

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Extraction

Après les macérations dans l'éthanol des fruits de *Cryptocarya dealbata* et des feuilles de *Cryptocarya rigidifolia*, les solutions alcooliques obtenues ont été évaporées sous vide et les rendements en extraits bruts sont présentés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Rendements des extractions

Matériel végétal	Code	Masse poudre (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	Aspect et couleur
<i>C. dealbata</i>	TST139	350	55,92	15,97	2,18	Pâte marron
<i>C. rigidifolia</i>	MG442	300	26,9	8,96	4,83	Pâte verdâtre

2. Fractionnement liquide-liquide

2.1. Fractionnement liquide-liquide de l'extrait brut de *Cryptocarya dealbata*

Après dissolution de 39,6g de l'extrait brut de *Cryptocarya dealbata* dans 800 ml de MeOH, le mélange a été extrait successivement avec des solvants non miscibles entre eux et a fourni trois fractions : 7,55 g de fraction hexanique (TST139-1) ; 19,63g de fraction acétate d'éthyle (TST139-2) et 10,01g de fraction aqueuse (TST139-3).

Les résultats du partage liquide-liquide sont rassemblés dans le **tableau 6** et exposés sur le **diagramme 2**.

Tableau 6 : Rendement du partage liquide-liquide de 39,6 g d'extrait brut de *C. dealbata*

Fraction	Code	Masse (g)	Rendement (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	Aspect et couleur
Hexane	TST139-1	7,55	19,06	27,30	Liquide visqueux verdâtre
AcOEt	TST139-2	19,63	49,57	7,40	Pâte marron
Aqueuse	TST139-3	10,01	25,27	22,83	Poudre rousse

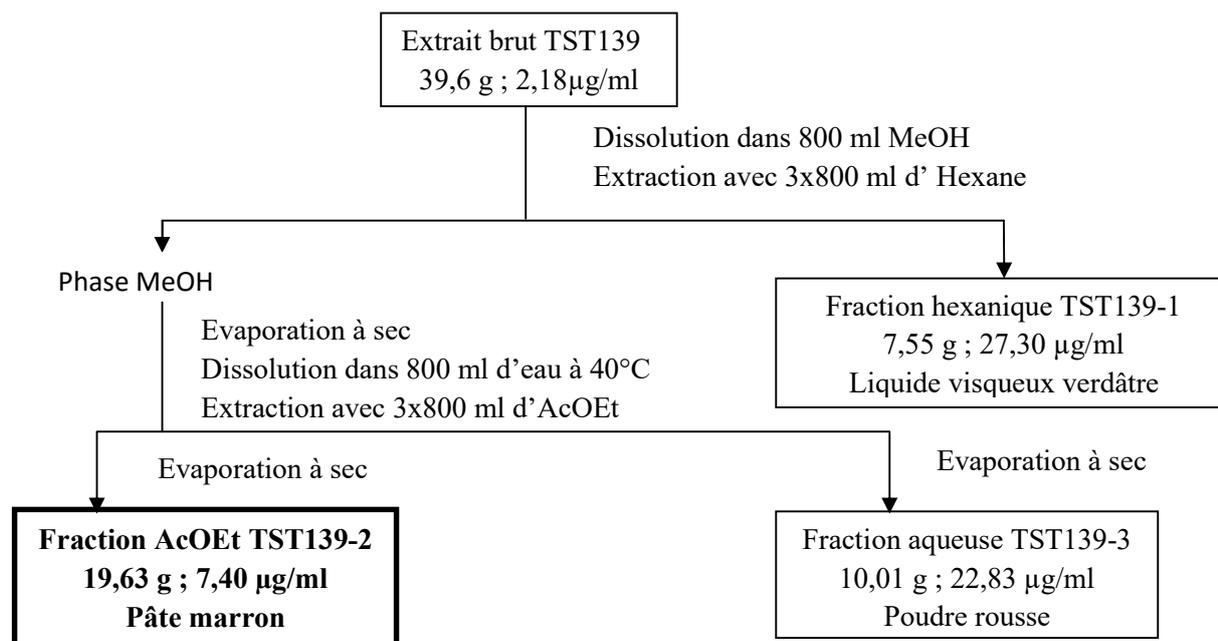


Diagramme 2 : Résultat du partage liquide-liquide de *Cryptocarya dealbata*

2.1. Fractionnement liquide-liquide de l'extrait brut de *Cryptocarya rigidifolia*

5 g d'extrait brut de *Cryptocarya rigidifolia* ont donné, 1481,42 mg de fraction hexanique (MG442-1) ; 764,81 mg de fraction AcOEt (MG442-2) ; 571,46 mg de fraction aqueuse (MG442-3) et 1249,48 mg de fraction insoluble (MG442-4).

Les résultats obtenus à partir du partage liquide-liquide de *Cryptocarya rigidifolia* sont récapitulés dans le **tableau 7** et le **diagramme 3**.

Tableau 7 : Rendement du partage liquide-liquide de 5g d'extrait brut de *C. rigidifolia*

Fraction	Code	Masse (mg)	Rendement (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	Aspect et couleur
Hexane	MG442-1	1481,42	29,62	13,82	Liquide visqueux jaune verdâtre
AcOEt	MG442-2	764,81	15,29	2,89	Pâte rouge marron
Aqueuse	MG442-3	571,46	11,42	Inactive	Pâte rouille
Insoluble	MG442-4	1249,48	24,98	Inactive	Poudre rousse

