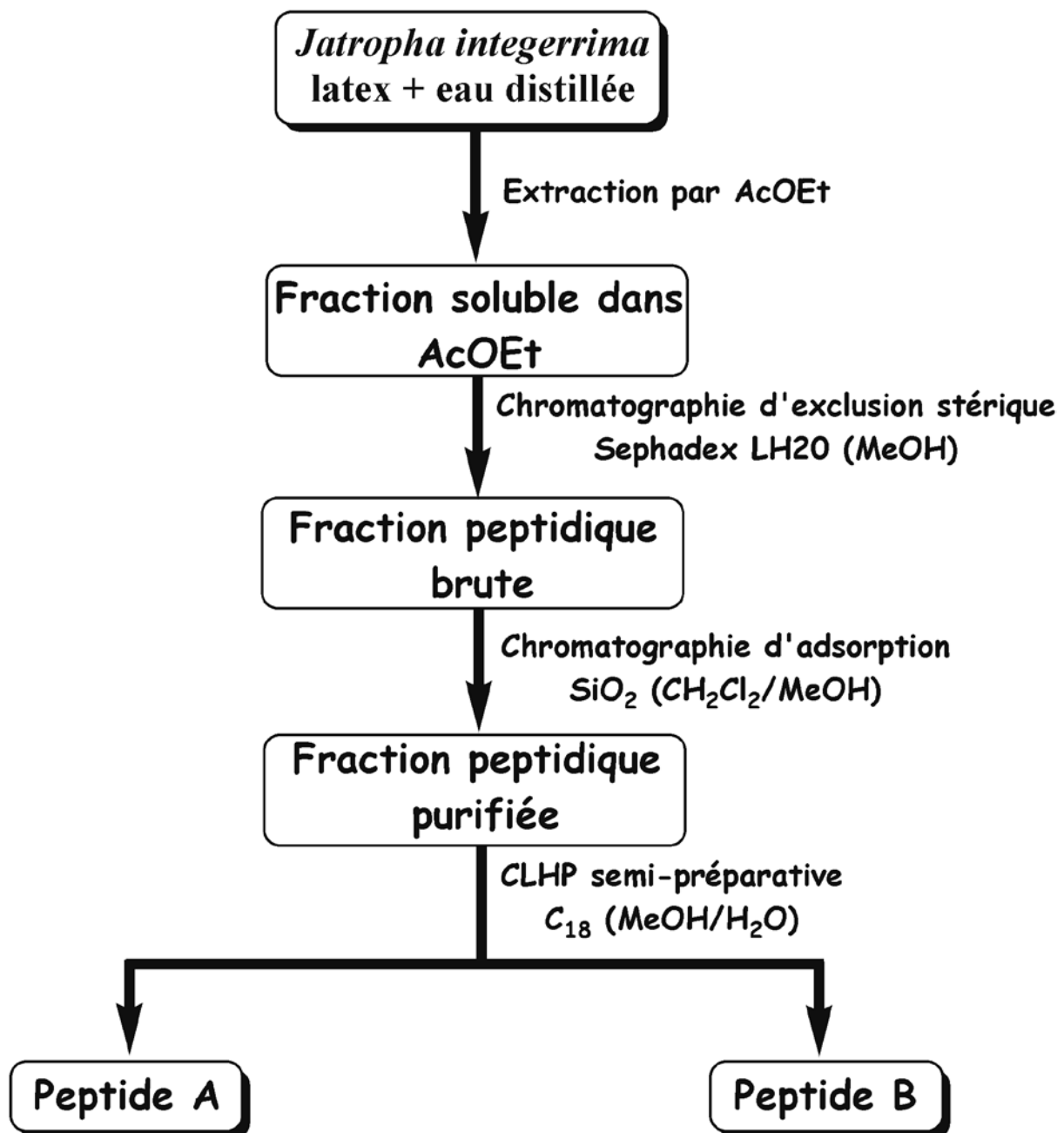
Tous les acides aminés des deux peptides cycliques ont une configuration de type *L*. La composition en acides aminés d'intégerrimacyclopeptide A (*m/z* 766) a permis de noter la présence de trois résidus de Ile, de deux résidus de Leu, de deux résidus de Gly et d'une Ser, par contre intégerrimacyclopeptide 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 (IC₅₀) correspondant à 50% d'inhibition de la croissance cellulaire est déduite. Selon les auteurs Geran et *al.*, un composé pur ayant une IC₅₀ 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.



CHAPITRE IV - ETUDE SEQUENTIELLE DE PEPTIDES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

I- GENERALITES

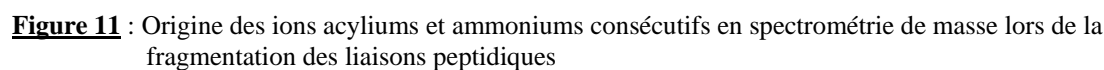
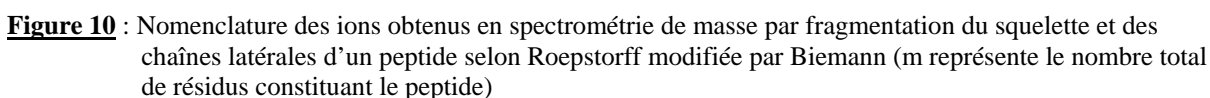
Parmi les méthodes classiques d'analyse séquentielle de peptides linéaires et de protéines, celle d'Edmann est la plus utilisée. Elle consiste à faire réagir en milieu basique l'isothiocyanate de phényle avec le peptide. Le produit formé après clivage en milieu acide est alors la phénylhydantoïne de l'acide aminé N-terminal qui est ainsi identifié par chromatographie. La fonction amine de l'acide aminé suivant étant régénérée, la réaction est répétée successivement pour chaque acide aminé du peptide et la séquence complète est ainsi déterminée. Le séquençage biochimique d'un peptide peut se faire également à partir de l'extrémité C-terminale par l'utilisation d'une carboxypeptidase qui libère l'un après l'autre l'acide aminé C-terminal, lequel est identifié.

Les peptides cycliques et les peptides dont les extrémités C et N terminales sont bloquées ne peuvent pas être séquencés par ces méthodes. Les méthodes spectrométriques (spectrométrie de masse) sont alors des méthodes appropriées.

En spectrométrie de masse, les ions formés par fragmentation d'un cyclopeptide sont nommés selon la nomenclature introduite par Roepstorff (1984) et Biemann (1988). On définit ainsi les ions b_n et y_n issus de la rupture de la liaison amide selon que la charge positive est conservée sur le fragment N-terminal (b_n) ou C-terminal (y_n). De même la rupture de la liaison entre $C\alpha$ et CO conduit à la formation de la série d'ions a_n . La différence de masse entre deux ions consécutifs de la même série b_n ou a_n correspond à la masse du résidu éliminé et permet ainsi de déterminer l'enchaînement des acides aminés, une limite est la difficulté de différencier deux isomères tels que Leu et Ile. Les autres types de fragments sont plus rarement observés.

II- SEQUENÇAGE DE PEPTIDES CYCLIQUES

L'observation des ions quasi-moléculaires $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ sous ionisation ESI (Electro Spray Ionisation) permet de déterminer la masse moléculaire. Par contre le séquençage des peptides cycliques par spectrométrie de masse en tandem MS/MS est très délicat en raison des multiples possibilités de rupture du peptide durant la collision car la protonation se fait aléatoirement sur tous les azotes de la molécule.



Ainsi le cyclopeptide se linéarise pour former autant de peptides linéaires qu'il comporte d'acides aminés. Puis chacun des peptides linéaires formés se fragmente à son tour pour former des séries d'ions b_n , a_n , et y_n . L'interprétation des spectres devient alors difficile voir impossible, par suite de la superposition de l'ensemble des fragmentations. Toutefois, lorsque les cyclopeptides comportent une proline, le caractère basique plus marqué de l'azote amide tertiaire en fait un site de protonation privilégié. On observe une rupture préférentielle de la liaison amide entre la proline et l'acide aminé précédent pour conduire à un peptide linéarisé, unique ou dominant du résidu N-terminal et de la proline. L'analyse de ces fragmentations conduit alors à la détermination de la séquence comme dans le cas des peptides linéaires

(Fig. 12).

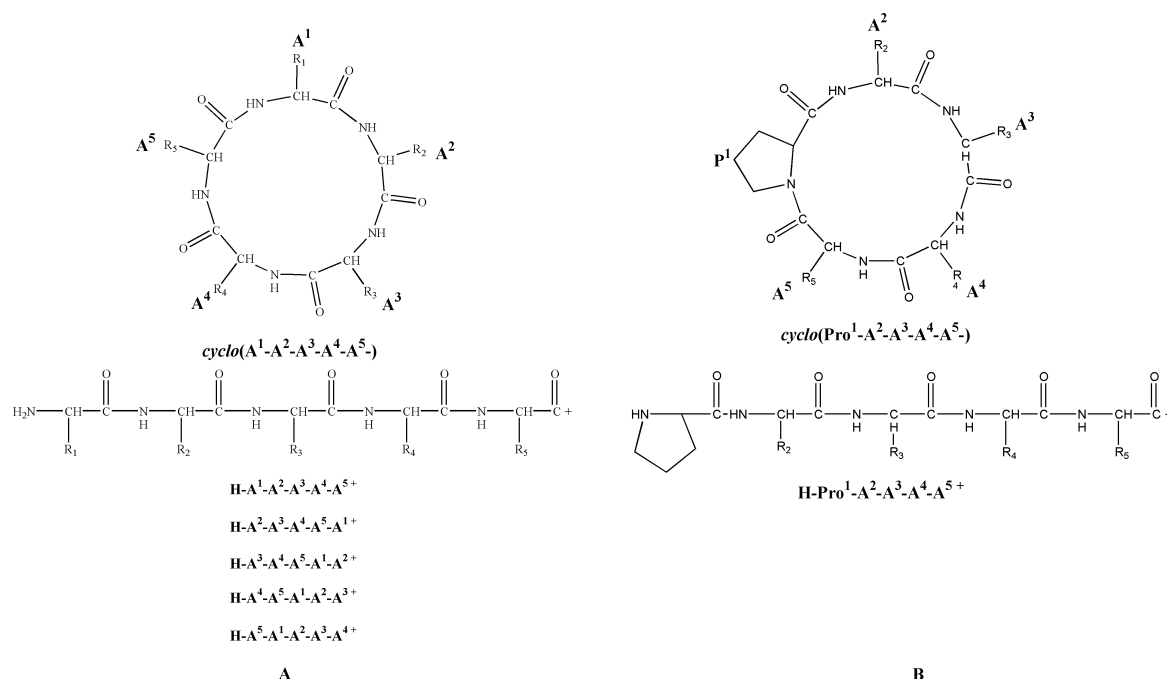


Figure 12 : A, Génération aléatoire de peptides linéaires ; B, Génération préférentielle d'un peptide linéaire

• Matériel et méthodes

Les spectres de masse TOF-MS et TOF-MS/MS ont été effectués sur un appareil API QSTAR Pulsar i avec une ionisation en Electrospray à une tension de 2500 eV. Le solvant utilisé pour dissoudre les échantillons a été le méthanol.

II-1- Spectre de masse ESI-Q-TOF de intégerrimacyclopeptide A

La figure 13 représente le spectre ESI-Q-TOF de intégerrimacyclopeptide A montrant l'ion protoné $[M+H]^+$ à 767 m/z et les ions adduits $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ respectivement à 789 et 805 m/z . De ces données on peut déduire que intégerrimacyclopeptide A a une masse M de 766 et comme formule brute $C_{37}H_{66}N_8O_9$. Cette formule est en accord avec la composition en acides aminés et correspond à la présence de huit résidus d'acides aminés moins une molécule d'eau.

