

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2016

THESES 2016 / TOU3 / 2067

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Chloé GANDINI

**Etude phytochimique d'une plante médicinale péruvienne *Cordia lutea*
Lam. ayant démontré une activité biologique contre la bactérie
Helicobacter pylori.**

Le 6 septembre 2016

Directeur de thèse : Mr le professeur FABRE Nicolas

JURY

Président : Mr le professeur VERHAEGHE Pierre

1er assesseur : Mr le professeur FABRE Nicolas

2ème assesseur : Mme le docteur Le-LAMER Anne-Cécile

3ème assesseur : Mr le docteur LLANES Fabrice

4ème assesseur : Mme le docteur JULLIAN Valérie

PERSONNEL ENSEIGNANT

de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2015

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo- Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES- GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires

M. CESTAC P	Pharmacie Clinique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie
Mme THOMAS F	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C	Biophysique
M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C	Physiologie
Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
Mme COSTE A (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N	Biochimie
Mme DERAËVE C	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A	Toxicologie
Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
Mme LEFEVRE L	Physiologie
Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
M. LEMARIE A	Biochimie
M. MARTI G	Pharmacognosie
Mme MIREY G (*)	Toxicologie
Mme MONTFERRAN S	Biochimie
M. Olichon A	Biochimie
M. PERE D	Pharmacognosie
Mme PORTHE G	Immunologie
Mme REYBIER-VUATToux K (*)	Chimie Analytique
M. Sainte-Marie Y	Physiologie
M. Stigliani J-L	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D	Hématologie
Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires Assistants Hospitolo-Universitaires

Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

Avant-propos

Cette thèse expérimentale présente les résultats de mon stage de master II, Chimie pharmaceutique et valorisation des substances naturelles que j'ai effectué à l'université de Paris-Saclay au sein de la faculté de pharmacie Paris XI. Le stage s'est déroulé au laboratoire LMI-LAVI de l'université péruvienne Cayetano Heredia, à Lima, qui constitue l'antenne péruvienne du laboratoire de pharmacochimie et de pharmacologie pour le développement (PHARMA-DEV) dans l'UMR 152, associant l'université Paul Sabatier de Toulouse et l'Institut pour la recherche et le développement (IRD).

Mon sujet de stage s'inscrit dans le cadre du sujet de thèse de Inès Yolanda Castro, étudiante au laboratoire LMI-LAVI de l'université péruvienne Cayetano Heredia. Elle travaille sur la caractérisation phytochimique et l'évaluation de l'activité biologique de *Cordia lutea*.

Mon travail s'est focalisé sur l'isolement et la caractérisation chimique des composés isolés au moyen de la spectroscopie de masse, de la RMN 1D (¹H-RMN, ¹³C-RMN) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), afin de contribuer à la connaissance de la composition chimique de *Cordia lutea* L.

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire LMI-LAVI, antenne péruvienne de l'UMR 152 Pharmadev IRD. À ce titre, je suis reconnaissante envers le Dr Michel Sauvain pour m'avoir accueillie dans son équipe à Lima.

De même, envers le professeur Nicolas Fabre auquel j'adresse un grand merci pour m'avoir acceptée au sein de l'UMR 152 Pharmadev de Toulouse ainsi que d'être le directeur de cette thèse d'exercice. Je vous remercie également pour les cours et travaux pratiques auxquels j'ai pu assister et qui ont contribué à m'intéresser aux substances naturelles.

Je remercie le Dr Valérie Jullian d'avoir accepté d'être ma tutrice et de m'avoir intégré dans un de ses projets de recherche et de participer à mon jury de thèse.

Un énorme merci à Inès Yolanda Castro pour m'avoir aidée, guidée et conseillée sur les manipulations expérimentales et sur les analyses des résultats obtenus. De même, pour les moments très sympas passés à Lima.

Sous leur direction, j'ai pu être initiée au travail dans la recherche pharmaceutique.

Je tiens à remercier le professeur Denis Castillo, également chercheur au laboratoire, pour son chaleureux accueil et son soutien.

J'adresse également un grand merci à tous les étudiants faisant partie du laboratoire LMI-LAVI, pour leur accueil, leurs conseils et les supers moments partagés ensemble lors de ces six mois de stage que je n'oublierai pas.

Je tiens à remercier les membres du jury pour leur présence et d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Je remercie Mr le professeur Pierre Verhaeghe d'être le président du jury. Vos conseils durant mes études de pharmacie m'ont grandement aidé et j'ai particulièrement apprécié vos cours de chimie thérapeutique.

Je remercie Mme le docteur Le-Lamer Anne-Cécile, pour ses conseils et ses TP de mycologies qui étaient vraiment intéressants et ont contribué à améliorer mes compétences de reconnaissances afin de continuer à chercher des champignons en forêt sans se tromper !

Je remercie également le Dr Fabrice Llanes de m'avoir consacré du temps lors de mes différents stages dans son officine. Il m'a initiée au travail en officine et m'a fait comprendre le rôle important du pharmacien en terme d'éducation thérapeutique, lors de la délivrance du médicament.

Également, un énorme merci à mes parents qui me soutiennent depuis le début de mes études en pharmacie, sans eux je n'aurais pas pu effectuer ces longues études ni partir au Pérou pour réaliser ce stage.

Enfin la famille et les amis qui ont été d'un grand soutien et qui sont là pour partager les bons et les difficiles moments.

Pour terminer, je remercie l'Université Paris-Saclay de m'avoir accordée une bourse de mobilité, soutien financier non négligeable pour ces six mois à Lima.

Liste des abréviations :

δ H : Déplacement chimique du proton

δ C : Déplacement chimique du carbone

Cq : carbone quaternaire

CI50 : Concentration inhibitrice ; représente la concentration d'une substance qui est requise pour une inhibition à 50 % *in vitro* d'une activité biologique.

CMI : concentration minimale inhibitrice ; est la plus petite concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber, *in vitro*, la croissance d'une souche de bactéries.

CCM : Chromatographie sur couche mince

COSY : COrrélation Spectroscopy

DCM : Dichlorométhane

Hp: *Helicobacter pylori*

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

IPP : Inhibiteur de la pompe à protons

IRD : Institut pour la recherche et le développement

J-MOD : J-Modulation

LMI-LAVI : Laboratoire Ando-amazonien de chimie du vivant

MPLC : Chromatographie liquide moyenne pression

MeOH : Méthanol

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

UMR : Unité mixte de recherche

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Tables des figures et des tableaux :

Figure 1. Mélange de plantes médicinales

Figure 2. Structures chimiques extraites à partir d'organismes vivant

Figure 3. De l'écorce de quinquina à la chloroquine (Savarine©)

Figure 4. *Helicobacter pylori*

Figure 5. Infection de la muqueuse par Hp.

Figure 6. Ulcère provoqué par Hp

Figure 7 : Recommandations françaises

Figure 8. Marché de plantes médicinales à Huaraz

Figure 9. Régions où l'on rencontre *Cordia lutea*

Figure 10. *Cordia lutea*

Figure 11. Fleurs de *Cordia lutea*

Figure 12. Composés principaux isolés de *Cordia lutea*

Figure 13. Alcaloïdes pyrolizidiniques

Figure 14. *Cordia curassavica*

Figure 15. *Cordia americana*

Figure 16. *Cordia verbenaceae*

Figure 17. *Cordia dichotoma*

Figure 18. Cordiaquinones A, B, J et K

Figure 19. Constituants principaux retrouvés des feuilles de *Cordia verbenaceae*

Figure 20. Structure chimique de l'acide rosmarinique

Figure 21. Représentant une partie des constituants de *Cordia dichotoma*

Figure 22. Schéma de partition du fractionnement biodirigé

Figure 23. Schéma d'extraction à partir de fleurs sèches de *Cordia lutea*

Figure 24. Fractions obtenues à partir de la MPLC 1

Figure 25. CCM de la MPLC 5

Figure 26. CCM de la MPLC 7

Figure 27. Comparaison des différents composés (SPE8)

Figure 28. Comparaison des CG0, CG4 et CG5 entre eux

Figure 29. SPE 18b du composé C

Figure 30. Spectre proton de CG4

Figure 31. Spectre proton de CG 5

Figure 32. Spectre proton de CG0

Figure 33. Spectre proton de SC3

Figure 34. Spectre carbone de SC3

Figure 35. Spectre HSQC de SC3 (2)

Figure 36. Alpha-L-Rhamnopyranose obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3

Figure 37. Fragment 1 obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3a

Figure 38. Fragment 2 obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3 ;

Figure 39. Fragment 3 obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3a

Figure 40. Structure des cycles A, B, C et D de la génine moyennant l'analyse de la COSY et de l'HMBC de SC3a

Figure 41. Corrélations COSY et HMBC du Fragment 1'

Figure 42. Fragment 1' obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3

Figure 43. Structure proposé du composé SC3a obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3

Figure 44. Structure proposé du composé SC3b obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3

Figure 45. Spectre de masse, mode positif de SC3

Figure 46. Mécanisme de fragmentation de la génine lors de la perte de $\text{OH}^- / \text{H}_2\text{O}$.

Figure 47. Représentation de la perte du CH_2 entre SC3 (2) b et SC3 (2) a.

Figure 48. Chromatogramme UPLC et spectre de masse

Figure 49. Chromatogramme UPLC et spectre de masse

Figure 50. Biosynthèse du squalène

Figure 51. Stigmastérol

Figure 52. β -sitostérol

Figure 53. Cordialine, de *Cordia verbenaceae*

Figure 54. Triterpènes de type dammarane isolés à partir de *Cordia multispicata*

Figure 55. Stéréochimie de SC3 proposée.

Figure 56. Comparaison des spectres protons des composés CG5 et SC3.

Figure 57. Comparaison des spectres protons des composés CG5 et SC3 du signal 4.70 ppm à 5.60 ppm.

Figure 58. Spectre proton de CG5.

Figure 59. Spectre proton de CG5 (en haut) et SC3 (en bas).

Figure 60. Comparaison de la zone de 0.65 ppm à 1.30 ppm entre CG5 et SC3.

Figure 61. Comparaison des spectres carbone de SC3 (2) et de CG5.

Figure 62. Chromatogramme UPLC de CG5.

Tableau 1. Système d'élution pour la MPLC 1 et 2
Tableau 2. Fractions obtenues à partir de la MPLC 1
Tableau 3. Fractions obtenues à partir de la MPLC 2
Tableau 4. Système d'élution pour la MPLC 3
Tableau 5. Fractions obtenues à partir de la MPLC 3
Tableau 6. Système d'élution de la MPLC 4
Tableau 7. Fractions obtenues à partir de la MPLC 4
Tableau 8. Système d'élution de la MPLC 5
Tableau 9. Fractions obtenues à partir de la MPLC 5
Tableau 10. Système d'élution des MPLC 6 and 7
Tableau 11. Fractions obtenues à partir de la MPLC 6
Tableau 12. Fractions obtenues à partir de la MPLC 7
Tableau 13. Regroupement 1
Tableau 14. Regroupement 2
Tableau 15. Méthode utilisée lors de l'analyse
Tableau 16. Assignment de carbones et protons moyennant HSQC
Tableau 17. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3
Tableau 18. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3a
Tableau 19. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3 a
Tableau 20. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3
Tableau 21. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3
Tableau 22. Résultats obtenus à partir des analyses de spectrométrie de masse

Table des matières

<i>Remerciements</i>	IV
Liste des abréviations :	VI
Tables des figures et des tableaux :	VII
RESUME	XII
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XII
1ère PARTIE	XIII
I. Histoire de la pharmacognosie.....	1
II. <i>Helicobacter pylori</i>	3
III. Travail préliminaire	6
IV. <i>Cordia lutea</i>	7
1. Description botanique.....	7
2. Usage traditionnel	8
3. Composition chimique	8
V. Le genre <i>Cordia</i> , exemple de 4 espèces utilisées en médecine traditionnelle	9
1. Présentation de la famille des Boraginaceae et du genre <i>Cordia</i>	9
2. Usages traditionnels.....	10
3. Etudes biologiques et phytochimiques	12
2ème partie.....	17
MATERIELS.....	18
I. Collecte et caractérisation botanique	18
II. Réactifs chimiques et équipements.....	18
METHODES.....	19
I. Extraction à partir des fleurs sèches	19
II. Extrait méthanolique	19
1. Extraction liquide/liquide avec le dichlorométhane	19
2. Extraction liquide éther de pétrole / méthanol, eau	19
3. Fractionnement chromatographique.....	19
III. Analyses structurales	24

1. Résonance magnétique nucléaire : RMN	24
2. Spectrométrie de masse	24
3. UPLC	25
3 ^{ème} partie.....	26
I. Résultats.....	27
1. Travaux préliminaires réalisés au laboratoire	27
2. Résultats obtenus à partir du second fractionnement	28
II. Elucidation structurale.....	31
1. Spectre proton de SC3	32
2. Spectre carbone de SC3	33
3. Spectre HSQC de SC3.....	34
4. Construction par fragments	36
III. Détermination de la masse de SC3 :	46
1. Analyse en basse résolution :	46
2. Analyse haute résolution :	47
4 ^{ème} partie.....	50
I. Discussion à propos de la structure de SC3 :	51
II. Analyses des données spectrales et chromatographiques obtenues pour CG5 :	53
CONCLUSION	58
BIBLIOGRAPHIE.....	59
ANNEXES	63

RESUME

Le genre *Cordia* contient plusieurs espèces qui sont utilisées en médecine depuis des siècles. Certaines d'entre elles font actuellement l'objet d'études chimiques, biologiques et cliniques. Parmi ce groupe de plantes, on retrouve *Cordia lutea* qui pousse en particulier dans le nord du Pérou. Ce sont les fleurs sèches qui sont utilisées en médecine traditionnelle et sont encore aujourd'hui largement consommées sous forme d'infusion pour les pathologies du foie. Dans cette étude, l'extrait éthanolique des fleurs a montré une activité intéressante sur la bactérie *Helicobacter pylori*. Un travail de phytochimie a donc été initié au laboratoire afin d'identifier les composés responsables de cette activité.

Dans ce cadre, ce rapport décrit l'isolement de composés, l'analyse de spectre RMN et de spectrométrie de masse des produits obtenus afin de compléter la fiche phytochimique de *Cordia lutea*.

RESUMEN

El género *Cordia* tiene algunas especies, que son utilizadas para la medicina desde varios siglos. Actualmente, algunas de ellas están en proyectos de estudio químico, biológico y clínico. Entre ese grupo de plantas, encontramos *Cordia lutea* que crece en el norte del Perú. Las flores secas son empleadas en medicina tradicional y todavía hoy se usan como infusión para las enfermedades del hígado. En este estudio, el extracto etanólico de las flores mostró una actividad interesante contra la bacteria *Helicobacter pylori*. Un trabajo de fitoquímica fue iniciado en este laboratorio para identificar los compuestos responsables de la actividad encontrada.

Este informe describe, en este caso, el aislamiento de compuestos y el análisis del espectro de RMN y de masa de los productos obtenidos para completar la descripción fitoquímica de *Cordia lutea*.

ABSTRACT

Cordia genus has several species used in medicine for centuries. Currently, some of them are investigated in chemical, biological and clinical studies. Among this group of plants, there is *Cordia lutea*, which grow up in the north of Peru. Dry flowers are used in traditional medicine and still, they are widely consumed as infusion for liver disease.

In this study, dry flower's ethanolic extract showed an interesting activity against the *Helicobacter pylori* bacteria. Phytochemistry work was initiated in the laboratory to identify the active compounds. This thesis describes the compound isolation, NMR and mass analysis of the obtained compound to complete the phytochemical description of *Cordia lutea*.

1ère PARTIE

I. Histoire de la pharmacognosie

Autrefois appelée « matière médicale », la pharmacognosie est l'étude des matières premières et des substances à potentialité médicamenteuses d'origine biologique, issues de végétaux, d'animaux, de champignons, de minéraux ou microbiologiques [1]. C'est une des sciences les plus anciennes, elle est liée à la botanique, à la chimie ainsi qu'à la médecine et à la pharmacie. L'utilisation des plantes médicinales a longtemps été fondée sur des connaissances empiriques, entourées de magie et de superstitions [2].



<http://www.quizz.biz/quizz-835743.html>



<http://www.icsn.cnrs-gif.fr/spip.php?rubrique193>

Figure 1. Mélange de plantes médicinales

Figure 2. Structures chimiques extraites à partir d'organismes vivants.

Au cours des siècles, les découvertes scientifiques ont permis à la pharmacognosie de se rationaliser. Aujourd'hui elle implique des techniques de pointe en termes d'analyse structurale, telles que la Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN), la Spectrométrie de Masse ou le Dichroïsme Circulaire. Le couplage de ces techniques à des outils statistiques et des bases de données a introduit de nouvelles façons de travailler. En effet, il y a deux approches : la traditionnelle qui se concentre sur l'isolement de composés actifs et sur la caractérisation des produits isolés, et l'approche métabolomique qui se focalise sur l'étude de l'ensemble des molécules constituant un extrait. Le *molecular networking* est une technique qui permet de cartographier les composants d'un mélange et de les relier suivant leurs ressemblances structurales [3], [4].

Depuis toujours l'Homme s'est inspiré de la Nature pour se nourrir, se vêtir et se soigner. En effet, les plantes furent les principales composantes des préparations médicinales jusqu'au développement de la chimie de synthèse au XVIII^{ème} siècle. Certains médicaments très connus ont été synthétisés à partir de substances naturelles. Par exemple, l'aspirine (acide acétylsalicylique) est un dérivé synthétique de l'acide salicylique qui fut découvert dans l'écorce de *Salix alba*. Elle est prescrite, entre autres, comme antipyrétique et anti-inflammatoire [5].

D'autres médicaments sont d'origine naturelle : la pénicilline, un important antibiotique, a été extraite d'une moisissure du genre *Penicillium* [5], [6]. La quinine, un alcaloïde, qui provient de l'écorce d'un arbre le *Cinchona officinalis*, originaire du Pérou, et l'artémisinine, une sesquiterpène lactone, extraite d'une plante chinoise *Artemisia annua*, sont à l'origine de plusieurs traitements antipaludéens [7]. Les travaux ayant mené à la découverte de l'artémisinine furent récompensés par le prix Nobel 2015 de médecine.

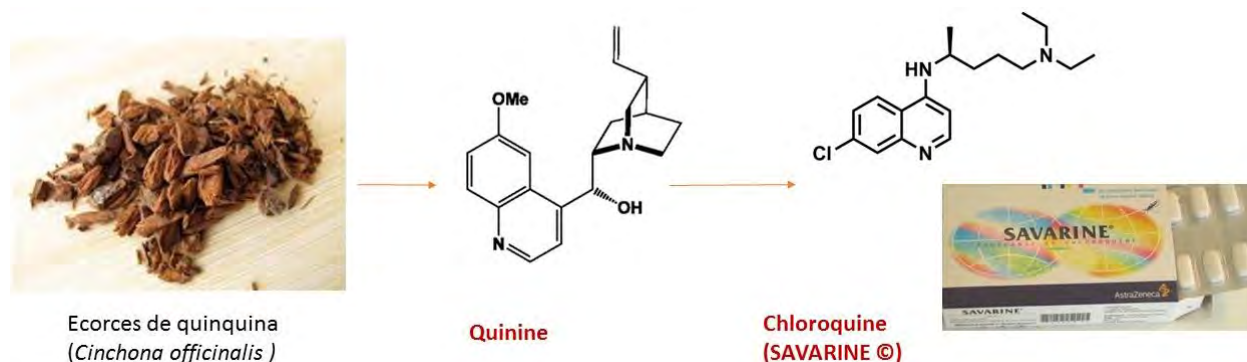


Figure 3. De l'écorce de quinquina à la chloroquine (Savarine©)
<http://www.vulgaris-medical.com/phytotherapie/quinquina>

Pourtant à partir des années 1950, la chimie des substances naturelles est délaissée au profit de la chimie de synthèse. Cependant, depuis une quinzaine d'années, la médecine naturelle revient sur le devant de la scène pour différentes raisons. D'une part, à cause de plusieurs scandales sanitaires, notamment l'affaire du Médiator© en 2009, et d'autre part du fait de la demande de la population qui se tourne de plus en plus vers des médecines dites douces, comme la phytothérapie, l'aromathérapie ou l'acupuncture. De plus, dans les pays en voie de développement l'accès au soin étant souvent difficile une grande partie de la population a encore recours à la médecine traditionnelle.

Actuellement le répertoire de certaines familles de médicaments comme les antibiotiques, devient de moins en moins efficace à cause d'une utilisation à large échelle souvent abusive, entraînant l'apparition de résistances bactériennes [8]. Ainsi les plantes et plus largement les produits naturels, peuvent donc être une source de nouvelles structures chimiques antibiotiques.

II. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (Hp) est un bacille appartenant à la famille des *Helicobacter* des bactéries du tube digestif. C'est un bacille de Gram négatif, de forme spiralée et doté de 2 à 6 flagelles [9], [10].



Figure 4. *Helicobacter pylori*
<http://www.ideo-gene.net/reflux-gastro-stop/helicobacter-pylori-symptomes-et-eradication/>

Cette bactérie a la particularité de se développer dans l'estomac, un environnement particulièrement acide puisque le pH varie de 1.5 à 5 selon qu'il soit au repos ou en phase digestive. *Hp* possède plusieurs facteurs de pathogénicité :

Ceux liés à la bactérie sont les éléments microbiens qui participent au processus d'infection et provoquent la maladie chez l'hôte infecté (c'est ce qu'on appelle la virulence). Ces facteurs sont répartis sur deux niveaux, ceux qui favorisent la colonisation et l'invasion et ceux qui entraînent directement des dommages comme les toxines bactériennes.

Pour *Hp*, celle-ci sécrète en grande quantité une uréase, enzyme neutralisant l'acidité de l'estomac, lui permettant ainsi de proliférer et de survivre dans le mucus de la paroi stomacale. Ses flagelles lui confèrent une grande mobilité dans le mucus gastrique, ce qui lui donne la capacité de coloniser une grande partie de l'estomac. Enfin, elle possède des adhésines responsables de son adhésion aux cellules épithéliales et d'autres enzymes, la super-oxyde dismutase et la catalase qui lui confèrent une résistance à la phagocytose [11].

On estime aujourd'hui que près de 50 % de la population mondiale est infectée par *Helicobacter pylori* mais il existe de grandes disparités géographiques. En effet, sa prévalence est supérieure à 90 % en Asie, en Amérique latine et dans les pays en voie de développement, alors qu'elle est égale à 30 % dans les pays occidentaux, ce qui amène des inégalités de prises en charge et du pourcentage de chances de guérir.

L'issue clinique résulte donc de facteurs de pathogénicité bactérienne, de facteurs génétiques de l'hôte, de facteurs environnementaux protecteurs ou aggravants, ainsi que de la localisation et de la durée de l'infection [9], [10].

La transmission de la bactérie est essentiellement inter-humaine, par voie orale ou par les selles. Ainsi la proximité (vie en collectivité, hôpitaux) et les mauvaises conditions d'hygiène sont des facteurs qui favorisent l'infection.

Helicobacter pylori est responsable de l'infection bactérienne chronique la plus répandue dans le monde. Elle s'acquiert généralement pendant l'enfance mais ne se manifeste pas systématiquement car la clinique est généralement silencieuse. Un sujet peut présenter une inflammation, appelée gastrite chronique, qui peut persister tant que la bactérie n'est pas éradiquée. Parfois, ces inflammations s'aggravent et vont induire des ulcères gastriques pouvant évoluer à un cancer gastrique dans 1 à 5 % des cas [11].

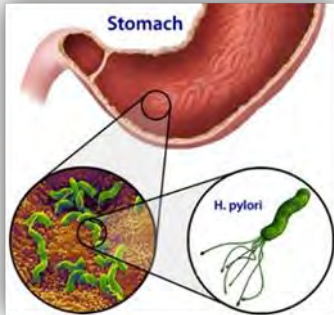


Figure 5. Infection de la muqueuse par Hp.
<https://pharmaceuticalintelligence.com/2015/05/07/ulcer-causing-helicobacter-bacteria-induce-stomach-stem-cell-to-grow/>

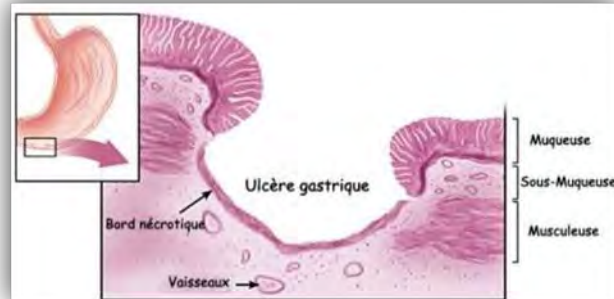


Figure 6. Ulcère provoqué par Hp
http://hepatoweb.com/ulcere_physiopathologie.php

Le diagnostic repose sur des tests non invasifs :

- Le test respiratoire à l'urée marquée au carbone 13
- La détection d'antigènes bactériens dans les selles
- La sérologie (sérum, urines, salive) : détection d'anticorps anti-H. pylori

Si ces tests s'avèrent négatifs mais que le doute persiste, il reste, en dernier recours, un test invasif l'endoscopie. C'est une méthode d'exploration et d'imagerie médicale permettant de visualiser l'intérieur du tube digestif. Le tube flexible peut accueillir des outils chirurgicaux pour réaliser des prélèvements [11].

Lorsqu'une personne est infectée et que les tests à *Hp* sont positifs, un traitement est toujours nécessaire. En France, les recommandations pour l'éradication de cette bactérie sont basées sur le consensus de Maastricht datant de 2012 [12] (Figure 7). Le schéma est le suivant :

- Traitement séquentiel de 10 jours qui comporte : 5 jours d'IPP (2 fois par jour) avec l'amoxicilline (1g, 2 fois par jour), puis 5 jours d'IPP (2 fois par jour), avec du métronidazole (500mg, 2 fois par jour) et de la clarithromycine (500mg, 2 fois par jour).
- Au bout de ces 10 jours des tests sont effectués afin de vérifier l'éradication. Si les tests sont positifs une alternative existe en Europe depuis 2013 avec une nouvelle spécialité, le Pylera© [13] qui renferme à la fois des sels de bismuth, de la tétracycline et du métronidazole, ce médicament est à prendre pendant 10 jours (3 gel, 4 fois par jour) accompagné d'un IPP (2 fois par jour).