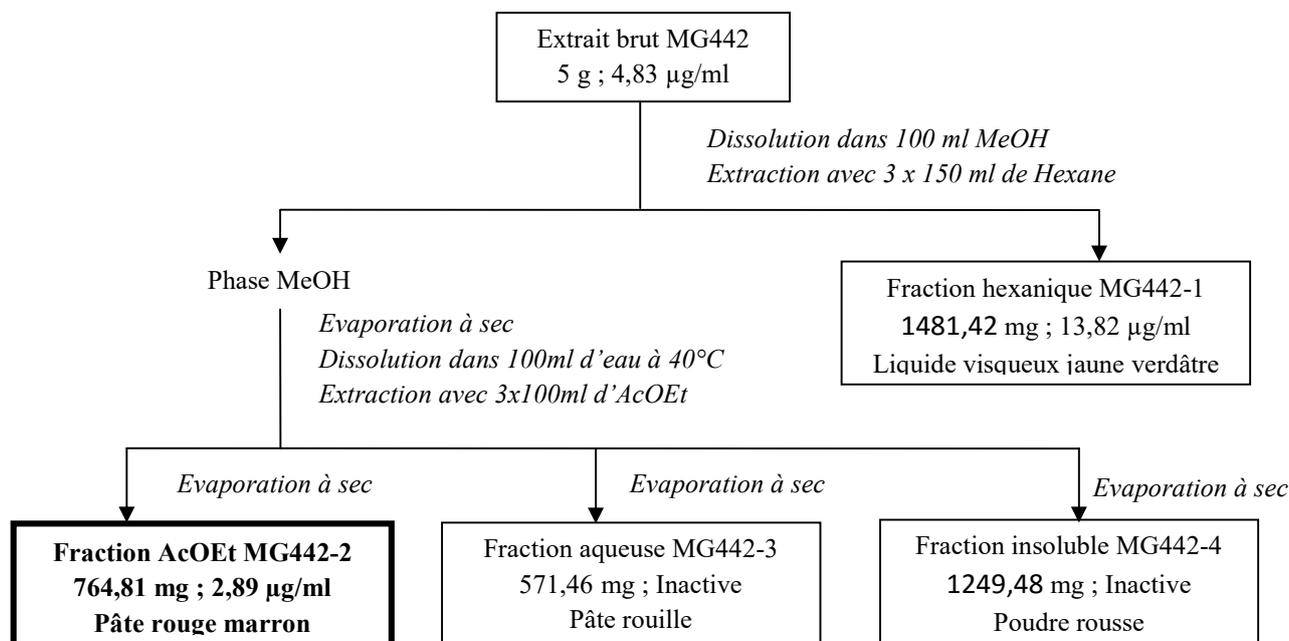


Diagramme 3 : Résultat du partage liquide-liquide de *Cryptocarya rigidifolia*

3. Etude phytochimique de la fraction AcOEt de *Cryptocarya dealbata* (TST139-2)

En considérant les résultats obtenus à la suite du test antiplasmodial effectué sur les 3 fractions issues de l'extrait brut de *C. dealbata*, notre choix s'est porté sur la fraction ayant le meilleur IC_{50} soit TST139-2 ($IC_{50} = 7,40 \mu\text{g/ml}$), pour effectuer une étude phytochimique approfondie.

3.1. Fractionnement et isolement

3.1.1. Chromatographie sur colonne de la fraction TST139-2

3 g de la fraction AcOEt (TST139-2) ont été soumis à un fractionnement sur colonne de gel de Sephadex LH-20. Le système d'éluion isocratique $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:50) a été appliqué. Les fractions présentant les mêmes profils chromatographiques sur CCM ont été rassemblées. 7 fractions notées TST139-21 à TST139-27 ont été obtenues (**Diagramme 4**).

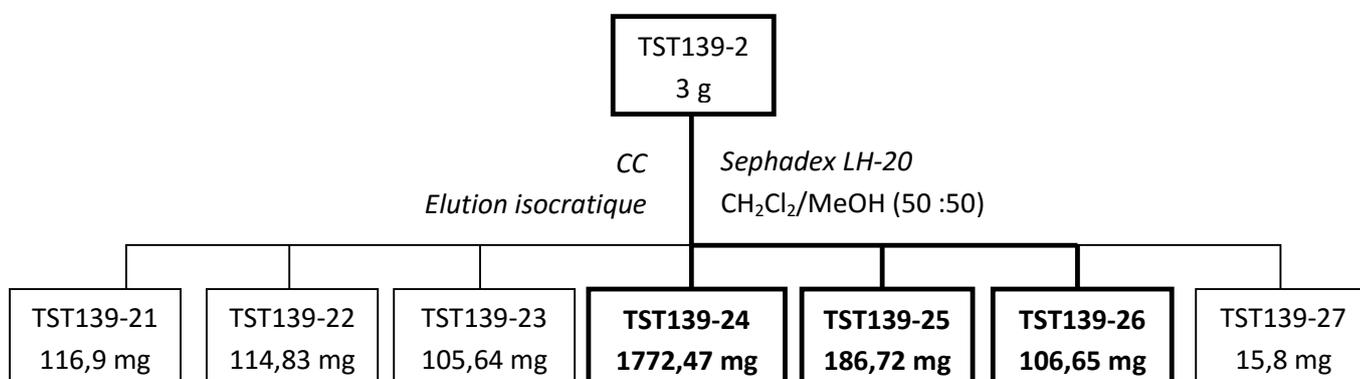


Diagramme 4 : Fractionnement sur colonne de Sephadex LH-20 de TST139-2

3.1.2. Purification de TST139-25

La fraction TST139-25 (186,72 mg) a été analysée par chromatographie sur colonne de silice (50-200 μm) en élution isocratique Hexane/AcOEt (50 : 50) et a permis de recueillir la fraction TST139-25-4. Cette dernière a été par la suite purifiée par chromatographie sur colonne de silice (20-45 μm) en élution isocratique cyclohexane/AcOEt (60 : 40) pour obtenir le composé TST139-25-4A (34,47 mg) (**Diagramme 5**).

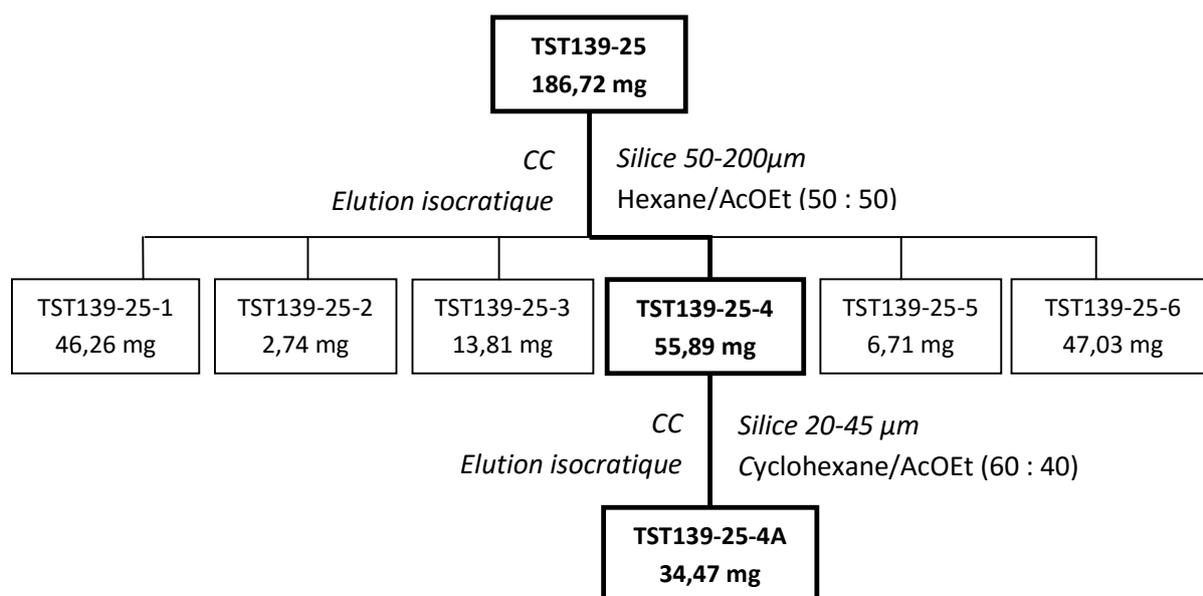


Diagramme 5 : Fractionnement sur colonne de TST139-25

3.1.3. Purification de TST139-26

La fraction TST139-26 (106,65 mg) a été soumise à un fractionnement par chromatographie d'adsorption sur silice en élution isocratique (Hexane/AcOEt : 70-30). Deux produits codés TST139-26-1 et TST139-26-2 ont été isolés (**Diagramme 6**).