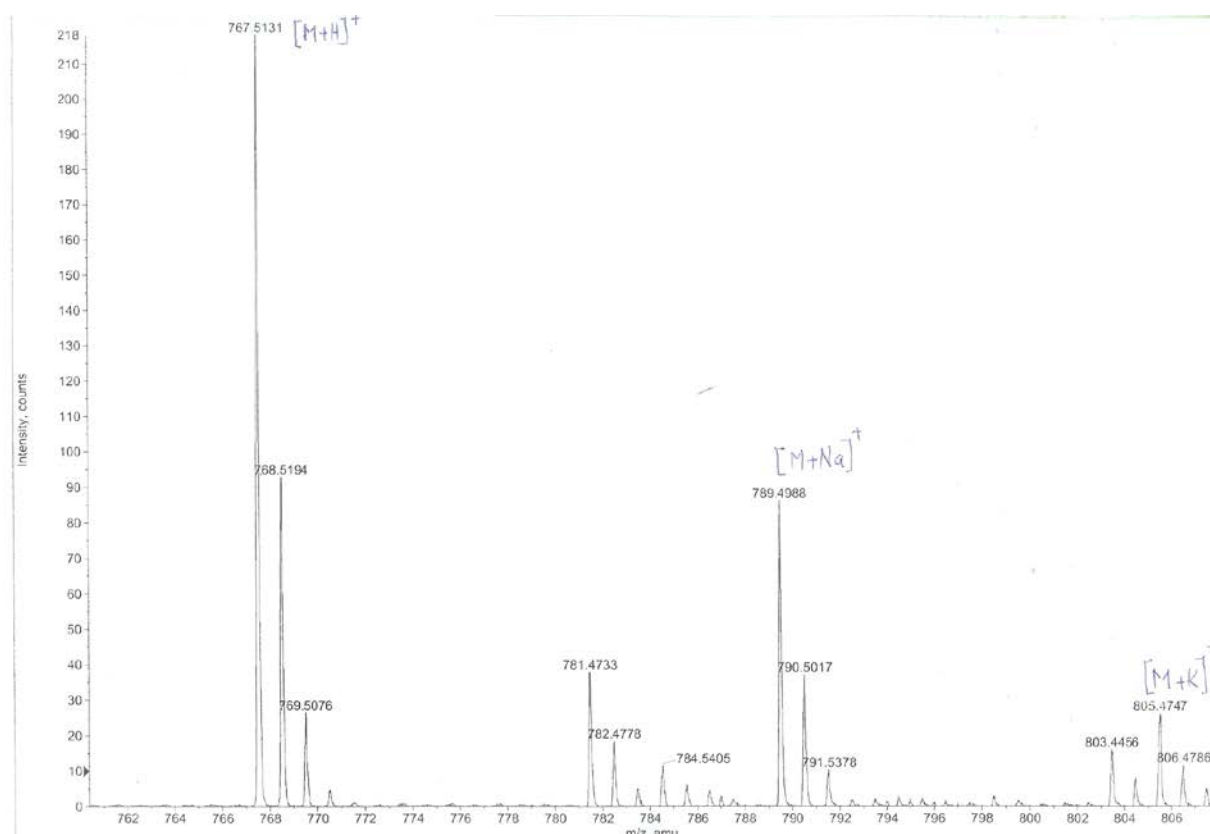


Figure 13 : Spectre de masse ESI-Q-TOF-MS de intégerrimacyclopeptide A

II-2- Fragmentation de l'ion moléculaire $[M+H]^+$

L'ion moléculaire $[M+H]^+$ à 767 m/z a été sélectionné pour le spectre de fragmentation à 40 eV, en présence d'azote. Pour rendre plus aisé l'exploitation des résultats, les acides aminés ont été numérotés en exposant.

Sur le spectre CID (Collision Ionisation Diffusion) de intégerrimacyclopeptide A, la série d'ions acyliums de type b_{n1} correspondant à la rupture de liaison Ile⁴-Ser³ indique la

perte successive d'une Ile (m/z 654), d'une Ile (m/z 541), d'une Leu (m/z 428), d'une Gly (m/z 371), d'une Ile (m/z 258), d'une Leu pour donner le dipeptide protoné Gly-Ser (m/z 145).

Une seconde série d'ions est observée décalée de 28 uma. Elle est attribuée à la série d'ions de type a_{n1} dont l'analyse permet de confirmer la perte successive des résidus cités.

La même analyse a permis d'identifier les séries d'ions acyliums b_{n2} , b_{n3} , b_{n4} ...correspondant aux autres fragmentations du cyclopeptide, elle confirme la séquence attribuée à intégerrimacyclopeptide A : *cyclo*(Leu/Ile¹-Gly²-Ser³-Leu/Ile⁴-Leu/Ile⁵-Leu/Ile⁶-Gly⁷-Leu/Ile⁸) (Fig. 6 et 7).

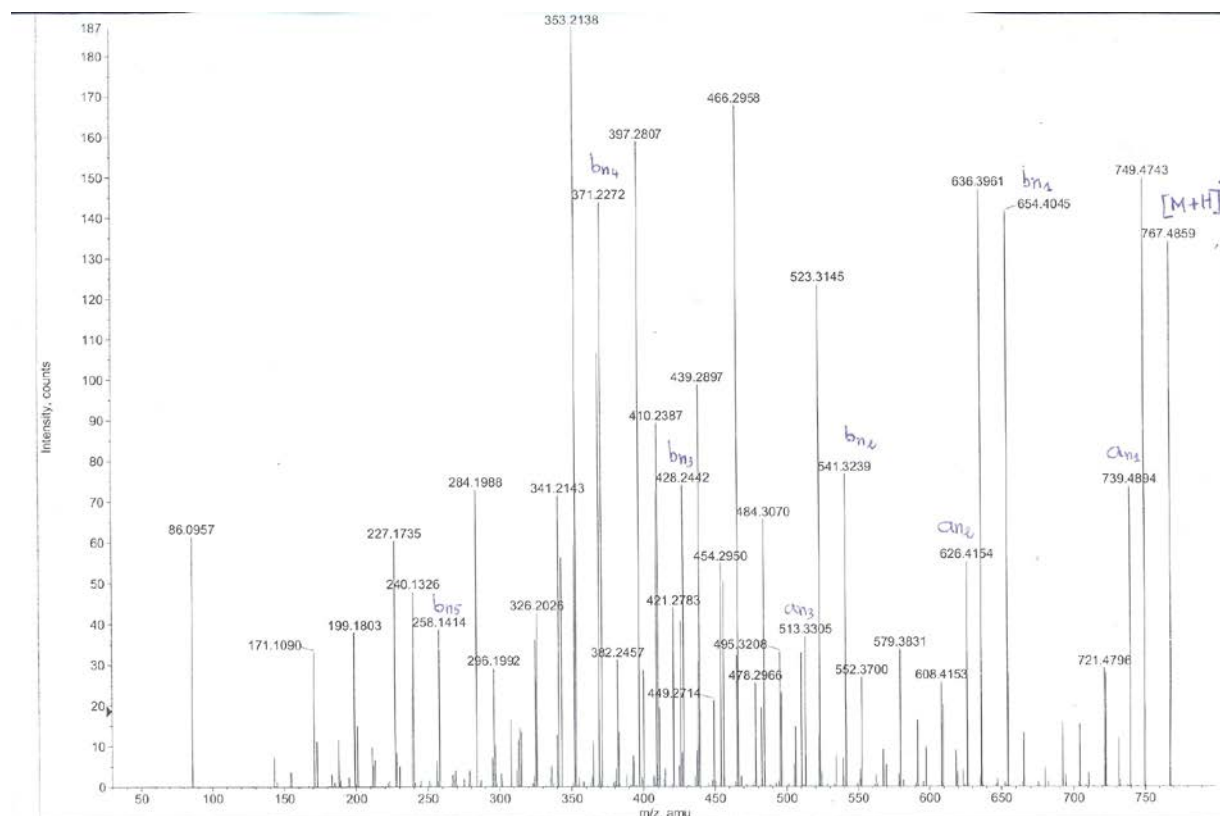


Figure 14 : Spectre de masse en tandem ESI-Q-TOF de intégerrimacyclopeptide A

Une incertitude existe sur la position des résidus Leu et Ile puisqu'il n'est pas possible de distinguer les acides aminés isomères par spectrométrie de masse dans ces conditions. L'étude par RMN va permettre de lever cette ambiguïté.

II-3-Séquençage de intégerrimacyclopeptide B

Intégerrimacyclopeptide B présente également sur son spectre ESI-Q-TOF l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 652 ainsi que les ions adduits $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ respectivement à m/z 674 et 690, permettant de lui attribuer une masse de m/z 651 et correspondant à la formule brute $C_{31}H_{53}N_7O_8$ (Fig.15).

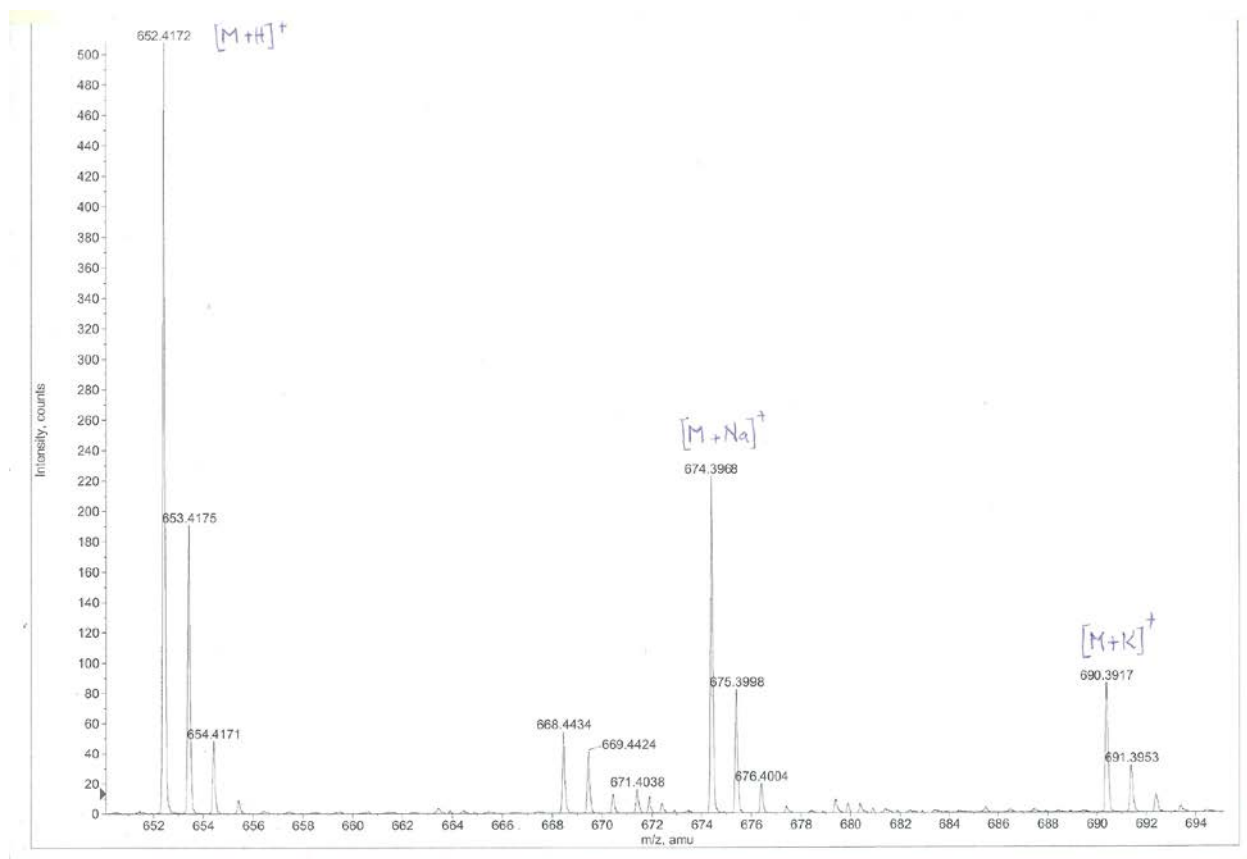


Figure 15 : Spectre de masse ESI-Q-TOF-MS de intégerrimacyclopeptide B

Parmi les fragmentations, est notée une série d'ions b_n à m/z 539, 426, 369, 256 et 155 dont l'analyse a permis de noter la perte successive d'une Leu (Ile), d'une Leu (Ile), d'une Gly, d'une Leu (Ile) et d'une Thr pour aboutir au dipeptide protoné $[H-Pro-Gly]^+$ à m/z 155 (Fig.16 et 17).

