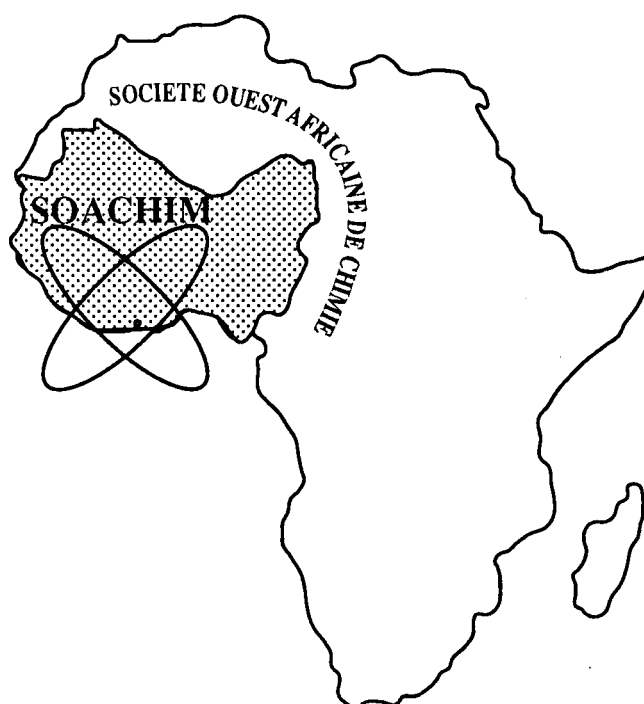


*Etude des propriétés fluorescentes de  
l'antibactérien almazole D et C. Mise en  
évidence de la conversion photochimique de  
l'almazole D en C par voie fluorimétrique*

**Bédié Mbow, Ibrahima Ndiaye, Atanasse Coly,  
Alphonse Tine**

*Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*

*J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*(2014), 038 : 15- 21  
19<sup>ème</sup> Année, Décembre 2014



ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2  
Cote INIST (CNRS France) : <27680>  
Site Web: <http://www.soachim.org>

## **Etude des propriétés fluorescentes de l'antibactérien almazole D et C. Mise en évidence de la conversion photochimique de l'almazole D en C par voie fluorimétrique**

**Bédié Mbow<sup>1</sup>, Ibrahima Ndiaye<sup>1\*</sup>, Atanasse Coly<sup>2</sup>, Alphonse Tine<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>*Groupe de Recherches sur les Substances Bioactives, (GRSB), Faculté des Sciences et Techniques Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.*

<sup>2</sup>*Laboratoire de Photochimie et d'Analyse, (LPA), Faculté des Sciences et Techniques Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.*

(Reçu le 27/08/2014 – Accepté après corrections le 18/12/ 2014)

**Résumé:** Après isolement des métabolites secondaires fluorescents, l'almazole C et l'antibactérien almazole D à partir de l'algue rouge *Haraldiophyllum sp*<sup>[1-2]</sup>, une étude fluorimétrique comparative de ces alcaloïdes indoliques naturels a été menée. Ce travail nous a permis de confirmer la révision de la structure de l'almazole D après constat de sa conversion photochimique en almazole C suite à une réaction de décarboxylation. Ce travail a permis aussi d'obtenir des conditions optimales d'analyse de ces alcaloïdes.

**Mots clés :** Almazole D, Almazole C, *Haraldiophyllum*, analyses par fluorescence, alcaloïdes indoliques, conversion photochimique, lumière UV.

### **Study of the fluorescent properties of the antibacterial almazole D and C. Description of photochemical conversion of almazole D into C by fluorimetric method**

**Abstract :** After isolation of fluorescents secondary metabolites, almazole C and the antibacterial almazole D from the red algae *Haraldiophyllum sp*<sup>[1-2]</sup>, a comparative fluorimetric study of these unusual natural indole alkaloids have been investigated. This work has allowed us to confirm the revised structure of almazole D after finding its photochemical conversion into almazole C following decarboxylation. This work led also the obtaining of optimum analytical conditions of these alkaloids.