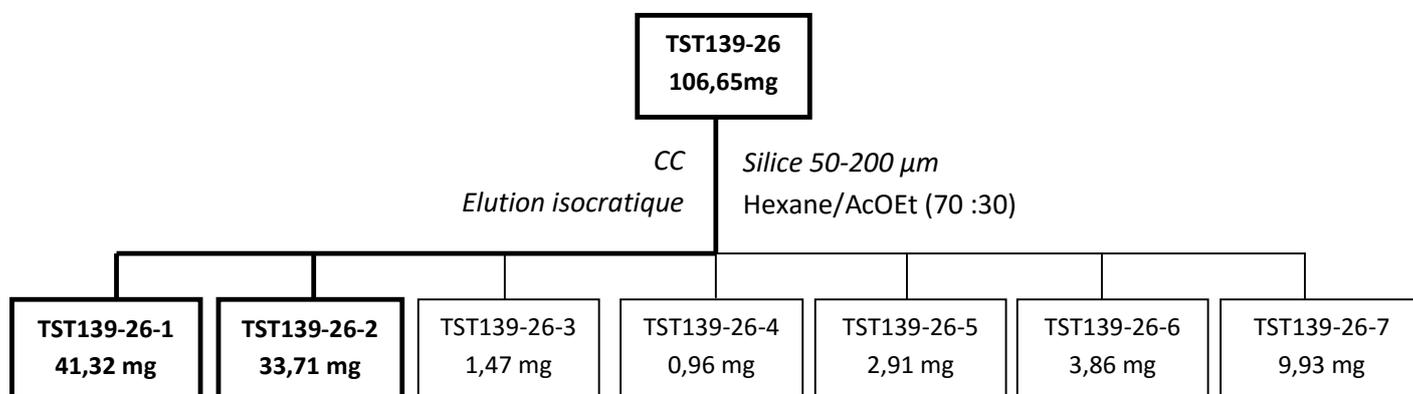


Diagramme 6 : Fractionnement sur colonne de silice de TST139-26

3.1.4. Purification de TST139-24

Le schéma de fractionnement de la fraction TST139-24 est présenté sur le **diagramme 7**. Le premier fractionnement par chromatographie sur colonne de silice de la fraction TST139-24 en élution avec gradient de solvant (Hexane/AcOEt de 40-60 à 0-100) a permis d'obtenir vingt sous fractions.

La sous fraction TST139-2415 a été ensuite traité par chromatographie sur colonne de silice en élution isocratique hexane/AcOEt (50 : 50). Le composé TST139-2415-4 ainsi obtenu, a été purifié par rinçage et cristallisation avec le mélange cyclohexane/AcOEt (60 : 40) pour donner le composé **TST139-2415-4A**.

Le traitement par chromatographie sur colonne de silice en élution isocratique (hexane/AcOEt : 40-60) de la fraction TST139-2417 a fourni le composé **TST139-2417-10**.

La fraction TST139-24-18 a été partagée par chromatographie sur colonne de silice, utilisant l'élution isocratique (hexane/AcOEt : 40-60) et a donné 5 sous fractions. Les sous fractions TST 139-2418-1, TST139-2418-2 et TST 139-2418-3 ont été regroupées puis purifiées par une chromatographie sur colonne de silice (20-45 μm), en élution isocratique cyclohexane/AcOEt (60 : 40), pour donner le composé **TST139-2418-2A**.

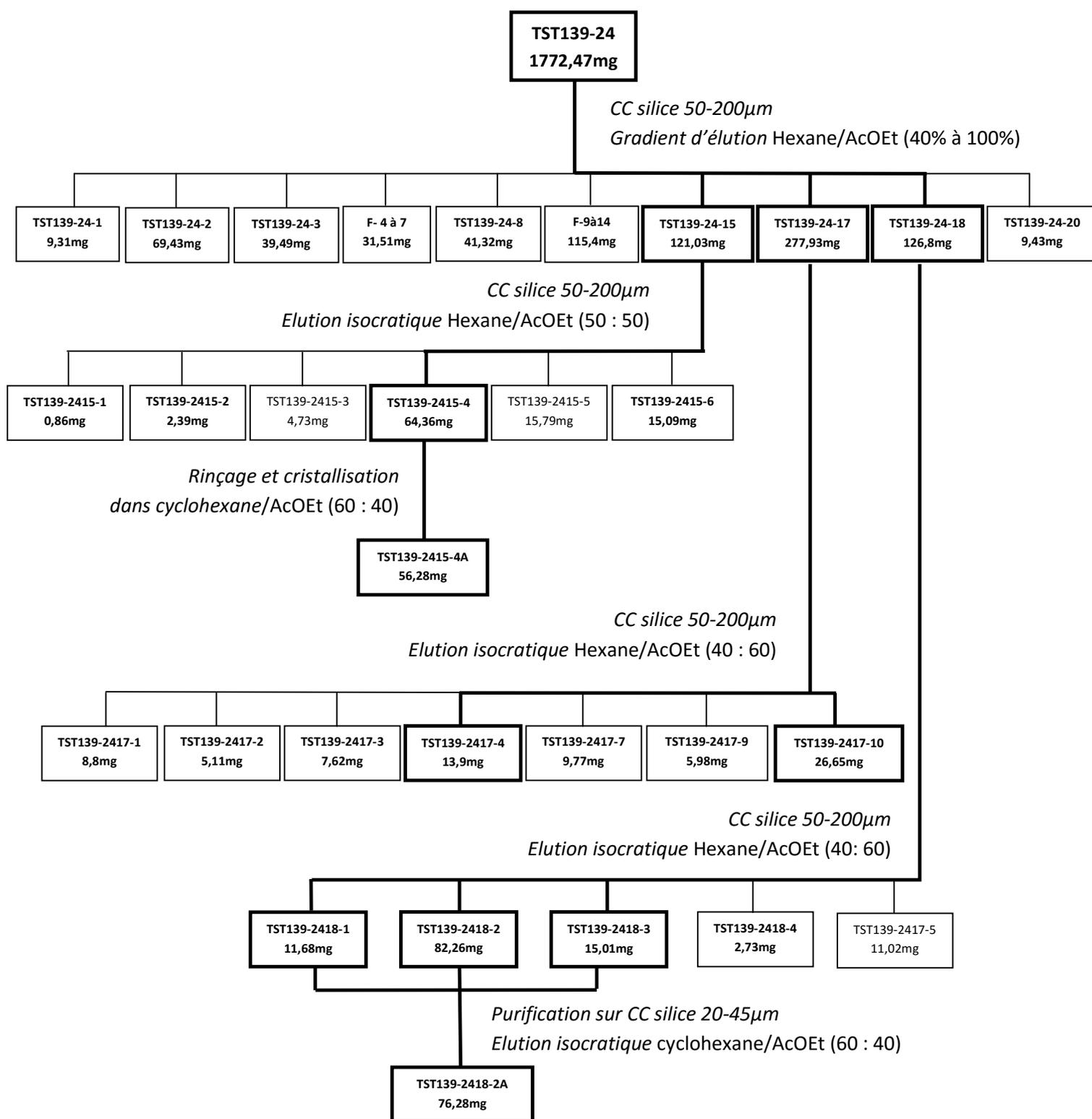


Diagramme 7 : Fractionnement et purification de TST139-24

3.2. Déterminations structurales des composés isolés

3.2.1. Détermination de la structure du composé TST139-25-4A

Le composé a été obtenu sous forme de poudre jaune pâle (34,47 mg) à partir de l'extrait AcOEt fractionné sur des colonnes de Sephadex LH-20 et silice (50-200 μm), suivie d'une purification sur colonne de silice (20-45 μm). Le produit a été analysé en SM, IR, UV, RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), et RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3).

. Spectre de Masse ESI-HRMS

Le spectre de masse à haute résolution électrospray en mode d'ionisation positif (**Figure 30**) ESI-HRMS montre un pic à $m/z = 293,1161$ correspondant à l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$ (masse moléculaire calculée 293,1154).