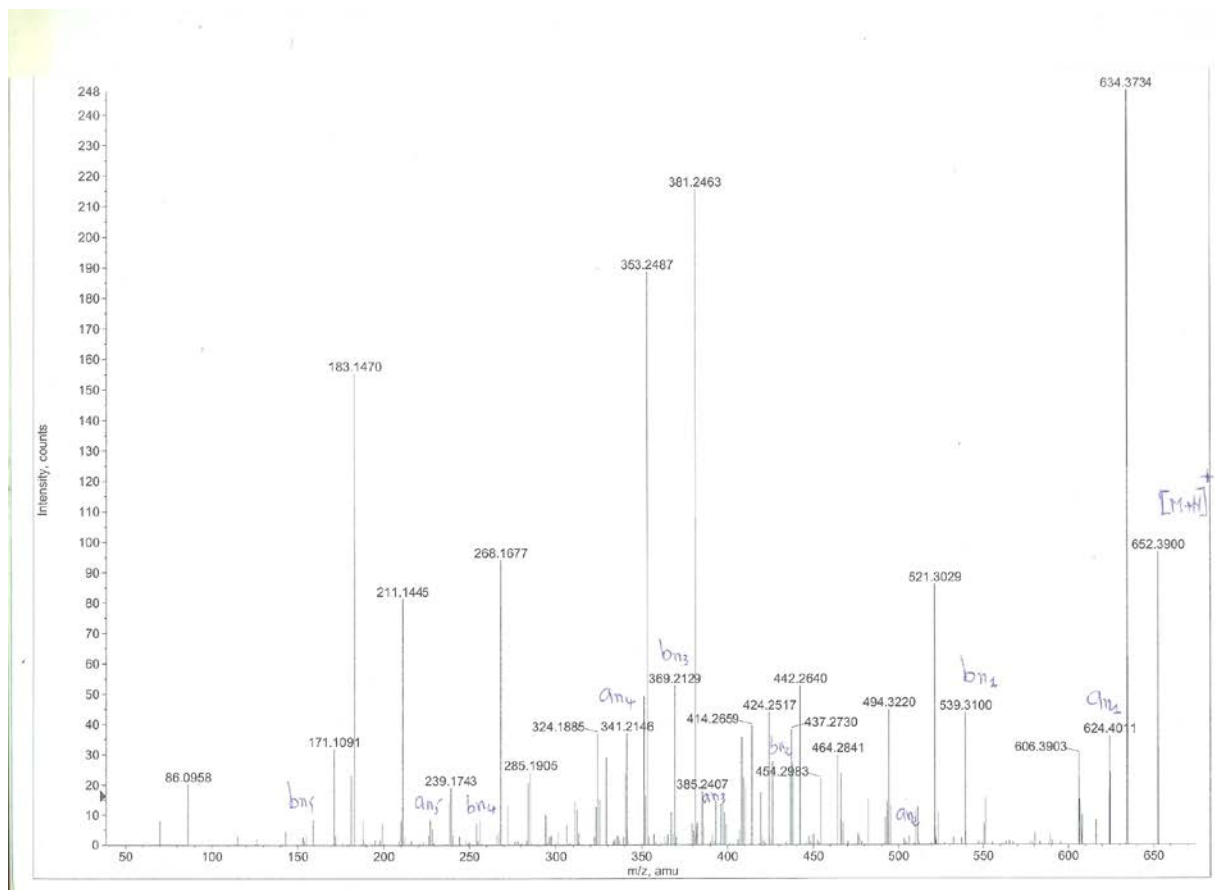


Figure 16 : Spectre de masse en tandem ESI-Q-TOF de intégrerrimacyclopeptide B

La proline est le premier résidu de la partie N-terminale puisque la coupure préférentielle a lieu sur la liaison amide entre la proline et le résidu précédent. Une seconde série d'ions est observée, décalée de 28 uma. Elle est attribuée à la série d'ions a_n dont l'analyse permet de confirmer la perte successive des résidus cités. Ces données ont permis d'établir la séquence d'intégrerrimacyclopeptide B : *cyclo* (Pro¹-Gly²-Thr³-Leu/Ile⁴-Gly⁵-Leu/Ile⁶-Leu/Ile⁷).

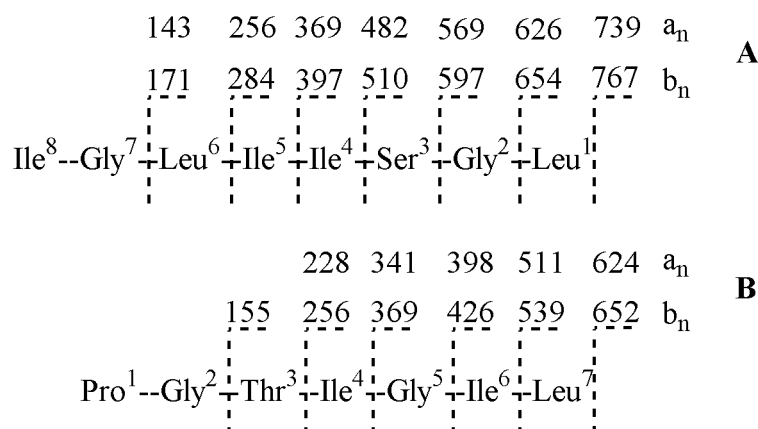


Figure 17 : Fragments observés dans les spectres MS/MS de intégrerrimacyclopeptide A (A) et de intégrerrimacyclopeptide B (B).

CONCLUSION

Le séquençage de deux cyclopeptides par spectrométrie de masse en tandem MS/MS est possible. La présence d'une proline facilite l'analyse des spectres MS/MS car on note une rupture privilégiée entre la proline et l'acide aminé précédent. La présence d'acides aminés isomères tels que la Leu ou Ile laisse une ambiguïté sur leur position respective.

CHAPITRE V - SEQUENÇAGE DES CYCLOPEPTIDES PAR RMN 2D

I– DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE INTEGERRIMACYCLOPEPTIDE A

I-1- Analyse des spectres

Le spectre RMN ^1H à une dimension de intégrerrimacyclopeptide A en solution dans le DMSO à 313 K fait apparaître une conformation majoritaire (supérieure 90 %) permettant son analyse (Fig. 18).

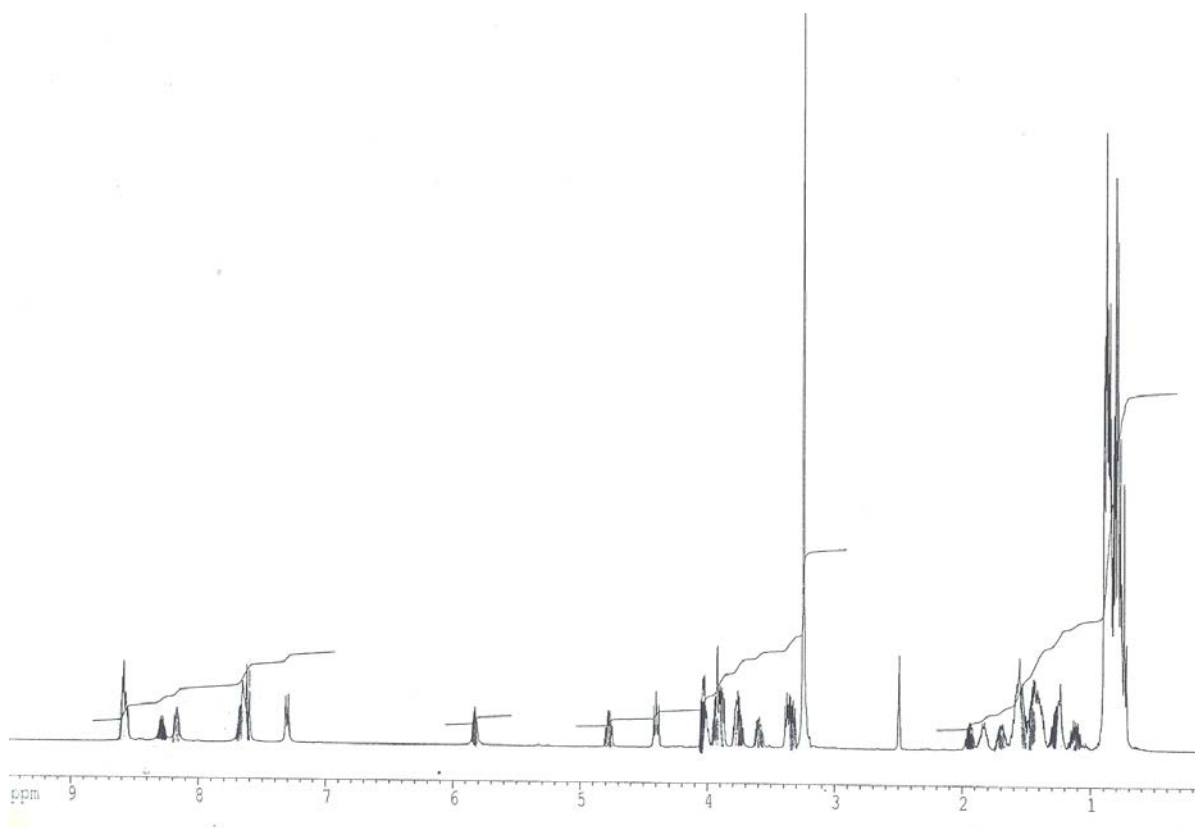


Figure 18 : Spectre de RMN ^1H d'intégrerrimacyclopeptide A (29 mM ; 400, 13 MHz ; DMSO- d_6 ; 313 K ; w = 0,0 - 9,5 ppm

Trois régions peuvent être distinguées sur le spectre.

- Entre 7,3 et 8,7 ppm, on a la région des protons amides présentant huit doublets à 7,30; 7,60 ; 7,62 ; 7,64 ; 8,16 ; 8,28 ; 8,53 et 8,56 ppm attribuables respectivement à des résidus monoalkylés qui sont Ile, Ser, Leu, Ile, Gly, Ile, Gly et Leu.
- La région des protons α est observée entre 3,3 et 5,0 ppm où l'on trouve aussi le proton de l'hydroxyle de la sérine représenté par un singulet à 5,82 ppm.

- Entre 0,7 et 3,8 ppm sont observés les protons des groupements CH, CH₂ et CH₃ des chaînes latérales.

Le spectre COSY met clairement en évidence les couplages scalaires entre le proton amide et le proton α du même résidu (Fig. 19).

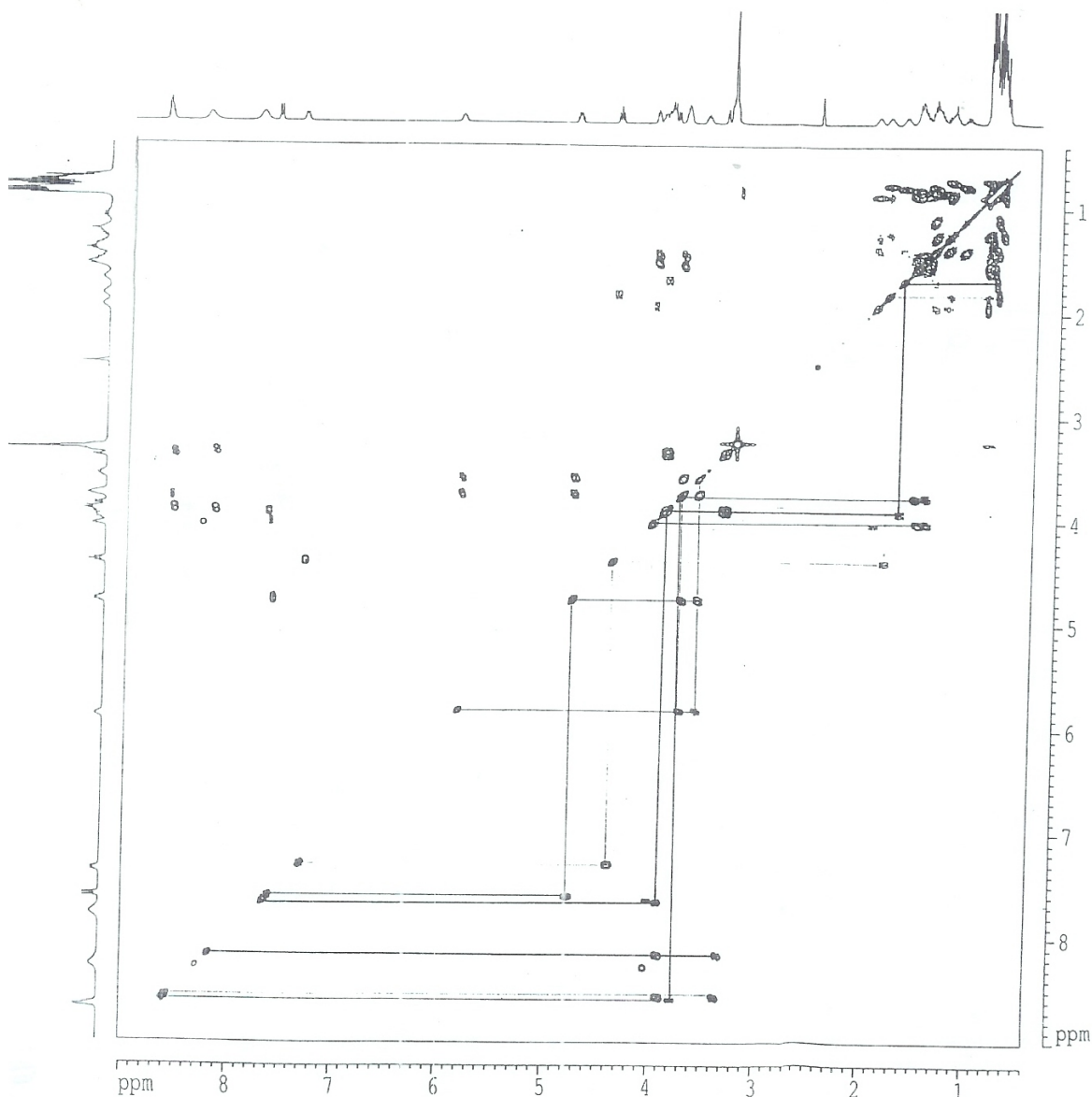


Figure 19 : Spectre de RMN¹H-¹H COSY d'intégrinacyclopeptide A (29 mM ; 400, 13 MHz ; DMSO-d₆ ; 313 K ; w₁ = w₂ = 1 - 9 ppm)

Ainsi le NH à 8,53 ppm correspondant à la Gly² est corrélé aux protons $\alpha\alpha'$ de ce même résidu à 3,82 et 3,33 ppm.

La complexité du spectre liée à l'encombrement de certains signaux amène à exploiter en combiné les spectres COSY et TOCSY. Ce dernier faisant apparaître pour chaque acide aminé l'ensemble des protons qui lui sont propres (Fig. 20). Sont ainsi identifiés les systèmes de spins des acides aminés suivants : Leu, Gly, Ile, Gly, Ile, Leu, Ser et Ile partant du NH de chacun de ces résidus.