**Keywords:** *almazole D, almazole C, Haraldiophyllum, fluorescence analysis, indole alkaloids, photochemical conversion, UV light.*

---

\* **Auteur de correspondance :** *Ibrahima Ndiaye*, E-mail : [ibrave@yahoo.fr](mailto:ibrave@yahoo.fr) ; Tel.: (221) 776425962

## 1. Introduction

Dans des travaux précédents<sup>[1-3]</sup>, nous avons rapportés les résultats de nouveaux alcaloïdes comme les almazoles (A-D) **1-2**, **4-5** et le peptide modifié préalmazole C **3**, isolés de l'algue rouge *Haraldiophyllum sp.*, récoltée en marée basse sur les rochers des Almadies (nord de Dakar, Sénégal). Ces composés se caractérisent par la présence de l'oxazole 2,5-disubstitué au niveau de C5' avec un noyau indole et à C2' avec un groupement N,N-diméthylphénylalanine (**Figure 1**). Après élucidation spectroscopique des almazoles C **4**<sup>[1]</sup> et D **5**<sup>[2]</sup>, la structure de l'almazole C **4** a été confirmée par synthèse biomimétique, et sa configuration absolue a été déterminée<sup>[1]</sup>. Nous n'avions pas synthétisé l'almazole D **5**, cependant nous avons noté la préparation des almazoles A **1** et B **2** par photolyse de N-acyl isoxazol-5(2H) one<sup>[4]</sup>. Nous avons remarqué que, les almazoles D et C présentent un signal de fluorescence intense dans le méthanol avec des longueurs d'onde maximale d'excitation ( $\lambda_{ex} = 365$  nm) et d'émission ( $\lambda_{em} = 470$  nm)<sup>[1]</sup>; Cette fluorescence est très certainement due à la présence des noyaux indole et oxazole dans ces molécules. On peut noter que cette fluorescence est en rapport avec l'aspect brillant de l'algue et du changement de couleur en fonction de la profondeur de l'eau où l'algue a été récoltée en marée basse: rose vers 1 m de profondeur et rouge près de la surface (entre 0,2-0,3 m). L'évaluation de l'activité biologique indique que l'almazole D **4** est le premier composé de la famille des almazoles dotée d'une activité antibactérienne. Il présente une forte activité antibactérienne contre les germes de Gram-négatif tels que *Serratia marcescens* et *Salmonella typhi XLD*<sup>[2]</sup>.

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

## 2. Partie expérimentale

### 2.1 Réactifs

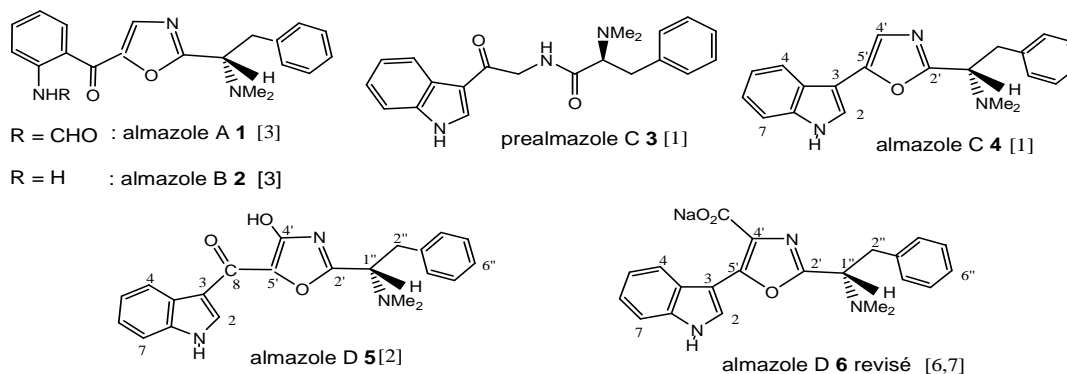
Les almazole D et C sont des produits naturels organiques extraits de l'algue rouge *Haraldiophyllum sp.* récoltée sur les rochers des Almadies (nord de Dakar). Le protocole expérimental d'isolement des almazoles a été rapporté précédemment<sup>[1-3]</sup>. Toutes les solutions ont été préparées à partir d'échantillons originaux d'almazole naturel C et D. L'acide chlorhydrique (36%), les pastilles d'hydroxyde de sodium (97%) et les solvants pour analyses spectroscopiques tels que l'acétonitrile (99,9% ; Trans. (230 nm : 99%), le butanol (99,7% ; Trans. (280 nm : 98%), le DMF (99,8% ; Abs. (340-400nm) : 0,01) et le cyclohexane (99,5% ; Trans. (255 nm : 98%) proviennent de Sigma Aldrich (Taufkirchen, Allemagne). L'éthanol (99,8% pour analyse fluorimétrique) vient de Carlo Erba.

