

3.2.4. Détermination de la structure du composé TST139-26-1

Le produit TST139-26-1 a été obtenu sous forme de cristaux blancs. Le composé a été analysé en SM et RMN pour la détermination de sa structure.

. Spectres de masse ESI-MS

Sur chaque spectre de masse (**Figure 63**) ESI-MS enregistré on observe un pic à $m/z = 255$ en mode négative, correspondant à l'ion pseudo moléculaire $[M-H]^-$ et un pic à $m/z = 279$ en mode positive, correspondant à l'ion pseudo moléculaire $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de $M = 256$, relative à la formule brute $C_{15}H_{12}O_4$.

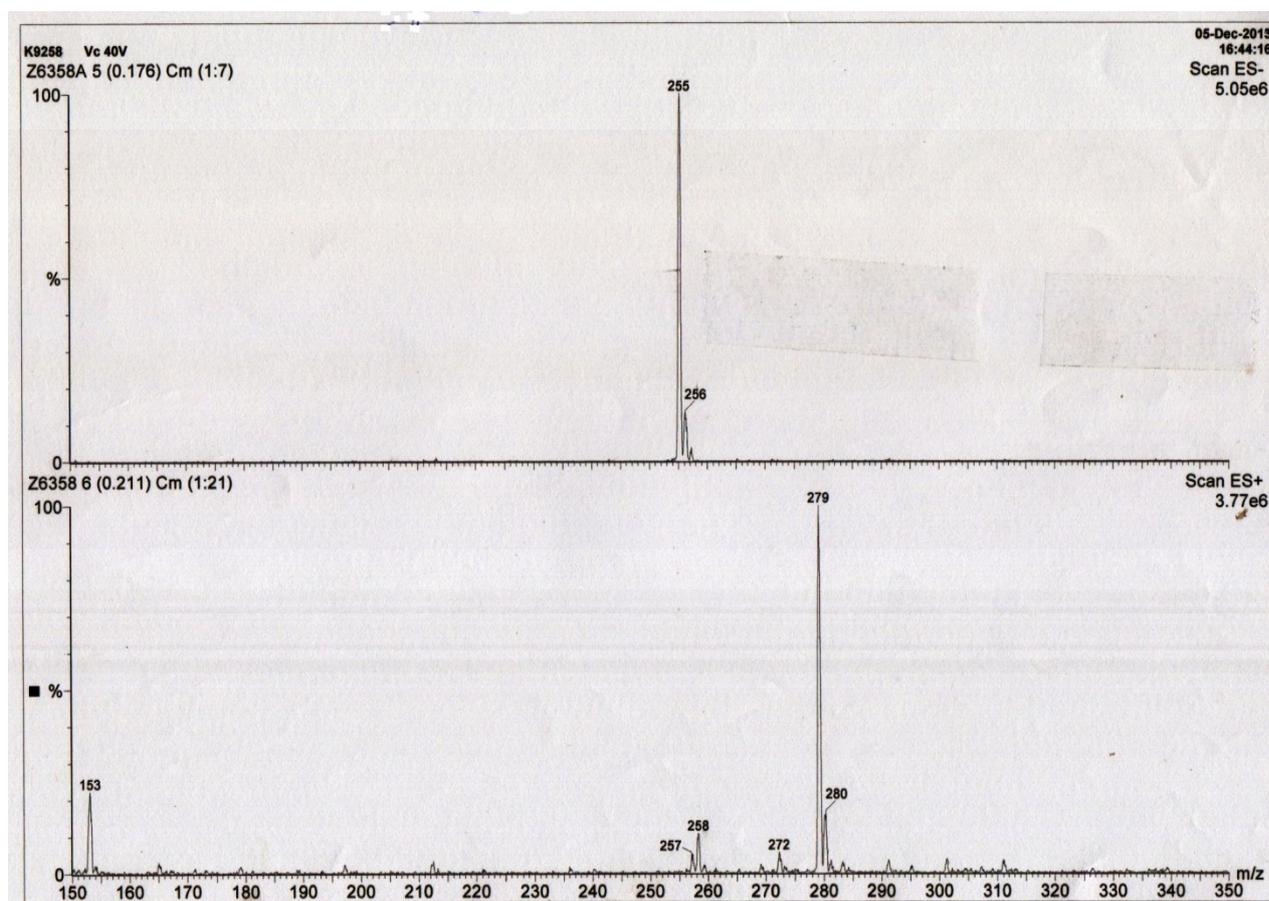


Figure 63 : Spectres de masse ESI-MS du composé TST139-26-1

. Spectre du proton RMN 1H ($CDCl_3$; 400MHz)