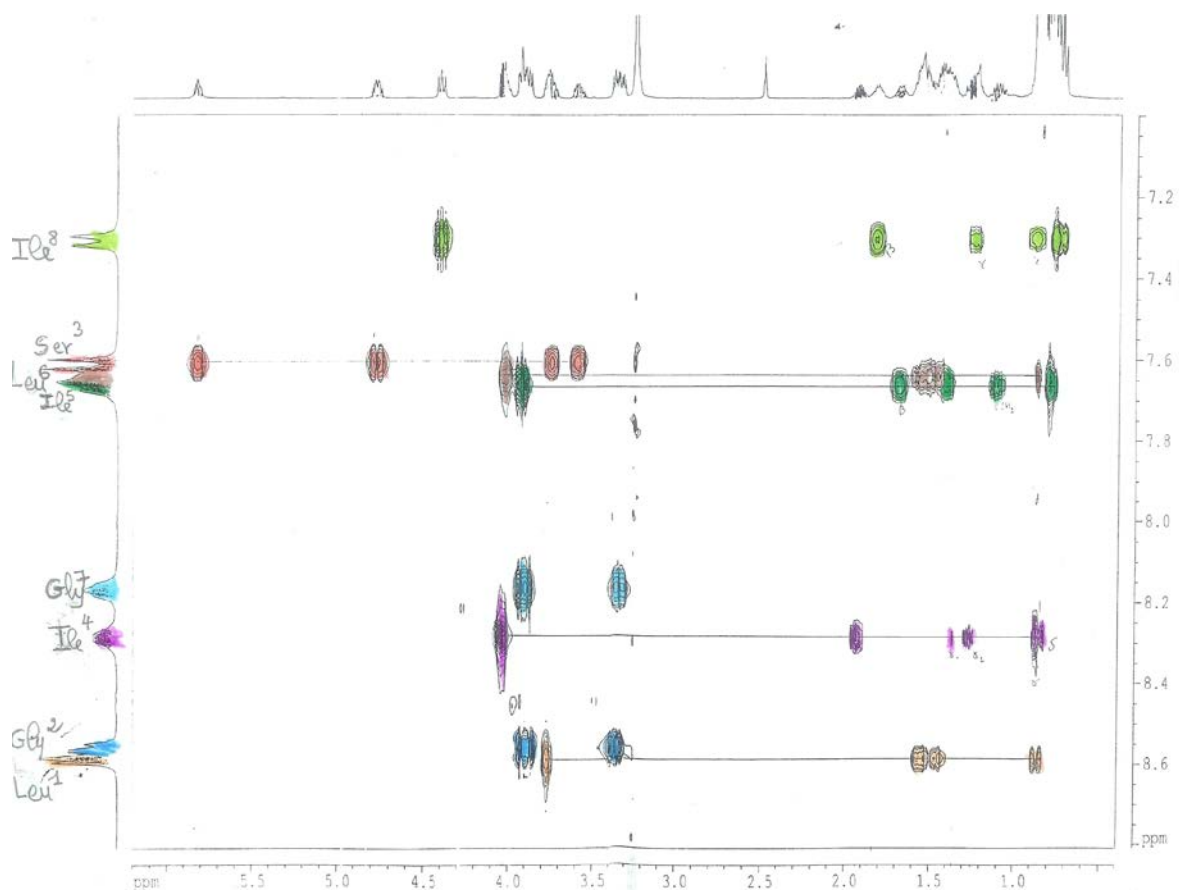


Figure 20 : Spectre de RMN 2D TOCSY d'intégerrimacyclopeptide A (29 mM ; 400, 13 MHz. DMSO-d₆ ; 313 K ; temps de mélange 120 ms ; w₁ = 0-6,20 ppm et w₂ = 7 - 9 ppm)

I-2- Attributions des signaux de ¹³C

Le spectre de RMN 1D ¹³C *J* modulé de intégerrimacyclopeptide A présente trois régions caractéristiques : (Fig. 21) et (Fig. 22)

- de 168,5 à 172,3 ppm ; région des carbonyles montrant ceux du squelette peptidique.
- de 42,5 à 62,4 ppm ; région des carbones α et dans laquelle se trouve le carbone β de la sérine déblindé par l'oxygène à 62,4 ppm.
- de 10 à 40 ppm ; région des carbones des chaînes latérales des résidus Leu et Ile.

Les protons des carbones αα' des glycines sont identifiés à 42,8 et 42,6 ppm.

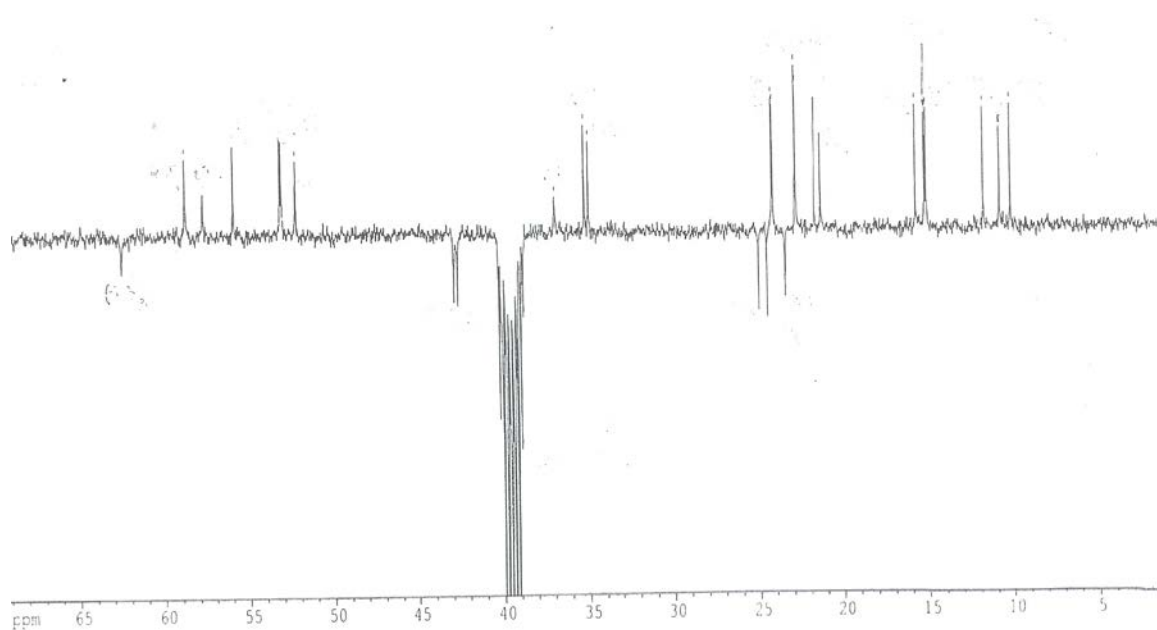


Figure 21 : Spectre de RMN 1D ^{13}C / modulé d'intégrinmacyclopeptide A (29 mM ; 75,47 Mhz ; DMSO- d_6 ; 313 K ; région des C_α et des carbones aliphatiques 2 - 69 ppm)

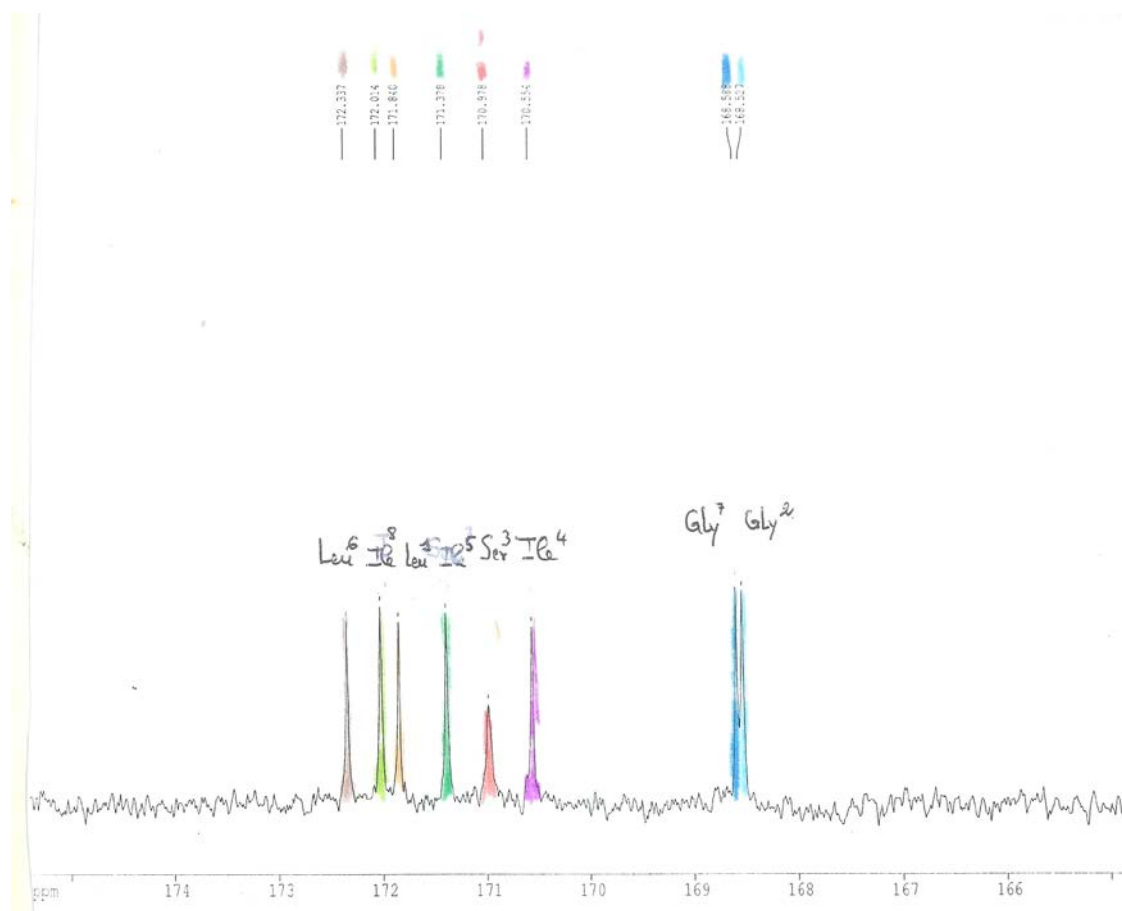


Figure 22 : Spectre de RMN 1D ^{13}C / modulé d'intégrinmacyclopeptide A (29 mM ; 75,47 MHz ; DMSO- d_6 ; 313 K ; région des carbonyles 165 - 175 ppm)

Le spectre HSQC, mettant en évidence les couplages hétéronucléaires $^1J_{CH}$, permet de déterminer pour chaque proton, le déplacement chimique du carbone qui le porte (Fig. 23).

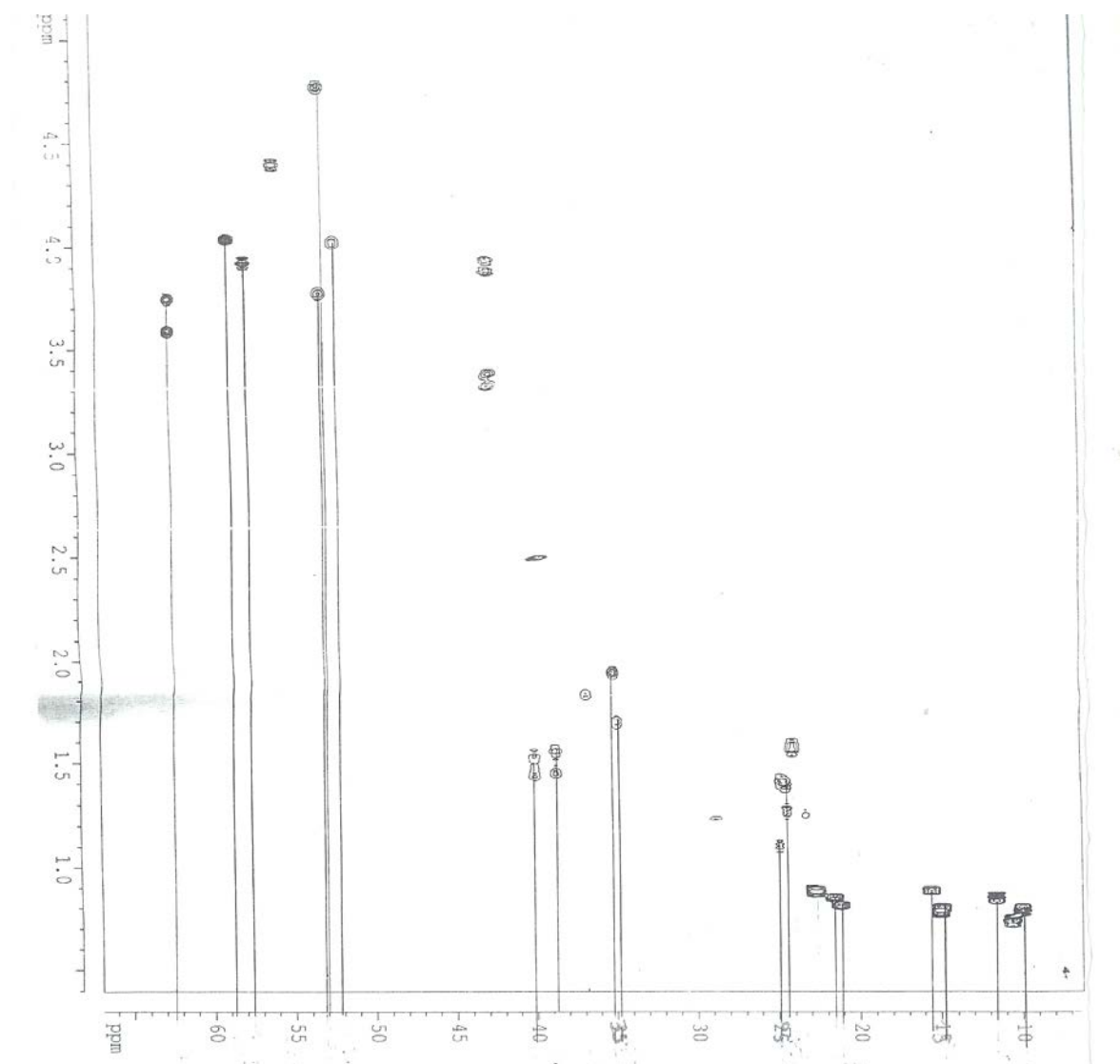


Figure 23 : Spectre de RMN 2D HSQC d'intégrinmacyclopeptide A (29 mM ; 300,13 MHz ; DMSO- d_6 ; 313 K ; délai optimisé pour J_{CH} 135 Hz ; $w_1 = 0,5-5$ ppm et $w_2 = 7 - 66$ ppm)

I-3- Détermination de la séquence par HMBC

L'analyse du spectre HMBC, par l'observation des interactions d'un carbonyle avec les protons NH, α et β a permis leurs attributions et leurs corrélations avec le NH du résidu suivant la détermination de la séquence (Fig. 24).