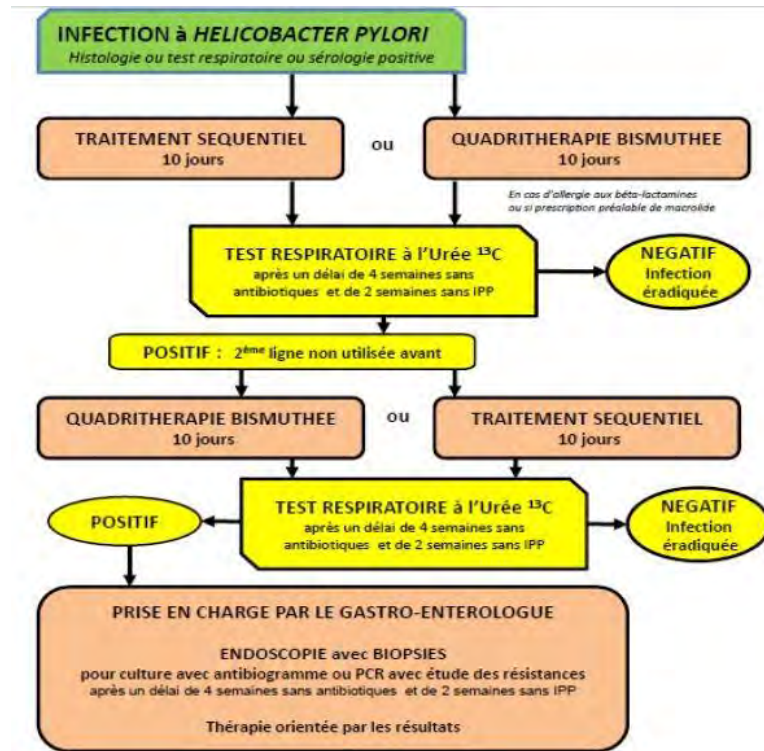


Figure 7 : Recommandations françaises [14]

Actuellement au Pérou la stratégie repose sur le traité de Maastricht II-2000 qui comporte un traitement de 1^{ère} ligne : une thérapie triple durant 14 jours et qui comprend un IPP (2 fois par jour), de la clarithromycine (500 mg, 2 fois par jour) et de l'amoxicilline (1 g, 2 fois par jour), pour les 7 premiers jours puis un IPP, de la clarithromycine et du métronidazole pour les 7 derniers jours. En cas d'échec, un traitement de 2^{ème} ligne est proposé qui repose sur une thérapie quadruple durant 7 jours avec un IPP, du bismuth (120 mg 4 fois par jour), du métronidazole (500 mg 3 fois par jour), et de la tétracycline (500 mg 4 fois par jour).

Ces traitements comportent malheureusement des effets indésirables. En effet, dans 30 à 50 % des cas, les antibiotiques provoquent des diarrhées. Pour le métronidazole et la clarithromycine, ce sont surtout des nausées, vomissements et un mauvais goût métallique qui sont reportés [15], [16]. Enfin, pour l'amoxicilline, des réactions allergiques croisées avec les bêta lactamines peuvent être observées ainsi que des colites pseudomembraneuses [17]. Ces effets indésirables diminuent l'observance, ce qui réduit le pourcentage de chance d'éradication de la bactérie. *Hp* devient résistante à une partie de ces molécules, notamment pour la clarithromycine et le métronidazole [18]. Les échecs d'éradications ont deux causes principales : la non observance du traitement, car le patient supporte mal les effets secondaires et la résistance de certaines souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques. En Europe, le taux de résistance à la clarithromycine est de 20 %, et celui concernant le métronidazole s'élève jusqu'à 42% [19]. Au Pérou, de nombreux cas de résistances sont aussi décrits et les taux élevés. Ces résistances sont expliquées en partie par des mutations au niveau de l'ARN ribosomique de la bactérie.

L'infection gastrique à *H. pylori* reste fréquente en France avec une prévalence de l'ordre de 30%, et plus de 60% dans les pays où les conditions d'hygiène sont moindres [20], [21]. De nombreux facteurs qui dépendent de l'hôte, de la bactérie infectante et de l'environnement influent sur l'évolution de la gastrite chronique et sur le développement de maladies digestives et extradiigestives. La prise en charge des patients infectés par *H. pylori* reste complexe, imparfaite et de plus en plus de résistances envers les antibiotiques sont observées. Ainsi aujourd'hui, il est devenu nécessaire de trouver de nouvelles molécules actives afin de lutter contre cette bactérie. C'est dans ce contexte qu'entre en jeu la pharmacognosie et l'ethnopharmacologie. Ces deux sciences, entre autres, vont mener vers des plantes médicinales connues pour leurs propriétés anti bactérienne et/ou utilisées pour soigner les pathologies gastriques. Cette thèse rapporte le travail phytochimique réalisé sur *Cordia lutea*, une plante médicinale péruvienne.

III. Travail préliminaire

Précédemment, un groupe d'ethnobotanistes de l'IRD a réalisé un travail de récolte de plantes médicinales dont l'usage traditionnel, dans la région de Huaraz et Chiclayo, est de traiter les problèmes gastro intestinaux. Des tests *in-vitro* d'extraits de ces plantes ont été effectués, pour parvenir à la conclusion que *Cordia lutea* était la plante qui présentait l'activité anti-*Helicobacter pylori* la plus élevée. Un travail d'isolement biodirigé a ensuite été réalisé. Trois fractions ont été isolées et caractérisées : SC1, SC2 et SC3.

Cette thèse décrit la continuité du travail d'isolement, l'objectif étant d'isoler les trois composés précédents, ainsi que d'autres, afin de compléter la fiche phytochimique de *Cordia lutea*. En effet, à ce jour, peu de travaux ont été réalisés sur cette plante pourtant très utilisée au Pérou.

IV. *Cordia lutea*

Au Pérou, les origines de la médecine traditionnelle sont à rechercher dans la religion et la mythologie à une époque antérieure à la colonisation espagnole. Le prêtre, en plus de son activité religieuse qui était de mener les rituels agricoles et sociaux, avait aussi le rôle de médecin [22].



Figure 8. Marché de plantes médicinale à Huaraz

Photo personnelle (Huaraz, 11/02/16)

Grâce à sa géographie qui concentre des contrastes vertigineux entre les trois grands ensembles qui composent le pays : le désert de la côte pacifique, les Andes avec l'altiplano, les cordillères et les canyons, et la forêt amazonienne, le Pérou possède un réservoir important de ressources naturelles et une riche biodiversité. On y trouve aussi une grande variété culturelle et aujourd'hui encore de nombreuses communautés autochtones perpétuent les savoirs en matière d'utilisation des plantes médicinales traditionnelles. Parmi ces plantes il y a *Cordia lutea* dont le nom vernaculaire au Pérou est « Flor de overo » [23].

1. Description botanique

Cordia lutea compte douze synonymes, dont *Lithocardium flavum* et *Cordia rotundifolia* R&P [24]. Elle a aussi plusieurs noms vernaculaires : *overo*, *gomo amarillo* ou *murciélago* [25] pouvant induire des confusions, d'où l'importance de la description botanique. *Cordia lutea* est un arbuste ou arbre pouvant atteindre jusqu'à 7,5 mètres de hauteur. Il pousse dans les régions du nord du Pérou entre 0 et 1500m d'altitude (cercle rouge sur la carte ci-dessous).



Figure 9. Régions où l'on rencontre *Cordia lutea*

<http://www.altiplano-voyage.com/voyage-perou/informations-pratiques-perou/carte-perou/>

Les feuilles présentent une disposition alterne, sont simples et de formes ovales ou elliptiques, avec un bord légèrement crénelé (figure 10).

Ces feuilles sont recouvertes de poils hirsutes et cireux, une des caractéristiques retrouvée dans la famille des Boraginaceae, dont fait partie *Cordia lutea*. Les fleurs, pentamères, sont disposées en panicules et la corolle est de couleur jaune (figure 11). Le fruit de forme sphérique blanc cassé possède une chair tendre [23].



Figure 10. *Cordia lutea*
(Missouri botanical garden herbarium)
<http://www.tropicos.org/Name/4001137?tab=images>



Figure 11. Fleurs de *Cordia lutea*
http://toptropicals.com/catalog/uid/cordia_lutea.htm

2. Usage traditionnel

Cordia lutea est une plante médicinale que l'on trouve facilement dans les marchés car elle est largement utilisée par les péruviens. Ce sont les fleurs séchées, sous le nom de « flor de overo » qui sont utilisées en décoction ou en infusion pour traiter les maladies hépatiques comme l'ictère par exemple ou les douleurs rénales [23].

3. Composition chimique

Cordia lutea appartient à la famille des Boraginaceae, elle pourrait donc contenir des alcaloïdes pyrrolizidiniques (PAs) connues pour leur toxicité. On ne recense qu'un seul article publié en 2015 portant sur une étude phytochimique de cette plante. Les auteurs de cette publication reportent une absence de PAs pour cette espèce d'origine péruvienne, après un travail sur la plante entière (racines, tiges, feuilles et fleurs). L'absence de cette famille de composés permet d'assurer la sécurité d'emploi des préparations médicinales à base de cette plante.

L'analyse de l'extrait brut méthanolique (obtenu à partir de la plante entière) met en évidence 5 composés, dont 2 appartenant à la famille des flavonoïdes (rutine et quercétine) et des acides gras [25]. Ces molécules sont déjà bien connues et sont presque ubiquitaires dans le monde végétal.

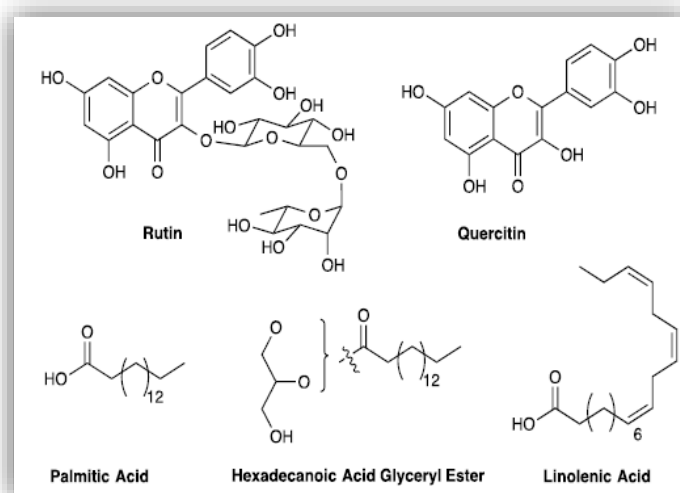


Figure 12. Composés principaux isolés de *Cordia lutea* [25]

Afin d'élargir les connaissances sur la composition phytochimique du genre *Cordia*, un travail bibliographique a été fait portant sur quatre autres espèces appartenant au genre *Cordia*.

V. Le genre *Cordia*, exemple de 4 espèces utilisées en médecine traditionnelle

1. Présentation de la famille des Boraginaceae et du genre *Cordia*

Cordia est un genre appartenant à la famille des Boraginaceae, selon la classification APG III (annexe 1) datant de 2009 [26]. Cette famille, répartie dans le monde entier et principalement dans les régions tropicales et chaudes, comporte 130 genres dont le genre *Cordia* qui à lui seul contient plus de 300 espèces [27].

Les Boraginaceae possèdent comme constituants chimiques des naphtoquinones et des dérivés phénoliques comme l'acide rosmarinique. La classe des alcaloïdes pyrrolizidiniques constitue un marqueur chimio taxonomique important des Boraginaceae car on le retrouve quasi systématiquement dans les genres qui forment cette grande famille. Cependant ces alcaloïdes sont toxiques. Des études ont montré que ces composés sont hépatotoxiques, cancérigènes, génotoxiques, tératogènes et parfois pneumotoxiques [28]. Ainsi une consommation régulière de plantes médicinales contenant ces alcaloïdes peut induire des effets indésirables graves [7], [29]. Parmi les 300 espèces qui constituent le genre *Cordia*, seule les deux espèces *Cordia sinensis* et *Cordia myxa* contiennent des PAs [30].

Ces alcaloïdes sont caractérisés par une structure pyrrolizidine qui correspond à l'association de deux cycles pyrroles. La diversification chimique se fait par des ramifications, sur les positions 7 et 1 du noyau pyrrolizidine. La plupart des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont des esters formés entre des aminoalcools et un ou deux acides carboxyliques aliphatiques [29]. Les aminoalcools dérivés de la pyrrolizidine sont appelés des nécines. Les acides estérifiant ces nécines sont des acides aliphatiques pouvant compter jusqu'à 10 carbones et sont nommés acides néciques.

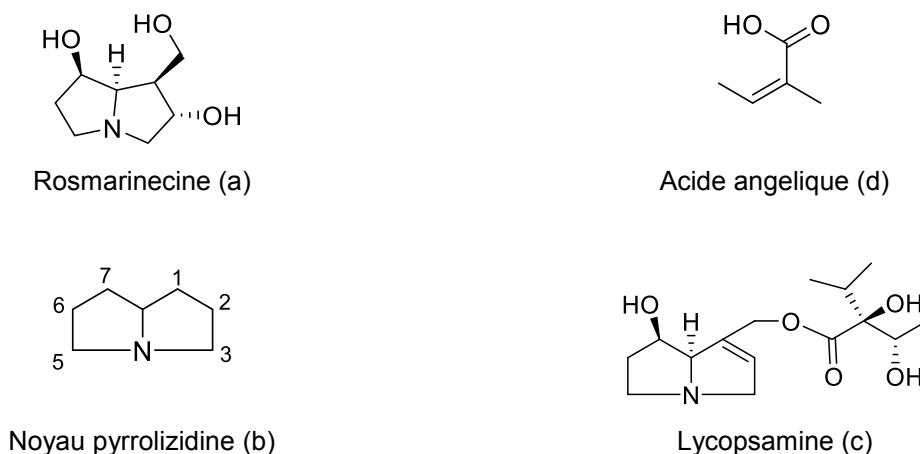


Figure 13. Alcaloïdes pyrrolizidiniques (a,b,c) et acide nécique (d)

Au sein de la famille des Boraginaceae on retrouve aussi des flavonoïdes, composés ubiquitaires du règne végétal donnant aux fleurs et aux fruits leurs couleurs, des terpènes et des acides gras, comme les oméga 6 [31].

Concernant le genre *Cordia* les études phytochimiques de plusieurs espèces ont montré la production de divers métabolites secondaires comme des flavonoïdes, des dérivés acides phénols, des chromènes, la classe des terpènes et des quinones (hydroquinones, naphthoquinones et benzoquinones terpenoïdes) [27].

2. Usages traditionnels

Certaines espèces appartenant au genre *Cordia* sont utilisées en médecine traditionnelle depuis plusieurs siècles pour répondre aux besoins de la population. Aujourd'hui encore ces plantes font partie de l'arsenal médical dans certaines régions du monde car une partie de la population n'a pas accès au traitement recommandé pour des raisons financières ou de disponibilité.

Voici quelques exemples d'espèces qui sont encore utilisées en médecine traditionnelle et qui font l'objet de publications.

Cordia curassavica est utilisée en Amérique-centrale. Au Mexique, ses feuilles sont utilisées en décoction pour traiter les pathologies gastro-intestinales. Au Panama, la même préparation est utilisée pour traiter les maladies respiratoires et au Nicaragua ce sont les maux de tête et les pathologies parasitaires qui sont concernées [32], [33].



Figure 14. *Cordia curassavica*

http://plantes-rizieres-guyane.cirad.fr/dicotyledones/boraginaceae/cordia_curassavica

Cordia verbenacea et ***Cordia americana*** sont utilisées au Brésil sous forme de cataplasme pour cicatriser les plaies [27], [34]. La décoction de feuilles est utilisée comme anti-inflammatoire, ainsi que pour le traitement des ulcères gastriques. *Cordia verbenacea* possède également des propriétés anti- rhumatismales, analgésiques et antimicrobiennes. Les feuilles et tiges sont utilisées soit en décoction ou infusion soit en un extrait alcoolique [34].



Figure 15. *Cordia americana*

<http://jardinbotanico.montevideo.gub.uy/publicaciones/especies-prioritarias/cordia-americana>



Figure 16. *Cordia verbenaceae*

<http://www.rain-tree.com/Plant-Images/cordia-pic.htm#.V5DZk7iLTIU>

Le genre *Cordia* ne se rencontre pas uniquement en Amérique centrale et en Amérique du Sud, on le retrouve aussi en Asie, avec l'espèce ***Cordia dichotoma*** qui pousse dans les régions du sud de l'Himalaya, aux alentours de 1500m d'altitude. Elle fait partie de la médecine Unani en Inde, où le fruit est également consommé dans l'alimentation de par sa composition riche en vitamines et polysaccharides. *Cordia dichotoma* a de nombreux usages médicaux. Les feuilles possèdent des propriétés anti-ulcères, antitussives et astringentes déjà décrites pour *Cordia verbenacea*. Elles jouissent également d'une réputation d'antidiabétique, d'anti-helminthique d'immuno-modulateur et de diurétique. Traditionnellement, les feuilles et l'écorce étaient consommées pour traiter les dyspepsies, la fièvre et la diarrhée [8].



Figure 17. *Cordia dichotoma*

http://gardentia.net/2013/07/31/bhokar-lasora-gunda/gunda_5/

<http://tropical.theferns.info/image.php?id=Cordia+dichotoma>

L'étude phytochimique des quatre espèces citées précédemment a permis d'isoler des composés chimiques. Des tests biologiques ont été réalisés afin de savoir s'ils sont actifs ou pas.

3. Etudes biologiques et phytochimiques

a. *Cordia currasavica*

Les racines ne sont pas recensées pour un usage traditionnel. Cependant l'extrait de dichlorométhane a montré une activité contre le phytopathogène *Cladosporium cucumerinum*, la levure *Candida albicans* et la larve du moustique (*Aedes aegypti*) vecteur de la fièvre jaune [33]. L'activité anti microbienne de plusieurs extraits de feuilles (chloroforme, hexane et méthanol), ont été testé *in vitro* sur treize souches bactériennes (gram positif et gram négatif) et cinq souches fongiques. Les résultats confirment une activité contre le champignon *Trichophyton mentagrophytes* (qui induit des dermatophytoses) avec une $CI_{50} = 230 \mu\text{g/ml}$ obtenue pour l'extrait hexanoïque. La référence est le kétoconazole qui lui a une $CI_{50} = 0.1 \mu\text{g/ml}$.

Contre la bactérie *Vibrio cholerae*, responsable du choléra, une CMI = 125 µg/ml est observée. La référence étant le chloramphenicol avec une valeur de CMI de = 1.0 µg/ml.

L'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes a aussi été testée sur les mêmes souches bactériennes et fongiques. *Sarcina lutea* et *Vibrio cholerae* sont les souches bactériennes les plus sensibles avec une CMI = 62 µg/ml (à comparer à la CMI de 1.0 µg/ml du chloramphenicol). *Rhizoctonia solani* (responsable de maladie cryptogamique des végétaux cultivés) est la souche fongique qui a montré le plus de sensibilité vis à vis de l'huile essentielle avec une CI_{50} = 180 µg/ml à comparer à la référence, le kétoconazole dont la CMI = 0,2 µg/ml [32].

Les résultats de ces études attestent donc l'usage traditionnel de cette plante en tant qu'antimicrobien dans les pathologies respiratoires et gastriques.

L'étude d'un extrait de racine qui s'est avéré avoir une action anti microbienne contient des dérivés de naphthoquinones qui sont les cordiaquinones A et B. L'étude a mis en évidence deux nouvelles cordiaquinones J et K.

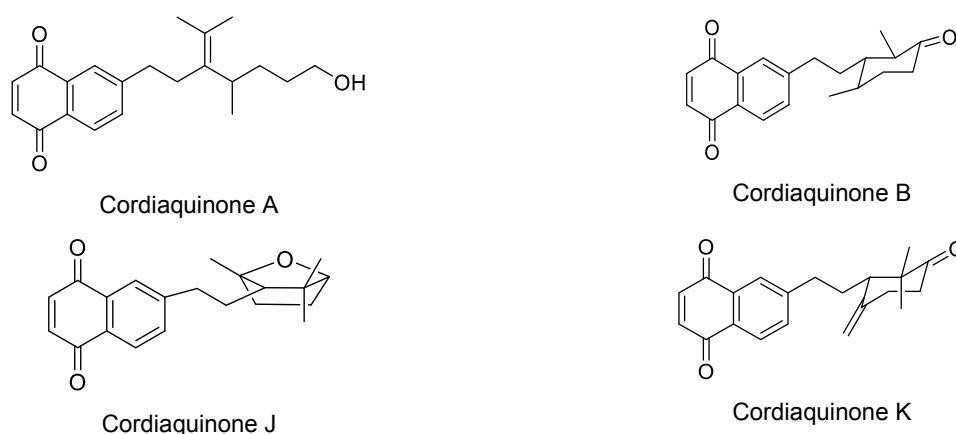


Figure 18. Cordiaquinones A, B, J et K

L'extrait hexanique des parties aériennes contient des mono et sesquiterpènes. Il a été noté l'absence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans tous les extraits étudiés, ainsi le risque de toxicité est réduit. L'huile essentielle est principalement composée de sesquiterpènes [32].

b. Cordia verbenaceae

Les feuilles se consomment traditionnellement sous forme d'extrait hydroalcoolique, de décoction ou d'infusion pour leurs propriétés antirhumatismales, anti-inflammatoires, analgésiques et cicatrisantes. Des chercheurs ont étudié différents types d'extraits et d'huile essentielle afin de mettre en évidence le ou les composés responsables des propriétés pré-citées.

L'huile essentielle, obtenue à partir de feuilles fraîches, a montré une activité anti-inflammatoire sur des rongeurs. *Cordia verbenacea* est aussi utilisée en tant qu'agent antimicrobien.

Ainsi l'activité antibactérienne de l'extrait de feuilles a été testée sur deux bactéries Gram-positif (*S. aureus* et *B. cereus*) et deux bactéries Gram-négatif (*E. coli* and *P.aeruginosa*). La CMI calculée a mis en évidence le caractère antibactérien de cet extrait qui se révèle plus actif contre les grams positifs [35]. Cependant, une autre étude [34] portant elle aussi sur l'activité antibactérienne d'une infusion de feuilles n'obtient pas de résultats significatifs lorsque les composés (isolés à partir de l'infusion de feuilles) sont testés seuls. Les auteurs de cette étude [35] concluent toutefois, que l'association entre ces composés et un antibiotique de référence est bénéfique car un effet potentialisateur est observé.

Ces différentes études permettent de confirmer l'usage traditionnel, notamment en tant qu'anti-inflammatoire et antimicrobien.

Les tests phytochimique et l'isolement de composés à partir d'un extrait de feuilles a mis en évidence des flavonols (artémétine, rutine, quercétine), les acides gallique, chlorogénique et caféique, des phénols glycosides, des mucilages, des tannins, des alcaloïdes, le β sitostérol (molécule ayant une action bénéfique dans l'athérosclérose, le cancer bénin de la prostate et du colon) ainsi qu'une forte quantité de mono terpènes et sesquiterpènes oxygénés [34], [35].

Les propriétés antibactériennes de l'infusion de feuilles pourraient donc s'expliquer par la présence de terpènes [35] et de flavonoïdes comme la quercétine qui détiennent aussi une activité antibactérienne [36],[37]. Dans une autre étude ayant confirmé *in vitro* l'activité anti-inflammatoire d'un extrait de feuille et de l'huile essentielle, la caractérisation chimique révèle la présence de l'artémétine et des terpènes α humulène et trans- caryophyllène [35], [38] responsables de cette activité.

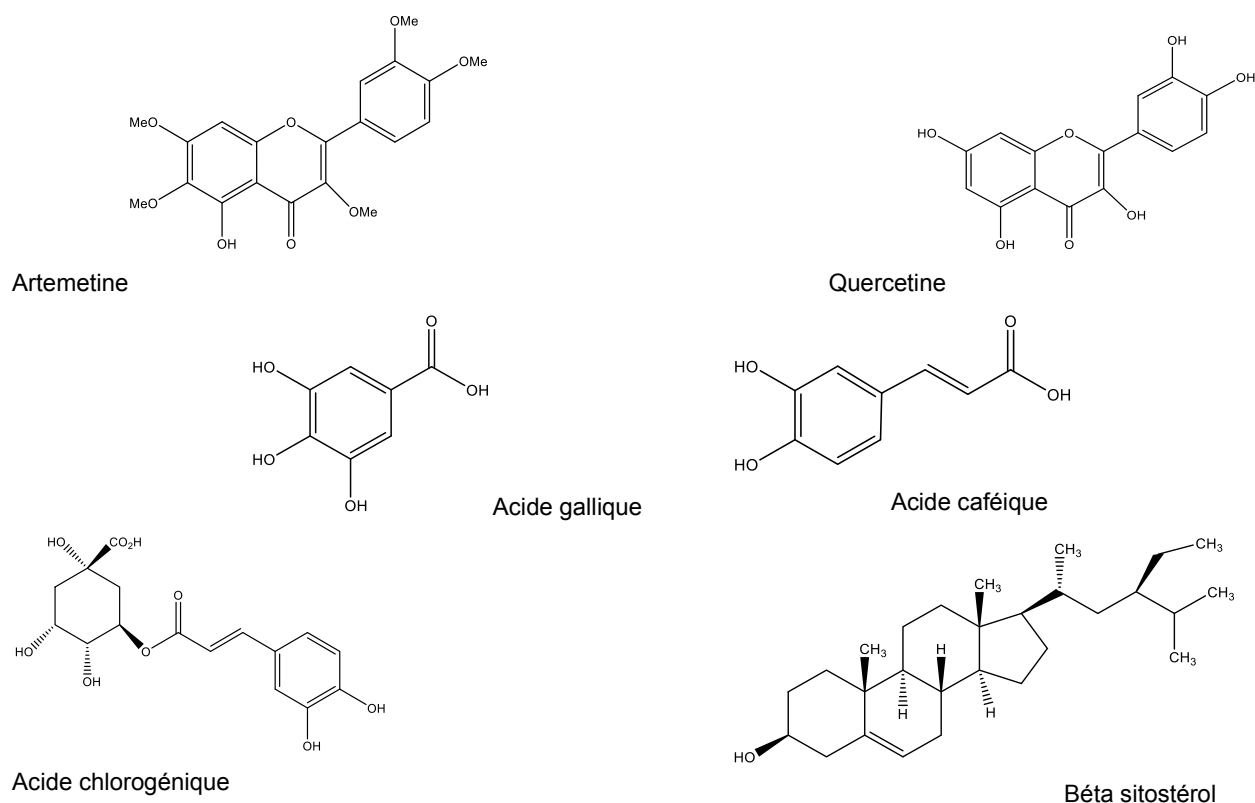


Figure19. Constituants principaux retrouvés dans les feuilles de *Cordia verbenaceae*

c. *Cordia americana*

Les feuilles sont utilisées traditionnellement pour leur activité anti-inflammatoire et cicatrisante. L'acide rosmarinique, isolé à partir d'un extrait de feuilles, présente une activité inhibitrice efficace contre les médiateurs de l'inflammation 5-LO, p38 α MAPK, TNF α . Les auteurs de l'étude ont démontré que l'extrait dans son ensemble, possède une activité inhibitrice plus efficace que l'acide rosmarinique seul. L'usage ethnopharmacologique est donc validé par la présente étude.

In vitro, il a été mis en évidence l'activité anti-inflammatoire d'un extrait éthanolique de feuilles. L'étude de cet extrait fait ressortir un composé majoritaire appartenant aux dérivés acides phénols, qui est l'acide rosmarinique, auquel est attribué cette action pharmacologique.

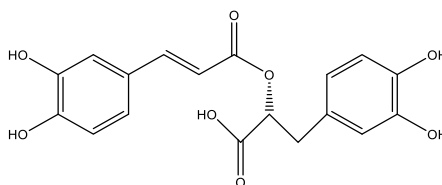


Figure 20. Structure chimique de l'acide rosmarinique

Sont aussi retrouvés dans l'extrait de feuilles, des tannins, des flavonoïdes (rutine), des stérols (sitostérols et campestérols), des triterpènes. Des molécules de la famille des quinones et des aldéhydes phénoliques ont été isolées à partir du duramen¹. Il est à noter dans cette espèce l'absence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques [39].

d. *Cordia dichotoma* ou *Cordia latifolia* (un synonyme)

Cette plante faisant partie de la pharmacopée Unani indienne, plusieurs études ont cherché à mettre en évidence de manière plus rationnelle les propriétés qui lui sont attribuées.