Les pics multiples à 7.47 à 7.38 ppm (5H, *m*) correspondent aux signaux des protons aromatiques. La présence du système ABX (5.43 ppm, *dd*, $J = 13.0$ et 3.1 Hz ; 2.83 ppm, *dd*, $J = 17.2$ et 3.1 Hz et 3.09 ppm, *dd*, $J = 17.2$ et 13.0 Hz) pour les protons en H-2 et H-3 (encadré en en bleu sur le spectre RMN 1H) correspondent aux signaux des protons du squelette flavonoïdique de type flavanone du produit TST139-26-1 (**Figure 64**).

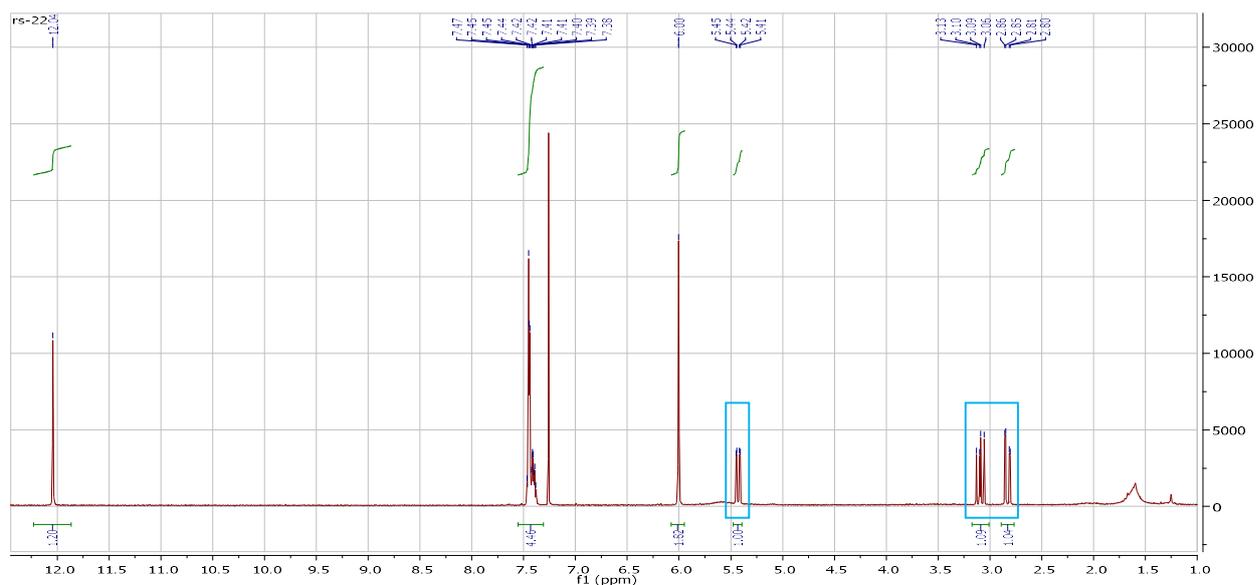


Figure 64 : Spectre RMN ^1H du composé TST139-26-1

. Spectre du carbone RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz)

On observe la présence de 15 carbones dont un carbonyle à 195.9 ppm. Deux carbones respectivement à 163.3 et 164.6 ppm sont des carbones liés chacun à un hétéroatome, ils seront en position méta l'un de l'autre, eux-mêmes en position méta d'un carbone lié à un hétéroatome, ce qui indique que le noyau A est disubstitué en position 5 et 7. Les carbones à 126.3, 129.0, 129.1 et 138.4 ppm confirment la présence d'un cycle benzénique (Figure 65). De plus, ceci complète les informations en RMN ^1H que le produit TST139-26-1 est un flavonoïde de type flavanone.