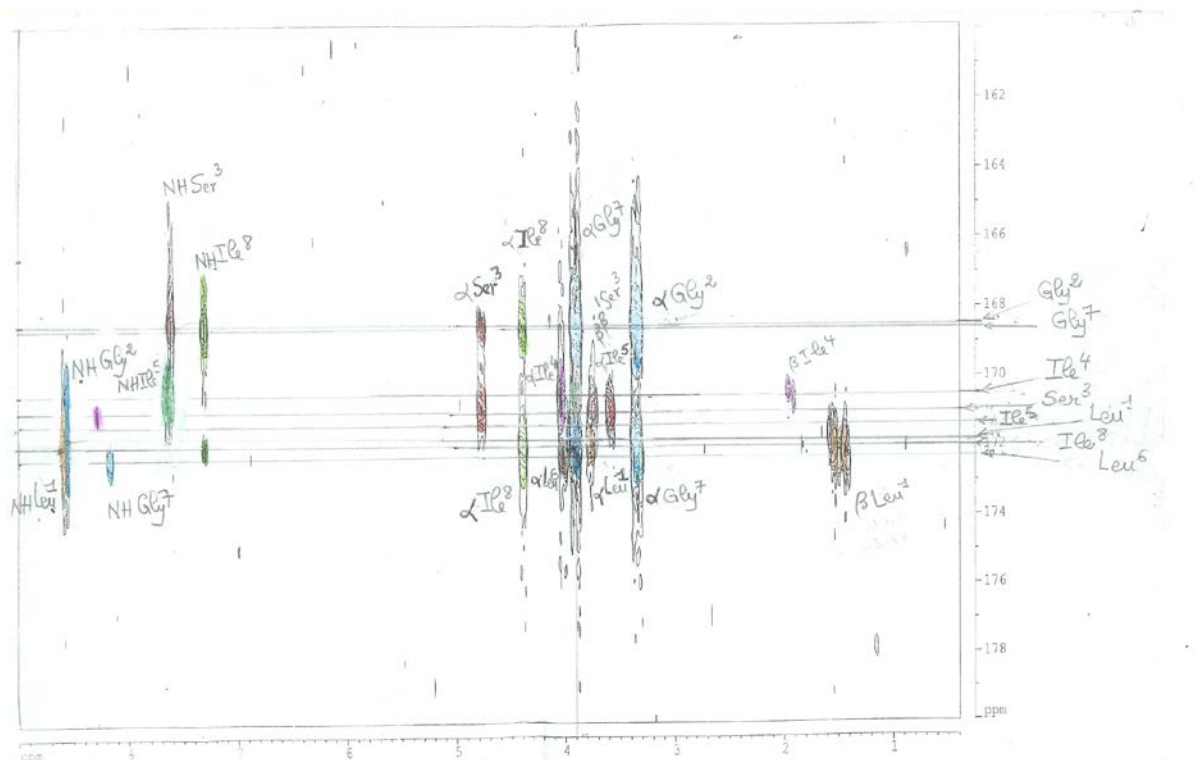


Figure 24 : Spectre de RMN 2D HMBC d'integerrimacyclopeptide A (29 mM ; 300,13 MHz. DMSO-
d₆ 313 K ; délai optimisé pour J_{CH} 7Hz ; $w_1 = 0,5 - 9$ ppm et $w_2 = 160 - 179$ ppm)

Les résidus sont ensuite reliés les uns aux autres à l'aide des corrélations $^2J_{CH}$ entre le carbonyle d'un résidu et le proton amide du résidu suivant et/ou des corrélations $^3J_{CH}$ entre ce carbonyle et le proton α du résidu suivant qui sont mises en évidences dans l'expérience HMBC.

Cette méthode hétéronucléaire de détermination de la séquence est préférable à la méthode homonucléaire décrite par Wüthrich car pour les peptides cycliques de petites tailles les informations (NOESY) conformationnelles peuvent interférer avec les informations séquentielles et être source d'ambiguïté.

Le spectre HMBC montre une corrélation entre le carbonyle de Gly² à 168,5 ppm et le NH de la Ser³, le carbonyle de la Ser³ est corrélié au NH de Ile⁴ ; le carbonyle de Ile⁴ est corrélié au NH et au proton α de Ile⁵ ; le carbonyle de Ile⁵ est corrélié au NH, au proton α , β et δ de Leu⁶ ; le carbonyle de Leu⁶ est corrélié au NH et au proton α de Gly⁷, le carbonyle de Gly⁷ au NH et au proton α de Ile⁸ et le carbonyle de Ile⁸ est corrélié au NH et au proton α de Leu¹.

L'ambiguïté liée à la position respective des résidus de Leu et Ile a été résolue. La structure d'intéggerrimacyclopeptide A est donc la suivante : *cyclo* (Leu¹-Gly²-Ser³-Ile⁴-Ile⁵-Leu⁶-Gly⁷-Ile⁸)

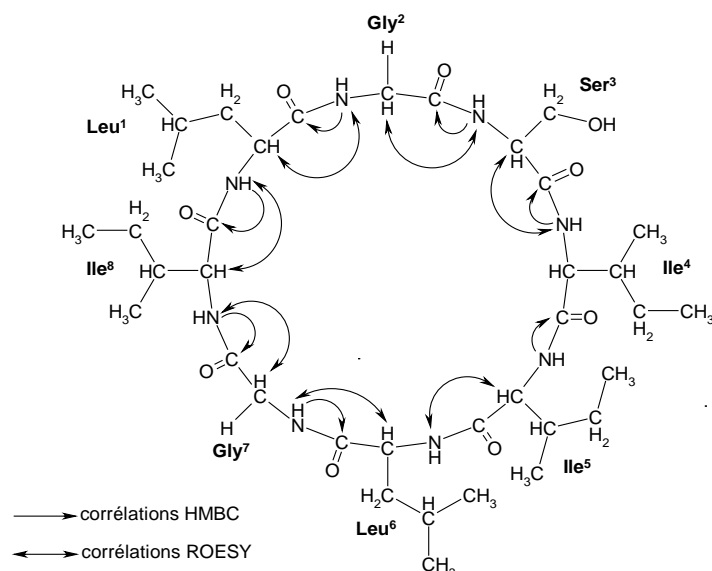


Figure 25 : Principales corrélations $d_{\text{CO-NH}(i,i+1)}$ et $d_{\alpha\text{N}(i,i+1)}$ observées sur les spectres HMBC et ROESY de intéggerrimacyclopeptide A.

I-4- Séquençage de intéggerrimacyclopeptide A selon la stratégie de Wüthrich

Le séquençage par RMN homonucléaire est réalisé par l'observation des corrélations de type $d_{\text{NN}(i,i+1)}$ et de type $d_{\alpha\text{N}(i,i+1)}$ sur le spectre ROESY.

Le spectre ROESY montre des interactions $d_{\alpha\text{N}(i,i+1)}$ entre le proton α de Gly⁷ et le NH de Ile⁸, le proton α de Gly² et le NH de Ser³; le proton α de Leu⁶ et le NH de Gly⁷, le proton α de Ser³ et le NH de Ile⁴, le proton α de Leu¹ et le NH de Gly², le proton α de Ile⁸ et le NH de Leu¹, le proton α de Ile⁵ et le NH de Leu⁶. L'analyse du spectre de ROESY (Fig. 26) permet d'avoir la séquence suivante : *cyclo* (Leu¹-Gly²-Ser³-Ile⁴-Ile⁵-Ile⁶-Gly⁷-Ile⁸), structure identique à celle proposée par l'interprétation des données HMBC.

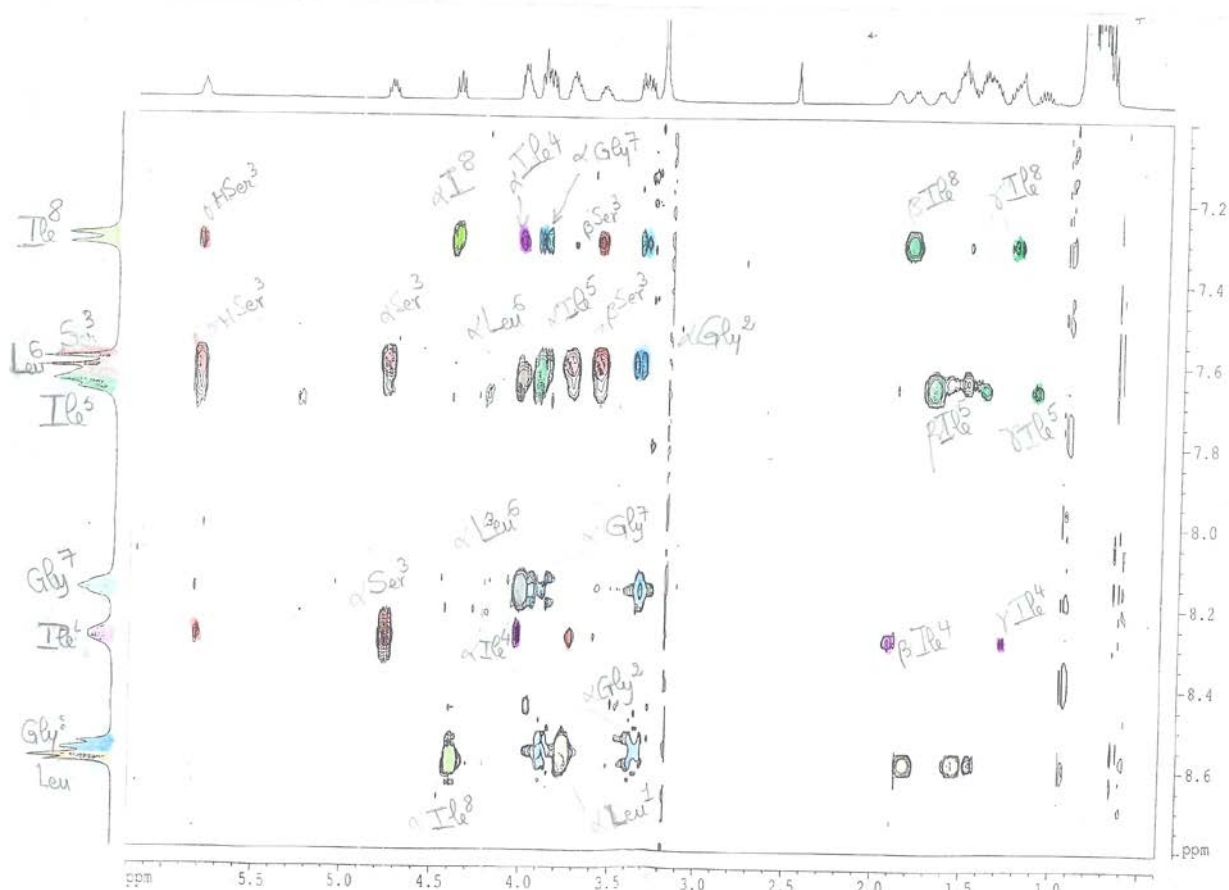


Figure 26 : Spectre de RMN 2D ROESY d'intégrinmacrocyclopeptide A (29 mM ; 400, 13 MHz ; DMSO- d_6 ; 313 K, temps de verrouillage de spin 150 ms ; $w_1 = 0,5 - 6$ ppm et $w_2 = 7,0-8,8$ ppm)

I-5- Détermination de la structure primaire de intégrinmacrocyclopeptide B

Sur le spectre RMN 1H à une dimension de intégrinmacrocyclopeptide B, on peut distinguer trois régions qui sont : la région des protons amides qui se situe entre 6,4 et 9,2 ppm, la région des protons α entre 3,2 et 5,3 ppm où l'on retrouve le proton de l'hydroxyle de la Thr et la région des protons des groupements CH, CH_2 et CH_3 des chaînes latérales qui est entre 0,6 et 2,6 ppm (Fig. 27).