### 2.2 Appareillage

Les mesures de fluorescence à température ambiante ont été faites avec un spectrophotofluorimètre Kontron, modèle SFM-25 connecté à un ordinateur et piloté par le logiciel LCWIN-25.

Une lampe à haute pression de mercure, Osram 200W HBO avec une source d'alimentation Oriel modèle 8500 a été utilisée pour la réalisation des réactions de photolyse. Le dispositif photochimique inclut une lampe au mercure, un ventilateur et une lentille de quartz appropriée pour concentrer la radiation incidente sur la cuve contenant la solution.

Une cuve parallélépipédique en quartz (Labomoderne, France) comprenant cinq faces polies avec d'une épaisseur de 1cm a été placée devant le faisceau optique à 60 cm de la lampe d'irradiation. Les mesures de pH ont été effectuées avec un pH-mètre Consort, modèle P107 et des micropipettes (Pipetman) de 20 et 100  $\mu$ l ont été utilisées pour les dilutions.



**Figure 1:** Métabolites secondaires de l'algue rouge *Haraldiophyllum sp.*

### 2.3 Préparation des solutions

La densité des almazoles a été déterminée en calculant le ratio de la masse de 100 µl de composé sur celui d'une quantité égale d'eau distillée. Les densités trouvées sont les suivants: 0,78 pour l'almazole D et de 0,73 pour l'almazole C. A partir de ces valeurs, des solutions mères  $10^{-3}$ M des deux composés ont été préparées dans l'éthanol et des dilutions en série ont été effectuées pour obtenir les solutions de travail. Toutes les solutions ont été protégées contre la lumière avec une feuille d'aluminium et conservées au réfrigérateur à 6 ° C. Les solutions mères de HCl (1N) et NaOH (1N) ont été préparées avec de l'eau distillée et les séries de dilutions ont été faites à partir de ces solutions mères.

### 3. Méthodologie: Les mesures analytiques et réactions de photolyse

Un échantillon de la solution diluée d'almazole est placé dans la cuve en quartz et les spectres de fluorescence ont été enregistrés entre 200 et 320 nm pour l'excitation et entre 320 et 500 nm pour l'émission avec une vitesse de balayage de 480 nm/min. Pour chaque composé, l'intensité de fluorescence a été déterminée à des longueurs d'onde maximales d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ ) fixes en mesurant la hauteur du pic spectral. Les courbes de calibration linéaires ont été obtenues à ces valeurs de  $\lambda_{ex}$  et  $\lambda_{em}$ . 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 par l'enregistrement des courbes d'intensité de fluorescence (IF) en fonction du temps d'irradiation UV ( $t_{irr}$ ). Toutes les