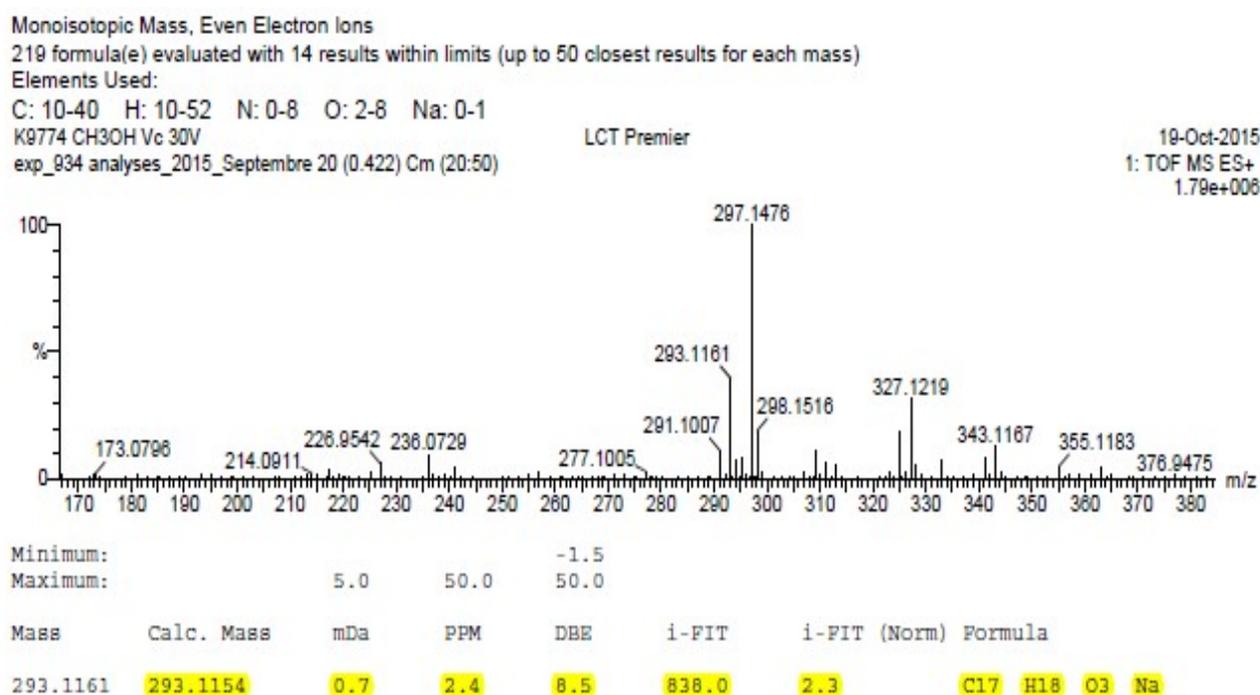


Figure 30 : Spectre de masse haute résolution ESI-HRMS du composé TST139-25-4A

. Spectroscopie UV et spectroscopie IR

Le spectre UV (**Figure 31**) montre deux bandes d'absorption maximale à 256 nm et 291 nm correspondant respectivement aux absorptions des deux cycles lactone et aromatique [Silverstein *et al.*, 1998].

Le spectre infrarouge (**Figure 32**) indique la présence de groupements : hydroxyle (3414 cm^{-1}), carbonyle (1704 cm^{-1}) et aromatique (1600 cm^{-1} , 1494 cm^{-1} et 1450 cm^{-1}) et montre également la présence de bandes d'absorption des liaisons C-H aromatiques (3022 cm^{-1}) et C-H aliphatiques (2925 cm^{-1} et 2855 cm^{-1}) [Silverstein *et al.*, 1998 ; Pretsh *et al.*, 1990].