Un extrait d'écorce a été testé sur des bactéries gram positif avec *E.coli* et *P.aeruginosa* et sur des grams négatifs comme *S.pyogenes* et *S.aureus*, en utilisant comme référence la nystatine. De même que l'activité antifongique a été testée sur *A. niger*, *A.clavitus* et *C.albicans*. Les résultats montrent une efficacité de l'extrait sur ces souches microbiennes.

Traditionnellement utilisé pour ses vertus antiparasitaire, un extrait de fruit a été testé sur le nématode *Meloidogyne incognita* [8]. Une autre étude [40] révélera la nature des composés responsables de cette activité.

Plusieurs autres activités pharmacologiques furent étudiées à partir d'extrait des différentes parties de la plante. Ainsi, l'étude de la pulpe et du fruit entier démontre une activité antidiabétique et anti helminthique. La substance gélatineuse obtenue par macération du fruit

¹ Duramen = Cœur des troncs d'arbres, partie centrale plus colorée, imputrescible, dépourvue de tissus vivants, souvent dure et lourde, et qui s'oppose par tous ces caractères à l'aubier qui l'entoure.

frais est utilisée comme gastro-protecteur et la gomme permet une diminution d'un œdème inflammatoire [8].

L'extrait méthanolique d'écorces s'est révélé actif contre des bactéries. Une étude chimique de cet extrait a été effectuée et les acides cordinoïque, cordioïque et cordifolique et un flavonoïde, l'apigénine ont été isolés. Concernant l'extrait de fruit, les latifolicines A, B, C et D (dérivés du phénylpropane) seraient en partie responsables de l'activité nématocide. La présence de l'acide rosmarinique dans la gomme du fruit explique en partie l'action antiinflammatoire [40], [41].

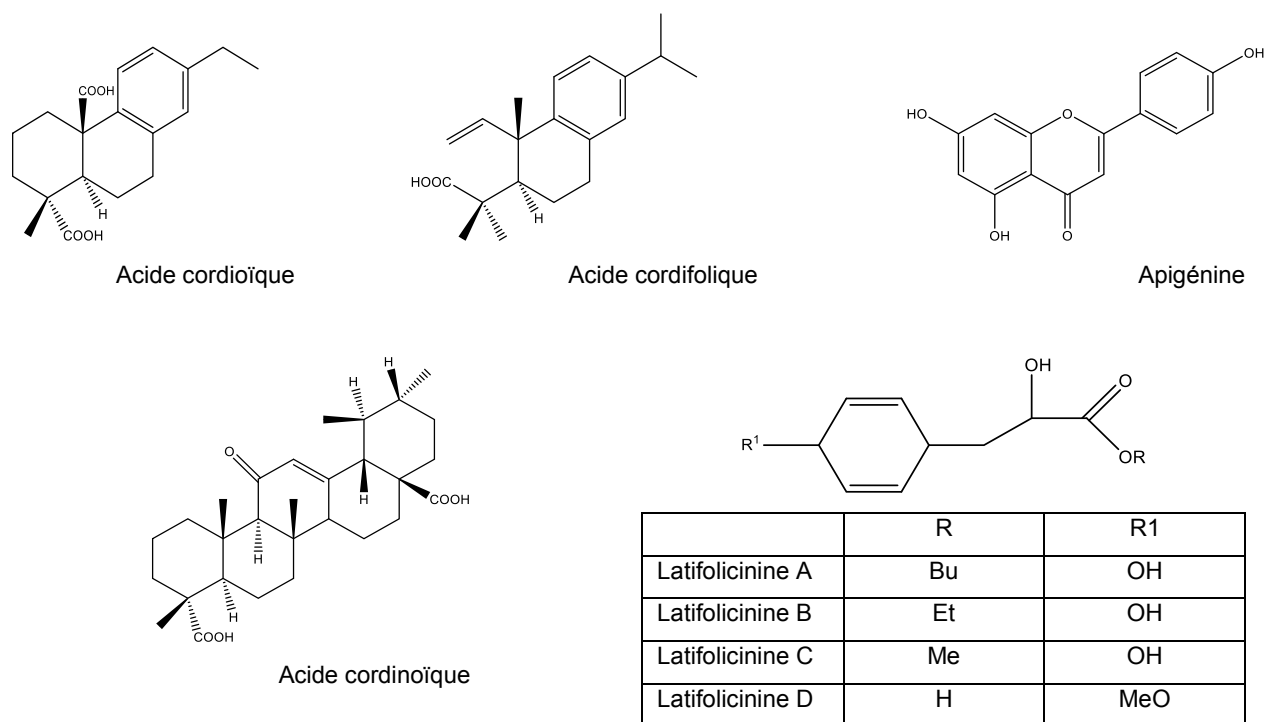


Figure 21. Représentant une partie des constituants de *Cordia dichotoma*

Conclusion sur le genre *Cordia*

Le genre *Cordia*, rencontré dans les régions chaudes et tropicales, comporte des espèces largement utilisées en médecine traditionnelle encore de nos jours. Les propriétés thérapeutiques varient selon l'espèce utilisée. Mais des activités communes sont retrouvées comme antimicrobiennes, anti-inflammatoires, cicatrisantes, antitussives et anti-ulcère. Cette redondance s'explique notamment par les molécules qui sont retrouvées dans les extraits. Les études chimiques et biologiques réalisées à partir d'extraits de plantes entières ou d'une seule partie de plante (feuilles, fleurs, écorces, fruits) ont pu justifier l'usage traditionnel. L'absence de la classe des alcaloïdes pyrrolizidiniques pour certaines espèces permet d'assurer une sécurité d'emploi vis-à-vis de la toxicité de ces produits. De plus, les familles des métabolites secondaires rencontrés dans ces 5 espèces du genre *Cordia* correspondent aux familles de molécules retrouvées chez les Boraginaceae. On peut citer, par exemple, les dérivés phénoliques comme l'acide rosmarinique, les quinones et les flavonoïdes.

2^{ème} partie

MATERIELS

I. Collecte et caractérisation botanique

Les fleurs de *Cordia lutea* ont été achetées au marché de Trujillo dans la région La Libertad, au Pérou. L'identification taxonomique a été faite par le biologiste Severo Baldeón du Museum d'histoire naturelle de l'université nationale de San Marcos (Lima, Pérou).

II. Réactifs chimiques et équipements

Les **solvants** utilisés sont l'éthanol à 96°, acheté en pharmacie, l'éther de pétrole, le dichlorométhane, le méthanol et l'acétate d'éthyle (HPLC grade, JT Baker, Avantors, USA) ; le **Rotavapor Büchi** R-200 avec un bain chauffant (Büchi B-490), fixé avec une pompe (Vacuubrand Vacuum pumping unité PC 500 séries CVC3000), fut utilisé pour toutes les concentrations des extraits et fractions isolées. Un **bain ultrasonique** (Branson 3520), la **centrifugeuse** (Hettich D.78532 Tuttlingen, typ Werk Nr), l'**étuve** (modèle : LSIS/VC111, série B080166, 1900W) et la **balance** (Adventurer) ont été utilisés pour les différentes manipulations. La **Chromatographie liquide à moyenne pression** (MPLC) fut réalisée avec une pompe Büchi Pump Manager C-615 ; Büchi pump Module C-605 et deux colonnes Büchi moyenne pression ont été utilisées. La première une colonne 23*5cm qui sert pour les 5 premières MPLC, puis une colonne 10*2.5 pour la 6^{ème} et 7^{ème} MPLC. La phase stationnaire est réalisée avec du gel de silice (silica gel 60 / 0.015-0.040 mm, Merck, Germany). Les multiples extractions sur phase solide (SPE) ont été réalisées avec des cartouches SPE remplies avec du gel de silice (silica gel 0.045 mm ; SiOH 6ml/1000mg, Chromabond, Macherey-Nagel). Les **chromatographies sur couche mince** (CCM) ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice (silica gel 60 F254, Merck, Germany). Le révélateur utilisé pour les CCM était la vanilline, préparée comme suit :

5g de vanilline (Sigma-aldrich, USA) dissout dans 500 ml d'éthanol à 96°, et 15 ml d'acide sulfurique à 98 % (Merck, Germany).

METHODES

I. Extraction à partir des fleurs sèches

Les fleurs de *Cordia lutea* séchées (974 g) sont broyées pour obtenir une poudre (950g). La poudre est mise en macération, à température ambiante, dans de l'éthanol à 96°vol, la proportion suivante est utilisée : 1litre d'éthanol pour 100g de poudre de fleurs. Après 24h de macération, le marc est séparé par filtration. Le filtrat est ensuite séché au rotavapor à basse pression (175 mbar) et à 55°C. la poudre de plante est ainsi extraite successivement 4 fois. Un extrait brut éthanolique de 248 g est obtenu.

II. Extrait méthanolique

1. Extraction liquide/liquide avec le dichlorométhane

L'extrait brut (248 g) est repris avec 1 litre d'eau distillée puis soniqué durant 20 min. La phase aqueuse est mise au repos durant 24 h au frigo à 4°C, un sédiment est observé. La séparation entre la phase liquide et le sédiment est réalisé par centrifugation (10 min, 5000RPM, 10°C). La phase liquide est extraite par 400 ml de dichlorométhane dans une ampoule à décanter. La phase organique est recueillie et concentrée au rotavapor à pression ambiante, à 55 °C. Un extrait dichlorométhane de 11 g est obtenu.

2. Extraction liquide éther de pétrole / méthanol, eau

L'extrait dichlorométhane (11 g) est dissout dans un mélange de 150 ml d'éther de pétrole et 130 ml de méthanol /eau (90/10). On laisse reposer dans une ampoule à décanter jusqu'à obtenir deux phases bien distinctes. Ensuite, chaque phase est concentrée au rotavapor sous une pression de 13 mbar pour l'extrait éther de pétrole et de 337 mbar à 80 mbar pour le mélange méthanol/eau, à 40°C.

Deux extraits sont obtenus : un extrait méthanolique de 3,80g et un extrait ether de pétrole de 4,2 g. (cf schéma d'extraction en annexe 2)

3. Fractionnement chromatographique

L'extrait méthanolique (3.8 g) est soumis à une succession de chromatographies sur gel de silice réalisées avec l'équipement MPLC-Buchi. (cf schéma de fractionnement en annexe 3)

a. MPLC 1 et 2

Deux MPLCs en phase normale successives sont réalisées à partir de l'extrait méthanolique (3.80 g) qui est divisé en deux parts égales. Le gel de silice est imprégné avec de l'éther de pétrole. Le flux de solvant est réglé entre 10 et 14 ml/min. Des fractions de 10 ml sont collectées dans des tubes à essais. Le système d'élution et de collecte de fractions est présenté dans le tableau suivant :

	Solvants	Proportion	Volume
MPLC 1	acétate d'éthyle / éther de pétrole	9:1	200 ml
	acétate d'éthyle	10:0	500 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	9 :1	400 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	8 :2	200 ml
MPLC 2	acétate d'éthyle / éther de pétrole	9:1	200 ml
	acétate d'éthyle	10:0	500 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	9 :1	400 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	8 :2	300 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	7 :3	200 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	6 :4	100 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	5:5	100 ml
	acétate d'éthyle / méthanol	0 :10	300 ml

Tableau 1. Système d'élution pour la MPLC 1 et 2

Chaque CCM est éluee avec le système acétate d'éthyle / méthanol 9 :1. Les fractions sont regroupées selon le profil chromatographique. 10 fractions sont obtenues à partir de la MPLC 1 et 7 fractions à partir de la MPLC 2 :

CG1 0016.1 Tubes 1-5 706 mg	CG1 0016.2 Tubes 6-9 650 mg	CG1 0016.3 Tubes 10-13 127 mg	CG1 0016.4 Tubes 14-27 260 mg	CG1 0016.5 Tubes 28-39 110 mg
CG1 0016.6 Tubes 40-60 70 mg	CG1 0016.7 Tubes 61-69 40 mg	CG1 0016.8 Tubes 70-83 5 mg	CG1 0016.9 Tubes 83-89 2 mg	CG1 0016.10 Tubes 90-fin 1 mg

Tableau 2. Fractions obtenues à partir de la MPLC 1

CG1 0016.11 Tubes 1-15 850 mg	CG1 0016.12 Tubes 16-25 130 mg	CG1 0016.13 Tubes 26-39 80 mg	CG1 0016.14 Tubes 40-53 80 mg
CG1 0016.15 Tubes 54-59 190 mg	CG1 0016.16 Tubes 60-70 130 mg	CG1 0016.17 Tubes 71-100 (fin) 520 mg	-

Tableau 3. Fractions obtenues à partir de la MPLC 2

b. MPLC 3

Une MPLC en phase normale est réalisée à partir de l'échantillon CG1 0016.5 + CG1 0016.15 (300 mg). Le gel de silice (70g) est imprégné avec de l'éther de pétrole. Le flux de solvant est réglé entre 10 et 14 ml/min. Des fractions de 7 ml sont collectées dans des tubes à essais. Le système d'élution et de collecte de fractions est présenté dans le tableau suivant :

Numéros des tubes	Solvants	Proportion	Volume
1-10	acétate d'éthyle	100 %	200 ml
11-63	acétate d'éthyle /méthanol	9,5:0,5	500 ml
64-97	acétate d'éthyle /méthanol	9:1	300 ml

Tableau 4. Système d'élution pour la MPLC 3

Chaque CCM est éluee avec le système acétate d'éthyle / méthanol 9 :1. Les fractions sont regroupées selon le profil chromatographique. 6 fractions sont obtenues :

CG1 0023.1 Tubes 1-11 10 mg	CG1 0023.2 Tubes 12-14 5 mg	CG1 0023.3 Tubes 15-31 10 mg	CG1 0023.4 Tubes 32-40 80 mg	CG1 0023.5 Tubes 41-71 120 mg	CG1 0023.6 Tubes 72-87 10 mg
-----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------	------------------------------------

Tableau 5. Fractions obtenues à partir de la MPLC 3

c. MPLC 4

Deux MPLCs en phase normale successives sont réalisées à partir des échantillons CG1 0016.6 + CG1 0016.16 (200 mg). Le gel de silice (70 g) est imprégné avec de l'acétate d'éthyle. Le flux de solvant est réglé sur 8 ml/min. Des fractions de 6 ml sont collectées dans des tubes à essais. Le système d'élution et de collecte de fractions est présenté dans le tableau suivant :

Numéro des tubes	Solvants	Proportion	Volume
1-12	acétate d'éthyle	10:0	100 ml
13-56	acétate d'éthyle /méthanol	9:1	400 ml
56-66	acétate d'éthyle /méthanol	8:2	100 ml
67-74	acétate d'éthyle /méthanol	7:3	100 ml

Table 6. Système d'élution de la MPLC 4

Chaque CCM est éluee avec le système acétate d'éthyle / méthanol 9 :1. Les fractions sont regroupées selon le profil chromatographique. 5 fractions sont obtenues :

CG1 0024.1 Tubes 1-27 10 mg	CG1 0024.2 Tube 28 ND	CG1 0024.3 Tubes 29-30 20 mg	CG1 0024.4 Tubes 31-36 80 mg	CG1 0024.5 Tubes 37-74 30 mg
-----------------------------------	-----------------------------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------

Table 7. Fractions obtenues à partir de la MPLC 4

d. MPLC 5

Une MPLC en phase normale est réalisée à partir de l'échantillon CG1 0016.4 + CG1 0016.14 (340 mg). Le gel de silice (70 g) est imprégné avec de l'acétate d'éthyle. Le flux de solvant est réglé sur 5 ml/min puis sur 4 ml/min. Des fractions de 5 ml puis de 2.5 ml sont collectées dans des tubes à essais. Le système d'élution et de collecte de fractions est présenté dans le tableau suivant :

Numéro des tubes	Solvants	Proportion	Volume
1-53	acétate d'éthyle	10:0	200 ml

Table 8. Système d'élution de la MPLC 5

Chaque CCM est éluée avec le système acétate d'éthyle / méthanol 9 :1. Les fractions sont regroupées selon le profil chromatographique. 6 fractions sont obtenues :

CG1 0025.1 Tubes 1-4 18mg	CG1 0025.2 Tubes 5-7 44 mg	CG1 0025.3 Tubes 8-11 109 mg	CG1 0025.4 Tubes 12-19 58 mg	CG1 0025.5 Tubes 20-30 35 mg	CG1 0025.6 Tubes 31-53 13 mg
---------------------------------	----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------

Table 9. Fractions obtenues à partir de la MPLC 5

e. MPLC 6 et 7

Deux MPLCs en phase normale successives sont réalisées à partir de l'échantillon CG1 0023.5 (120 mg) qui est divisé en deux parts égales. Le gel de silice (8 g) est imprégné avec de l'acétate d'éthyle. Le flux de solvant est réglé sur 5 ml/min puis sur 4 ml/min. Des fractions de 2.5 ml sont collectées dans des tubes à essais. Le système d'élution et de collecte de fractions est présenté dans le tableau suivant :

Solvants	Proportion	Volume
ethyl acetate	10:0	100 ml
ethyl acetate / methanol	9:1	100 ml

Table 10. Système d'élution des MPLC 6 and 7

Chaque CCM est éluée avec le système acétate d'éthyle / méthanol 9 :1. Les fractions sont regroupées selon le profil chromatographique. 3 fractions sont obtenues à partir de la MPLC 6 et 6 fractions à partir de la MPLC 7 :

CG1 0027.1 Tubes 39-65 90.5 mg	CG1 0027.2 Tubes 66-80 12.5 mg	CG1 0027.3 Tubes 80-100 20.8 mg
--------------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------------

Table 11. Fractions obtenues à partir de la MPLC 6

CG10027.4 Tubes 12-30 274 mg	CG10027.5 Tubes 31-34 ND	CG10027.6 Tubes 35-44 7 mg	CG10027.7 Tubes 45-49 2 mg	CG10027.8 Tubes 50-64 18 mg	CG10027.9 Tubes 65-80 17 mg
------------------------------------	--------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Table 12. Fractions obtenues à partir de la MPLC 7

f. Regroupement

Afin de re-isoler les composés SC1, SC2 et SC3 issus du travail précédent, on procède à un regroupement de fractions obtenues via les MPLC 1 à 7 en se référant aux profils chromatographiques.

//////////	SC1	SC2	SC2&SC3	SC3
Fractions	CG1 0023.6; CG1 0024.4 CG1 0027.8; CG1 0027.9 CG1 0027.2; CG1 0027.3 → 158.3 mg	CG1 0024.3 CG1 0025.5 CG1 0027.1; CG1 0027.4 → 419.5 mg	CG1 0025.4 CG1 0023.4 → 138 mg	CG1 0025.3 CG1 0023.3 → 129 mg

Table 13. Regroupement 1

Sur les profils de CCM, on remarque trois spots (que l'on nomme, CG 0, CG4 et CG5) d'une intensité forte. Afin de les isoler, on procède au regroupement suivant :

//////////	CG0	CG4	CG5
Fractions	CG1 0024.5 → 30 mg	CG1 0025.1; CG1 0025.2 → 62 mg	CG1 0027.6; CG1 0027.7 → 9 mg

Table 14. Regroupement 2

g. Isolement des composés :

- Composé CG5

L'échantillon CG1 0027.6 + CG1 0027.7 (9 mg) est soumis à deux SPE successives. Ce qui amène à l'isolement de **CG1 0030.1 (2.5 mg)**, qui est le composé 5, **CG5**.

- Composé SC3 (2)

L'échantillon CG1 0025.1 (18 mg) est soumis à trois SPE successives. Ce qui amène à l'isolement de **CG1 0033.5 (1.8 mg)**, qui est le composé SC3 (2). Composé déjà identifié lors du travail précédent.

- Composé CG 4

L'échantillon CG1 0031.1 est soumis à quatre SPE successives. Ce qui amène à l'isolement de **CG10037.4 - 5.2mg**, qui est le composé 4, **CG4**.

- Composé CG 0

L'échantillon CG1 0024.5 (30 mg) + SC 1030 (34.2 mg) est soumis à six SPE successives. Ce qui amène à l'isolement de **CG1 0037.2 (2.5mg)**, qui est le composé 0, **CG0**.

III. Analyses structurales

1. Résonance magnétique nucléaire : RMN

L'ensemble des analyses a été effectué sur des spectromètres Brüker® Avance 300MHz ou Brüker® Avance 500MHz, au sein du service commun de RMN de l'Université de Paul Sabatier à Toulouse.

La résonance magnétique nucléaire, ou RMN est une technique non destructive permettant l'étude structurale de composés chimiques. Les échantillons sont soit en solution soit solide. Cette technique se fonde sur les propriétés cinétiques et magnétiques des noyaux atomiques possédant un spin nucléaire comme ^1H , ^{13}C , et la possibilité de les faire résonner à l'aide d'un champ magnétique. Les différentes analyses ont été effectuées en premier lieu par deux techniques à une dimension : RMN du proton, qui peut renseigner sur l'environnement chimique direct des protons et en RMN ^{13}C j-mod (RMN du carbone dite « d'écho de spin J-modulée ») qui permet de faire la différence entre les groupements quaternaires -C, -CH₃, -CH₂ ou -CH.

Une technique à deux dimensions appelée HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) est également utilisée permettant de visualiser les corrélations hétéronucléaires entre des noyaux séparés par deux à trois liaisons. Enfin l'analyse HSQC (Heteronuclear Single Quantum Connectivity) permet de corréler un proton avec un noyau X selon une constante de couplage 1J, tandis que l'analyse ^1H - ^1H COSY (proton-proton Correlated Spectroscopy) met en évidence les couplages scalaires entre protons voisins.

2. Spectrométrie de masse

- Basse résolution : L'analyse en injection directe a été réalisée sur un spectromètre trappe à ions (Finnigan LCQ MS ; Thermo-Fisher).

- Haute résolution : La séparation a été réalisée sur une HPLC Alliance 2695 (Waters):

Colonne Kinetex EVO C18 100 x 2.1 2.7 μm ; Gradient : C= Eau + 0.1% acide formique ; D= ACN + 0.1% acide formique

Temps (min)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Débit (ml/min)
0.00	0.0	0.0	95.0	5.0	0.500
0.50	0.0	0.0	95.0	5.0	0.500
10.00	0.0	0.0	2.0	98.0	0.500
12.00	0.0	0.0	2.0	98.0	0.500
12.50	0.0	0.0	95.0	5.0	0.500
15.00	0.0	0.0	95.0	5.0	0.500

Détection masse: QTOF premier (Waters)

ESI négatif et positif de 100 à 1200 Da

Capillary (kV): 3.0

Sampling Cone: 20.0

Extraction Cone: 4.0

Ion Guide: 4.0

Source Temperature (°C): 120

Desolvation Temperature (°C): 350

Cone Gas Flow (L/Hr): 30.0

Desolvation Gas Flow (L/Hr): 750.0

3. UPLC

L'analyse UPLC du composé CG5 a été réalisé sur une colonne Kinetex C18 ; 2,6 μm , 160 x 2,1 mm, 100 Å.

Le système utilisé est un système UHPLC HITACHI (VWR International, Fontenay-Sous-Bois, France) équipé de deux pompes LaChrom ULTRA L-2160U, d'un passeur d'échantillons LaChrom ULTRA L-2200U, d'un four thermostaté LaChrom ULTRA L-2300 et d'un détecteur à barrette de diode LaChrom ULTRA L-2455U, le tout contrôlé par le logiciel EZchrom *Elite*. La colonne est éluée par différents systèmes de phases mobiles, en mode gradient.

Temps (min)	H ₂ O (%)	Acétonitrile (%)	Flux (ml/min)
0.0	95.0	5.0	0.500
10.0	0.0	100.0	0.500
13.0	0.0	100.0	0.500
15.0	95.0	5.0	0.500
18.0	95.0	5.0	0.500

Tableau 15. Méthode utilisé lors de l'analyse

3^{ème} partie

I. Résultats

1. Travaux préliminaires réalisés au laboratoire

Un précédent travail a montré que les fleurs de *Cordia lutea* peuvent être une nouvelle source de composés antibactériens, et plus précisément agissant contre *Helicobacter pylori*.

Au cours de ce travail, le protocole de partition de l'extrait éthanolique de fleur a été mis au point pour donner un précipité, un extrait éther de pétrole, un extrait méthanolique et un extrait aqueux. Le précipité a été identifié comme étant essentiellement de la rutine, par comparaison avec un témoin en CCM et HPLC.

L'activité anti-*Helicobacter pylori* est mesurée sur des cultures *in vitro* de la bactérie par une méthode de microdilution, avec comme référence l'amoxicilline (CMI = 0.015 µg/ml) [42], [43]. L'activité se concentre dans la fraction méthanolique. Cette fraction a été soumise à un fractionnement biodirigé.

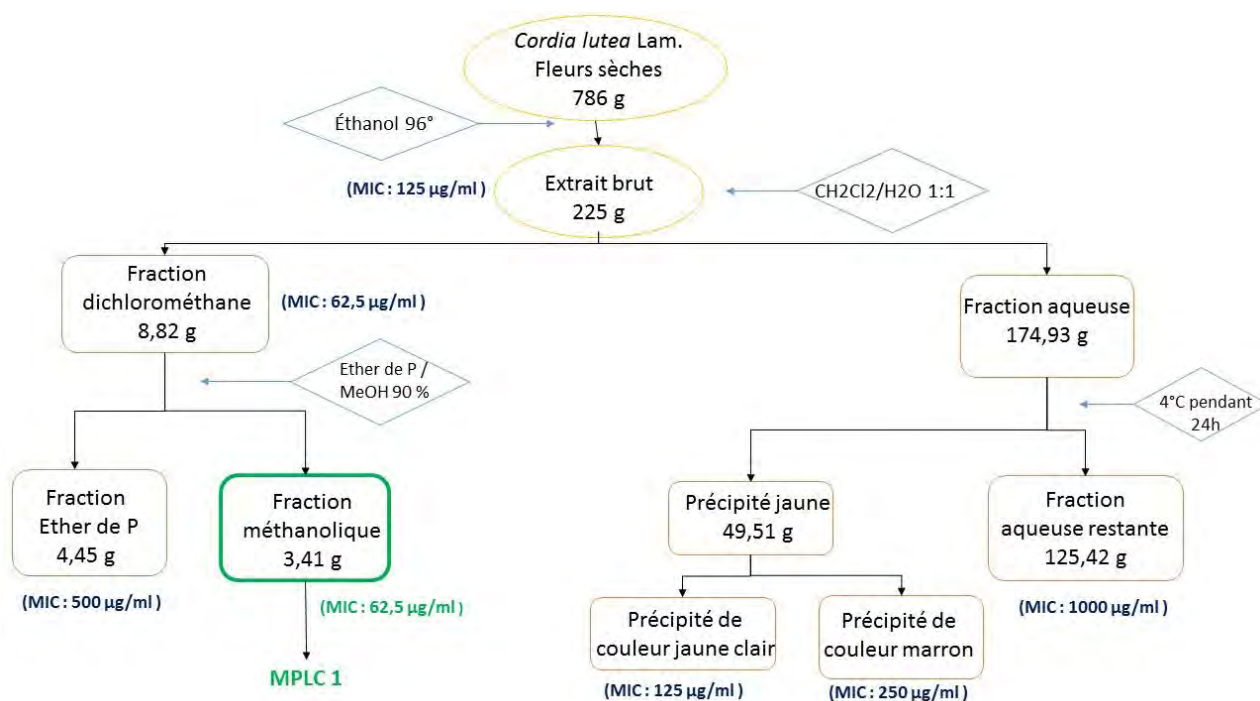


Figure 22 Schéma de partition du fractionnement biodirigé

A partir de l'extrait méthanolique, trois fractions SC1, SC2 et SC3 ont été isolées après plusieurs fractionnements. SC3 présente la meilleure activité anti-*Helicobacter pylori* avec une CMI < 3.9 µg/ml.