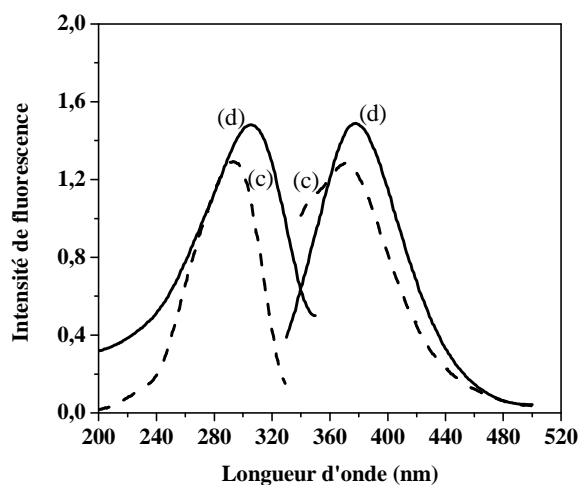
études de photolyse ont été réalisées à 22°C. Aucun dispositif de refroidissement n'était nécessaire car il n'y a pas eu de chaleur produite pendant l'irradiation. Toutes les mesures de fluorescence ont été corrigées en tenant compte du signal du solvant et réalisées dans les mêmes conditions de voltage (HV = 400V) et de sensibilité (facteur = 1). Les données expérimentales ont été traitées avec un logiciel spécialisé : Microcal Origin, version 6.0, qui permet également de tracer les courbes. Au cours de la photolyse, la solution de la cuve de quartz était agitée magnétiquement.

## 4. Résultats et discussion

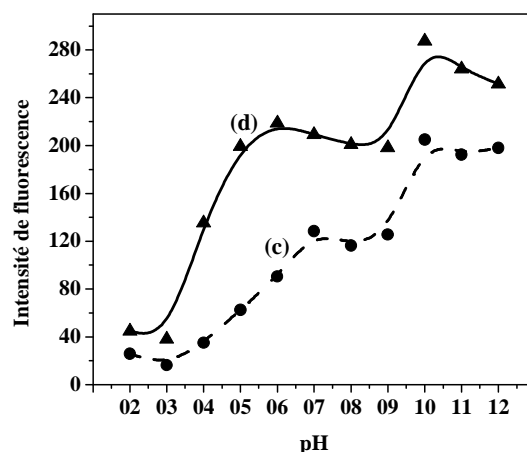
### 4.1 Propriétés fluorescentes des almazoles

Nous avons observé que les almazoles D et C étaient naturellement fluorescents dans de nombreux solvants en milieu neutre ou alcalin. Les spectres d'excitation et d'émission enregistrés (**Figure 2**) ont une forme similaire dans tous les solvants étudiés et se caractérisent par une seule bande sans épaulements.

Etant donné que le signal de fluorescence est sensible au pH<sup>[5]</sup>, l'influence du pH sur l'intensité de fluorescence des almazoles étudiés a été vérifiée. Le pH a été mesuré avec un pH-mètre en utilisant des concentrations de NaOH ou HCl appropriées au lieu de solutions tamponnées. Les résultats obtenus (**Figure 3**) montrent que l'intensité de fluorescence augmente rapidement avec l'augmentation du pH et atteint deux paliers pour des valeurs de pH comprises entre 6-9 pour le premier palier et 10-12 pour le second. Pour la suite des expériences analytiques, le pH optimal de 10 sera choisi pour les deux composés.



**Figure 2:** Spectres d'excitation et d'émission enregistré dans l'éthanol pour l'almazole D (d):  $10^{-7}$  M,  $\lambda_{ex} = 306$  nm,  $\lambda_{em} = 378$  nm et l'almazole C (c):  $10^{-5}$  M,  $\lambda_{ex} = 293$  nm,  $\lambda_{em} = 370$  nm.



**Figure 3:** Effet du pH (concentrations appropriées de NaOH ou HCl) sur l'intensité de fluorescence de l'almazole D (d) :  $10^{-7}$  M,  $\lambda_{ex} = 306$  nm,  $\lambda_{em} = 378$  nm et de l'almazole C (c):  $10^{-5}$  M,  $\lambda_{ex} = 293$  nm,  $\lambda_{em} = 370$  nm.