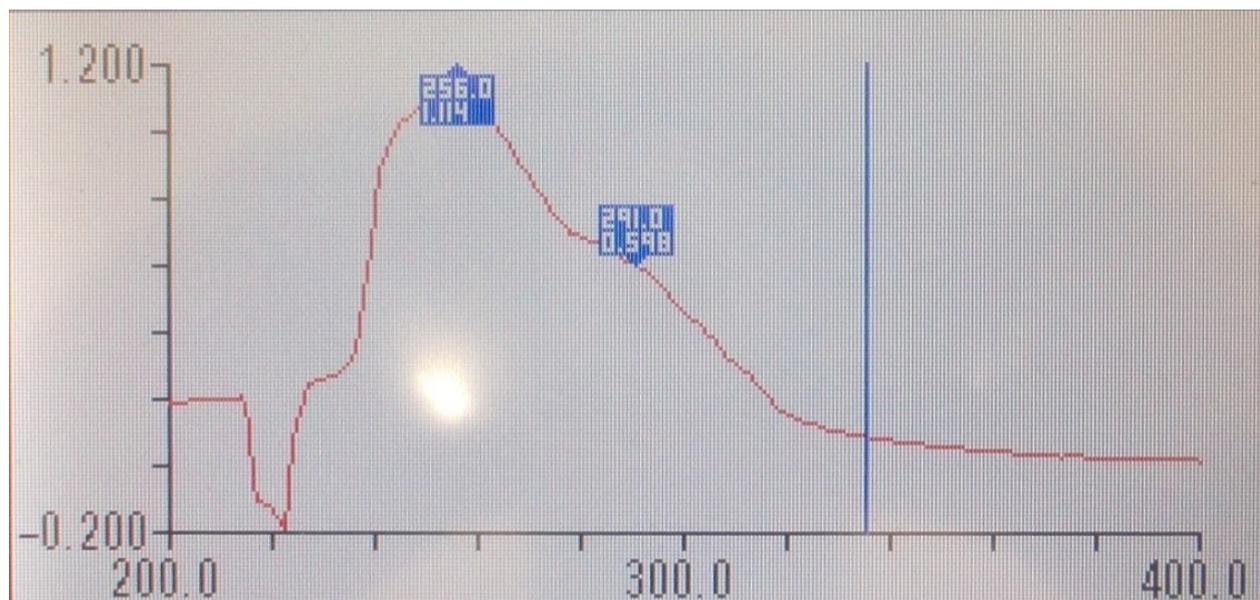


Figure 31 : Spectre UV du composé TST139-25-4A

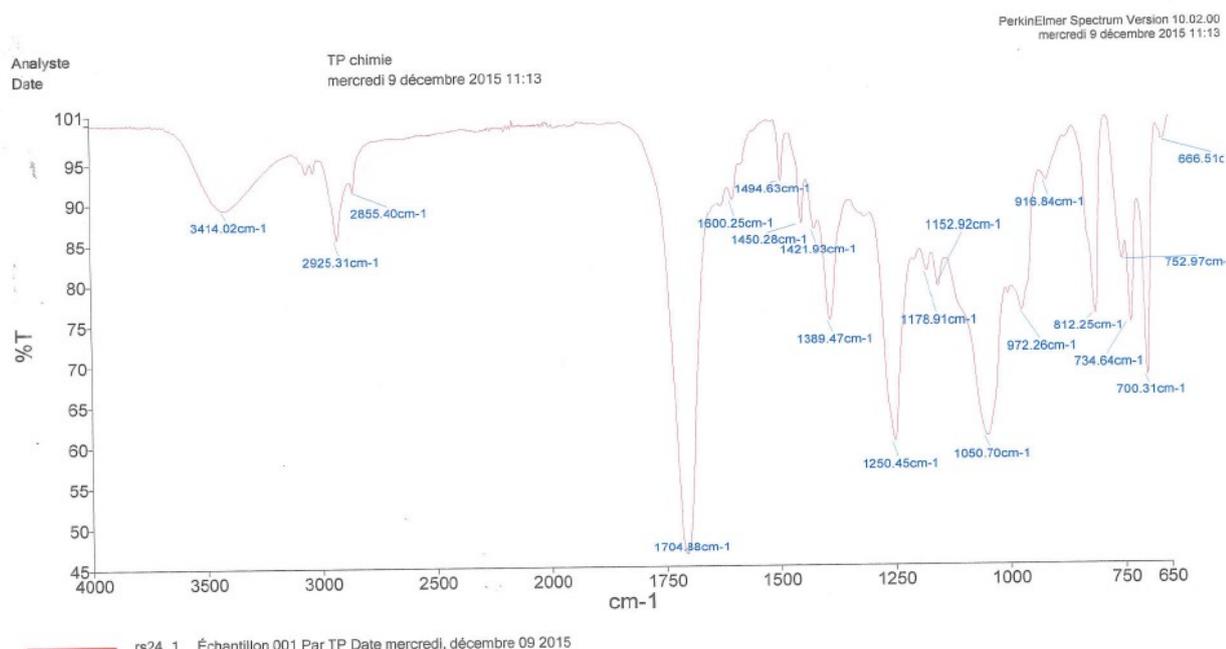


Figure 32 : Spectre IR du composé TST139-25-4A

. Spectre du proton RMN ^1H

Le spectre RMN ^1H a été effectué dans CDCl_3 à 400 MHz. La présence d'un cycle aromatique est indiquée par les signaux multiplets de 7.41 ppm à 7.22 ppm (5H, *m*) (encadré en bleu sur le spectre RMN ^1H) de la **figure 33**. Le multiplet à 6.87 ppm (1H, *m*) et le doublet à 6.01 ppm (1H, *d*, $J = 9.5$ Hz) correspondent à des protons en α et β d'un cycle lactonique α,β -insaturé. Le spectre RMN ^1H fait apparaître aussi 4 protons dont 3 doublets dédoublés à 6.75 ppm (1H,

dd, $J = 15.5$ Hz, $J = 10.5$ Hz), 6.43 ppm (1H, *dd*, $J = 15.0$ Hz, $J = 10.5$ Hz), 5.83 ppm (1H, *dd*, $J = 15.0$ Hz, $J = 6.5$ Hz) et un doublet à 6.55 ppm (1H, *d*, $J = 15.5$ Hz) prouve de l'existence de deux doubles liaisons dans une chaîne. De plus, la constante de couplage à environ 15 Hz pour les protons oléfiniques 5.83 ppm, 6.43 ppm, 6.55 ppm et 6.75 ppm indique que ce sont des doubles liaisons en *trans*. Les multiplets à 4.79 ppm (1H, *m*) et à 4.64 ppm (1H, *m*) correspondent aux déplacements chimiques des protons portés par des carbones oxygénés. Ces informations supposent que le produit **TST139-25-4A** est une α -pyrone substituée en position 6.

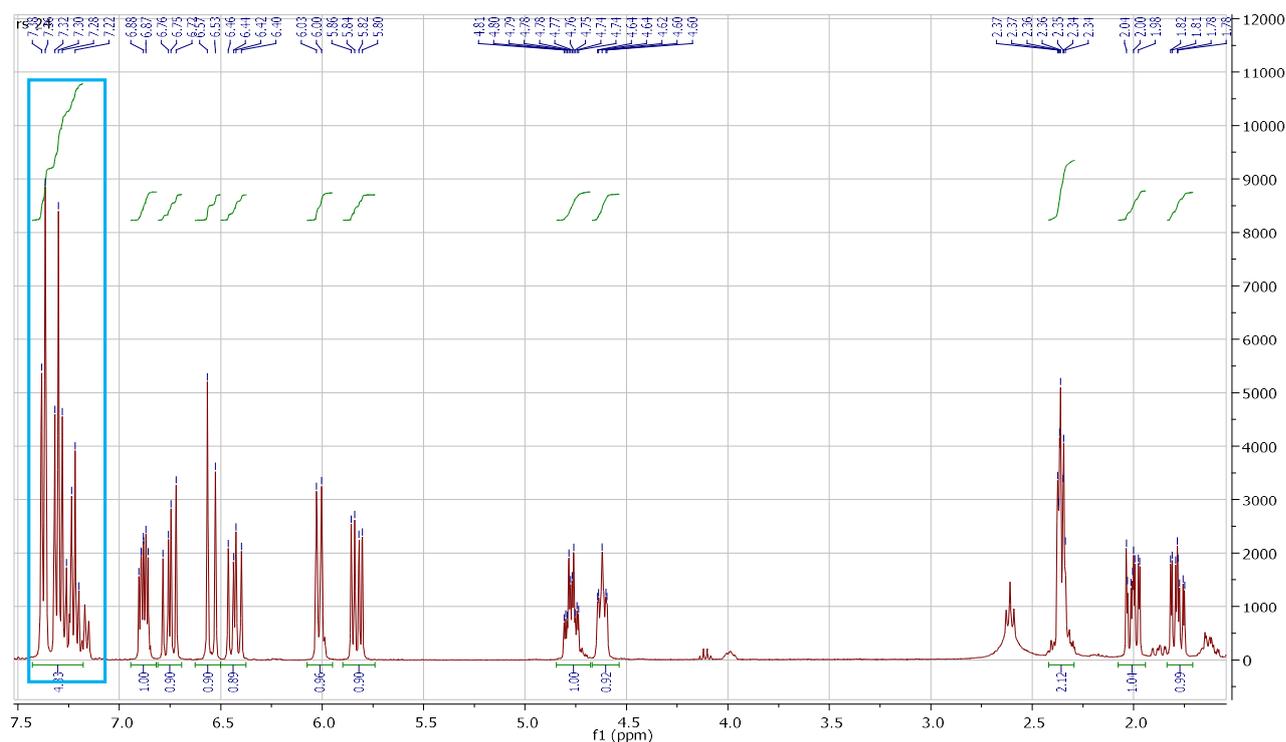


Figure 33 : Spectre RMN ^1H du composé TST139-25-4A

. Spectre du carbone RMN ^{13}C et DEPT 135

Le spectre de RMN ^{13}C est mis en parallèle avec le spectre DEPT 135 (**Figure 34**). Les enregistrements des spectres ont été effectués dans CDCl_3 à 100 MHz. Ils font apparaitre 17 signaux correspondant à 17 carbones dont 2 $-\text{CH}_2$, 13 $-\text{CH}$ et 2 carbones quaternaires. La présence d'un groupe carbonyle est remarquée à 164.7 ppm. Les carbones à 67.7 ppm et 74.9 ppm correspondent à deux $-\text{CH}$ liés à un oxygène. Les déplacements des carbones à 126.4 ppm à 137.1 ppm confirment la présence d'un cycle aromatique, ce qui est en accord avec la formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$ correspondant à la masse moléculaire $M = 270$.