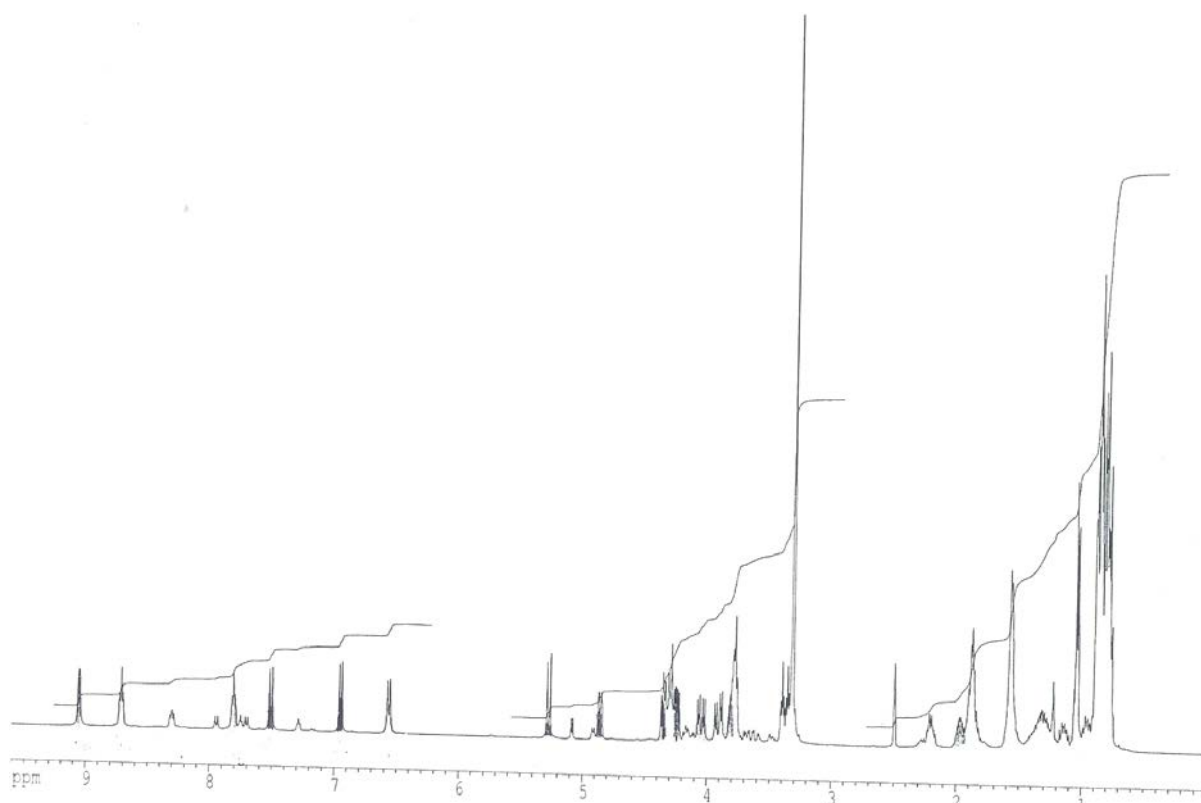


Figure 27 : Spectre de RMN ^1H d'intégerrimacyclopeptide B (29 mM ; 400,13 MHz ; DMSO- d_6 ; 313 K ; W = 0,0 - 9,5 ppm)

L'analyse des spectres COSY et TOCSY permet d'identifier les acides aminés suivants : Gly, Tyr, Ile, Gly, Ile et Leu en partant du NH de chacun de ces résidus. Le système de spins de la proline est mis en évidence dans les spectres COSY et TOCSY (Fig. 28). Le proton α de la proline à 4,55 ppm est corrélé aux protons β , α et $\delta\delta'$ à 3,20 et 3,47 ppm. Le proton α à 4,55 ppm est corrélé aux protons β , ceux-ci aux protons γ et eux-mêmes aux protons δ et δ' .

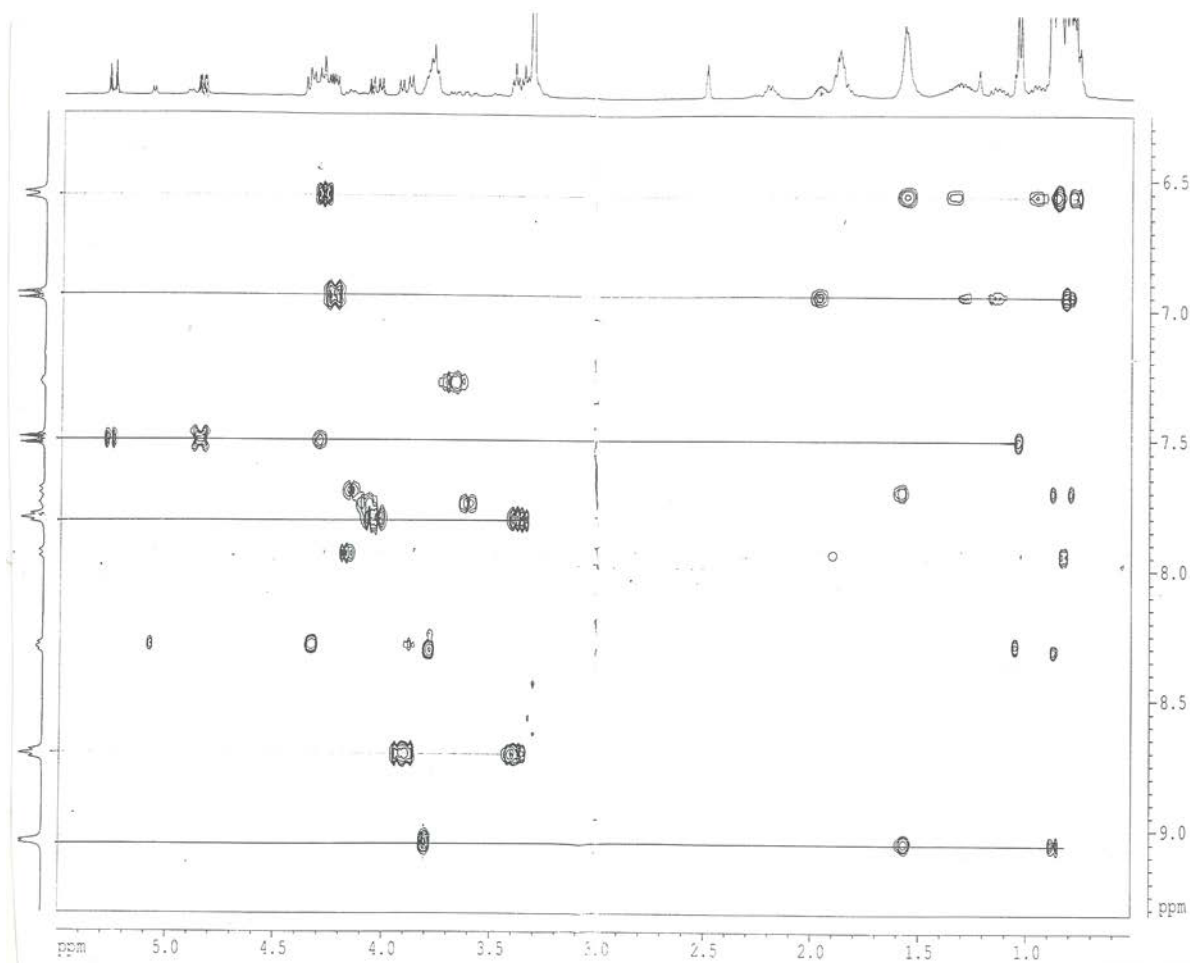


Figure 28 : Spectre de RMN 2D TOCSY d'intégerrimacyclopeptide B (29 mM ; 400,13 MHz. DMSO-d₆ ; 313 K ; temps de mélange 120 ms ; w₁ = 0-6,20 ppm et w₂ = 7-9 ppm)

L'étude du spectre RMN 1D ¹³C montre trois régions caractéristiques :

- de 168,67 à 172,66 ppm, la région des carbones des groupements carbonyles.
- de 42,9 à 61,0 ppm, la région des carbones α, des carbonyles et dans laquelle se trouve le carbone δ de la proline déblindé par l'atome d'azote hétérocyclique à 45,6 ppm.
- de 10,60 à 66,80 ppm se trouve la région des carbones des chaînes latérales.

Dans le spectre HMBC, on observe une corrélation entre le carbonyle à 168,8 ppm attribué à la Gly² et le NH de la Thr³, le carbonyle de la Thr³ est corrélié au NH de Ile⁴. Le carbonyle de Ile⁴ est corrélié au NH et au proton α de Gly⁵ ; le carbonyle de Gly⁵ est corrélié au NH de Ile⁶, et le carbonyle de Ile⁶, au NH et au proton α de Leu⁷. Le carbonyle de Pro¹ est corrélié au NH de Gly². Le carbonyle de la Leu⁷ n'étant pas corrélié avec un NH ce qui suggère que le CO de la Leu⁷ est lié à l'azote de la proline (Fig. 29).

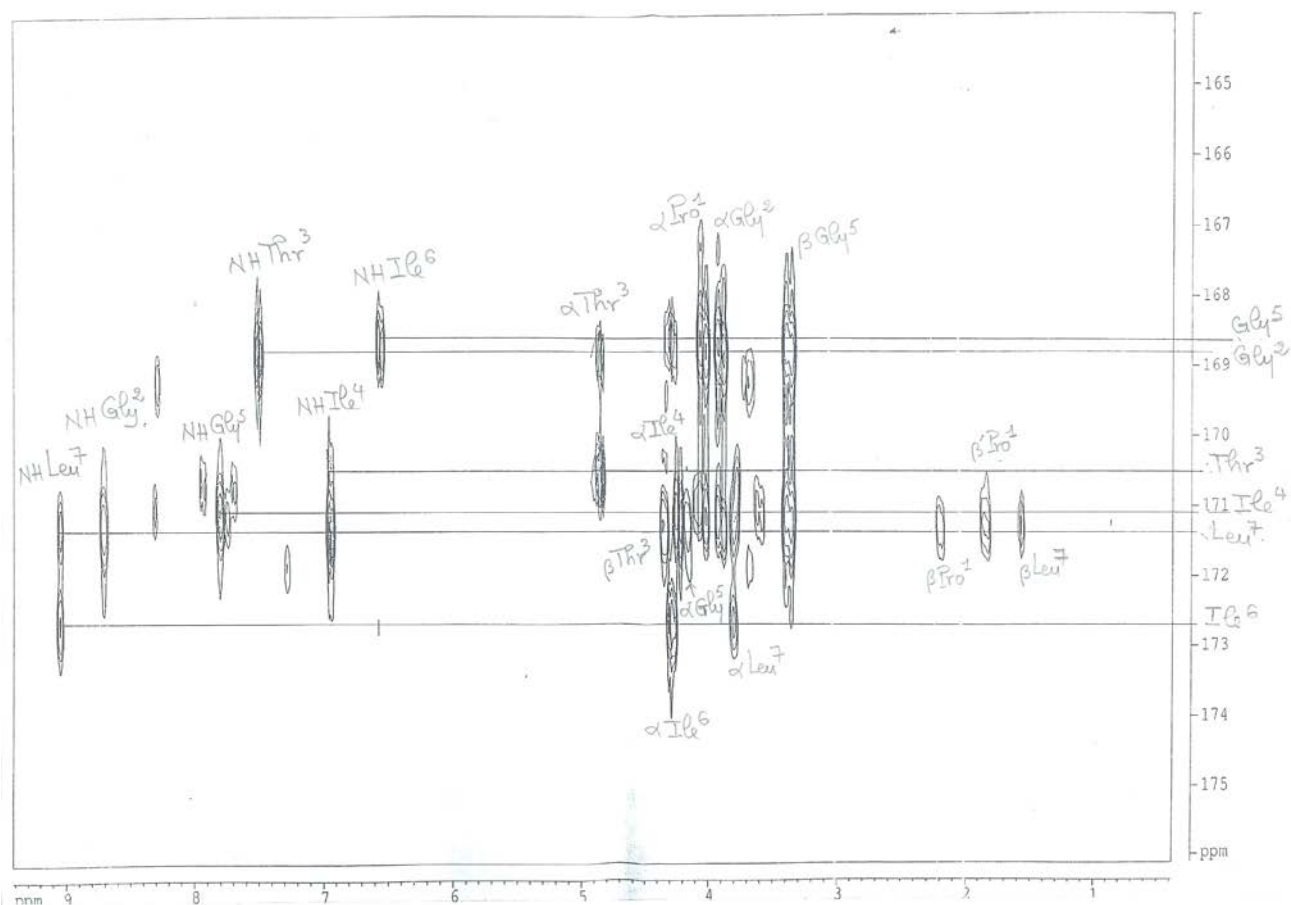


Figure 29 : Spectre de RMN 2D HMBC d'intégerrimacyclopeptide B (29 mM ; 300,13 MHz. DMSO-d₆ 313 K ;

délai optimisé pour J_{CH} 7 Hz ; $w_1 = 0,5-9$ ppm et $w_2 = 160-179$ ppm)

On peut donc établir la structure d'intégerrimacyclopeptide B qui est la suivante : *cyclo* (Pro¹-Gly²-Thr³-Ile⁴-Gly⁵-Ile⁶-Leu⁷).