Nous avons examiné également l'effet de quelques solvants organiques protiques et aprotiques et des solutions aqueuses dans des conditions optimales de pH sur les propriétés spectrales de fluorescence des almazoles étudiés. Les longueurs d'onde maximales analytiques d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ ) et les intensités relatives de fluorescence ( $I_F$ ) des deux almazoles dans quelques milieux sont présentés au **Tableau I**. On observe un important déplacement bathochrome à la fois des bandes d'excitation (de 13 à 68 nm) et d'émission (de 11 à 86 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. En plus des déplacements des bandes, il se produit une augmentation du signal dans la plupart des solvants prospectés. L'éthanol semble être pour les deux composés, le milieu idéal pour l'étude de la fluorescence. Ce résultat pourrait être lié à une précédente étude<sup>[2]</sup> conduite dans le

méthanol et qui confirme que le signal de fluorescence augmente généralement dans les milieux alcooliques.

#### 4.2 Effets de la lumière UV sur les almazoles

##### 4.2.1 Irradiation des almazoles D et C

Le but de cette étude est d'examiner la photostabilité des alcaloïdes marins, almazoles C et D. A cet effet, nous avons utilisé une lampe à haute pression de mercure de 200W qui fournit un rendement lumineux relativement continu de 200 à 800 nm. L'influence de la lumière UV sur le signal de fluorescence des deux almazoles a été suivie à des longueurs d'onde analytiques d'excitation et d'émission dans l'éthanol. Pour l'almazole C, nous avons constaté dans tous les cas, une diminution drastique de l'intensité de fluorescence avec le temps d'irradiation UV, indiquant ainsi une photodécomposition relativement rapide de cet alcaloïde (**Figure 4**).

**Tableau I:** Paramètres analytiques de fluorescence des almazoles dans différents milieux.

|                              | Solvant                  | $\lambda_{ex}$ (nm) <sup>a</sup> | $\lambda_{em}$ (nm) <sup>a</sup> | $I_F$ <sup>b</sup> |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Almazole D<br>( $10^{-5}$ M) | Eau (pH=07) <sup>c</sup> | 304                              | 378                              | 236                |
|                              | Eau (pH=10) <sup>c</sup> | 310                              | 363                              | 354                |
|                              | Ethanol                  | 304                              | 378                              | 2100               |
|                              | Butanol                  | 358                              | 383                              | 157                |
|                              | Acetonitrile             | 320                              | 375                              | 6                  |
|                              | DMF                      | 317                              | 370                              | 62                 |
|                              | Cyclohexane              | 288                              | 306                              | 4                  |
| Almazole C<br>( $10^{-5}$ M) | Eau (pH=07)              | 291                              | 367                              | 6                  |
|                              | Eau (pH=10)              | 287                              | 363                              | 9                  |
|                              | Ethanol                  | 284                              | 292                              | 145                |
|                              | Butanol                  | 290                              | 326                              | 55                 |
|                              | Acetonitrile             | 282                              | 332                              | 14                 |
|                              | DMF                      | 296                              | 333                              | 25                 |
|                              | Cyclohexane              | 288                              | 326                              | 7                  |

<sup>a</sup>Valeurs des longueurs d'onde maximale des spectres d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ );

<sup>b</sup> Intensité de fluorescence relative, corrigé avec le signal du solvant;