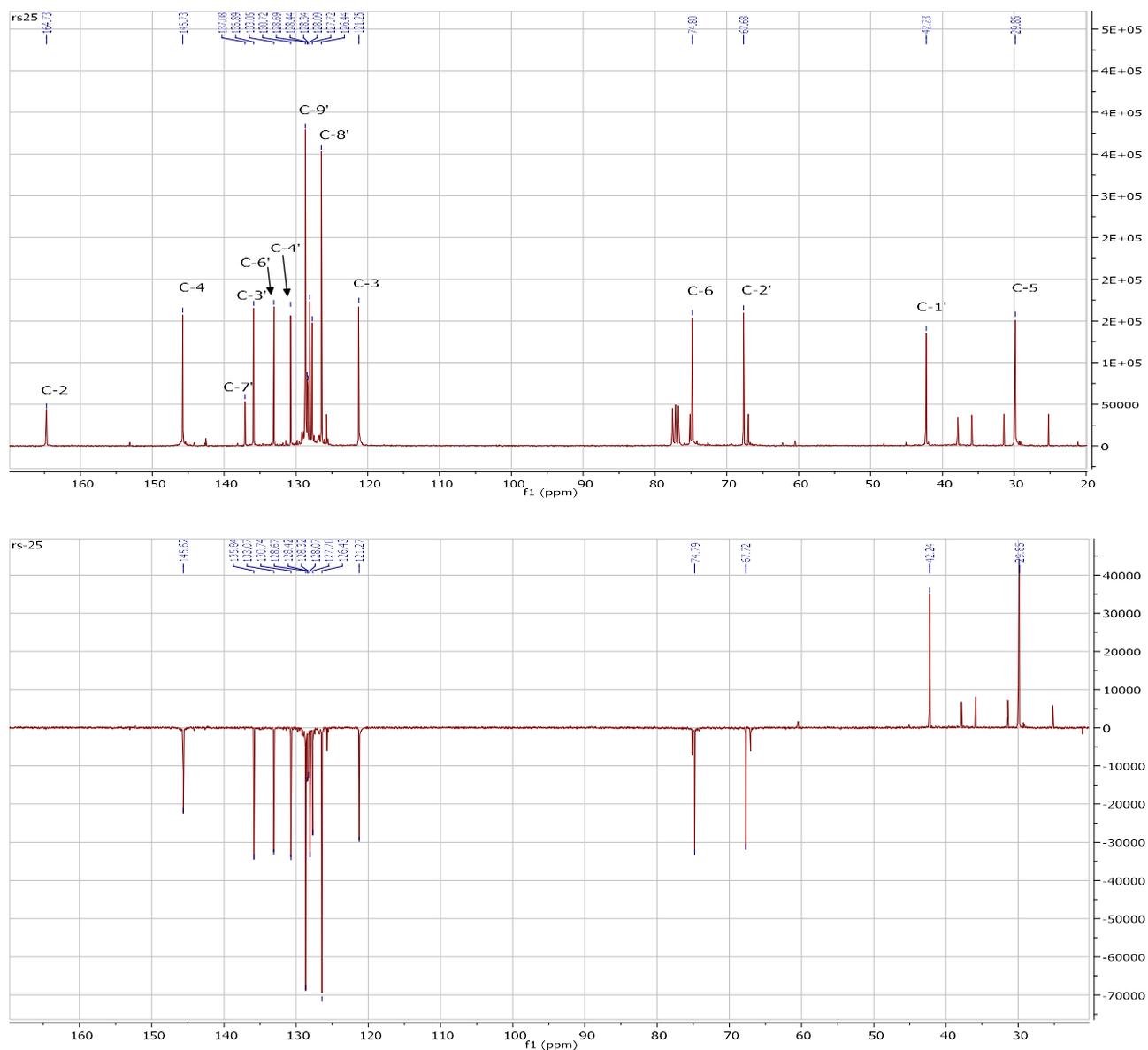


Figure 34 : Spectres RMN ^{13}C et DEPT135 du composé TST139-25-4A

. Spectre HSQC

Les couplages hétéro-nucléaires 1J proton-carbone observés par expérience HSQC (**Figure 35**) permettent d'attribuer les protons aux carbones qui les portent (**Tableau 8**). Les taches des corrélations de couleur bleue correspondent à des CH et celles de couleur rouge à des CH_2 , donc la molécule contient 13 CH et 2 CH_2 . Les protons benzéniques entre 7.41-7.22 ppm (5 H, m) (encadré en bleu) sont portés par les carbones à 126.4 ppm à 128.7 ppm. Les protons à 6.01 ppm et à 6.87 ppm caractéristiques du cycle lactonique sont portés respectivement par les carbones à 121.2 ppm (C-3) et 145.7 ppm (C-4). Le proton à 4.6 ppm est porté par un carbone oxygéné à 67.8 ppm (C-2').

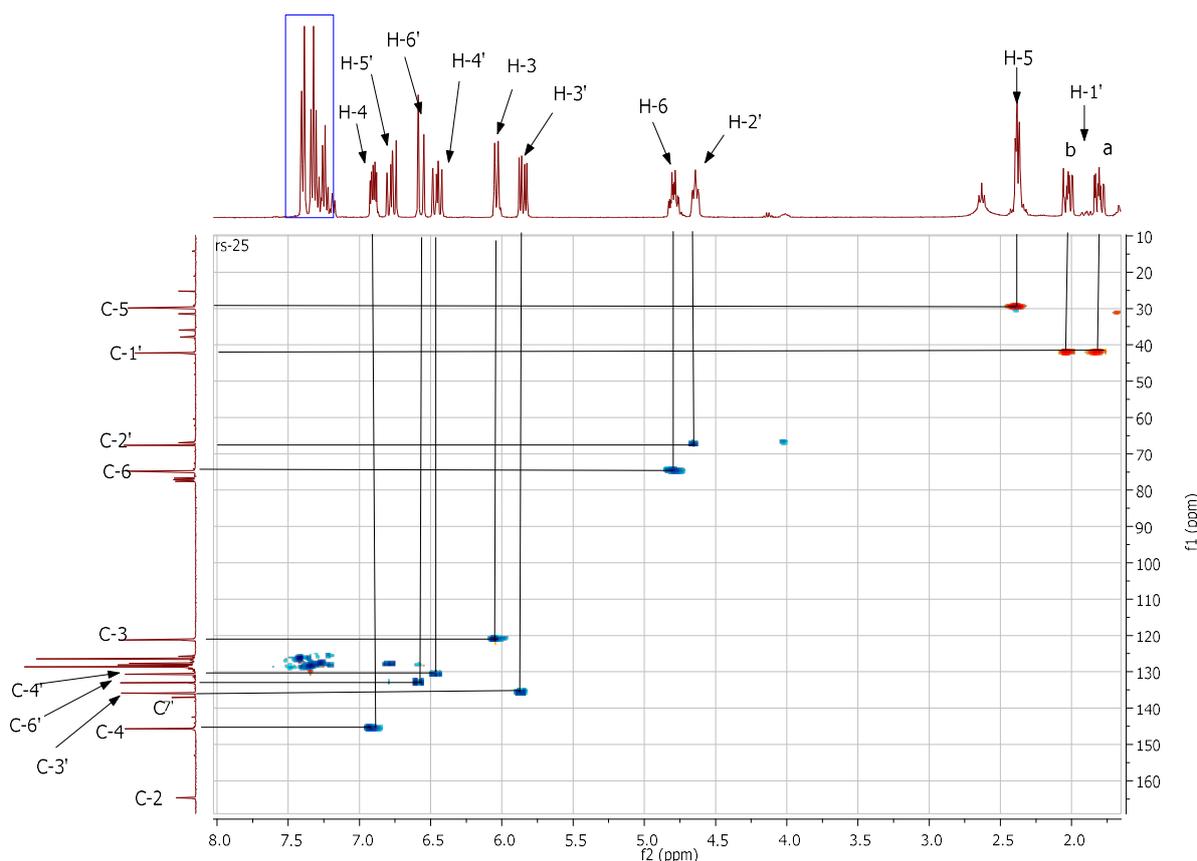


Figure 35 : Spectre RMN HSQC du composé TST139-25-4A

. Analyse des spectres 2D COSY et HMBC

Les corrélations homonucléaires COSY (**Figure 36**) et hétéronucléaires HMBC (**Figure 37**) permettent de déterminer la structure de la chaîne latérale portée par le cycle α -pyrone comme étant un 2'-hydroxy-6'-phénylhex-3',5'-diényle lié à son carbone C-6.