Ces trois fractions ont été soumises à une analyse par UHPLC qui a mis en évidence que chacune de ces trois fractions est un mélange de deux composés présents en quantité équivalente.

Les résultats de la RMN et de la spectrométrie de masse ont confirmé la présence d'un mélange de deux structures pour chacune des 3 fractions. Chaque structure comporte deux parties, une génine et un sucre. Ces composés sont des phytostérols glycosylés. Les 2 composés dans chaque fraction proviennent de 2 génines différentes substituées par le même saccharide.

A notre connaissance, ces structures sont nouvelles pour *Cordia*, ce qui est intéressant car ce travail apporte de nouvelles informations sur la composition chimique des fleurs de cette plante.

Au vu de ces mélanges de composés qui présente une activité biologique intéressante, il a été décidé de réaliser un nouveau fractionnement guidé par ce travail précédent afin de re-isoler en plus grande quantité les trois fractions SC1, SC2 et SC3, de trouver d'autres composés pour compléter la fiche phytochimique de *Cordia lutea*.

2. Résultats obtenus à partir du second fractionnement

a. Extraction

Le schéma d'extraction à partir d'une plus grande quantité de fleurs sèches de *Cordia lutea* est présenté ci-dessous. Ce protocole a été amélioré et adapté par rapport aux objectifs fixés pour ce travail.

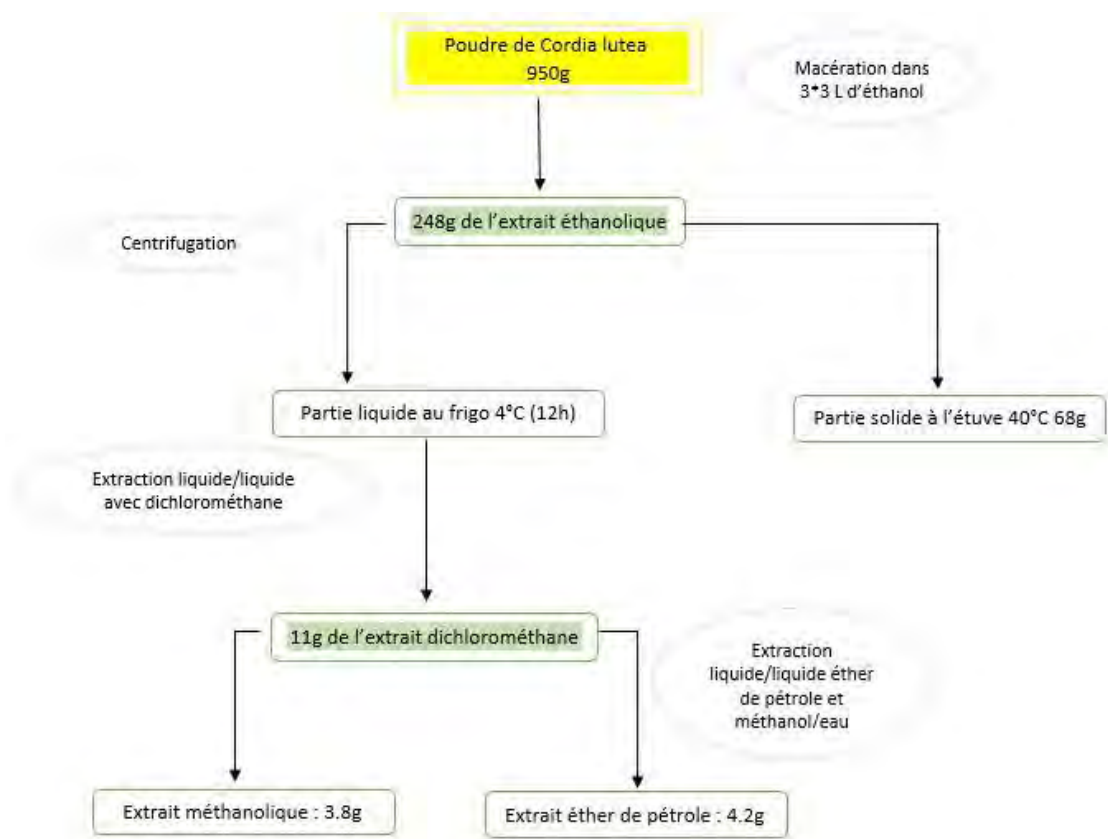


Figure 23 : Schéma d'extraction à partir de fleurs sèches de *Cordia lutea*

b. Fractionnement

A partir de l'extrait méthanolique (3.80 g) un premier fractionnement sur colonne de silice est réalisé. Sur la CCM (figure 24) les fractions SC1, SC2 et SC3 sont retrouvées dans les fractions D, E et F et on observe trois autres fractions CG 0, CG4 et CG 5. Sur cette CCM est mise en évidence la différence entre les 6 fractions. Le travail de fractionnement successif conduisant à l'isolement de ces fractions est présenté dans le schéma de fractionnement [annexe 3].

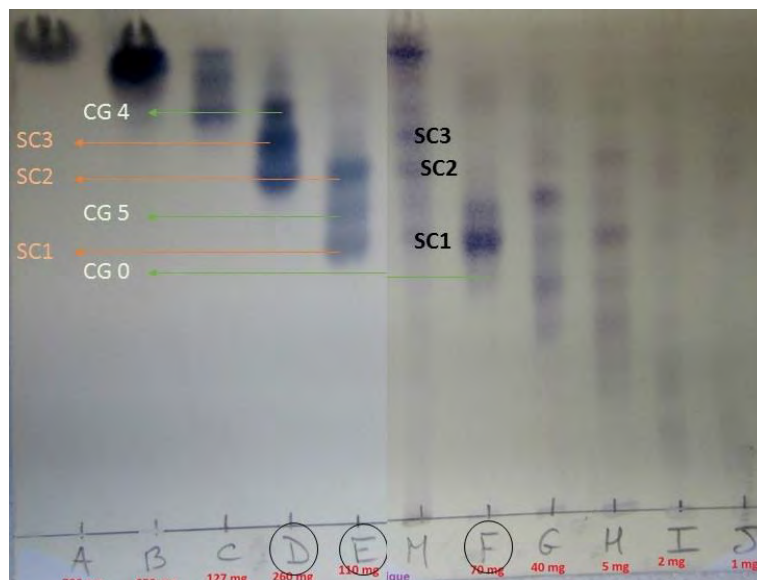


Figure 24. Fractions obtenues à partir de la MPLC 1

➤ Isolement de la fraction CG4

Les fractions D1 et D2 obtenues après le premier fractionnement (MPLC 1 et 2) sont réunies et soumises à un nouveau fractionnement (MPLC 5). Au cours de ce fractionnement, CG4 est élué dans la fraction [1-4] et la fraction SC3 dans la fraction [8-11]. Les fractions CG4 et SC3 sont donc bien différentes entre elles. A la fin de la SPE 11, on obtient la fraction CG1 0032.2 qui a une masse de 5.4 mg. Afin d'augmenter la quantité de l'échantillon, sont rajoutées deux fractions issues du travail précédent. Cette union est justifiée en se référant à leur profil chromatographique qui montre que ces deux fractions contiennent elles aussi le CG4. Après deux SPE successives, le CG4 est isolé (figure 25).

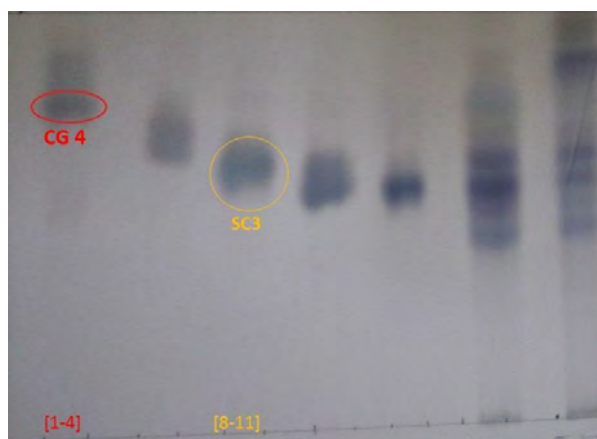


Figure 25. CCM de la MPLC 5

➤ Isolement de la fraction CG5

La MPLC 7 permet de sélectionner deux fractions [35-44] et [45-49], où se trouve la fraction CG5. Après réunion de ces deux fractions et purification par la SPE 8 et la SPE 9, CG5 est isolée. Le profil chromatographique de la SPE 8 (figures 26 et 27) montre bien que CG 5 se distingue des trois fractions s précédentes SC1, SC2 et SC3.



Figure 26. CCM de la MPLC 7

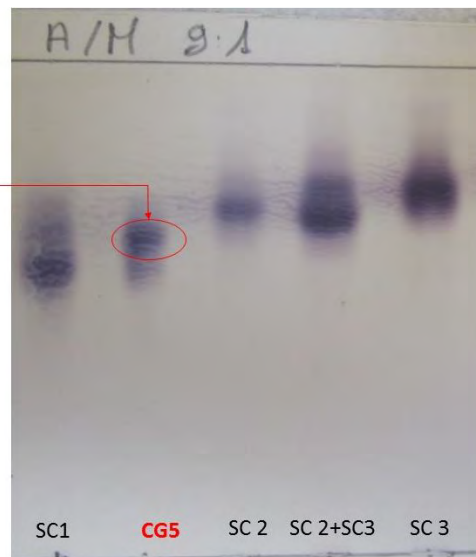


Figure 27. Comparaison des différents composés (SPE8)

➤ Isolement de la fraction CG0

Le profil chromatographique (figure 28) confirme que les trois fractions CG0, CG4 et CG5 sont bien distinctes entre elles. Sur la CCM de comparaison on remarque que la fraction CG0 est composée de trois tâches nommées ici **a**, **b** et **c**. Le but est de les séparer car la tâche **a** pourrait être la fraction SC1. Alors que la séparation de **b** et **c** de la tâche **a** fut aisée, la séparation de **b** de **c** fut beaucoup plus compliquée. Quatre systèmes d'élution furent essayés mais les deux tâches n'ont toujours pas été séparées après la SPE 18b (figure 29) et le mélange CG0 est envoyé en analyse RMN tel quel.

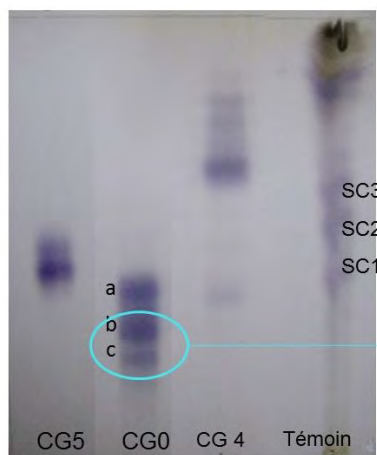


Figure 28. Comparaison des CG0, CG4 et CG5

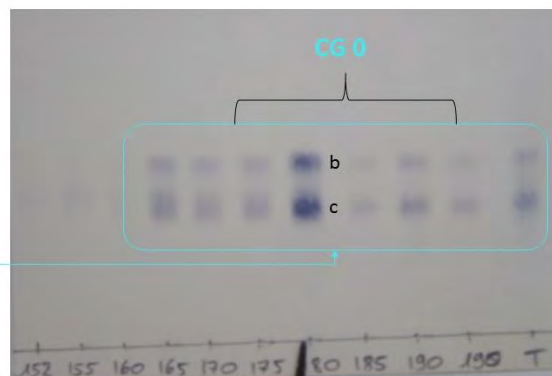


Figure 29. SPE 18b du composé C

II. Elucidation structurale

Parmi les spectres protons des fractions CG0, CG4 et CG5, (figures 30 à 32) celui du CG5 paraît proche de ceux des fractions isolées précédemment, SC1, SC2 et SC3.



Figure 30. Spectre proton de CG4

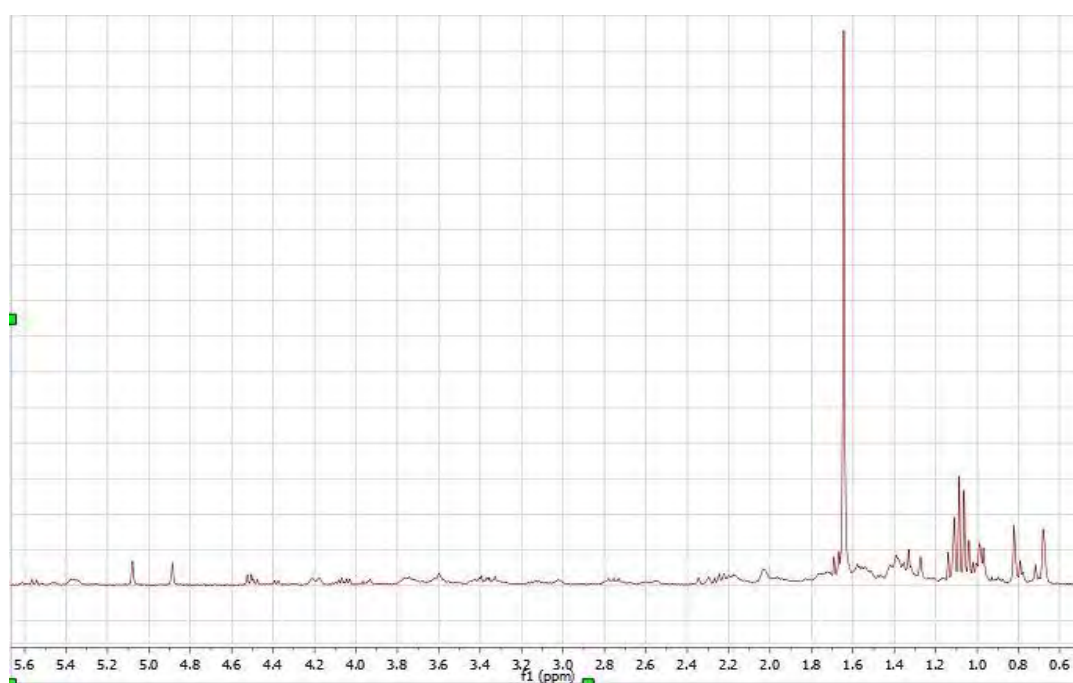


Figure 31. Spectre proton de CG 5

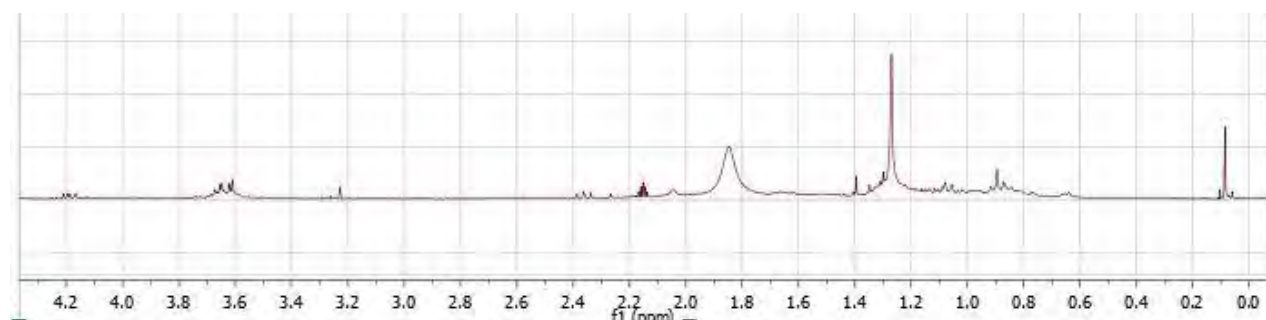


Figure 32. Spectre proton de CG0

Dans ce rapport sera présenté l'élucidation structurale de SC3, un composé dont le profil du spectre proton ressemble à celui de CG5. Cette élucidation se fait à partir de la RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY, HSQC et HMBC) [Cf spectres en annexe 5].

1. Spectre proton de SC3

Le spectre proton présente 3 zones distinctes, de 0.6 ppm à 2.58 ppm qui concentre les alcanes, de 3.43 ppm à 4.82 ppm concerne les protons reliés à un sucre puis de 4.88 ppm à 5.7 ppm la zone des protons oléfiniques [44]. Le proton de signal à 4.82 ppm correspond à un proton anomérique, c'est le proton qui a son signal le plus déplacé vers les champs forts.

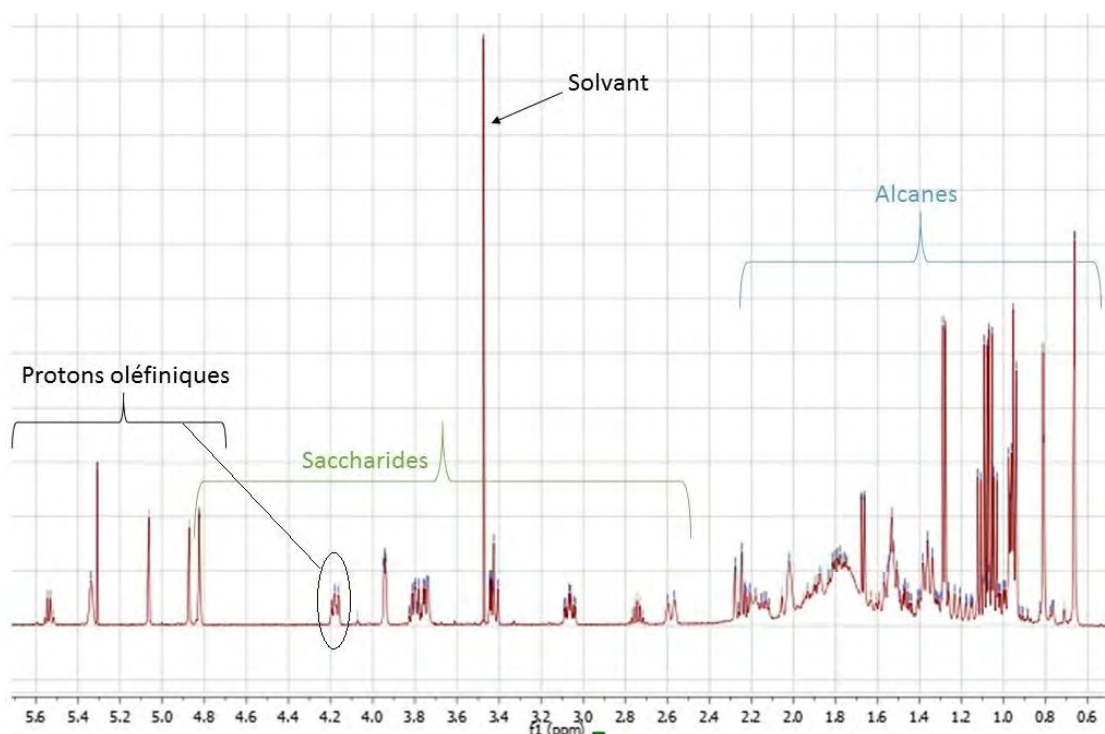


Figure 33. Spectre proton de SC3

De ce profil, on en déduit que la structure va comporter un ou plusieurs sucres, des groupes éthyléniques et des alcanes.

Pourquoi est-ce un mélange ?

- Un signal de calibration est choisi au niveau d'un proton appartenant au sucre. Le signal à 3.74 ppm qui est un doublet de doublet, est calibré pour qu'il soit égal à 1 proton. Une fois la calibration faite, certains protons ont une intégration inférieure à 1.
- Le doublet de doublet à 5.54 ppm intègre pour 0,41 et le singulet à 5.06 ppm intègre pour 0,59. Leur somme est égale à 1, ce qui signifie que chacun de ces protons appartient à une molécule différente. Le proton à 5.54 ppm appartient à la molécule minoritaire (appelée b) et le proton à 5.06 ppm appartient à la molécule majoritaire (appelée a). On a donc 59% de la molécule (a) et 41 % de la molécule (b).

- Le doublet à 1.12 ppm et le doublet à 1.04 ppm ont une intégration identique égale à 1,26 et les doublets 1.07 ppm et 1.09 ppm ont une intégration identique égale à 2.05. Le spectre HSQC indique que ces signaux correspondent à des CH₃. Ainsi la paire 1.12/1.04 ppm appartient à la molécule b et la paire 1.07/1.09 ppm appartient à la molécule a.

2. Spectre carbone de SC3

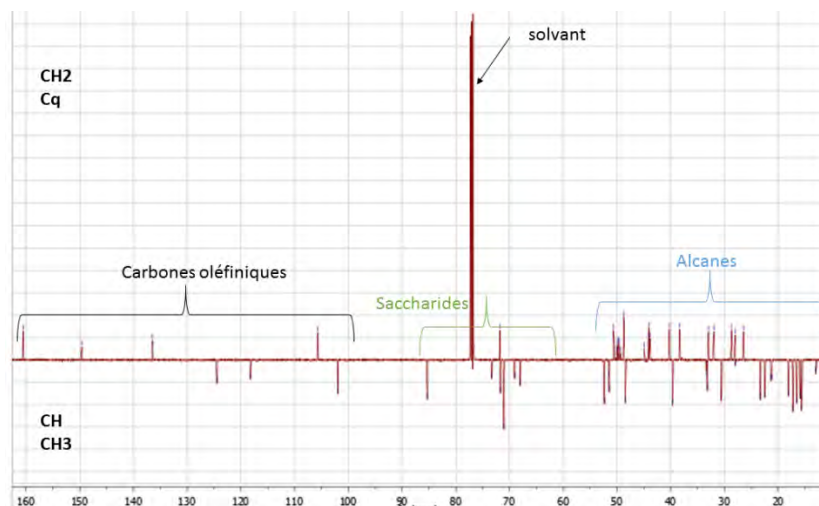


Figure 34. Spectre carbone de SC3

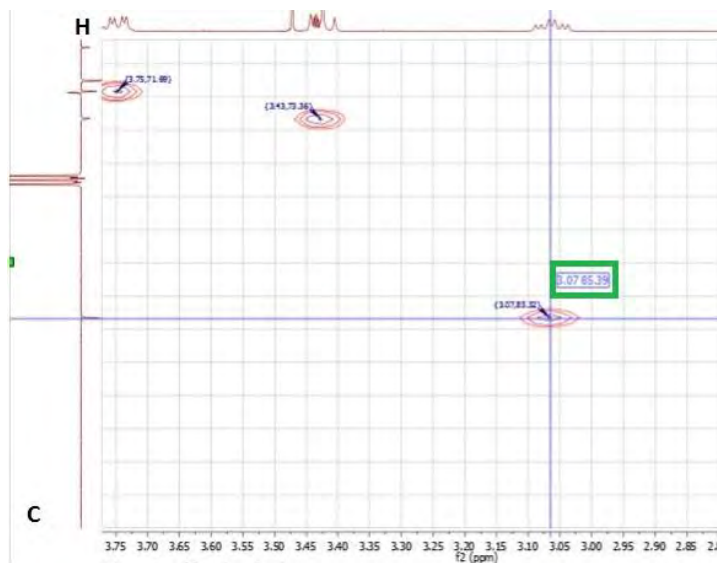
Le spectre carbone présente lui aussi 3 zones distinctes :

- 13.13 ppm à 52.51 ppm correspond aux alcanes
- 68.03 ppm à 85.17 ppm correspond aux carbonates reliés au sucre
- 101 ppm à 160 ppm correspond aux carbonates oléfiniques.

Le spectre 13C-JMOD-RMN montre dans la zone des -CH- et -CH₃- , 27 signaux dont 10 correspondent à des méthyles. Dans la partie positive du spectre, où apparaissent les -CH₂- et les carbonates quaternaires, on différencie 17 signaux. En comptant les signaux positifs et négatifs du spectre J-modulé du carbone, il y a un total de 44 carbonates.

3. Spectre HSQC de SC3

Les corrélations obtenues avec le spectre HSQC permettent de relier les CH, CH₂ et CH₃ avec leur proton correspondant. Les carbones n'ayant pas de corrélation correspondent à des carbones quaternaires. Ci-dessous une figure illustrant une corrélation entre un carbone et son proton.



En abscisse, le spectre proton, avec les déplacements en ppm et en ordonnée, le spectre carbone.

La corrélation montrée ici indique que le carbone 85,39 est relié au proton 3.07. Le carbone se trouve dans la zone CH/CH₃ et le proton intègre pour 1.15, c'est donc un CH.

Figure 35. Spectre HSQC de SC3

δC	parité	HSQC
160,5	CQ	PTC
149,6	CQ	PTC
136,4	CQ	PTC
124,4	CH	5,34
118,1	CH	5,54
105,6	CH ₂	5,06/4,88
101,9	CH	4,82
85,3	CH	3,07
73,2	CH	3,43
71,7	CQ	PTC
71,69	CH	3,75
71,04	CH	3,94
71,05	CH	4,18
69,0	CH	4,19
67,9	CH	3,8
52,3	CH	1
51,5	CH	1,54
50,6	CH ₂	2,28/2,58
48,7	CQ	PTC
48,4	CH	2,2
44,9	CH ₂	1,05/1,63
44	CQ	PTC
43,8	CH ₂	1,15/1,57
40,2	CH ₂	1,535
39,5	CH	1,47
38,3	CH ₂	2,02
33,3	CH	1,74
32,9	CH ₂	1,375
31,9	CH ₂	1,23/2,14
30,5	CH	2,25
28,7	CH ₂	1,80/1,88
28,00	CH	2,74
27,9	CH ₂	1,37 / 1,94
26,5	CH ₂	1,35/1,530
23,2	CH ₃	1,07
22,4	CH ₃	1,09
21,4	CH ₃	1,12
21,2	CH ₃	1,04
18,0	CH ₃	0,97
17,2	CH ₃	1,29
16,5	CH ₃	0,67
15,9	CH ₃	0,81
15,6	CH ₃	0,95
13,00	CH ₃	1,65

Tableau 16. Assignment de carbones et protons moyennant HSQC (PTC : pas de tâche de corrélation)

4. Construction par fragments

a. Construction du sucre

Légende : s = singulet, sl = singulet large, d=doublet, dd= doublet de doublet, t= triplet, dt= doublet de triplet q=quadruplet, m=multiplet.

Attribution	δC [ppm]	Parité [ppm]	δH [ppm]	Multiplicité	Constante de couplage [Hz]	COSY [ppm]	HMBC [ppm]
1'	101,9	CH	4,82	sl	1,4	3,94	67,9 / 73,2 / 85,31
4'	73,2	CH	3,43	dd	9,6 / 9,6	3,8 / 3,75	17,28 / 67,9 / 71,69
3'	71,6	CH	3,75	dd	9,6 / 3,6	3,94 / 3,8 / 3,43	73,2
2'	71,0	CH	3,94	dd	3,6 / 1,4	3,75 / 4,82	73,2 / 71,69
5'	67,9	CH	3,80	dd	9,6 / 6,2	1,29 / 3,43	PDC*
6'	17,2	CH ₃	1,29	d	6,2	3,8	67,9 / 72,2

Tableau 17. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3 (500MHz, CDCl₃MeOH) *PDC = pas de tâche de corrélation

Le sucre est construit à partir des corrélations en COSY qui s'enchaînent comme suit du fait de son déplacement chimique élevé, le proton à 4.82 ppm est le proton anomérique H1'. Ce proton présente une corrélation avec le signal à 3,94 ppm qui peut donc être attribué comme H2', et qui corréle à son tour avec le proton à 3.75 ppm qui est donc H3'. H3'corréle avec le signal à 3,43 ppm (H4') présentant lui-même une corrélation avec le signal 3,80 ppm (H'5), corrélant à son tour avec les protons du méthyl à 1,29 ppm (H6'). Les corrélations en HMBC permettent de confirmer l'enchaînement des protons. Le proton anomérique présente une corrélation en HMBC avec le signal à 85,3 ppm ce qui fait le lien entre le sucre et la génine. Les constantes de couplages des protons permettent de déterminer leur position axiale ou équatoriale. Les protons à H'3, H'4et H'5 présentent chacun une constante de couplage égale à 9,6 Hz, caractéristique d'un couplage axial-axial, et sont donc en position axiale. Le proton H3' et le proton H2' sont tous les deux des doublets de doublet et leur constante de couplage égale à 3,5 Hz est caractéristique d'un couplage axial-équatorial dans un sucre. Le proton H2' est donc en position équatoriale. La seconde constante de couplage, 1,4 Hz, du proton H'2, est égale à celle du proton anomérique, caractéristique d'un couplage équatorial-équatorial, le proton H'1 est donc en position équatoriale.