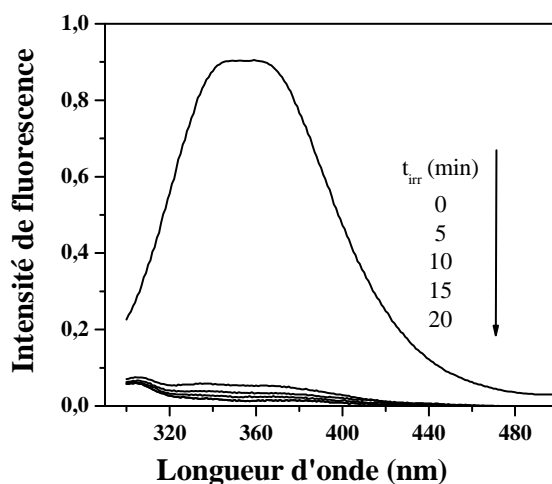
<sup>c</sup> Valeurs correspondantes à  $[NaOH] = 10^{-7}$  et  $5 \times 10^{-4}$  M;

En effet, après un temps d'irradiation de 5 minutes, il ne restait plus que 6% environ de l'intensité de fluorescence initiale de l'almazone C. En outre, ce signal de fluorescence résiduelle a continué 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.

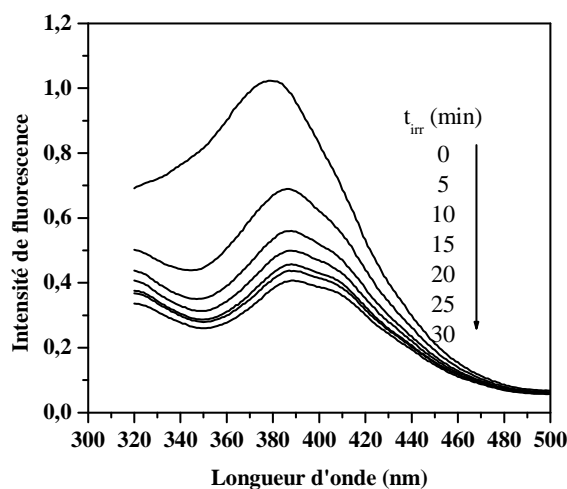
En revanche, pour l'almazone D, le signal de fluorescence décroît progressivement avec l'augmentation du temps d'irradiation et se stabilise autour de 37% de la valeur initiale au bout de 30 min d'irradiation (**Figure 5**). Ce signal de fluorescence résiduelle trop élevée est due à la formation progressive d'un photoproduit

fluorescent, émettant à une longueur d'onde plus courte ( $\lambda_{em} \approx 292$  nm) par rapport à l'almazone D, et chevauchant la longueur d'onde analytique d'émission initiale de l'alcaïoïde irradié.

Par ailleurs, après 15 min d'irradiation de l'almazone 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. D'autre part, après 30 minutes d'irradiation, nous constatons un chevauchement avec une similitude de forme entre les spectres de l'almazone D irradié et celui de l'almazone C non irradié (**Figure 6**).



**Figure 4:** Effet du temps d'irradiation UV sur l'intensité de fluorescence de l'almazone C dans l'éthanol: concentration =  $10^{-5}$  M,  $\lambda_{ex} = 293$  nm,  $\lambda_{em} = 370$  nm.

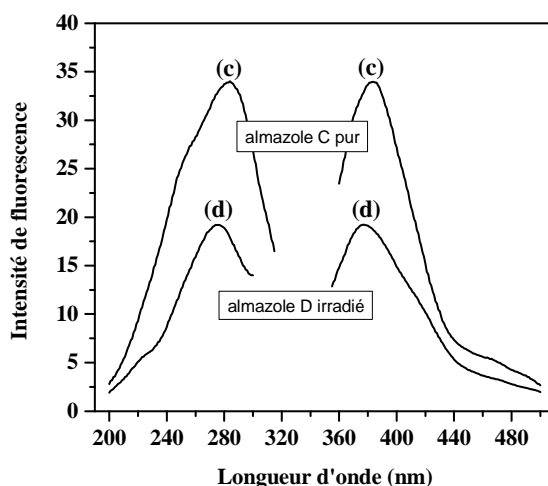


**Figure 5:** Effet du temps d'irradiation UV sur l'intensité de fluorescence de l'almazone D dans l'éthanol: concentration =  $10^{-5}$  M,  $\lambda_{ex} = 304$  nm,  $\lambda_{em} = 378$  nm.