Les protons H-3 (6.01 ppm) et H-4 (6.90 ppm) corrélient entre eux en COSY et corrélient avec un $-\text{CH}_2$ à 29.8 ppm (C-5) et un carbonyle à 164.7 ppm (C-2) en HMBC. Le proton H-4 (6.90 ppm) corrélie avec un CH oxygéné à 74.8 ppm (C-6) en HMBC. Ces observations confirment la présence d'une entité lactonique à 6 chaînons, α/β -insaturée, substituée en position 6, c'est-à-dire une α -pyrone.

La corrélation du proton H-1' (2.02 ppm) en COSY avec le proton H-6 (4.79 ppm) et avec le carbone C-6 (74.8 ppm) en HMBC démontre l'attachement du substituant au carbone C-6 du cycle α -pyrone. D'autres données de HMBC sont présentées dans le **tableau 8** et la **figure 38** pour appuyer la corrélation entre les protons et les carbones de la structure du composé TST139-25-4A. La corrélation du proton H-2' (4.64 ppm) porté par un carbone oxygéné en COSY avec les protons H-1', H-3' et avec les carbones C-6, C-1', C-2' montre que le groupement hydroxyle est rattaché au carbone C-2' (67.7 ppm).

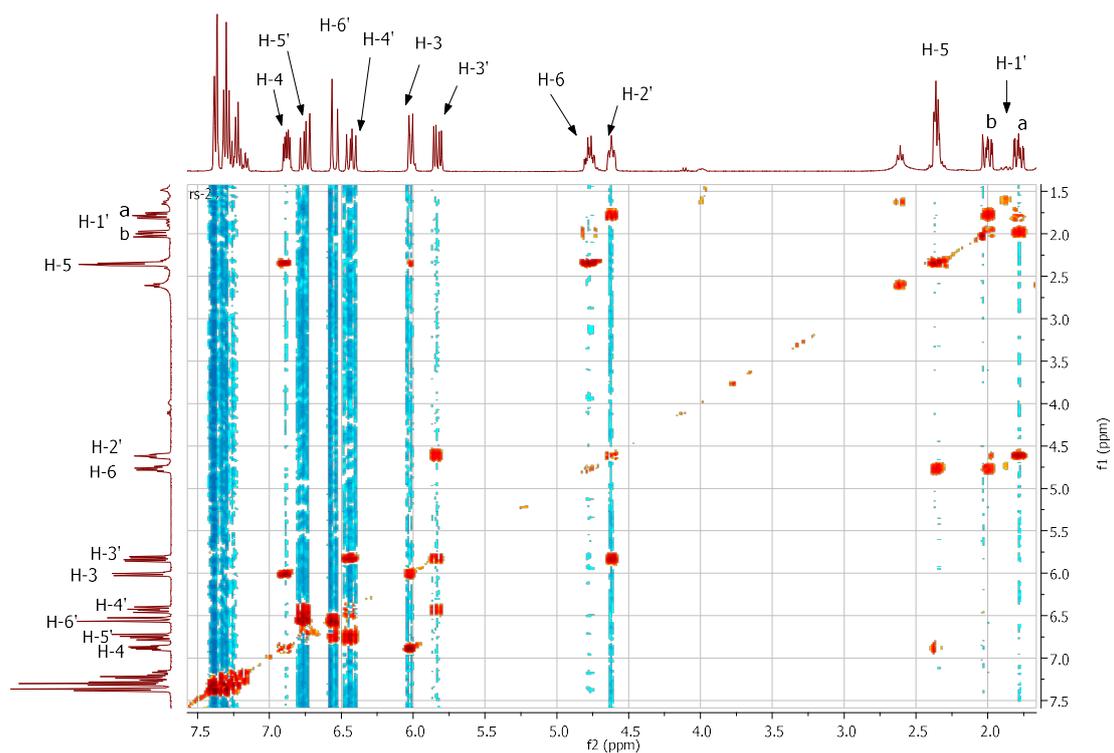


Figure 36 : Spectre COSY du composé TST139-25-4A

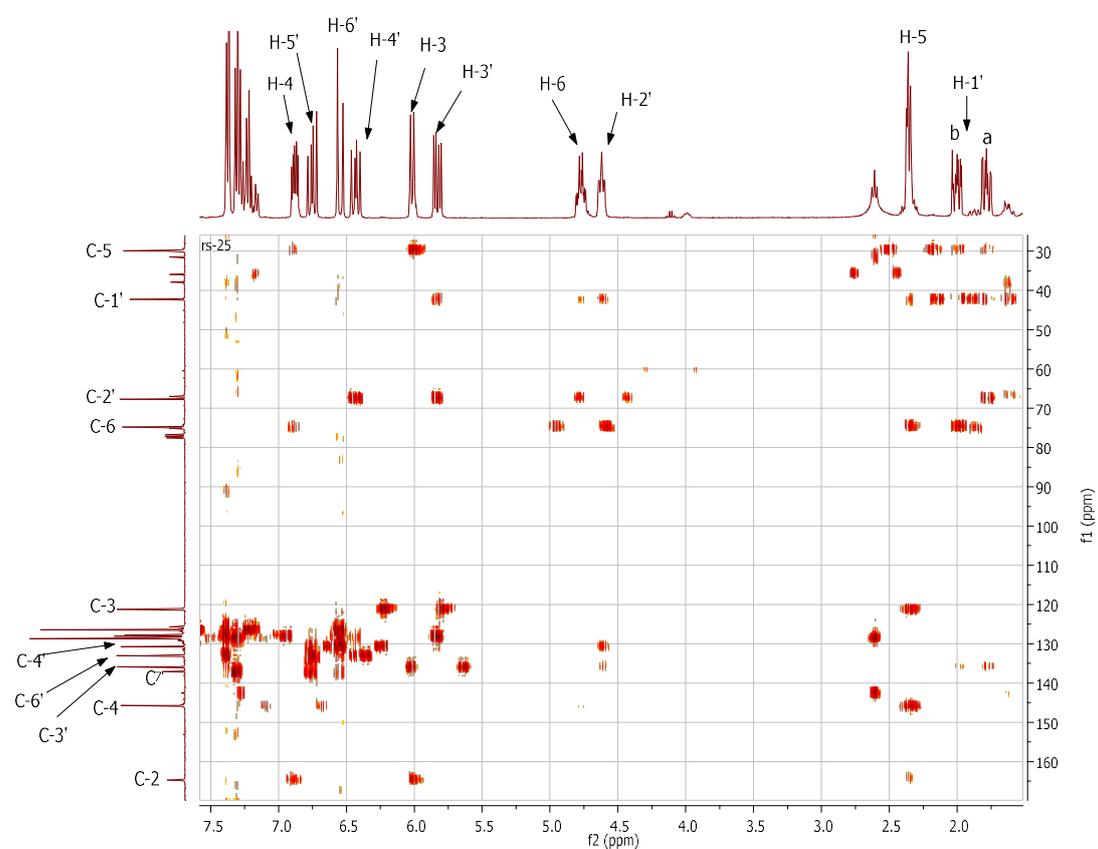


Figure 37 : Spectre HMBC du composé TST139-25-4A

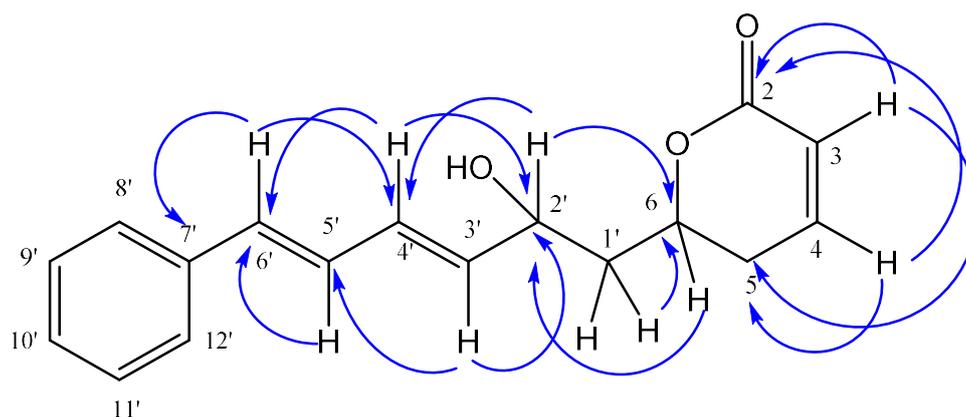


Figure 38 : Principales corrélations HMBC du composé TST139-25-4A

. Analyse du spectre NOESY du composé TST139-25-4A