Grâce à ces données, le sucre est tracé et présenté dans la figure 36 (les corrélations en COSY sont représentées en gras et celles de l'HMBC sont les flèches en jaune) La nature du sucre est un Alpha-L-Rhamnopyranose car si l'on trace la configuration en Fischer on remarque que la cyclisation s'est faite par la gauche. La RMN est une technique permettant de trouver la configuration relative et non absolue, cependant la forme L est la plus fréquente dans la nature

c'est pourquoi on peut supposer que cet alpha Rhamnopyranose est de série L. Pour le confirmer, on peut utiliser la technique du dichroïsme circulaire vibrationnel.

Une hydrolyse acide et une extraction liquide / liquide (la génine ira dans la phase apolaire et le sucre se trouvera dans la phase polaire) est une autre technique permettant d'isoler le sucre afin de confirmer sa nature.

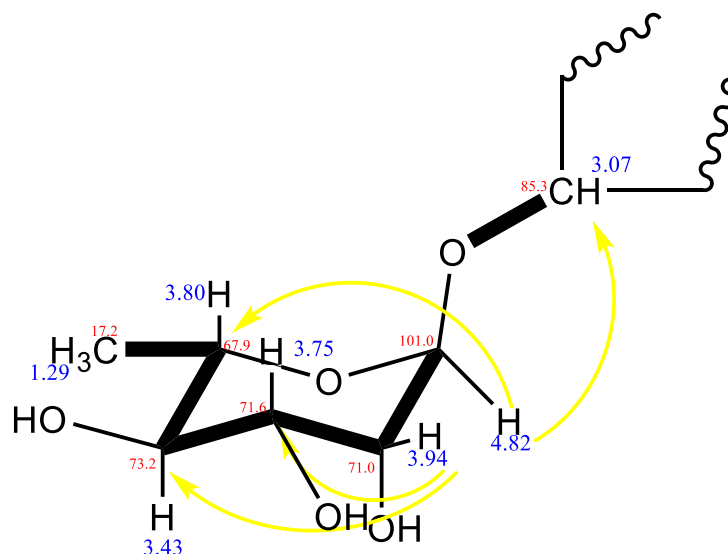


Figure 36. Alpha-L-Rhamnopyranose obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY (trait gras) et HMBC de SC3 (flèches jaunes) ; les nombres en bleu correspondent au déplacement du proton et les nombres en rouge correspondent au déplacement du carbone.

Précédemment nous avons constaté que la fraction SC3 était composée de 2 produits a et b. La suite de l'élucidation concerne la molécule SC3a majoritaire.

b. Construction du fragment 1

Attribution	δC [ppm]	Parité	δH [ppm]	Multiplicité	Constante de couplage [Hz]	COSY [ppm]	HMBC [ppm]
30	105,6	CH ₂	5,06	s	-	4,88	160,5 / 30,5
			4,88	s	-	5,06	160,5 / 30,5 / 71,0
24	160,5	Cq	-	-	-	PDC	105,4 / 22,4
25	30,5	CH	2,25	s	-	PDC	160,5 / 22,4
27	22,4	CH ₃	1,07	d	7,0	2,25	30,5 / 160,5
26	23,2	CH ₃	1,09	d	7,0	2,25	30,5 / 160,5
23	71,0	CH	4,18	d	9,9	1,57 / 1,15	105,4

22	43,8	CH	1,15	s	-	1,74	18,0
			1,57	s	-	1,57	18,0
20	33,3	CH	1,74	s	-	1,57	18,0
21	18,0	CH ₂	0,97	d	6,7	PDC	33,3 / 43,8 / 51,0
17	51,0	CH	1,54	s	-	PDC	PDC

Tableau 18. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3a (500MHz, CDCl₃MeOH)

Ce premier fragment est construit à partir des protons du signal à 105,6 ppm (5,06-4,88ppm). Le déplacement élevé du signal à 105,6 ppm est typique d'un carbone éthylénique, le déplacement également élevé de ses deux protons confirme cette observation. Les 2 protons éthyléniques (5,06-4,88ppm) présentent des corrélations en HMBC avec les signaux 71,0 ppm, 160,5 ppm et 30,5 ppm. Le signal à 160,5 ppm correspond donc au carbone quaternaire de la double liaison, qui est substitué par les carbones à 71,0 et 30,5 ppm. Le proton à 2,25 ppm, relié au carbone à 30,5 ppm, présente une corrélation COSY avec les doublets 1,07ppm et 1,09 ppm ce qui permet de déduire que les deux méthyles à 1,07 ppm et 1,09 ppm sont attachés au carbone à 30,5 ppm. Le carbone à 71,0 ppm est relié en HSQC au proton de signal 4,18 ppm, ce signal se situe vers les champs forts ce qui indique qu'il est relié à un alcool secondaire. D'autre part, le spectre COSY révèle que le proton de signal 1,57 ppm présente des corrélations avec les signaux de 4,18 ppm et 1,74 ppm ainsi qu'une corrélation en HMBC avec le méthyl à 0,97 ppm. Le proton du signal à 0,97 présente en HMBC des corrélations avec les signaux à 33,3 ppm, à 43,8 ppm et à 51,5 ppm. Avec ces données, on peut tracer le fragment 1 présenté dans la figure 37 (les corrélations de l'expérience HMBC sont représentées avec des flèches en bleu ciel et celles de l'expérience COSY avec des traits noirs gras).

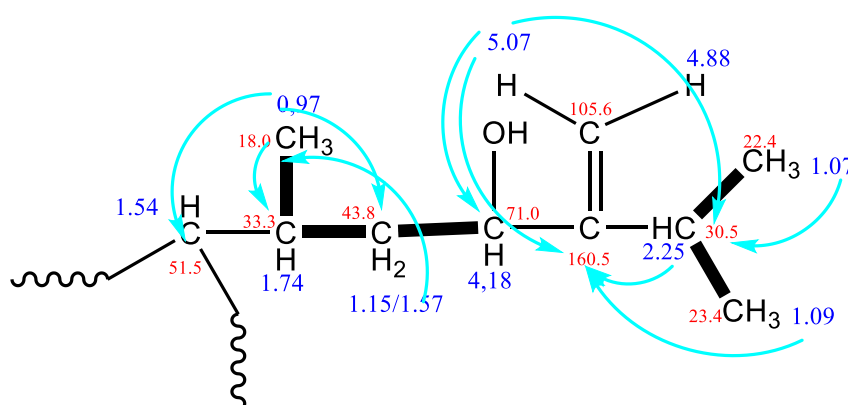


Figure 37. Fragment 1 obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3a ; les nombres en bleu correspondent au déplacement du proton et les nombres en rouge correspondent au déplacement du carbone

c. Construction du fragment 2

Attribution	δC [ppm]	Parité	δH [ppm]	Multiplicité	Constante de couplage [Hz]	COSY [ppm]	HMBC [ppm]
17	51,5	CH	1,54	s	-	1,37 / 2,14	15,9 / 18,0
19	15,9	CH ₃	0,81	s	-	PDC	38,3 / 44,0 / 48,7 / 51,5
12	38,3	CH ₂	2,02	sl	-	5,34	15,9
11	124,4	CH	5,34	sl	-	2,02	50,6
14	48,7	Cq	-	-	-	PDC	16,5 / 15,9
13	44,0	Cq	-	-	-	PDC	16,5 / 15,9 / 18,0
28	16,5	CH ₃	0,67	s	-	PDC	44,0 / 48,7 / 48,4 / 32,9
8	48,4	CH	2,20	-	-	-	50,6 / 16,5 / 26,5
15	32,9	CH ₂	1,375	-	-	PDC	PDC
16	31,9	CH ₂	1,23	d	12	2,14	PDC
			2,14	d	7,2	1,23	PDC
7	26,5	CH ₂	1,35	-	-	2,20 / 1,53 / 2,14	-
			1,53	-	-	-	-

Tableau 19. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3 a (500MHz, CDCl₃MeOH)

Le fragment 2 est construit à partir du proton à 1,54 ppm lequel présente une corrélation en COSY avec le signal à 2,14 ppm et une corrélation en HMBC avec le signal à 16,5 ppm qui correspond à un méthyle angulaire. Le proton à 0,81 ppm, du méthyl angulaire, montre une corrélation en HMBC avec les carbones quaternaires de signaux 44,0 ppm et 48,7 ppm et avec le signal à 38,2 ppm. Les protons du signal à 38,2 ppm (2,02-2,02 ppm) présentent une corrélation avec le signal à 5,34 ppm correspondant à un proton du type éthylénique. D'autre part le carbone quaternaire à 48,7 ppm présente une corrélation en HMBC avec le méthyle angulaire à 0,67 ppm. Quant à l'autre carbone quaternaire à 44,0 ppm, celui-ci montre en plus une corrélation en HMBC avec le méthyle 0,97 ppm du fragment 1. De ces informations est déduit le placement de ces deux carbones quaternaires ainsi que les deux méthyles angulaires. Le signal proton à 0,67 ppm présente une corrélation en HMBC avec le signal à 32,9 ppm et avec le signal à 48,4 ppm. Le proton à 2,20 ppm relié au carbone à 48,4 ppm présente une corrélation avec le signal à 1,35 ppm, qui est confirmé par l'HMBC. A partir de ces informations, le fragment est obtenu et présenté dans la figure 38 qui suit (les corrélations de l'expérience HMBC sont représentées

avec des flèches en bleu ciel et celles de l'expérience COSY avec des traits noirs gras, na pour non attribué).

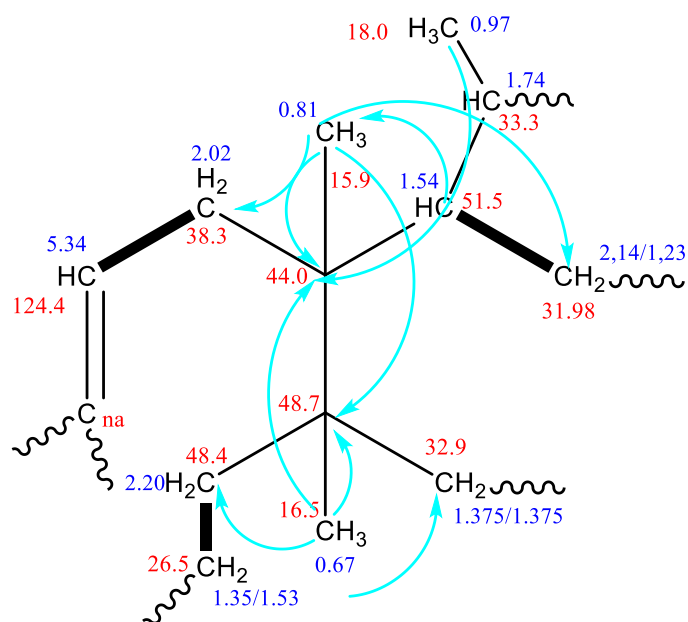


Figure 38. Fragment 2 obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3 ; les nombres en bleu correspondent au déplacement du proton et les nombres en rouge correspondent au déplacement du carbone

d. Construction du fragment 3

A partir de la connexion établie entre le sucre et la génine, se construit le fragment 3 :

Attribution	δC [ppm]	Parité [ppm]	δH [ppm]	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)	COSY [ppm]	HMBC [ppm]
1'	101,9	CH	4,82	sl	-	3,94	67,9 / 73,2 / 85,31
3	85,3	CH	3,07	td	10,7 / 4,3	1,47/1,88	101
4	39,5	CH	1,47	d	4,6	0,95 / 3,07 / 1,00	15,6
2	28,73	CH ₂	1,80 1,88	d d	4,1 4,1	3,07 / 1,535 3,07 / 1,535	PDC
29	15,6	CH ₃	0,95	d	6,6	1,47	52,3 / 85,3 / 39,5
5	52,3	CH	1,00	d	4,6	1,47	50,6 / 40,2
1	40,2	CH ₂	1,535	sl	-	2,28	50,6/136,4/53,3

Tableau 20. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3 (500MHz, CDCl₃MeOH)

Le proton anomérique présente une corrélation en HMBC avec le signal 85,3 ppm. Le proton du signal 85,3 ppm (3,07 ppm) corréle en COSY avec les deux protons à 1,47 ppm et à 1,88 ppm. Le spectre COSY nous indique que les protons du carbone à 28,7 ppm (1,88-1,80 ppm) sont en corrélation avec ceux à 1,535 ppm. Le signal à 1,47 ppm présente une corrélation en COSY avec le proton à 1,00 ppm et une corrélation en HMBC avec le signal à 15,61 ppm, ce qui place le dernier méthyl. Les corrélations retrouvées en HMBC confirment celles données par la COSY. Le fragment 3 présenté dans la figure 39 est obtenu (les corrélations de l'expérience HMBC sont représentées avec des flèches en bleu ciel et celles de l'expérience COSY avec des traits noirs gras).

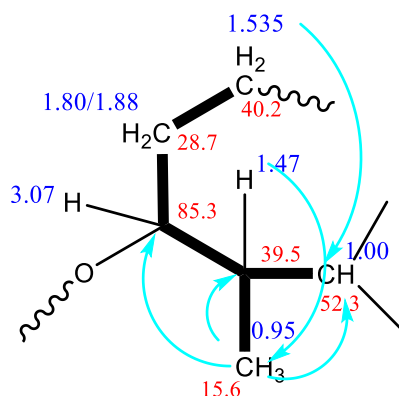


Figure 39. Fragment 3 obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3a ; les nombres en bleus correspondent au déplacement du proton et les nombres en rouge correspondent au déplacement du carbone

e. Structure finale

Avec toutes ces données, il en résulte que la structure du composé **SC3 a** est de type phytostérol en C30, avec un monosaccharide. Il reste donc à attribuer 2 couples de CH₂ et deux carbones quaternaires.

Attribution	δC [ppm]	Parité é	δH [ppm]	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)	COSY [ppm]	HMBC [ppm]
9	136,4	Cq	-	-	-	-	50,6 / 26,5
10	71.7	Cq	-	-	-	-	50,6
18	50.6	CH ₂	2,28 2,58	- -	15,2 15,2	- 2,02 / 2,28	40,2 / 48.4 / 52, 3 / 71,7 / 124,4 / 136,4
6	27.99	CH ₂	1,37 1,94	- d	- 2,4	- 1,35	-

Tableau 21. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC, COSY et HMBC, provenant du composé SC3 (500MHz, CDCl₃MeOH)

Le déplacement chimique du carbone quaternaire à 136,4 ppm est typique d'un carbone éthylénique et constitue donc le complément du carbone à 124,4 ppm. Le signal à 2,28 ppm présente plusieurs corrélations en HMBC avec les signaux à 52,3 ppm, 71,7 ppm, 48,4 ppm, 40,20 ppm 124,4 et 136,4 ppm. En conséquence de ces informations le carbone à 50,6 ppm (2,28-2,58 ppm) occupe une position centrale et est placé en position 18 dans la structure, le carbone quaternaire à 71,7 ppm se trouvant en position 10. Par élimination le dernier CH₂ restant est attribué à la position 6. On obtient en figure 40 la structure de la génine sans sa chaîne latérale (les corrélations de l'expérience HMBC sont représentées avec des flèches en bleu ciel et celles de l'expérience COSY avec des traits noirs gras).

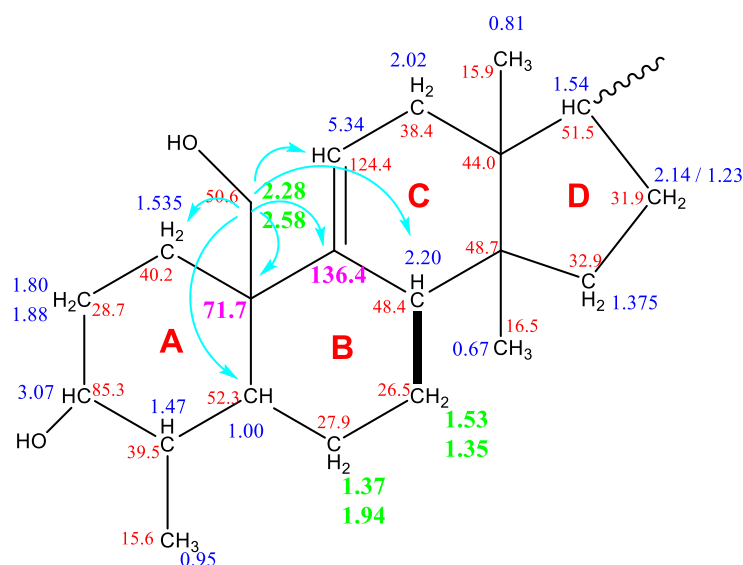


Figure 40. Structure des cycles A, B, C et D de la génine moyennant l'analyse de la COSY et de l'HMBC de SC3a ; les nombres en bleu correspondent au déplacement du proton et les nombres en rouge correspondent au déplacement du carbone

La corrélation en HMBC du signal à 3,07 avec le signal à 4,82 ppm permet de relier la génine au Rhamnopyranose. Grâce au spectre HMBC, le signal à 1,54 ppm peut être relié au signal de la chaîne latérale à 18 ppm. On obtient la structure du composé **SC3a**, présenté page 55 (les corrélations de l'expérience HMBC sont représentées avec des flèches en bleu ciel et celles de l'expérience COSY avec des traits noirs gras).

f. Structure de la molécule minoritaire

Lors de l'explication de la présence d'un mélange de deux molécules, on a différencié la paire de méthyles de signaux à 1,07 ppm et 1,09 ppm avec la paire de méthyles de signaux 1,04 ppm et 1,12 ppm. De même pour les 2 protons éthyléniques de signal 5,06 ppm et 5,54 ppm qui n'appartiennent pas à la même molécule.

Le proton éthylénique de signal à 5,54 ppm et la paire de méthyles de signal 1,04 ppm et 1,12 ppm font partie de la chaîne latérale de la molécule b.

La construction du fragment 1' se fait à partir des protons à 1,04 ppm et 1,12 ppm qui présentent une corrélation en HMBC avec le signal à 28,0 ppm et avec le signal à 149,6 ppm. Le carbone à 149,6 ppm montre une corrélation en HMBC avec le proton du méthyl à 1,65 ppm qui à son tour corréle en COSY avec le proton éthylénique à 5,54 ppm. Ce dernier proton présente en HMBC une corrélation avec le signal à 69,0 ppm qui est relié en HSQC avec le proton à 4,19 ppm où son déplacement est typique d'un proton relié à un alcool secondaire. Le signal à 4,19 ppm présente une corrélation en HMBC avec le carbone à 28,0 ppm et en COSY avec les protons à 1,15 ppm et 1,57 ppm qui appartiennent au fragment commun. Grâce à ces informations la chaîne latérale de SC3 b est tracée en figure 41. (Les corrélations de l'expérience HMBC sont représentées avec des flèches en bleu ciel et celles de l'expérience COSY avec des traits noirs gras).

La stéréochimie de **SC3a** et **SC3b** sera discutée dans la 4^{ème} partie de cette thèse.

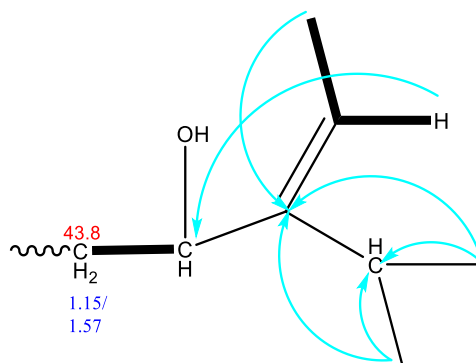


Figure 41. Corrélations COSY et HMBC du Fragment 1'

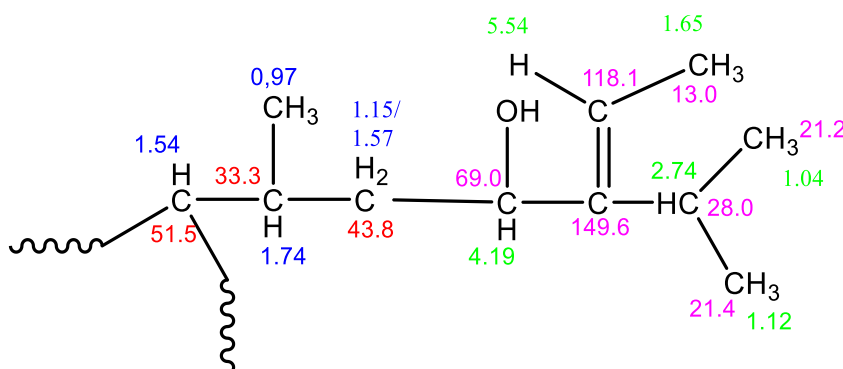


Figure 42. Fragment 1' obtenu moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3

Formule brute de **SC3 a** : $C_{36}H_{60}O_7$

Masse totale de SC3 a : 604

Formule brute de la génine : $C_{30}H_{50}O_3$

Masse de la génine : 458

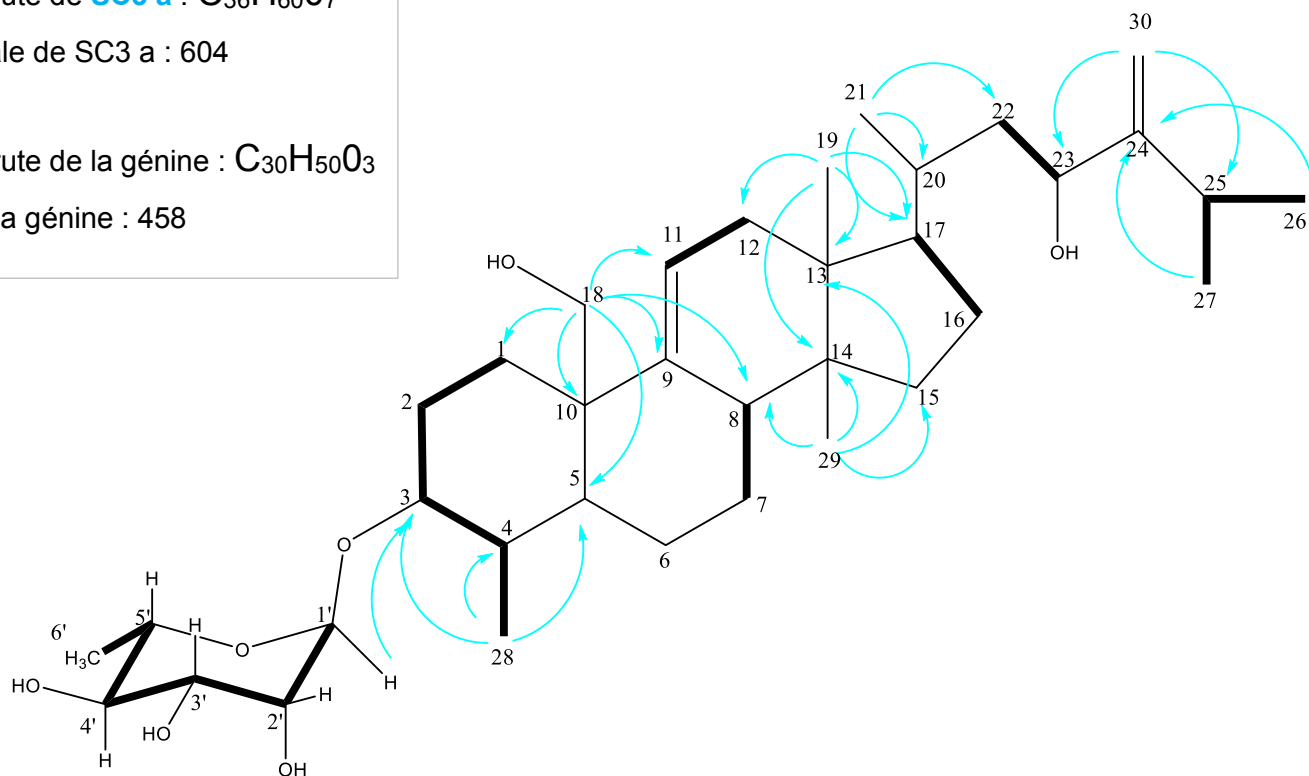


Figure 43. Structure proposée du composé **SC3a** obtenue moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3

Formule brute de **SC3 b** : $C_{37}H_{62}O_7$

Masse totale de SC3 b : 618

Formule brute de la génine :

$C_{31}H_{52}O_3$

Masse de la génine : 472

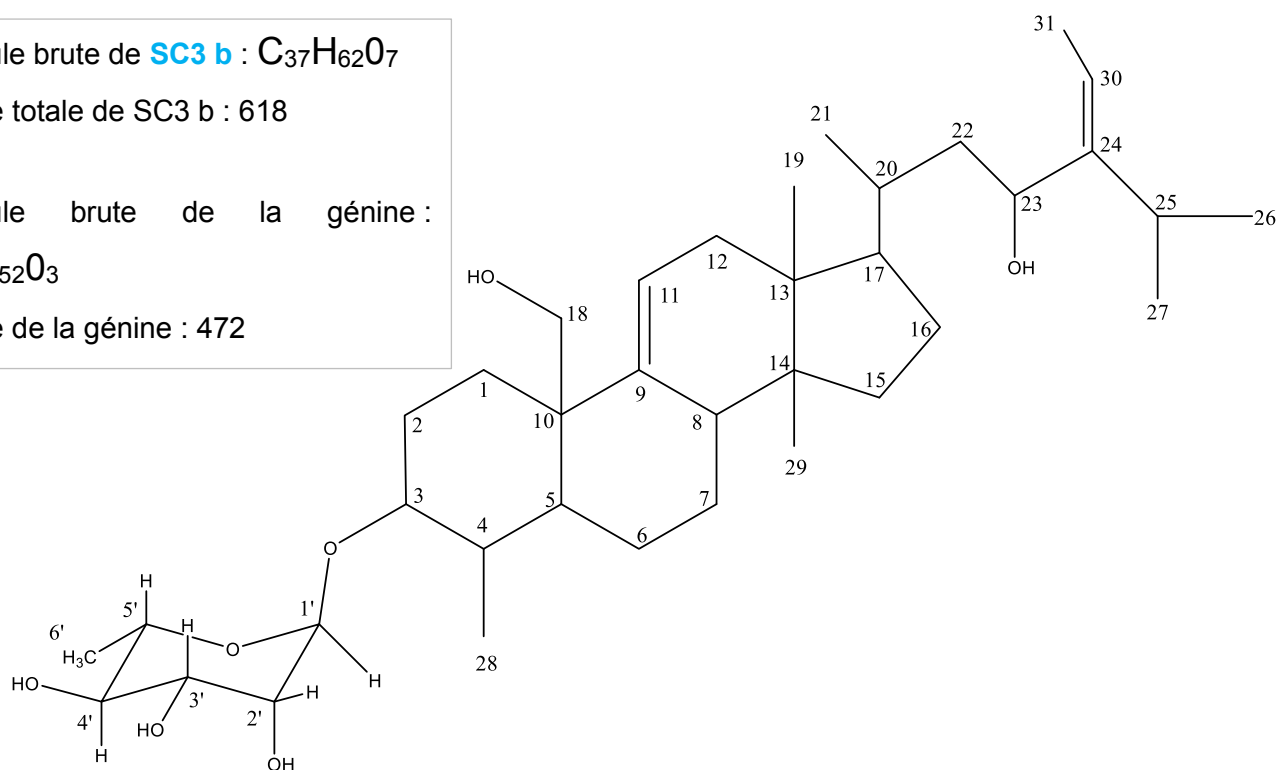


Figure 44. Structure proposée du composé **SC3b** obtenue moyennant l'analyse des spectres de COSY et HMBC de SC3

[Cf en annexe 5 pour le tableau résumant l'attribution des composés SC3a et SC3b.]