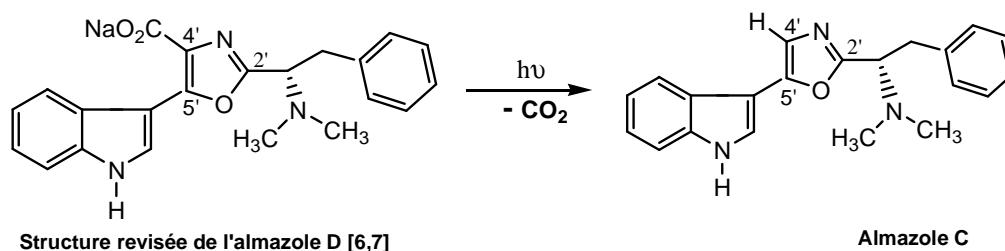
Etant donné que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont caractéristiques de chaque composé, on peut soutenir l'idée que l'almazole D s'est converti photochimiquement en almazole C après une réaction de décarboxylation. Cette décarboxylation suggère la présence d'un groupement carboxylate sur le carbone C4' de l'oxazole et l'absence de carbonyle entre l'indole et l'oxazole comme précédemment décrit<sup>[2]</sup>. Cette conversion confirme donc la nouvelle structure révisée de l'almazole D proposée par Tonsiengsom et coll.<sup>[6,7]</sup>. Par ailleurs, on peut noter que lors de son extraction, l'almazole D naturel était sous forme de carboxylate de sodium.<sup>[6,7]</sup>, 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 isolé à partir de la phase aqueuse issue de la partition eau / acétate d'éthyle<sup>[2]</sup>.

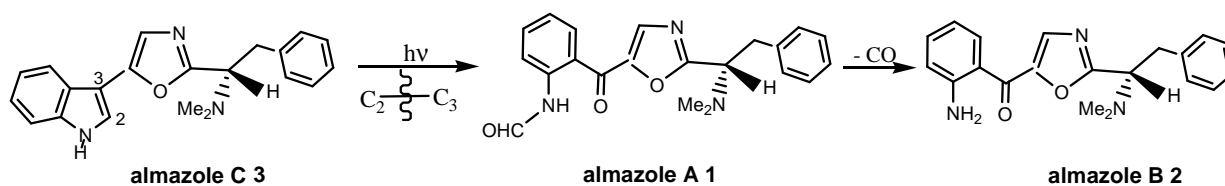
La sensibilité de l'almazole C à la lumière est en accord avec l'isolement à partir du même échantillon d'algue des almazoles A1 et B 2<sup>[3]</sup>. En effet, l'almazole A qui est le précurseur de l'almazole B par déformylation<sup>[3]</sup>, peut lui même, être issu d'une coupure oxydative de la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> de l'indole après de longues expositions de l'algue aux rayons solaires (Figure 8)<sup>[1]</sup>. On rappelle que l'algue vit sur les rochers entre 0,2 et 1,2 m de la surface de l'eau. Elle est donc exposée en permanence aux rayons solaires.



**Figure 6:** Spectres d'excitation et d'émission enregistrés dans l'éthanol pour l'almazole D irradié (d) :  $10^{-5}$  M,  $\lambda_{ex}=276$  nm,  $\lambda_{em}=378$  nm, tirr =30 min et de l'almazole C (c):  $10^{-5}$  M,  $\lambda_e =293$  nm,  $\lambda_{em}=370$  nm.