Le spectre NOESY nous permet de voir les interactions protons non reliés qui sont proches dans l'espace et de donner configuration géométrique de la molécule. La corrélation entre les protons à δ 4.79 ppm (H-6) et à δ 1.78 ppm (H-1'a) montre que ces deux protons sont voisins dans l'espace. On observe aussi une corrélation dipolaire entre les protons à δ 2.00 ppm (H-1'b) et à δ 4.64 ppm (H-2') (**Figure 39**). Les corrélations observées en spectre NOESY sont présentés dans la **figure 40**.

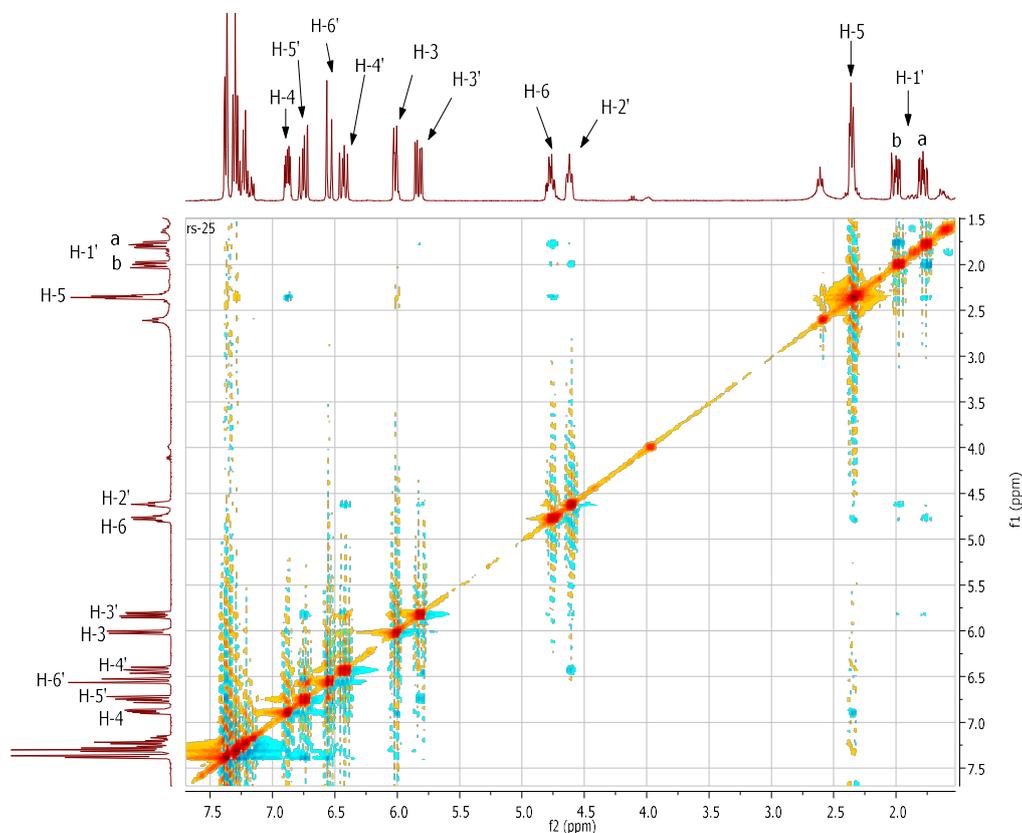


Figure 39 : Spectre NOESY du composé TST139-25-4A

Tableau 8 : Données spectrales en RMN du composé **Dealbacryptone I** (pyrone 1)

Position	δ H en ppm et (J en Hz)	δ C (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
2		164.7			
3	6.01 <i>brd</i> (9.5)	121.2	H-5 ; H-4	C-5 ; C-2	
4	6.87 <i>ddd</i> (9.5, 5, 4)	145.7	H-5 ; H-3	C-5; C-6; C-2	H-5; H-3
5	2.35 <i>m</i>	29.8	H-5	C-1' ; C-6 ; C-3 ; C-4	H-6 ; H-4
6	4.77 <i>m</i>	74.8	H-6 ; H-4	C-1' ; C-2'	
1'a	1.78 <i>ddd</i> (14.0, 10.0, 3.0)	42.2	H-1'b ; H-2'	C-5 ; C-2'	H-1'b ; H-5 ; H-6
1'b	2.00 <i>ddd</i> (14.0, 9.5, 3.0)		H-1'a ; H-6	C-5 ; C-6	H-1'a ; H-2'
2'	4.64 <i>ddd</i> (10.0, 6.5, 3.0)	67.8	H-1'a ; H-3'	C-6 ; C-4'	H-1'b ; H-4'
3'	5.83 <i>dd</i> (15.0, 6.5)	135.8	H-2' ; H-4'	C-1' ; C-2' ; C-5'	
4'	6.43 <i>dd</i> (15.0, 10.5)	130.7	H-3' ; H-5'	C-2'	H-4' ; H-6'
5'	6.75 <i>dd</i> (15.5, 10.5)	127.7	H-6' ; H-4'	C-6' ; C-7'	H-3' ; H-12'
6'	6.55 <i>d</i> (15.5)	133.0	H-5'	C-8' ; C-7' ; C-4'	H-8'
7'		137.1			
8'	7.37 <i>m</i>	126.4		C-6'	
9'	7.30 <i>m</i>	128.7		C-7'	
10'	7.23 <i>m</i>	128.1			
11'	7.30 <i>m</i>	128.4			
12'	7.37 <i>m</i>	128.3		C-5'	