Conclusion

Les structures proposées pour chacune des molécules composant le mélange SC3 sont cohérentes avec toutes les corrélations observées dans les expériences COSY, HSQC, HMBC. Par contre, notons que les déplacements chimiques des carbones et protons en positions 10 et 18 sont en dehors des valeurs généralement observées pour de telles positions.

III. Détermination de la masse de SC3 :

1. Analyse en basse résolution :

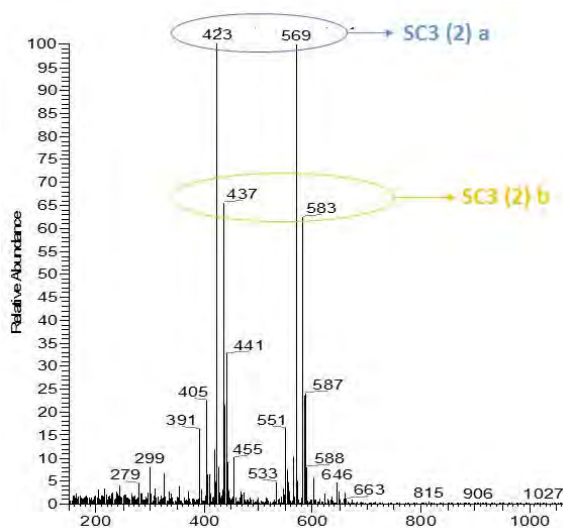


Figure 45. Spectre de masse, mode positif de SC3

Ce spectre de masse (figure 45) a été obtenu en mode APCI positif (Ionisation chimique à pression atmosphérique) par introduction directe en basse résolution. On observe 4 pics majoritaires qui correspondent à quatre cations : m/z 583, m/z 437, m/z 569, et m/z 423. On sait que la fraction SC3 (2) est un mélange de deux molécules, ainsi ce spectre de masse le confirme. Lors de l'élucidation structurale, la masse totale calculée pour **SC3a** est égale à 604 uma. Si on fait la soustraction suivante $604 - 569 = 35$. Cette perte de masse de 35 correspond à la perte de OH^- et H_2O . En conséquence le cation m/z 569 correspond à $[\text{M} - \text{OH}^- - \text{H}_2\text{O}]$. On effectue le même raisonnement pour le cation m/z 583 de la molécule **SC3b**.

Concernant le couple d'ions m/z 569 ; m/z 423, on observe une perte de masse de 146 entre eux. Cette valeur est aussi retrouvée pour le couple m/z 583 ; m/z 437. Cette perte de masse de 146 correspond à la perte du rhamnose. Les ions fils m/z 423 et m/z 437 représentent donc la génine de la structure. On peut donc déduire que le couple m/z 583, m/z 437 appartient à la molécule minoritaire SC3 (2) b et que le couple m/z 569, m/z 423 appartient à la molécule majoritaire SC3 (2) a.

La masse de la génine trouvée lors de l'élucidation structurale pour **SC3a** est égale à 458 et la soustraction entre 458 et 423 donne 35. Le même raisonnement est effectué pour le cation m/z 437. La figure 46 illustre un exemple de fragmentation lors de la perte de masse de 35 :

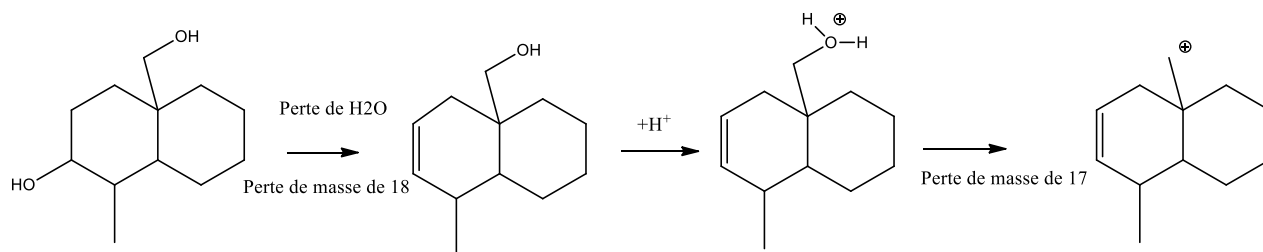


Figure 46. Mécanisme de fragmentation de la génine lors de la perte de H_2O / OH^- .

Sur le spectre, entre la masse de 437 et de 423 ainsi qu'entre la masse de 583 et de 569 est observée une perte de 14 qui correspond à un CH_2 . Se note ici (Figure 47) la différence de structure entre SC3 a et SC3b mis en évidence lors de l'élucidation structurale avec la RMN.

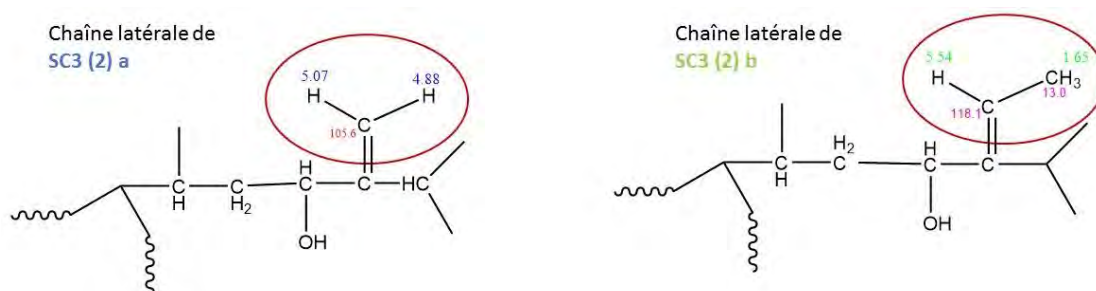


Figure 47. Représentation de la perte du CH_2 entre SC3 (2) b et SC3 (2) a.

Cette technique de spectrométrie de masse en basse résolution ne permet pas de confirmer la formule brute déduite à partir de la structure trouvée en RMN.

2. Analyse haute résolution :

Les spectres de masse haute résolution (figure 48 et 49) obtenus par la technique UPLC/MS, (spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide ultra performante), en détection TIC (total ion current = quantité d'ions qui tapent dans le détecteur) permettent de trouver la formule brute des composés SC3a et SC3b et confirment la présence d'un mélange de deux molécules.

a. Analyse en mode positif :

Deux pics majoritaires sont observés (Figure 48), correspondant aux cations m/z 423 et m/z 437. La différence de masse entre ces deux valeurs est égale à 14 et correspond à la perte d'un CH_2 . On peut obtenir pour chacun de ces deux pics les spectres de masse suivant :



Figure 48. Chromatogramme UPLC et spectre de masse

Cette analyse confirme les données de l'analyse en basse résolution.

b. Analyse en mode négatif :

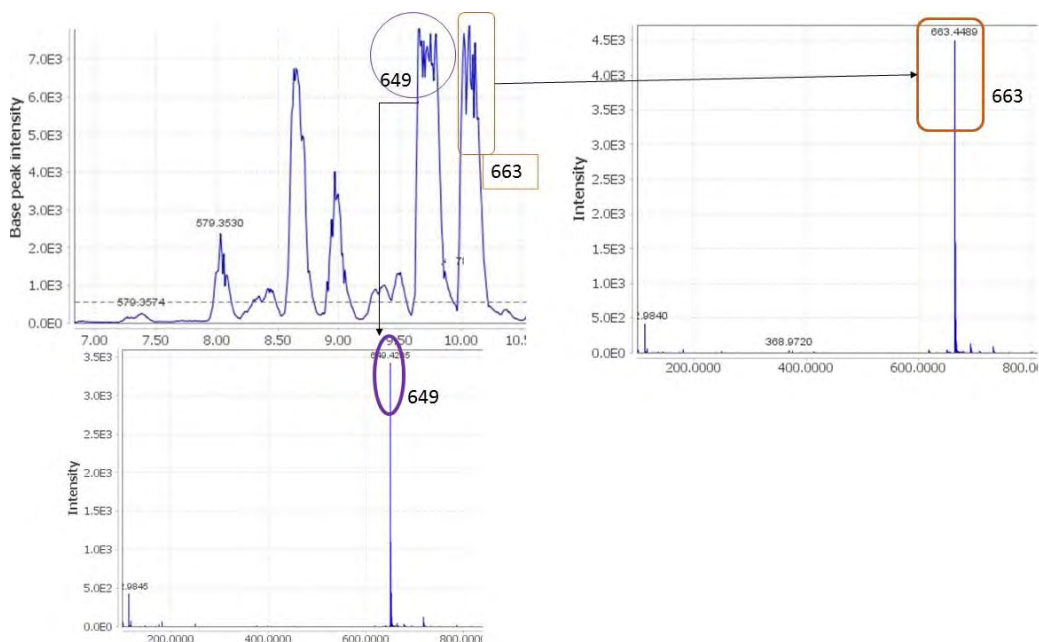


Figure 49. Chromatogramme UPLC et spectre de masse

Ici en mode négatif (figure 49), les anions m/z 649 et m/z 663 correspondent à l'adduit formiate $[M + \text{HCOO}]^-$ de molécules de masse 604 et 618, la masse de l'anion formiate étant de 45. En effet, si l'on prend la masse de SC3a, déduite précédemment, et que l'on fait la soustraction suivante : $649 - 604 = 45$, cette perte de 45 corrèle avec la masse de l'ion formiate.

Conclusion

En rassemblant les données du mode positif et négatif (en haute résolution), on retombe sur les mêmes conclusions que l'analyse en basse résolution. La formule brute calculée à partir de la structure élucidée avec la RMN est confirmée par cette analyse UPLC/MS.

On peut conclure que les structures proposées, après élucidation des spectres RMN, sont cohérentes avec ces analyses de spectrométrie de masse (Figure 22).

Formule brute de SC3 a : $C_{36}H_{60}O_7$ Masse totale de SC3 a : 604 uma Formule brute de la génine : $C_{30}H_{50}O_3$ Masse de la génine : 458 uma	Formule brute de SC3 b : $C_{37}H_{62}O_7$ Masse totale de SC3 b : 618 uma Formule brute de la génine : $C_{31}H_{52}O_3$ Masse de la génine : 472 uma
--	--

Tableau 22 : Résultats obtenus à partir des analyses de spectrométrie de masse

4^{ème} partie

I. Discussion à propos de la structure de SC3 :

Au vu de la complexité du spectre et des déplacements chimiques hors normes des protons et carbone des positions 10 et 18, le doute sur la structure des composés SC3a et SC3b est encore permis. Les données de HPLC-MS confortent le fait qu'il y a bien 2 molécules, composées chacune d'un sucre et d'une génine. Chaque molécule doit être séparée afin de refaire une analyse RMN complète de chacun des composés. Si des monocristaux peuvent être obtenus, une analyse par diffraction des rayons X sera effectuée.

SC3 fait partie de la famille des phytostérols. La biosynthèse de cette famille est réalisée à partir d'un précurseur, le squalène (figure 50). C'est un lipide ubiquiste qui appartient aux triterpènes, il est constitué de 6 unités isoprènes, dont ses doubles liaisons possèdent une configuration en E. Il est présent dans tous les organismes supérieurs (on le retrouve notamment dans le foie de requin), et il est le précurseur commun des triterpènes et des hormones stéroïdiennes, aussi bien animales que végétales, et de quelques vitamines. Il est présent dans de nombreuses membranes cellulaires dont il assure ainsi la fluidité.

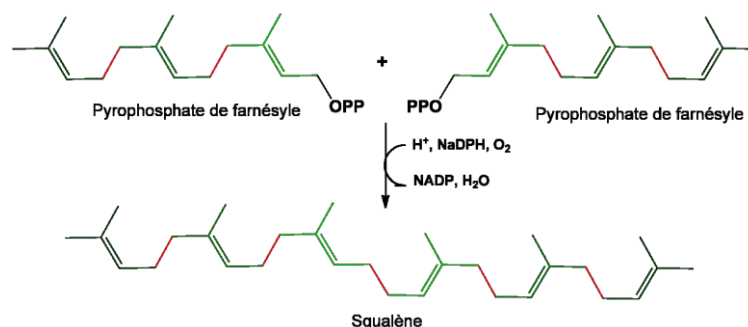


Figure 50. Biosynthèse du squalène.

Le squalène permet donc la synthèse de nombreux métabolites secondaires comme les phytostérols qui sont des molécules jouant divers rôles. Ce sont des constituants majeurs des membranes cellulaires, ils vont ainsi assurer la fluidité et le maintien architectural de la membrane. On peut citer l'ergostérol qui est le principal composant de la membrane cellulaire dans le règne fongique. Dans le règne végétal, les phytostérols les plus courants sont le stigmastérol (figure 51) et le β -sitostérol (figure 52).

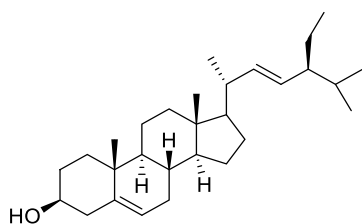


Figure 51. Stigmastérol

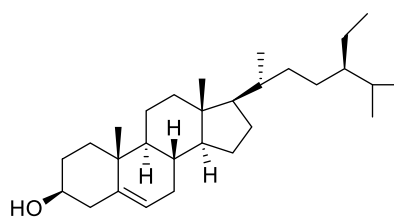


Figure 52. β -sitostérol

Dans l'industrie pharmaceutique les stérols et les sapogénines des plantes sont utilisables comme matières premières pour la préparation de la plupart des médicaments stéroïdes comme les contraceptifs, les anabolisants et les anti-inflammatoires. Dans l'industrie alimentaire, les phytostérols servent dans la préparation des margarines et autres produits consommables pouvant favoriser la baisse du taux de cholestérols [7].

Ce squalène est retrouvé dans l'écorce de *C. sinensis*, dans les graines de *C. dichotoma* et dans le duramen de *C. trichotoma*. De même a été identifiée la présence de stigmasterol et de campesterol dans les écorces de *C. macleodii*. De ces résultats on peut conclure que les phytostérols, dont les saponies de type stéroïdal, ne sont pas présents de manière systématique dans le genre *Cordia* (cf en annexe 6 pour les références). Toutefois, le squelette le plus proche des phytosterol/triterpene dans le genre *Cordia* sont des triterpènes de type dammarane [45], [46]. Il faut également prendre en compte que dans les espèces de *Cordia* citées précédemment les études portent principalement sur le duramen, les écorces, les racines, les fruits, les graines et les feuilles, alors que ce travail présente des composés isolés à partir des fleurs de *C. lutea*.

Concernant la stéréochimie de SC3, il est difficile de conclure car les triterpènes/phytosterols décrits dans le genre *Cordia* n'ont pas le même squelette que celui proposé pour SC3. En dehors de la stéréochimie beta des position 3 et 10, qui sont les mêmes pour tous les triterpènes, les autres positions varient suivant qu'on part d'un noyau protostane ou dammarane [7]. Les figures 53 et 54 présentent deux triterpènes type dammarane rencontrés pour deux espèces de *Cordia*.

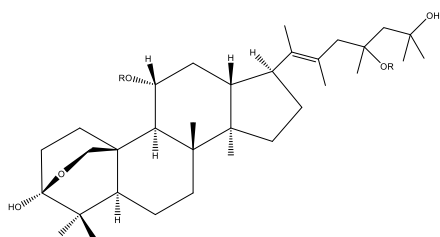


Figure 53. Cordialine, de *Cordia verbenaceae* [47]

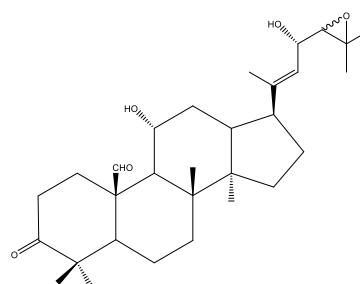


Figure 54. Dammarane-Type Triterpènes isolé à partir de *Cordia multispicata* [46]

II. Analyses des données spectrales et chromatographiques obtenues pour CG5 :

La comparaison des spectres protons et carbones de SC3 et CG5 permettra de mettre en évidence les similitudes et les différences entre les signaux obtenus. Ainsi, l'élucidation de CG5 pourrait être plus aisée.

Spectres protons :

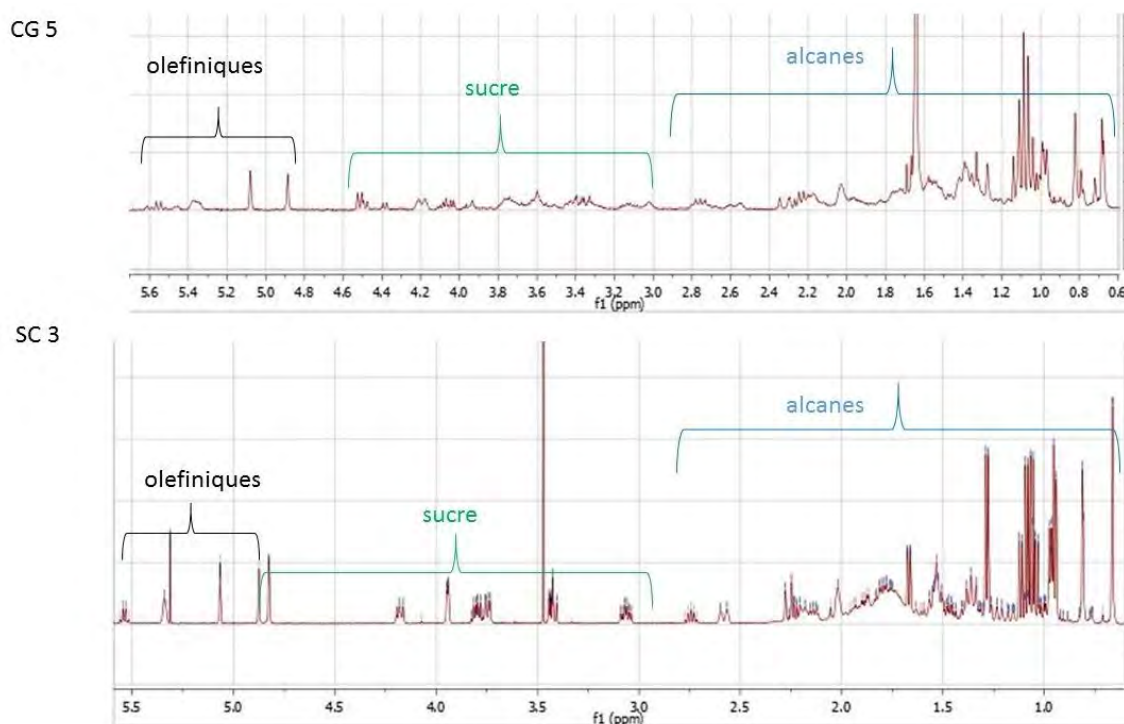


Figure 56. Comparaison des spectres protons des composés CG5 et SC3.

Sur le spectre proton on observe une similarité, en effet sur le spectre de CG5 on retrouve les trois zones définies pour SC3, c'est-à-dire la zone oléfinique, la zone correspondant aux protons du sucre et la zone des alcanes.

Lorsque l'on zoome sur ces différentes zones on remarque que certains signaux du spectre de CG5 sont proches de ceux de SC3 (signaux entourés) mais ne sont pas aussi bien définis, il semblerait que le composé CG5 ne soit pas bien purifié.

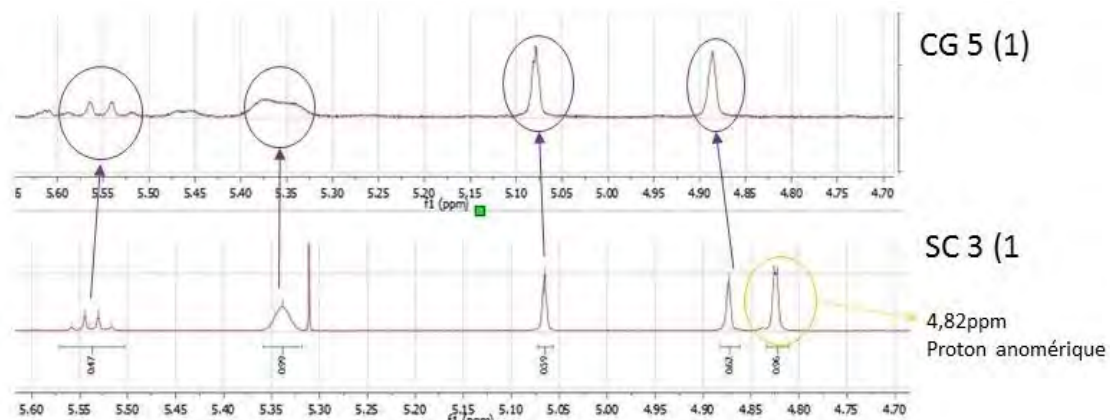


Figure 57. Comparaison des spectres protons des composés CG5 et SC3 du signal 4.70 ppm à 5.60 ppm.

Sur la figure ci-dessus on retrouve sur le spectre de CG5 les signaux des protons éthyléniques vers 5.55 ppm, 5.35 ppm, 5.06 ppm et 4.88 ppm. On ne retrouve pas le signal à 4, 82 ppm qui correspond au proton anomérique de SC3. Il y a dans le spectre de CG 5 un signal à 4.5 ppm, absent dans le spectre de SC3, qui peut correspondre au proton anomérique (figure 58).

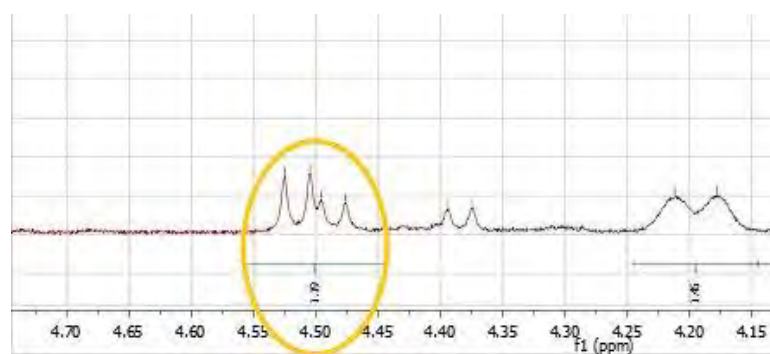


Figure 58. Spectre proton de CG5

En ce qui concerne les protons du sucre, seul le signal à 3.94 ppm est présent dans le spectre CG 5, les autres signaux sont moins bien définis (Figure 59).

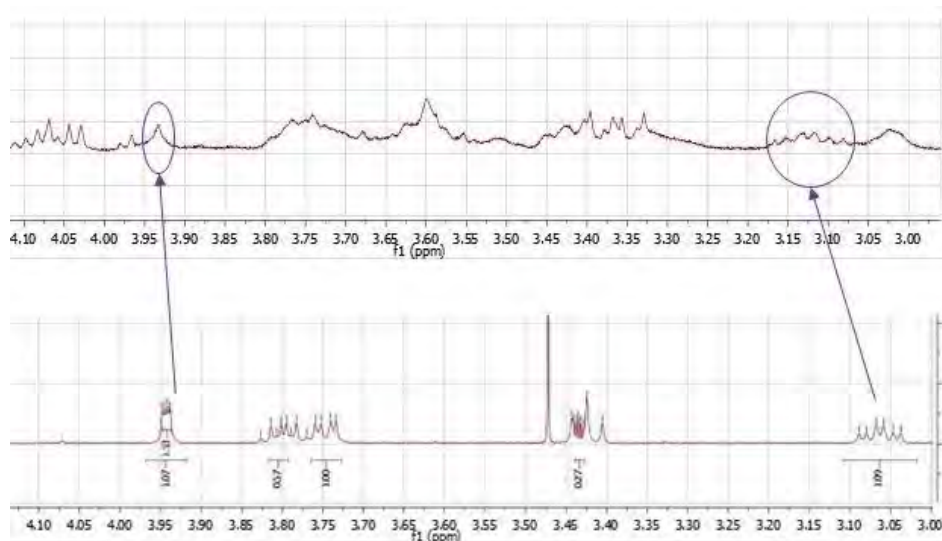


Figure 59. Spectre proton de CG5 (en haut) et SC3 (en bas).

Le doublet correspondant au méthyl de signal à 1.29 ppm n'est pas présent (doublet entouré en vert sur le spectre SC3). Avec l'absence du signal à 4.82 ppm on peut déduire qu'il peut s'agir d'un sucre différent du rhamnose.

La zone de 0.65 ppm à 1.15 ppm correspondant à plusieurs signaux de méthyles pour le composé SC3 présente des différences avec cette même zone pour le spectre CG5. Les méthyles à 0.81 ppm et 0.66 ppm de SC3 sont aussi présents pour CG5 (flèches noires), cependant les 2 méthyles 0.95 ppm et 0.97 ppm semblent ne pas être présents dans CG5 (signaux entourés en vert sur SC3). De même pour les quatre méthyles à 1.04 ppm, 1.07 ppm, 1.09 ppm et 1.12 ppm qui correspondent à 8 pics sur SC 3, on ne retrouve que 6 pics dans cette même zone. Il pourrait donc n'y avoir que 3 méthyles au lieu de 4 pour cette zone ou bien les signaux sont superposés (Figure 60).

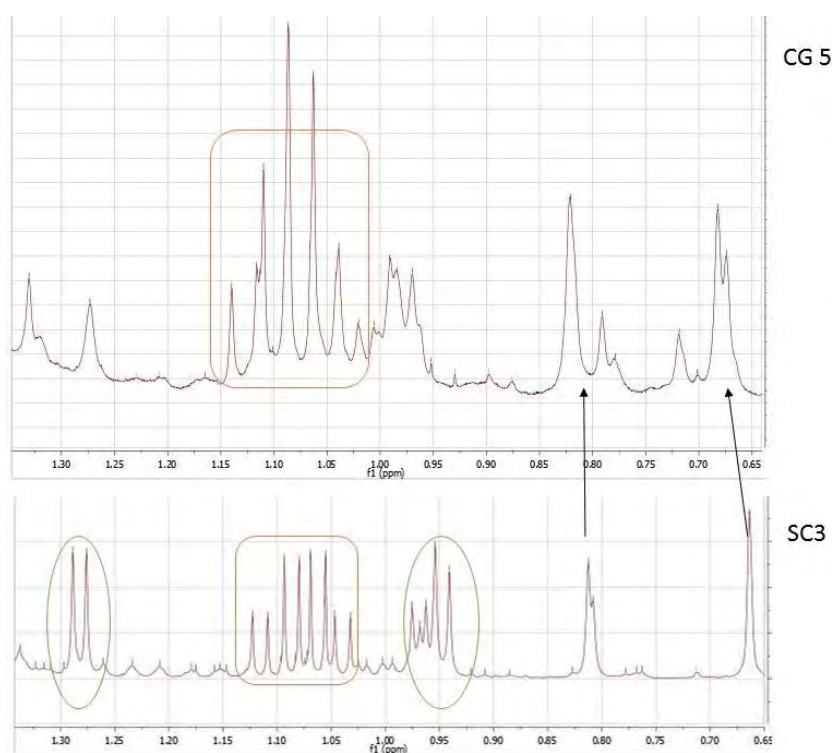


Figure 60. Comparaison de la zone de 0.65 ppm à 1.30 ppm entre CG5 et SC3

De ces informations tirées du spectre proton de CG 5, on peut avancer que la molécule possède certains signaux similaires comme : les signaux des protons éthyléniques et certains signaux des protons de méthyles ainsi que la présence d'un monosaccharide.