**Figure 7:** Conversion photochimique par décarboxylation de l'almazole D en almazole C



**Figure 8 :** Biogénèse des almazoles A et B à partir de l'almazole C

#### 4.2.2 Cinétique de la photolyse

La vitesse de la réaction de photolyse est particulièrement rapide pour l'almazole C, par suite d'une chute brutale du signal de fluorescence durant les 5 premières minutes d'irradiation (**Figure 4**). Cette réaction pourrait obéir à une cinétique apparente du premier ordre seulement pour des temps d'irradiation très courts ( $\leq 5$  min). En revanche, la vitesse de photolyse est beaucoup plus lente dans le cas de almazole D (**Figure 5**), pour lequel des relations linéaires satisfaisantes ont été obtenues pour les courbes cinétiques de photolyse. Nous avons utilisé les équations suivantes pour déterminer les lois cinétiques :  $\ln I_0 / I = kt$  pour une cinétique d'ordre 1 et  $I_0 / I = 1+k[A]_0t$  pour une cinétique d'ordre 2. Dans ces relations,  $I_0$  et  $I$  représentent l'intensité de fluorescence à  $t = 0$  et  $t \neq 0$  ;  $[A]_0$  étant la concentration initiale de l'almazole étudiée. La loi cinétique dépend du solvant utilisé et elle est du premier ordre dans l'éthanol (demi-vie,  $t_{1/2} = 28,4$  min) tandis que dans une solution aqueuse (pH = 10), une cinétique du deuxième ordre est observée (demi-vie,  $t_{1/2} = 4,2$  min). La cinétique du deuxième ordre dans l'eau montre que l'almazole D pourrait être persistant et majoritaire sous un environnement ensoleillé. Ceci est confirmé par les résultats de l'expérience qui indique que l'almazole D est de loin le métabolite secondaire majoritaire de l'algue *Haraldiophyllum sp*<sup>[2]</sup>.

#### 5. Conclusion

Dans ce travail, nous avons utilisé la méthode de fluorescence pour évaluer le degré de photodégradation des alcaloïdes indoliques, almazole D et C.

La sensibilité photochimique des deux composés semble être en accord avec la nature des métabolites secondaires isolés de cette algue.

Avec cette étude, nous avons observé la conversion photochimique de l'almazole D en almazole C avec des méthodes fluorimétriques. Cette transformation nous a permis surtout de confirmer la révision de la structure chimique de l'almazole D.

#### Bibliographie

- [1] Guella G, Mancini I, NDiaye I, Pietra F. Almazole C, a New Indole Alkaloid Bearing an Unusually 2,5-Disubstituted Oxazole Moiety and its Putative Biogenetic Peptidic Precursors, from a Senegalese Delesseriacean Seaweed. *Helv.Chim. Acta* (1994) 77, 1999-2006.
- [2] NDiaye I, Guella G, Mancini I, Pietra F. Almazole D, a New type of Antibacterial 2,5-Disubstituted Oxazolic Dipeptide from a Red Alga of the Coast of Senegal. *Tetrahedron lett* (1996) 37, 3049-3050.
- [3] NDiaye I, Guella G, Chiasera G, Mancini I, Pietra F. Almazole A and Almazole B, Unusual Marine Alkaloids of Unidentified Red Seaweed of the Family Delesseriaceae from the Coasts of Senegal. *Tetrahedron lett* (1994) 35, 4827-4830.
- [4] Khalafy J, Svensson CE, Prager RH, Craig MW. A new synthesis of chiral aminoalkyloxazole carboxylate esters from isoxazol-5(2H)-ones: the synthesis of almazoles A and B. *Tetrahedron lett* (1998) 39, 5405-5408.
- [5] Coly A, Aaron JJ. Photochemically-induced fluorescence determination of sulfonylurea herbicides using micellar media. *Talanta*, (1999) 49, 107-117.
- [6] Tonsiengsom S. Studies toward the total synthesis of alkaloids : Nagelamide A and D, Agelastatin D, Dragmacidin A-C, Salacin and Almazoles. PhD, Oregon State University (2006).
- [7] Miyake F, Hashimoto M, Tonsiengsom S, Yakushijin K., Horne DA. Synthesis of 5-(3-indolyl)oxazole natural products. Structure revision of Almazole D. *Tetrahedron* (2010) 66, 4888-4893.