Le spectre ROESY (Fig. 30) montre des interactions $d_{\alpha N(i, i+1)}$ entre le proton α de Ile⁶ et le NH de Leu⁷, le proton α de Ile⁴ et le proton amide de Gly⁵, le proton α de Gly² et le proton amide de Thr³ et le proton α de Gly⁵ et le proton amide de Ile⁶ ; le proton α de Thr³ et le proton amide de Ile⁴. Enfin la corrélation entre le proton α de Pro¹ et le proton amide de Gly².

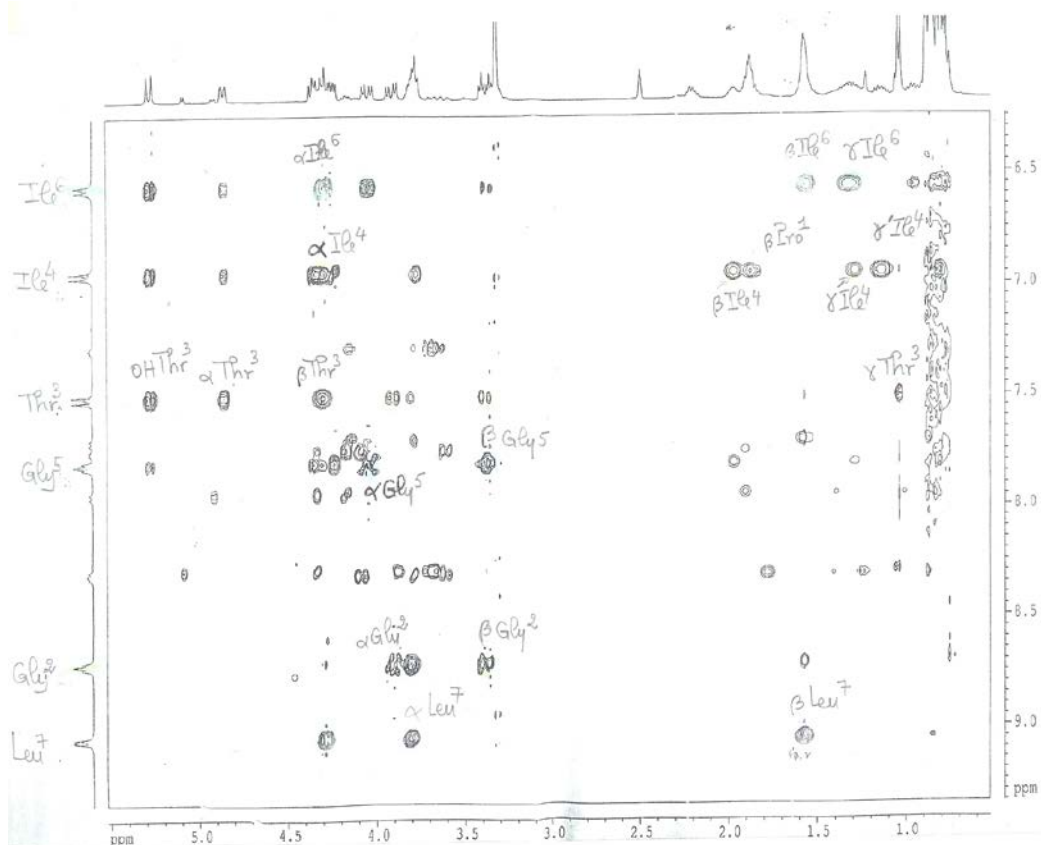


Figure 30 : Spectre de RMN 2D ROESY d'integerrimacyclopeptide B (29 mM ; 400,13 MHz ; DMSO-d₆ ; 313 K ; temps de verrouillage de spin 150 ms ; w₁ = 0,5-6 ppm et w₂ = 7, 0 - 8,8 ppm)

Ces résultats suggèrent la séquence suivante : *cyclo*(Pro¹-Gly²-Thr³-Ile⁴-Gly⁵-Ile⁶-Leu⁷) identique à la structure proposée par la méthode de séquençage par HMBC.

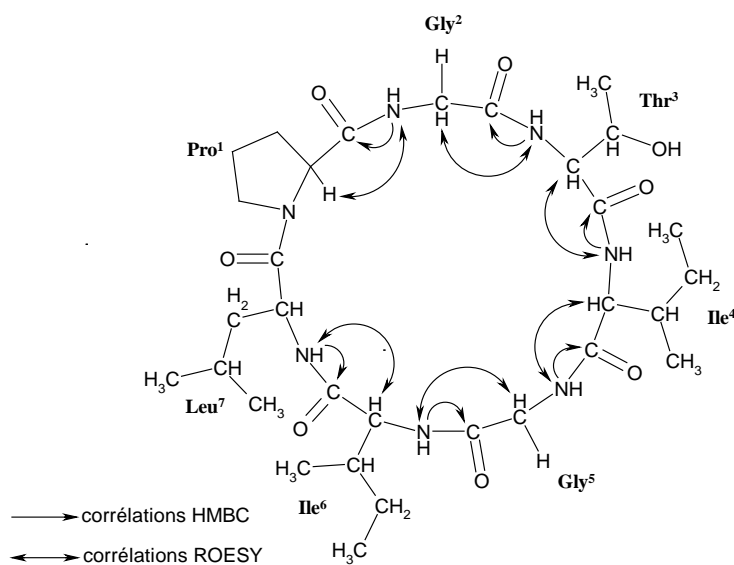


Figure 31 : Principales corrélations d_{CO-NH(i,i+1)} et d_{αN(i,i+1)} observées sur les spectres HMBC et ROESY de integerrimacyclopeptide B.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

A partir de latex de *Jatropha integerrima*, l'utilisation de techniques d'isolement et de purification notamment la chromatographie liquide haute performance (CLHP) nous a permis d'isoler deux cyclopeptides originaux. Leurs compositions en amino acides ont été déterminées par CPG après dérivation des acides aminés. Les peptides ont été d'abord séquencés par spectrométrie de masse en tandem MS / MS.

Le séquençage d'intégerrimacyclopeptide B possédant un résidu de proline a été plus aisé que celui d'intégerrimacyclopeptide A. En effet la présence de la proline dont l'azote tertiaire est plus basique en fait un site de protonation privilégié et la collision de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à 35-40 eV provoque la rupture de la liaison X_{aa} -Pro devenue site de coupure préférentielle et conduit à un peptide linéaire qui se fragmente à son tour. Le séquençage se produit par l'analyse des séries d'ions acyliums b_n et a_n fournis par la rupture de la liaison amide.

Dans le cas d'intégerrimacyclopeptide A, la rupture a lieu à tous les azotes de la molécule conduisant à plusieurs peptides linéaires dont les fragmentations rendent l'exploitation plus complexe.

Cette technique laisse une ambiguïté sur la position respective des résidus isomères, Leu et Ile, car elle ne permet pas de les distinguer.

Le séquençage par résonance magnétique nucléaire a permis de lever les ambiguïtés et de confirmer les séquences obtenues.

Cette méthode commence par l'attribution des signaux aux différents résidus par l'exploitation des spectres COSY, TOCSY et HSQC.

L'exploitation des spectres HMBC par l'observation des corrélations $^2J_{Co-NH(i,i+1)}$ et $^3J_{Co-H\alpha(i,i+1)}$ a été utilisée pour le séquençage des cyclopeptides. Cette méthode hétéronucléaire ^{13}C - 1H a été préférée de façon générale à la méthode homonucléaire s'appuyant sur les corrélations NOE, car il y'a risque de confusion entre les informations NOE séquentielles et les corrélations NOE conformationnelles pour les peptides de petite taille, et dus à des repliements liés à la conformation.

L'évaluation de l'activité cytotoxique a montré que ces produits sont doués d'activités cytotoxiques sur les cellules tumorales KB du nasopharynx humain.

Enfin, s'il fallait dégager les perspectives d'une nécessaire suite à ce travail, il s'agirait de souhaiter la réalisation de l'étude toxicologique, de pousser le fractionnement chimique pour pouvoir attribuer l'activité à une substance, d'extrapoler les résultats à divers niveaux de l'homme mais également de vérifier les autres connaissances des tradipraticiens sur cette plante par des méthodes scientifiques.

BIBLIOGRAPHIE

Adjanohoune, E.J. et Assi Akel 1979

Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali.

Ed. ACCT, Paris

André, F. et Pinet, E. (1997)

Tentoxin: structure-activity relationship. Application to the study of its action on chloroplast ATP-synthetase.

C R Séances Soc. Biol. Fil., **191**, 401-432.

Auvin-Guette, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Pousset, J.L.; Bodo, B. (1997)

Cyclogossine B, a cyclic octapeptide from *Jatropha gossypifolia*.

J. Nat Prod. , **60**, 1155-1157.

Auvin-Guette, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Xavier, S.X.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; (1999)

Pohlianins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha pohliana* spp. *molissima*.

Tetrahedron, **55**, 11495-11510.

Baraguey, C.; Auvin-Guette, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. (1998)

Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex *Jatropha chevalieri*.

J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, **1998**, 3033-3039.

Baraguey, C.; Blond, A.; Correia, I.; Pousset, J.L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C. (2000)

Mahafacyclin A, a cyclic heptapeptide from *Jatropha mahafalensis* exhibiting β -bulge conformation.

Tetrahedron Letters, **41**, 325-329.

Baraguey, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C. (2001)

Isolation, structure and synthesis of mahafacyclin B, a cyclic heptapeptide from the latex of *Jatropha mahafalensis*.

J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, **2001**, 2098-2103.

Blond, A; Cheminant, M.; Ségalas, I.; Péduzzi, J.; Barthélémy, M.; Goulard, C.; Salomon, R.A.; Moreno, F.; Farias, R.N.; Rebuffat, S. (2001)

Solution structure of microcin J25, the single macrocyclic antimicrobial peptide from *Escherichia coli*.

Eur. J. Biochem., **268**, 2098-2103.

Biemann, K. (1990)

Mass spectrometry – Nomenclature for peptide fragment ions (Positive ions);

in *Methods in Enzymology*, J. A. McCloskey, Editor; Academic Press; Inc.: San Diego; CA; p. 886-887.

Donassieu, M.-P. (1994)

Tous les fruits comestibles du monde.

Edition Bordas.

Dormann, D.-E.; Bovey, F.-A. (1975).

Carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. The spectrum of proline in oligopeptides.

J. Org. chem., **38**, 702-703.

Edman, P. (1950)

Method of determination of the amino acid sequence in peptides.

Acta Chem. Scand., **4**, 283-293.

Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. (1989)

Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules

Science, **246**, 64-71.

Feutren, G (1992).

Clinical experience with sandimmune (cyclosporine) in autoimmune diseases

Transplant. Proc., **24**, 55-60.

Francart C.; Wieruszeski, J.-M.; Tartar, A.; G. Lippens. (1996)

Structure and dynamic characterization of Pro Cis/Trans isomerization in a small cyclic peptide.

J. Am. Chem. Soc., **118**, 7019-7027.

- Fujii, K.; Sivonen, K.; Naganawa, E.; Harada, K. (1999)
Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*.
Tetrahedron, **56**, 725-733.
- Göransson, U.; Luijendijk, T.; Johansson, S.; Bohlin, K.; Claeson, P. (1999)
Seven novel macrocyclic polypeptides from *Viola arvensis*.
J. Nat. Prod., **62**, 283-286.
- Gustafson, K.R.; Sowder, R.C.; Henderson, L.E.; Parsons, I.C.; Kashman, Y.; Cardellina, J.H.; McMahon, J.B.; Buckheit, R.W.; Pannell, L.K.; Boyd, M.R. (1994)
Circulins A and B : novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*.
J. Am. Chem. Soc., **116**, 9337-9338.
- Hallock, Y.F.; Sowder II, R.C.; Pannell, L.K.; Hughes, C.B.; Johnson, D.G.; Gulakowski, R.; Cardellina II, J.H.; Boyd, M.R. (2000)
Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*.
J. Org. Chem., **65**, 124-128.
- Haraguchi, H.; Yamano, K; Kusunoki, N.; et Fukuda, A. (1997)
Effet of gliotoxin and related compounds on acetolactate synthase.
J. Agric. Food Chem., **45**, 2784-2787.
- Himaja, M.; Harish Kumar, K.; Ramana, M.-V.; Belagali, S. L. (1999)
Synthesis and biological evaluation of Pseudostellarin D.
European Journal of Medicinal Chemistry, **34**, 525-529.
- de Hoffmann, E.; Charette, J.; Stroobant, V. (1994)
Spectrométrie de masse.
Edition Masson, Paris, Milan, Barcelone.
- Hopfinger, A.-J. (1980)
A QSAR investigation of dihydrofolate reductase inhibition by baker triazines based upon molecular shape analysis.
J. Am. Chem. Soc., **102**, 7196-7206.