L'analyse du spectre carbone (Figure 61) de CG 5 montre aussi des similarités de signaux.

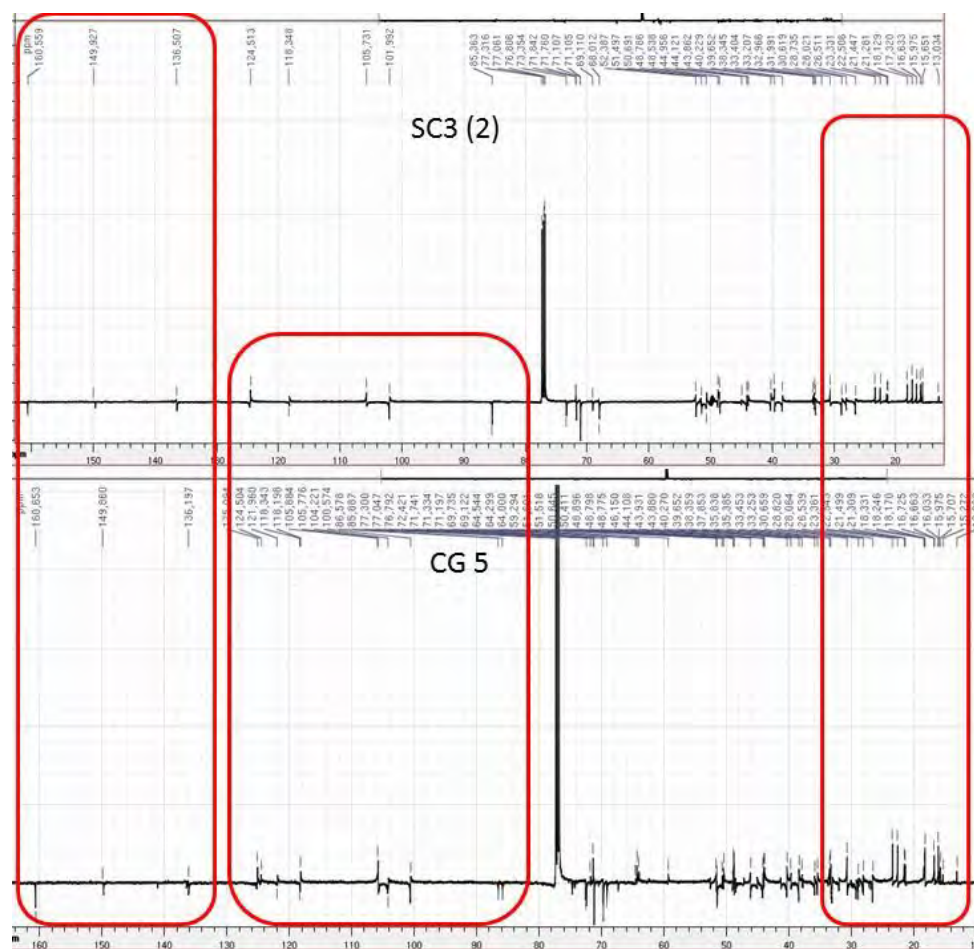


Figure 61. Comparaison des spectres carbone de SC3 (2) et de CG5.

Cependant ces spectres ne sont pas bien résolus, le produit n'étant pas suffisamment purifié. On peut formuler l'hypothèse d'un mélange similaire à SC3, où le sucre serait différent.

Analyse par UHPLC de CG5 :

Une analyse par UHPLC de CG5 est effectuée afin de séparer les différentes molécules constituant CG5. Le chromatogramme obtenu pourrait être comparé à celui de SC3 (2). De plus, les données du chromatogramme pourront aider pour adapter la méthode chromatographique afin de purifier CG5.

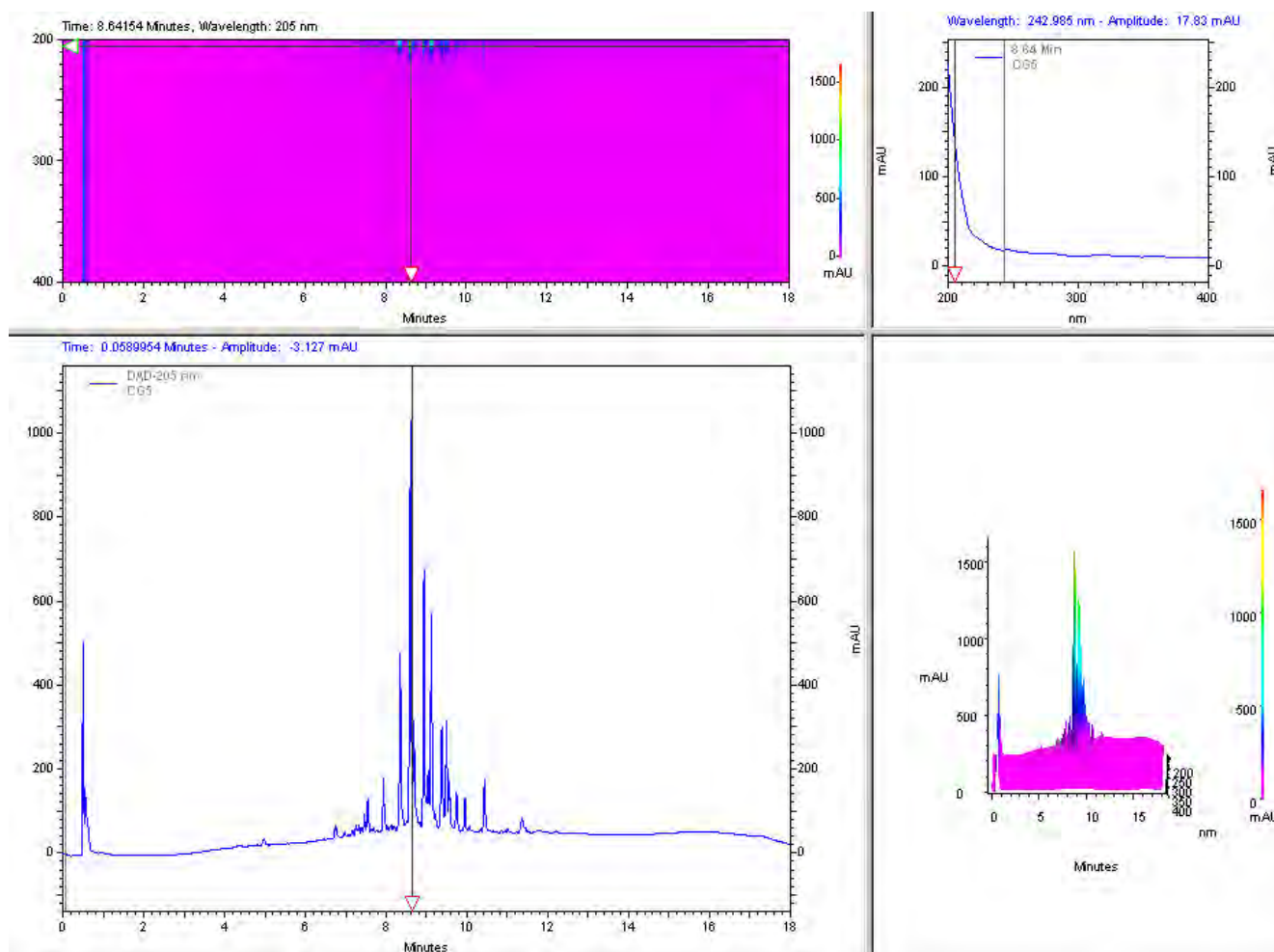


Figure 62. Chromatogramme UPLC de CG5.

Ce chromatogramme confirme que le produit CG5 n'est pas pur, on a un massif avec un pic majoritaire à 8,6 min. Afin de purifier et de n'obtenir que le majoritaire il faudrait faire une HPLC préparative.

CONCLUSION

Les objectifs de mon travail étaient focalisés sur l'isolement et la caractérisation chimique des composés isolés au moyen de la spectroscopie de masse, de la RMN 1D (¹H-RMN, ¹³C-RMN) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), afin de contribuer à la connaissance de la composition chimique de *Cordia lutea* L. J'ai donc isolé trois produits, CG0, CG4 et CG5, différents des trois précédents SC1 SC2 et SC3. Leur élucidation structurale est en cours d'analyse. L'isolation d'autres composés permet de compléter la composition phytochimique de *Cordia lutea* car aujourd'hui, à notre connaissance, une seule publication parle de sa composition chimique.

Ce stage a été réalisé dans un laboratoire de l'université péruvienne Cayetano Heredia à Lima. Sur place, le manque ou l'indisponibilité de certaines techniques d'analyses m'ont permis de trouver d'autres alternatives afin de tenir les objectifs fixés. Savoir s'adapter et organiser son travail en fonction du matériel disponible sont des compétences que j'ai acquise grâce à ce stage.

Au regard de l'activité biologique anti-*Helicobacter pylori* décrite pour l'extrait méthanolique, dont sont issus les composés isolés, il serait intéressant de tester chaque composé sur une souche d'HP.

Traditionnellement *Cordia lutea* est utilisée pour les pathologies concernant le foie. Dans un travail futur des fractions isolées de l'extrait méthanolique et aqueux pourraient être testées *in-vitro* sur des cellules du foie afin d'évaluer leur activité biologique.

La technique de fractionnement par chromatographie liquide nécessite une quantité importante de solvant et se pose la question de comment améliorer cette technique afin de diminuer l'utilisation de solvant toxique pour l'Homme et l'environnement.

La recherche de nouvelles molécules pour traiter les maux du 21^{ème} siècle comme la maladie d'Alzheimer, les cancers et les maladies métaboliques ainsi que la nécessité de renouveler l'arsenal des anti-infectieux se fait de plus en plus ressentir. Les pandémies de la grippe aviaire, d'Ebola et de Zika apparues ces 10 dernières années, ainsi que l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes en sont la preuve.

La nature recèle de milliers de composés qui pourraient devenir de nouveaux médicaments, c'est pourquoi il est important de garder un regard sur les médecines traditionnelles utilisant des plantes médicinales.

Cette thèse finalise mon cursus pharmaceutique et m'a confortée dans mon projet de continuer en thèse doctorale de science afin d'effectuer une carrière en tant qu'enseignant chercheur.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] <http://www.cnrtl.fr/definition/pharmacognosie> , consulté le 20 avril 2016
- [2] **G.Trease (1958)**, “De la connaissance des plantes à la pharmacognosie “, *Rev Hist Pharm.*, vol. 46, no. 158, pp. 348–351.
- [3] **J. Y. Yang, and all, (2013)**, “Molecular Networking as a Dereplication Strategy,” *J. Nat. Prod.*, vol. 76, no. 9, pp. 1686–1699,.
- [4] “GNPS - The Future of Natural Products Research and Mass Spectrometry.”
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp> , consulté le 24 avril 2016
- [5] **Roselyne Boulieu, (2013)**, *Initiation à la connaissance du médicament*, Ed. Ellipses
- [6] **Rolf D. Shmid, (2005)**, *Atlas de poche de Biotechnologie et de génie génétique*,
Ed. Flammarion
- [7] J.Bruneton, (2016), *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*,
Ed. Lavoisier Tec & Doc
- [8] **P. Nariya, and all, (2011)** “Antimicrobial and antifungal activities of *Cordia dichotoma* (Forster F.) bark extracts,” *AYU Int. Q. J. Res. Ayurveda*, vol. 32, no. 4, p. 585.
- [9] **J. G. Kusters, and all, (2006)** “Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 3, pp. 449–490.
- [10] **Bionmis, (2012)** “*Helicobacter Pylori*”,
http://www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/HELICOBACTER_PYLORI.pdf
consulté le 2 mai 2016
- [11] **Groupe d’étude français sur Helicobacter**, <http://www.helicobacter.fr/> , consulté le 8 juillet 2016
- [12] **P. Malfertheiner, and all and The European Helicobacter Study Group (EHSg), (2012)** “Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report,” *Gut*, vol. 61, no. 5, pp. 646–664.
- [13] **ANSM**, “Pylera.”
<http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Pylera-mise-sur-le-marche-et-informations-importantes-de-pharmacovigilance-Point-d-information>
consulté le 2 mai 2016
- [14] -Ulcère gastroduodénal - Objectifs de la prise en charge -
https://www.vidal.fr/recommandations/1498/ulcere_gastroduodenal/la_maladie/
consulté le 6 mai 2016

- [15] Base de données publique des médicaments, “RCP Metronidazole.” consulté le 6 mai 2016
- [16] Base de données publique des médicaments, “RCP Clarithromycine.” consulté le 6 mai 2016
- [17] Base de données publique des médicaments, “RCP Amoxicilline.” consulté le 6 mai 2016
- [18] **A. Courrilon-Malet** “Resistance d’*Helicobacter pylori*.”
<http://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/file/pdf/351.pdf> , consulté le 7 mai 2016
- [19] **M. Romano, and all, (2008)**, “Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 61, no. 10, pp. 1112–1115.
- [20] **D. E. Berg, and all, (1997)** “*Helicobacter pylori* Populations in Peruvian Patients,” *Clin Infect Dis.*, vol. 25, pp. 996–1002.
- [21] **Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología, (2010)** “*Helicobacter pylori* en los países en desarrollo.”
<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/helicobacter-pylori-spanish-2010.pdf> consulté le 10 mai 2016
- [22] “Les guérisseurs des Andes.” http://www.hommes-et-faits.com/anthropsy/Fa_Sorciers.html consulté le 11 mai 2016
- [23] **J. Mostacero, and all, (2011)**, *Plantas medicinales del Perú*. Trujillo.
- [24] “*Cordia lutea* Lam. — The Plant List.”
- [25] **I. Mayevych and all., (2015)** “Chemical Composition of *Cordia lutea* L.: Absence of Pyrrolizidine Alkaloids,” *Nat Prod Chem Res*, vol. 3, no. 6.
- [26] “An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: **APG III, (2009)** “*Botanical Journal of the Linnean Society*”, vol. 161, pp. 105–121.
- [27] **F. C. Geller, (2010)**, “Isolation, Structure Elucidation and Biological Investigation of Active Compounds in *Cordia americana* and *Brugmansia suaveolens*,” Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, University of Tübingen, Tübingen.
- [28] **H. Wiedenfeld and all, (2011)**, “Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants,” *Phytochem. Rev.*, vol. 10, no. 1, pp. 137–151.
- [29] **E. K. McLean, (1970)** “The toxic actions of pyrrolizidine (senecio) alkaloids,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 22, no. 4, pp. 429–483.
- [30] **P. N. Okusa, and all, (2012)** “Absence of pyrrolizidine alkaloids in *Cordia gillettii* de wild (boraginaceae),” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 41, pp. 1–2.

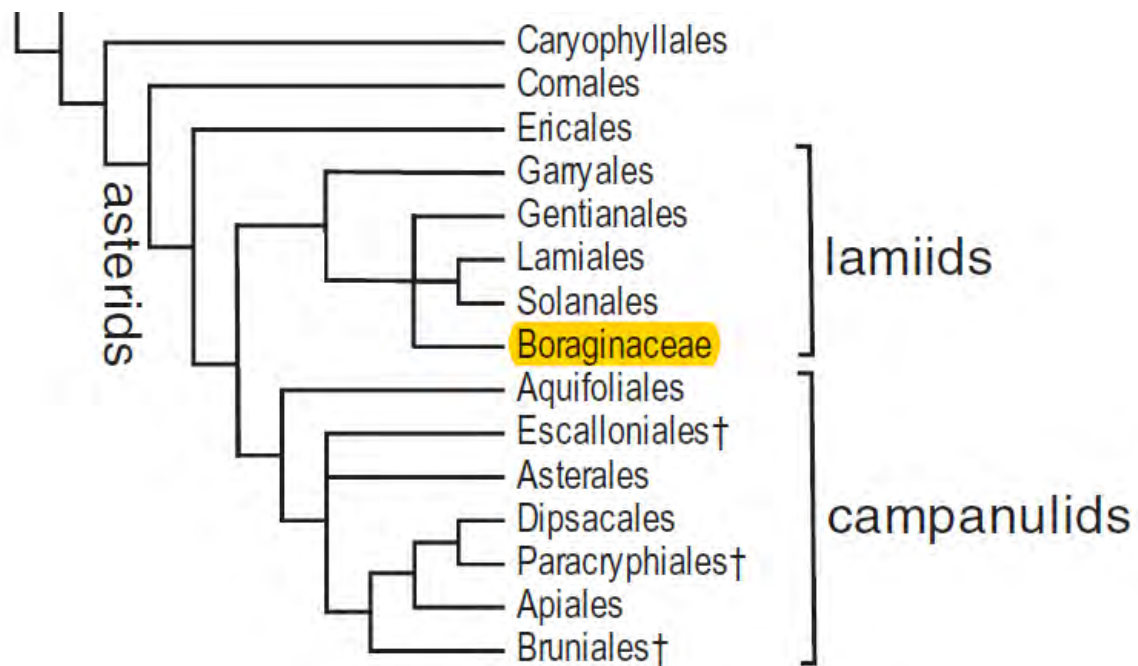
- [31] **I. Orhan, (2012)** "*Biotechnological production of plant secondary metabolites*". [Dubai, United Arab Emirates]: Bentham eBooks.
- [32] **T. Hernandez, (2007)**, "Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 111, no. 1, pp. 137–141.
- [33] **J-R. Ioset and all, (2000)** "Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*," *Phytochem*, vol. 53, pp. 613–617.
- [34] **E. F. F. Matias, and all, (2013)** "Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage," *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, vol. 2013, pp. 1–7.
- [35] **E. M. Z. Michielin, and all, (2009)** "Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 24, pp. 6615–6623.
- [36] **A. Basile, and all (2000)** "Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves," *Fitoterapia*, vol. 71 Suppl 1, pp. S110-116.
- [37] **J.-P. Rauha and all, (2000)**, "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 3–12.
- [38] **E. S. Fernandes and all, (2007)** "Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 569, no. 3, pp. 228–236.
- [39] **F. Geller and all, (2010)** "Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 128, no. 3, pp. 561–566.
- [40] **S. Begum, and all, (2011)**, "Chemical Constituents of *Cordia latifolia* and Their Nematicidal Activity," *Chemistry and Biodiversity*, vol. 8, pp. 850–861.
- [41] **P. G. Jamkhande, and all, (2013)**, "Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Cordia dichotoma* (Indian cherry): A review," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 3, no. 12, pp. 1009–1012.
- [42] **A. Chinniah and all, (2009)** "On the potential of *Tephrosia purpurea* as anti-*Helicobacter pylori* agent," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 124, no. 3, pp. 642–645.
- [43] **CLSI, NCCLS, (2010)**, "National Committe for Clinical Laboratory standars for Antimicrobial Susceptibility Testing" . Approved standar M45-A2.
- [44] **S. Berger and D. Sicker, (2009)**, "Classics in spectroscopy: isolation and structure elucidation of natural products." Weinheim : Wiley-VCH.
- [45] **N. Nakamura, and all (1997)**, "Dammarane-type triterpenes from *Cordia spinescens*", *Photochemistry*, vol. 46, no. 6, pp1139-1141.

[46] **M. Kuroyanagi , and all, (2003)**, " Dammarane-Type Triterpenes from the Brazilian Medicinal Plant *Cordia multispicata*", J. Nat. Prod., vol. 66, pp 1307–1312.

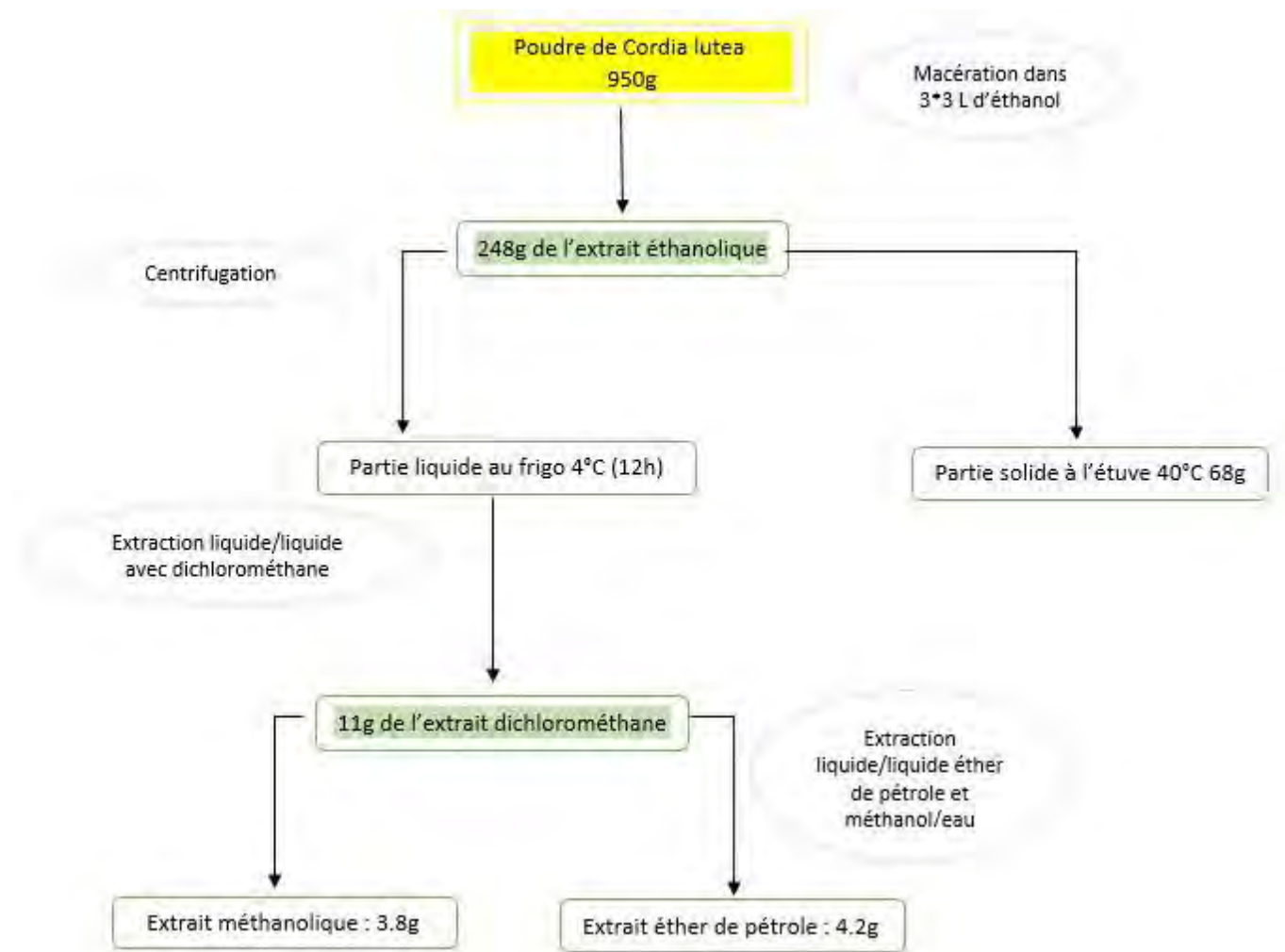
[47] **V. Vande Velde and all, (1982)**, "Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, pp. 2697-2700.

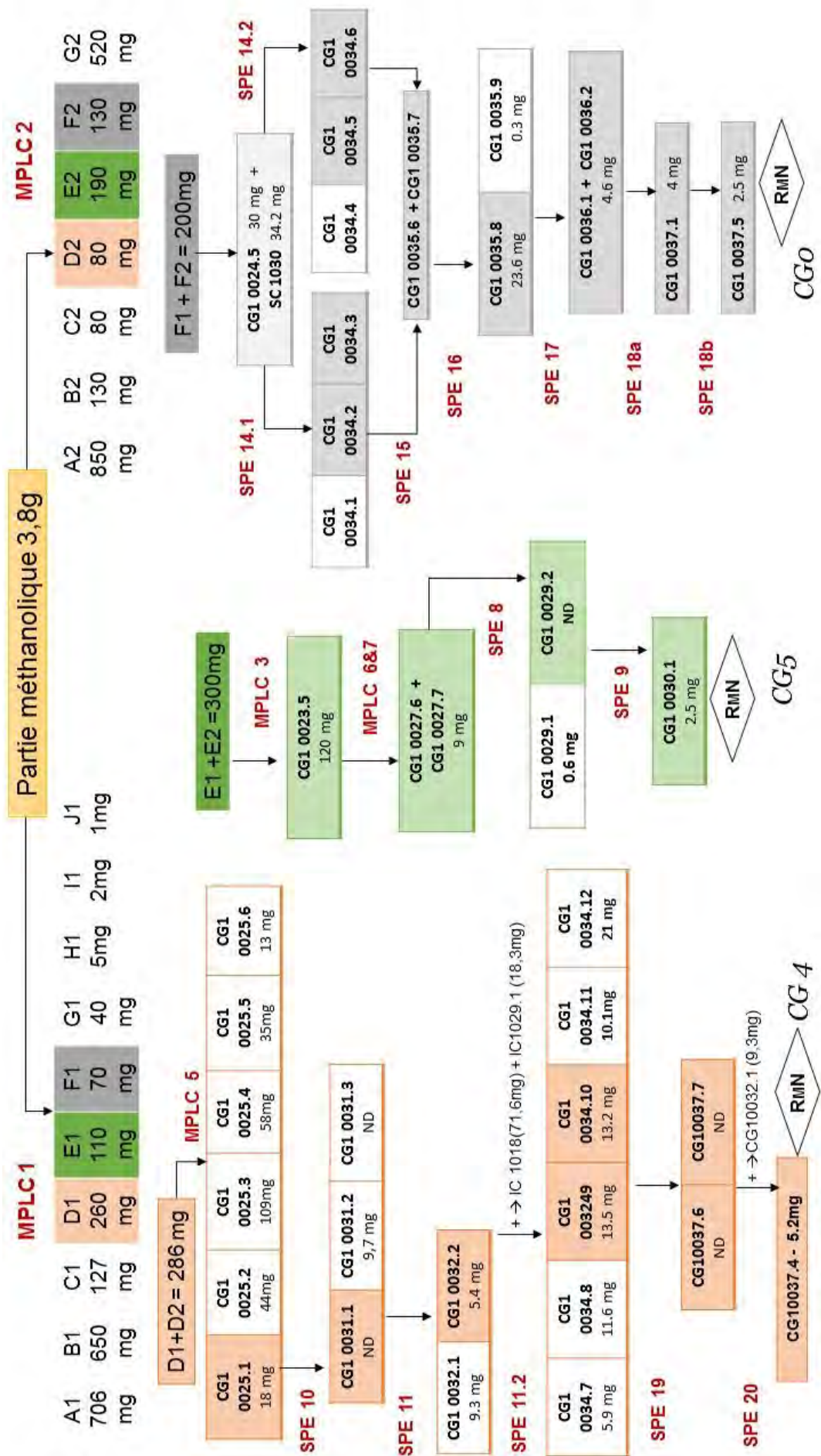
ANNEXES

Annexes 1. Partie de l'arbre phylogénétique des angiospermes (APG III)



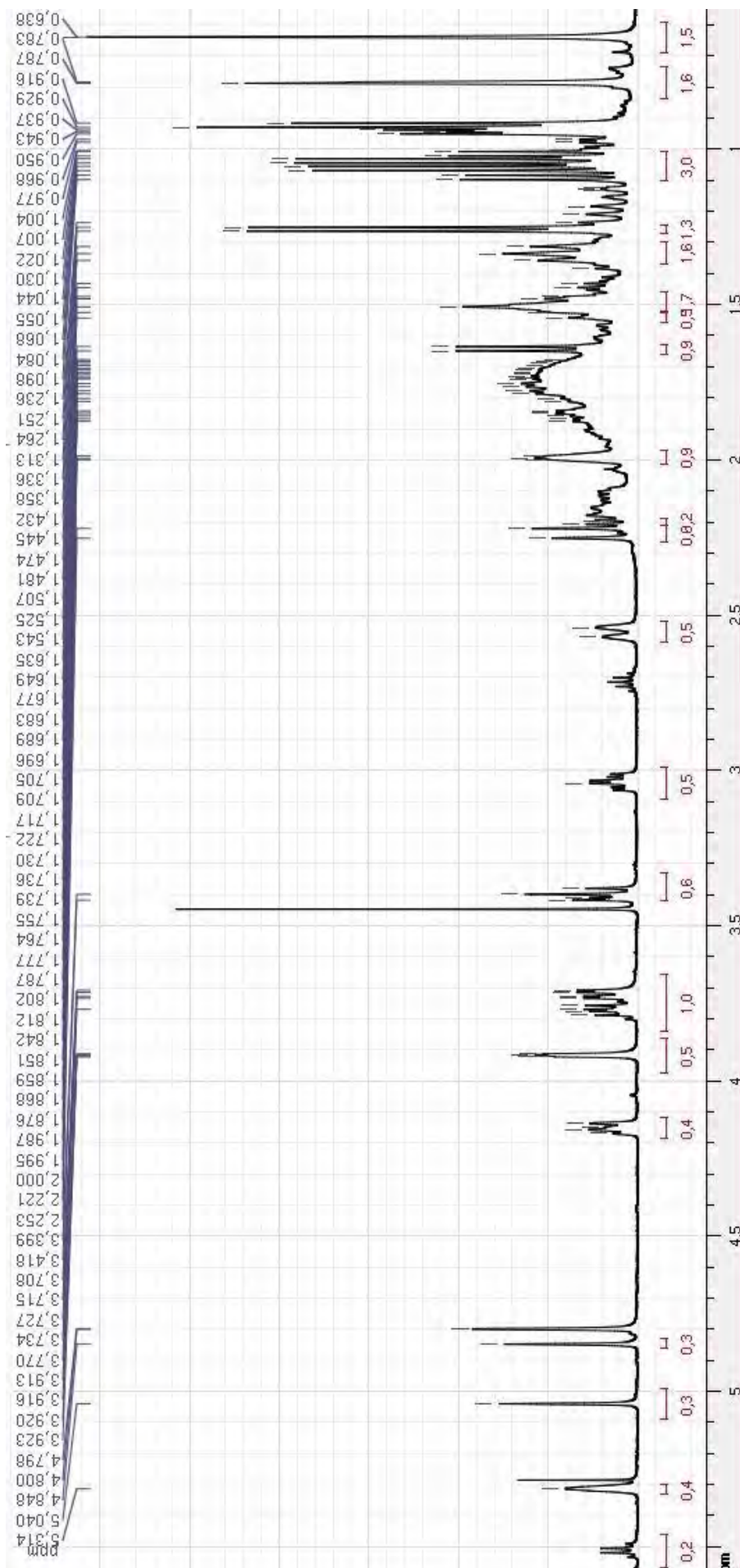
Annexe 2 : Schéma d'extraction



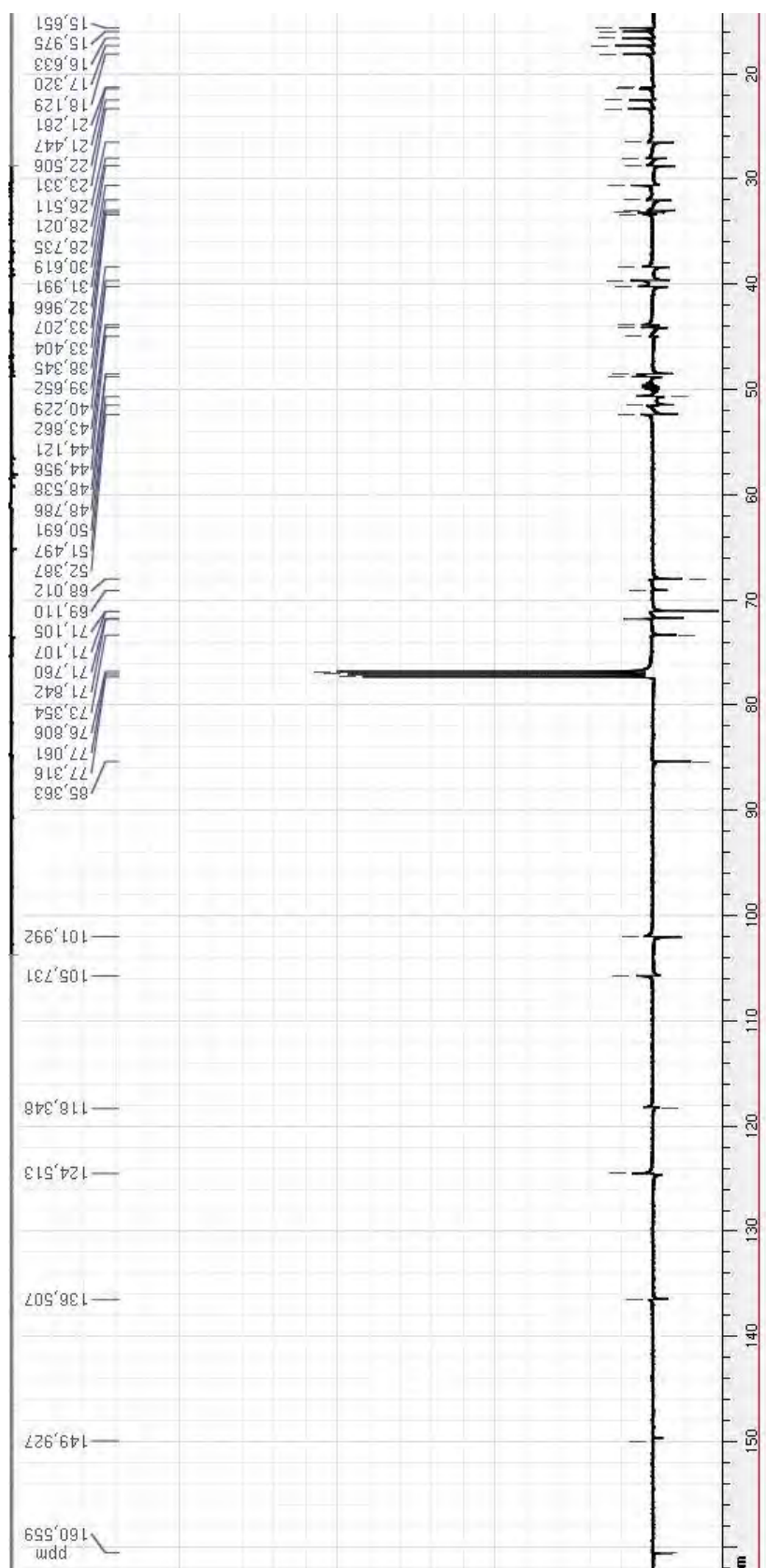


Annexe 4. Spectres RMN 1D (1H, 13C et J-MOD) et 2D (COSY, HMQC, HMBC) du composé SC3

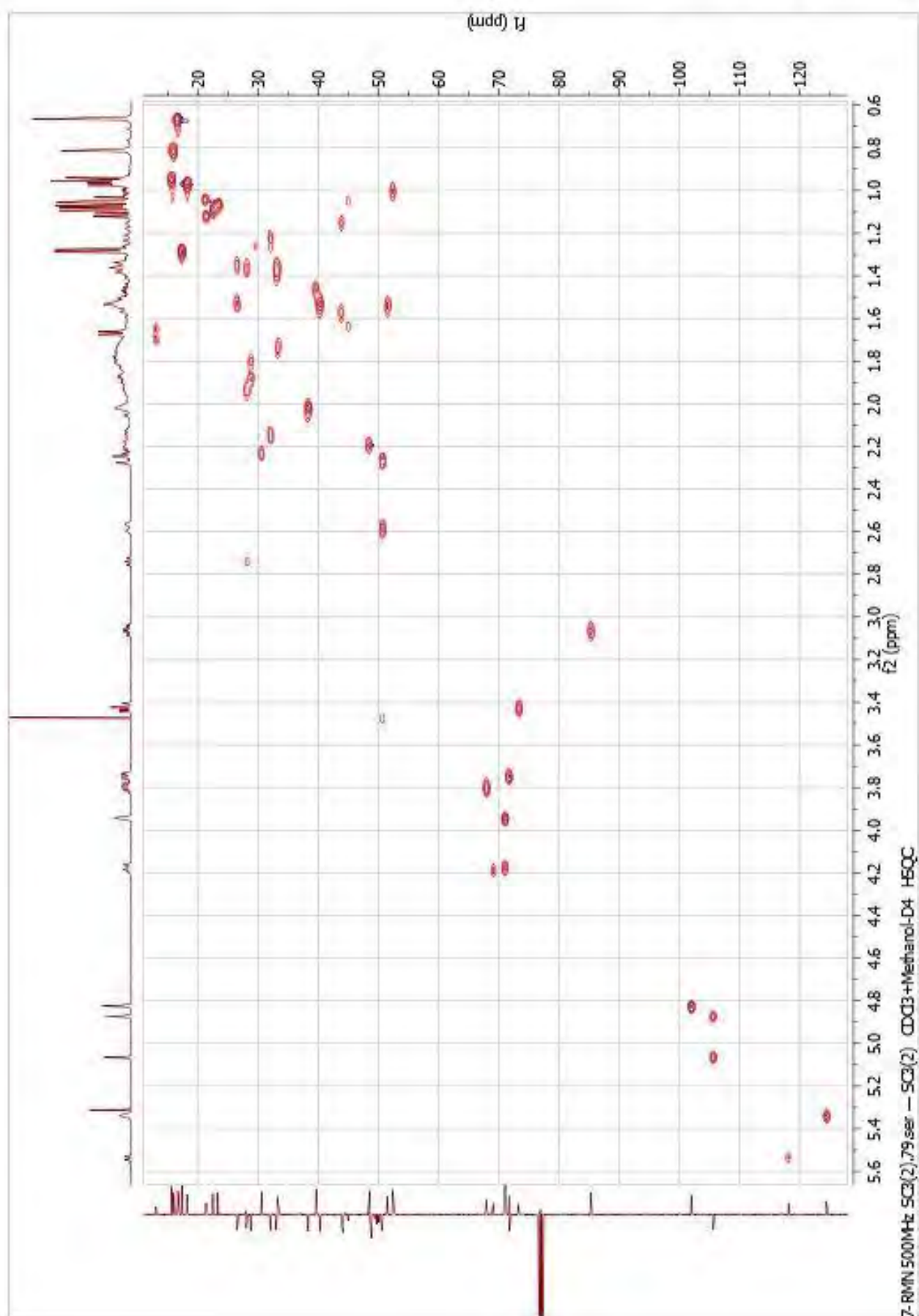
Spectre 1 : Spectre RMN 1H de SC3 à 500 MHz dans du CDCl₃++ MeOH D₄



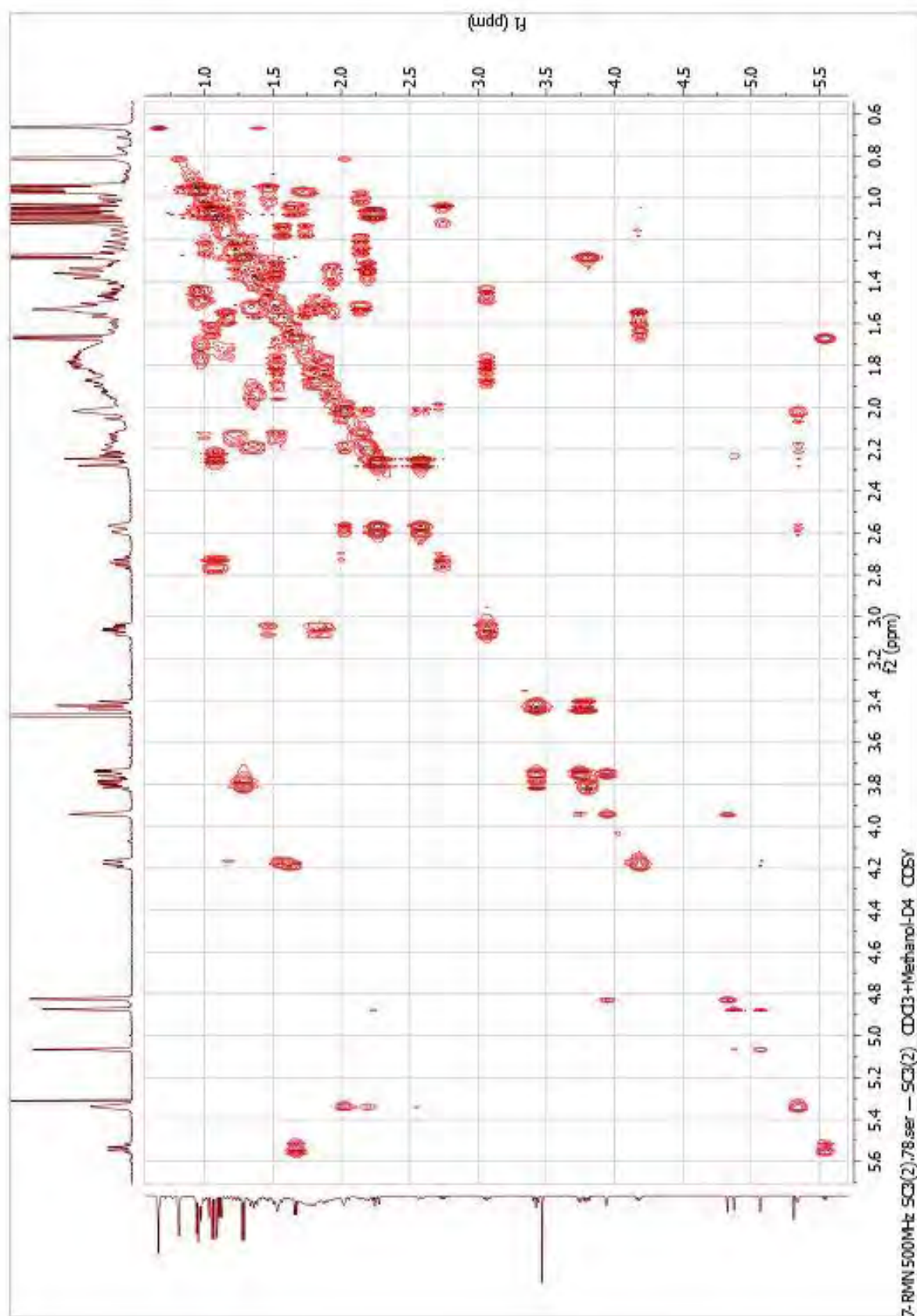
Spectre 2 : Spectre RMN ^{13}C de SC3 à 500 MHz dans du $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH D}_4$



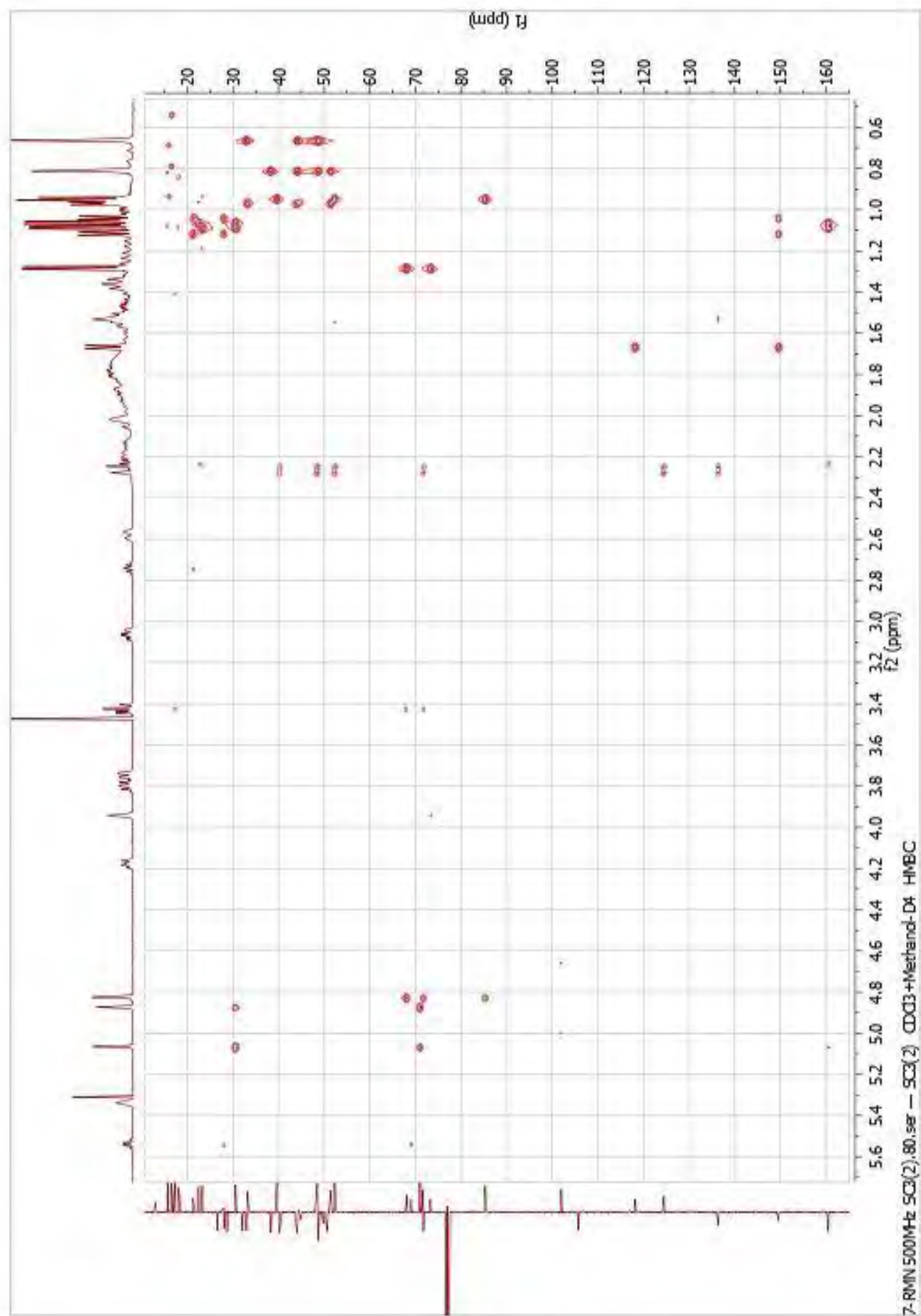
Spectre 3 : Spectre RMN HSQC de SC3 à 500 MHz dans du CDCl₃+ MeOH D₄



Spectre 4 : Spectre RMN COSY de SC3 à 500 MHz dans du CDCl₃+ MeOH D₄



Spectre 5 : Spectre RMN HMBC de SC3 à 500 MHz dans du CDCl₃+ MeOH D₄



Annexe 5 : Tableau résumant l'attribution des composés SC3a et SC3b.

Attribution	δC [ppm]	Parité	δH [ppm]	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)	COSY [ppm]	HMBC [ppm]
Sucre							
1'	101,9	CH	4,82	sl	1,4	3,94	67,9 / 73,2 / 85,3
2'	71,0	CH	3,94	dd	3,6 / 1,4	3,75 / 4,82	73,2 / 71,6
3'	71,6	CH	3,75	d	9,6 / 3,6	3,94 / 3,80 / 3,43	73,2
4'	73,2	CH	3,43	dd	9,6	3,8 / 3,75	17,2 / 67,9 / 71,6
5'	67,9	CH	3,8	dd	9,6 / 6,2	1,29 / 3,43	PDC*
6'	17,2	CH ₃	1,29	d	6,2	3,8	67,9 / 72,2
Génine							
1	40,2	CH ₂	1,535	sl	-	2,28	50,6 / 136,4 / 52,3
2	28,7	CH ₂	1,80 1,88	d d	4,1 4,1	3,07 / 1,535 3,07 / 1,535	PDC -
3	85,3	CH	3,07	td	10,7 / 4,3	1,47/1,88	101
4	39,5	CH	1,47	d	4,6	0,95/3,07/1.00	15,6
5	52,3	CH	1,00	d	4,6	1,47	50,6 / 40,2
6	50,6	CH ₂	2,28 2,58	- -	15,2 15,2	- 2,02 / 2,28	40,2 / 48,4 / 52,3 / 71,7
7	26,5	CH ₂	1,35	-	-	2,20 / 1,53 / 2,14	-
			1,53	-	-	-	-
8	48,4	CH	2,20	-	-	-	50,6 / 16,5 / 26,5
9	136,4	Cq	-	-	-	-	50,6 / 26,5
10	71,7	Cq	-	-	-	-	50,6
11	124,4	CH	5,34	sl	-	2,02	50,6
12	38,3	CH ₂	2,02	sl	-	5,34	15,9
13	44,0	Cq	-	-	-	PDC	16,5 / 15,9 / 18,0
14	48,7	Cq	-	-	-	PDC	16,5 / 15,9

15	32,9	CH ₂	1,375	-	-	PDC	PDC
16	32,9	CH ₂	1,23 2,14	d d	12 7,2	2,14 1,23	PDC PDC
17	51,5	CH	1,54	s	-	1,37/2,14	15,9/18,0
18	50,6	CH ₂	2,28 2,58	d d	15,2 15,2	2,58 2,28	40,2 / 48,4 / 52,3 / 71,7/ 124,4 / 136,4
19	15,9	CH ₃	0,81	s	-	PDC	38,3 / 44,0 / 48,7 / 51,5
20	33,3	CH	1,74	s	-	1,57	18,0
21	18,0	CH ₃	0,97	d	6,7	PDC	33,3 / 43,8 / 51,0
22	43,8	CH	1,15 1,57	s s	- -	1,74 1,57	18,0 18,0
23	71,0	CH	4,18	d	9,9	1,57 / 1,15	105,4
24	160,5	Cq	-	-	-	PDC	105,4 / 22,4
25	30,5	CH	2,25	s	-	PDC	160,5 / 22,4
26	23,2	CH ₃	1,09	d	7,0	2,25	30,5 / 160,5
27	22,4	CH ₃	1,07	d	7,0	2,25	30,5 / 160,5
28	16,5	CH ₃	0,67	s	-	PDC	44,0 / 48,7 / 48,4 / 32,9
29	15,6	CH ₃	0,95	d	6,6	1,47	52,3 / 85,3 / 39,5
30	105,6	CH ₂	5,06 4,88	s s	- -	4,88 5,06	160,5 / 30,5 160,5 / 30,5 / 71,0
Partie de la structure SC3 b							
23 "	69,0	CH	4,19	d	10,3	1,15 / 1,75	13,0 / 28,0
24 "	149,6	Cq	-	-	-	-	13,0 /
25 "	28,0	CH	2,74	m	6,9	1,04 / 1,12	-
26 "	21,4	CH ₃	1,12	d	7,0	-	28,0 / 149,6
27 "	21,2	CH ₃	1,04	d	7,2	-	28,0 / 149,6
30 "	118,1	CH	5,54	q	7,0	1,65	-
31	13,0	CH ₃	1,65	d	6,9	5,54	149,6 / 69,0

Annexe 6 : Sources

Composés	Partie de la plante	Espèce	Publications
β -sitosterol	Ecorces	<i>C.sinensis</i>	1) Firdous et al
	Graines	<i>C.dichotoma</i>	2) et 3)
	Duramen	<i>C.trichotoma</i>	4)
Stigmastérol Campesterol	Ecorces	<i>C.macleodii</i>	5) Nariya et al

2) Jamkhande PG, Barde SR, Patwekar SL, Tidke PS. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Cordia dichotoma* (Indian cherry): A review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2013;3(12):1009-12.

3) Basu N, Ghosal P, Thakur S. Structural studies on a polysaccharides fraction from the fruits of *Cordia dichotoma* Forst. Carbohydrate research. 1984 (131):149-55.

4) Alencar de Menezes JES, Lemos TLG, Pessoa ODL, Braz-Filho R, Montenegro RC, Wilke DV, et al. A Cytotoxic Meroterpenoid Benzoquinone from Roots of *Cordia globosa*. Planta Med. 2005 ;71(01) :54-8.

ABSTRACT

Cordia genus has several species used in medicine for centuries. Currently, some of them are investigated in chemical, biological and clinical studies. Among this group of plants, there is *Cordia lutea*, which grow up in the north of Peru. Dry flowers are used in traditional medicine and still, they are widely consumed as infusion for liver disease.

In this study, dry flower's ethanolic extract showed an interesting activity against the *Helicobacter pylori* bacteria. Phytochemistry work was initiated in the laboratory to identify the active compounds. This thesis describes the compound isolation, NMR and mass analysis of the obtained compound to complete the phytochemical description of *Cordia lutea*.

KEYWORDS

Anti- *Helicobacter pylori* activity ; *Cordia lutea* ; Peruvian traditional medicine ;
Phytochemistry

AUTEUR : GANDINI Chloé

TITRE : Etude phytochimique d'une plante médicinale péruvienne *Cordia lutea* Lam. ayant démontré une activité biologique contre la bactérie *Helicobacter pylori*.

DIRECTEUR DE THESE : Pr FABRE Nicolas

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté des sciences pharmaceutiques
de Toulouse
le : 6 septembre 2016

RESUME

Le genre *Cordia* contient plusieurs espèces qui sont utilisées en médecine depuis des siècles. Certaines d'entre elles font actuellement l'objet d'études chimiques, biologiques et cliniques. Parmi ce groupe de plantes on retrouve *Cordia lutea* qui pousse en particulier dans le nord du Pérou. Ce sont les fleurs sèches qui sont utilisées en médecine traditionnelle et sont encore aujourd'hui largement consommées sous forme d'infusion pour les pathologies du foie. Dans cette étude, l'extrait éthanolique des fleurs a montré une activité intéressante sur la bactérie *Helicobacter pylori*. Un travail de phytochimie a donc été initié au laboratoire afin d'identifier les composés responsables de cette activité. Dans ce cadre, ce rapport décrit l'isolement de composés, l'analyse de spectre RMN et de spectrométrie de masse des produits obtenus afin de compléter la fiche phytochimique de *Cordia lutea*.

MOTS CLES

Activité anti *Helicobacter pylori* ; *Cordia lutea* ; Médecine traditionnelle péruvienne ; Phytochimie

Faculté des sciences pharmaceutiques de Toulouse, Université Paul Sabatier
35 chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse, France

Laboratoire de pharmacochimie et de pharmacologie pour le développement -PHARMA-DEV -
UMR 152
35 chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse, France

Universidad Peruana Cayetano Heredia
Avenida Honorio Delgado, San Martin de Porres, Lima, PEROU