Horsten, S.F.A.J.; Berg, A.J.J. van den ; Bosch, J.J.K. van den ; Leeftang, B.R.; Labadie, R.P. (1996)

Cyclogossine A – a novel cyclic heptapeptide isolated from the latex of *Jatropha gossypifolia*.

Planta Medica, **62**, 46-50.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970).

Abbreviations and symbols for the description and the conformation of polypeptide chains-tentative rules.

Biochemistry, **9**, 3471-3479.

Karas & Hillenkamp (1988)

Laser desorption ionisation of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons.

F. Anal. Chem., **60**, 2299-2301.

Kerharo, J.; Adam, J.-G. (1974)

“La pharmacopée sénégalaise traditionnelle - plantes médicinales et toxiques”

Editions *VIGOT FRERES*.

Kinoshita, K.; Tanaka, J.; Kuroda, K.; Koyama, S. Natori.; Kinoshita, T. (1991)

Cycloleonurinin, a cyclic peptide from *Leonurinin fructus*.

Chem. Pharm. Bull., **39**, 712-715.

Laskowski, R. A.; Rullmann, J. A.; MacArthur, M. W.; Kaptein, R. & Thornton J. M. (1996)

AQUA and PROCHECK-NMR programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*. **8**, 477-486.

Le Bellec, F.; Renard, V. (1999)

Le Grand livre des fruits tropicaux.

Edition Orphie.

Loiseau, N.; Aninat, C.; Gomis, J.-M.; Delaforge, M.; André, F. (2001)

Les Cyclopeptides d'origine fongique : toxicité et cibles enzymatiques in « Explorer, exploiter les toxines scientifiques et maîtriser les organismes producteurs » *Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS*, 67-79.

- Loosli, H.R.; Kessler, H.; Osschkinat, H.; Weber, H.P.; Petcher, T.J.; Widmer, A. (1985)
The conformation of cyclosporin A in the crystal in solution.
Helv. Chim. Acta, **68**, 682-704.
- Mabberley, D. J. (1987)
The plant book.
Cambridge University Press.
- Mann J. (2001)
Natural products as immunosuppressive agents.
Nat. Prod. Rep., **18**, 417-430.
- Mann, M.; Hendrickson, R.C.; Pandey, A. (2001)
Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry.
Ann. Rev. Biochem., **70**, 437-73
- Matsumoto, T.; Shishido, A.; Morita, H.; Itokawa, H.; Takeya, K. (2001)
Cyclolinopeptides F-I, cyclic peptides from linseed.
Phytochemistry, **57**, 251-260.
- Meyer W.L.; Templeton, G. A.; Grable, C.I.; Jones, R.; Kuyper, L.F.; Lewis, R.B.; Sigel, C.W., Woodhead, S.H. (1975)
Chain reversals in proteins.
J. Am. Chem. Soc., **97**, 3802-3809.
- Meyer W.L. (1983)
On the mass spectrometric structure determination of the cyclic tetrapeptide tentoxin.
Tetrahedron Lett., **24**, 2163-2164.
- Morita, H.; Kayashita, T.; Kabata, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1994 a)
Pseudostellarins A-C, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*.
Tetrahedron, **50**, 6797-6804.

- Morita, H.; Kobata, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1994 b)
Pseudostellarins G, a new tyrosinase inhibitory cyclic octapeptide from *Pseudostellaria heterophylla*.
Tetrahedron Letters, **35**, 3563-3564.
- Morita, H.; Nagashima, S.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1994 c)
Conformational analysis of an antitumour cyclic pentapeptide, astin B, from *Aster tataricus*.
Tetrahedron, **50**, 11613-11622.
- Morita, H.; Shishido, A.; Kayashita, T.; Shimomura, M.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1994 d)
Two novel cyclic peptides, yunnannin A and B from *Stellaria yunnanensis*.
Chem. Letters, 2415-2418.
- Morita, H.; Yun, Y.S.; Takeya, K.; Itokawa, H. (1994 e)
Segetalin A, a new cyclic hexapeptide from *Vaccaria segetalis*.
Tetrahedron Letters, **35**, 9593-9596.
- Morita, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Iitaka, Y. (1997 a)
Cycloleonuripeptide D, a new proline-rich cyclic decapeptides from *Leonurus heterophyllus*.
Tetrahedron, **53**, 1617-1626.
- Morita, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Shiota, O. (1997 b)
Conformational preference of cycloleonuripeptides A, B and C, three proline-rich cyclic nonapeptides from *Leonurus heterophyllus*.
Chem. Pharm. Bull., **45**, 161-164.
- Morita, H.; Shishido, A.; Matsumoto, T.; Itokawa, H.; Takeya, K. (1999)
Cyclolinopeptides B-E, new cyclic peptides from *Linum usitatissimum*.
Tetrahedron, **55**, 967-976.
- Ovchinnikov, Y.-A.; Ivanov, V. T. (1974).
Integrated conformational studies of cyclopeptides.
Tetrahedron, **30**, 1871-1890.
- Ovchinnikov, Y.-A.; Ivanov, V. T. (1975)
Conformational states and biological activity of cyclic peptides.
Tetrahedron, **31**, 2177-2209.

Prasad, C. (1995)

Bioactive cyclic dipeptides.

Peptides, **16**, 151-164.

Roepstorff, P.; Fohlman, J. (1984)

Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides.

Biomed. Mass Spectrom., **11**, p. 601.

Tan, N.-H.; Zhou, J.; Chen, C.-X.; Zhao, S.-X (1993)

Cyclopeptides from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*.

Phytochemistry, **32**, 1327-1330.

Tancredi, T.; Benedetti, E.; Grimaldi, M.; Pedone, C.; Rossi, F.; Saviano, M.; Temussi, P.A.;

Zanotti, G. (1991)

Ion binding of cyclolinopeptide A: an NMR and CD conformational study.

Biopolymers, **31**, 761-767.

Takhtajan, A. (1997)

Diversity and classification of flowering plants.

Published by *Columbia University Press*.

Takeya, K.; Yamamiya, T.; Morita, H.; Itokawa, H. (1993)

Two antitumour bicyclic hexapeptides from *Rubia cordifolia*.

Phytochemistry, **33**, 613-615.

Van den Berg, A.J.J.; Horsten, S.F.A.J.; Bosch, J.J.K. van den ; Kroes, B.H.; Beukelman,

C.J.; Leeftang, B.R.; Labadie, R.P. (1995)

Curcacycline A – a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L.

FEBS Letters, **358**, 215-218.

Van den Berg, A.J.J.; Horsten, S.F.A.J.; Bosch, J.J.K. van den ; Beukelman, C.J.; Kroes,

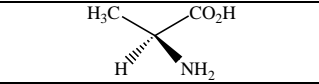
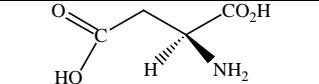
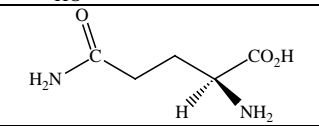
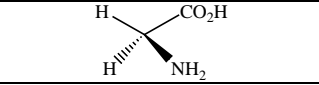
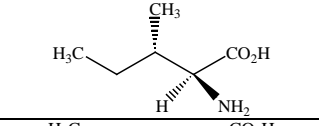
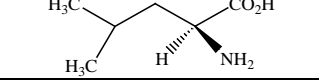
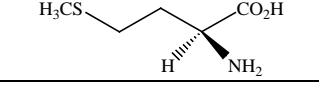
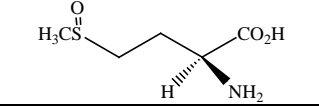
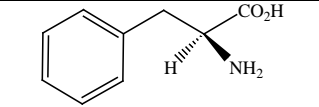
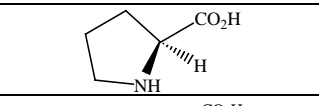
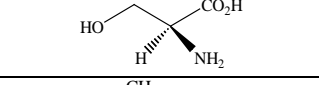
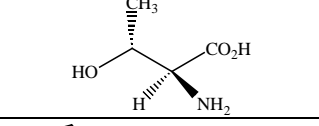
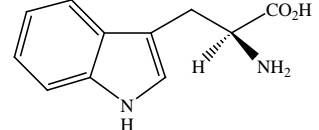
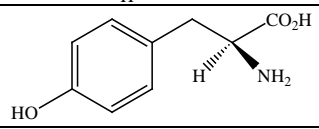
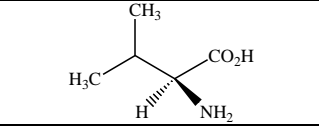
B.H.; Leeftang, B.R.; Labadie, R.P. (1996)

Podacycline A and B, two novel cyclic peptides in the latex of *Jatropha podagrica*.

Phytochemistry, **42**, 129-133.

- Wagner, G.; Kumar, A.; Wüthrich, K. (1981)
Systematic application of two-dimensional ^1H nuclear magnetic resonance techniques for studies of proteins. 2. Combined use of correlated spectroscopy and nuclear overhauser spectroscopy for sequential assignments of backbone resonances and elucidation of polypeptide secondary structures.
Eur. J. Biochem., **114**, 375-384.
- Waring, P.; Beaver, J. (1996)
Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines.
Gen. Pharmac., **27**, 1311-1316.
- Wélé, A.; Zhang, Y.; Caux, C.; Brouard, J.P.; Dubost, L.; Guette, C.; Pousset, J.L.; Badiane, M.; Bodo, B. (2002)
Isolation and structure of cycloenegalins A and B, novel cyclopeptides from the seeds of *Annona senegalensis*.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, **2002**, 2712-2718.
- Wélé, A.; Landon, C.; Labbé, H.; Vovelle, F.; Zhang, Y.; Bodo, B. (2004)
Sequence and solution structure of cherimolacyclopeptides A and B, novel cyclooctapeptides from *Annona cherimola*.
Tetrahedron, **60**, 405-414.
- Wieczorek, Z.; Bengtsson, B.; Trojnar, J.; Siemion, I.-Z. (1991)
Immunosuppressin activity of cyclolinopeptide A.
Peptide Res., **4**, 275-283.
- Witherup, K.M.; Bogusky, M.J.; Anderson, P.S.; Ramjit, H.; Ransom, R.W.; Wood, T.; Sardana M., (1994)
Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*.
J. Nat. Prod., **57**, 1619-1625.
- Wüthrich, K. (1986)
NMR of proteins and nucleic acids; 162-175. New-York: John Wiley & Sons.

Liste des principaux acides aminés

Structure	Code		Formule brute*	Masse du résidu amino acide *
	3-lettres	1-lettre		
	Ala	A	C₃H₅NO	71
	Asp	D	C₄H₅NO₃	115
	Gln	Q	C₅H₈N₂O₂	128
	Gly	G	C₂H₃NO	57
	Ile	I	C₆H₁₁NO	113
	Leu	L	C₆H₁₁NO	113
	Met	M	C₅H₉NOS	131
	Mso	Ms	C₅H₉NO₂S	147
	Phe	F	C₉H₉NO	147
	Pro	P	C₅H₇NO	97
	Ser	S	C₃H₅NO₂	87
	Thr	T	C₄H₇NO₂	101
	Trp	W	C₁₁H₁₀N₂O	186
	Tyr	Y	C₉H₉NO₂	163
	Val	V	C₅H₉NO	99

TITRE : PEPTIDES CYCLIQUES DU LATEX DE *Jatropha integerrima*
ISOLEMENT - ANALYSE STRUCTURALE - BIOACTIVITE

NOM ET PRENOM : NDIAYE WALY

Nature de Document : Mémoire de D.E.A de Chimie et Biochimie des produits naturels

Date et lieu de soutenance : le 11 novembre 2006 à la F.S.T de l'U.C.A.D

Composition du jury :

Président	: Abdoulaye	SAMB	Professeur	FST - UCAD
Examineurs :	Mamadou	KONE	Professeur	FST - UCAD
	Yérin Mbagnick	DIOP	Maître de Conférence Agrégé FMPO - UCAD	
	Alassane	WELE	Maître-Assistant FMPO - UCAD	

RESUME

Ce travail de recherche a porté sur l'isolement et la caractérisation de peptides cycliques isolés du latex de *Jatropha integerrima*, Euphorbiaceae. Deux cyclopeptides originaux dénommés intégerrimacyclopeptides A et B ont été obtenus par des techniques de chromatographie dont la CLHP. Leurs séquences ont été déterminées par des méthodes chimiques, par spectrométrie de masse en tandem MS / MS (ESI- Q- TOF) et par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) homo et hétéronucléaire à deux dimensions. Ces cyclopeptides sont doués d'activité cytotoxique sur les cellules tumorales KB du nasopharynx humain avec IC₅₀ de $0,46 \pm 0,4$ µg/ml et $0,66 \pm 0,8$ µg/ml.

Mots clés : *Jatropha*, spectrométrie de masse, RMN, cytotoxicité, intégerrimacyclopeptides A et B.