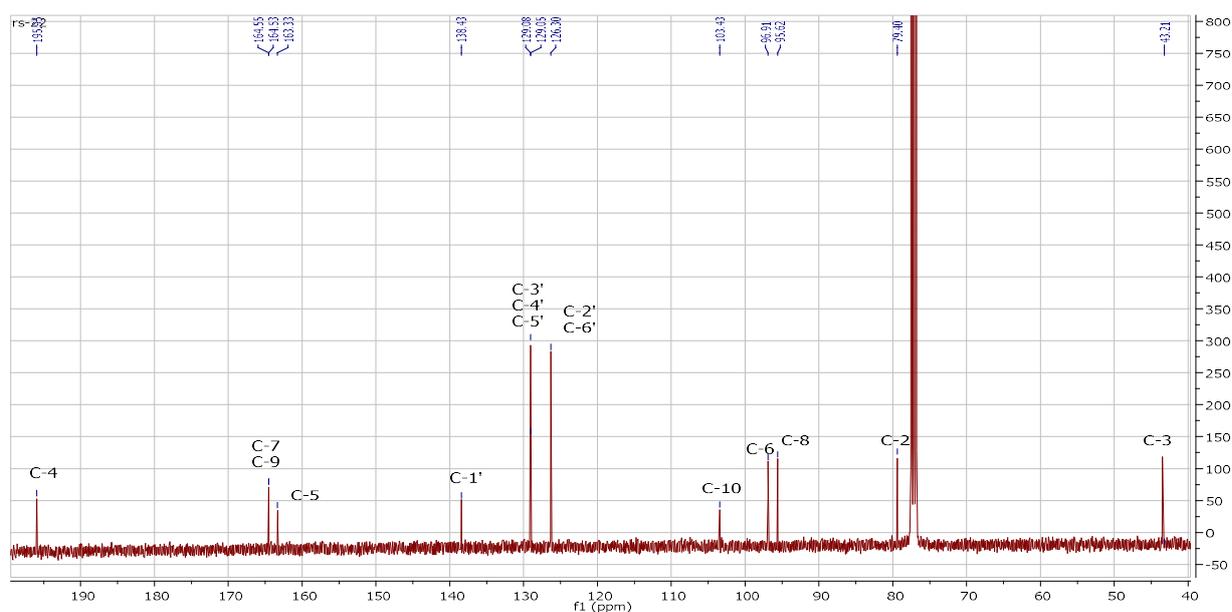


Figure 65 : Spectre RMN ^{13}C du composé TST139-26-1

. Spectre HSQC : Attribution des protons aux carbones

Les couplages hétéronucléaires 1J proton-carbone observés par expérience HSQC (**Figure 66**) permettent d'attribuer les protons aux carbones qui les portent. Les protons aromatiques à 7.47 à 7.38 ppm (5H, *m*) (encadré en bleu) sont portés par les carbones aromatiques à 126.3 ppm (C-2', C-6'), 129.1 ppm (C-3', C-5') et 129.0 ppm (C-4'). Le singulet à 6.00 ppm correspond à deux protons portés par les carbones à 95.6 ppm (C-8) et 96.9 ppm (C-6). Le proton à 5.45 ppm est rattaché au carbone à 79.4 ppm (C-2) et les doublets dédoublés à 2.85 ppm (1H) et 3.12 ppm (1H) sont portés par le carbone à 43.2 ppm (C-3) (**Tableau 11**).

De plus ces informations permettent de déterminer la présence de 6 carbones quaternaires, 8 CH et un CH₂ attribuable à la formule brute C₁₅H₁₂O₄ de masse moléculaire M = 256. La réalisation d'expériences RMN dans le CDCl₃ permet d'observer le proton chélaté OH-5 (12.07 ppm).

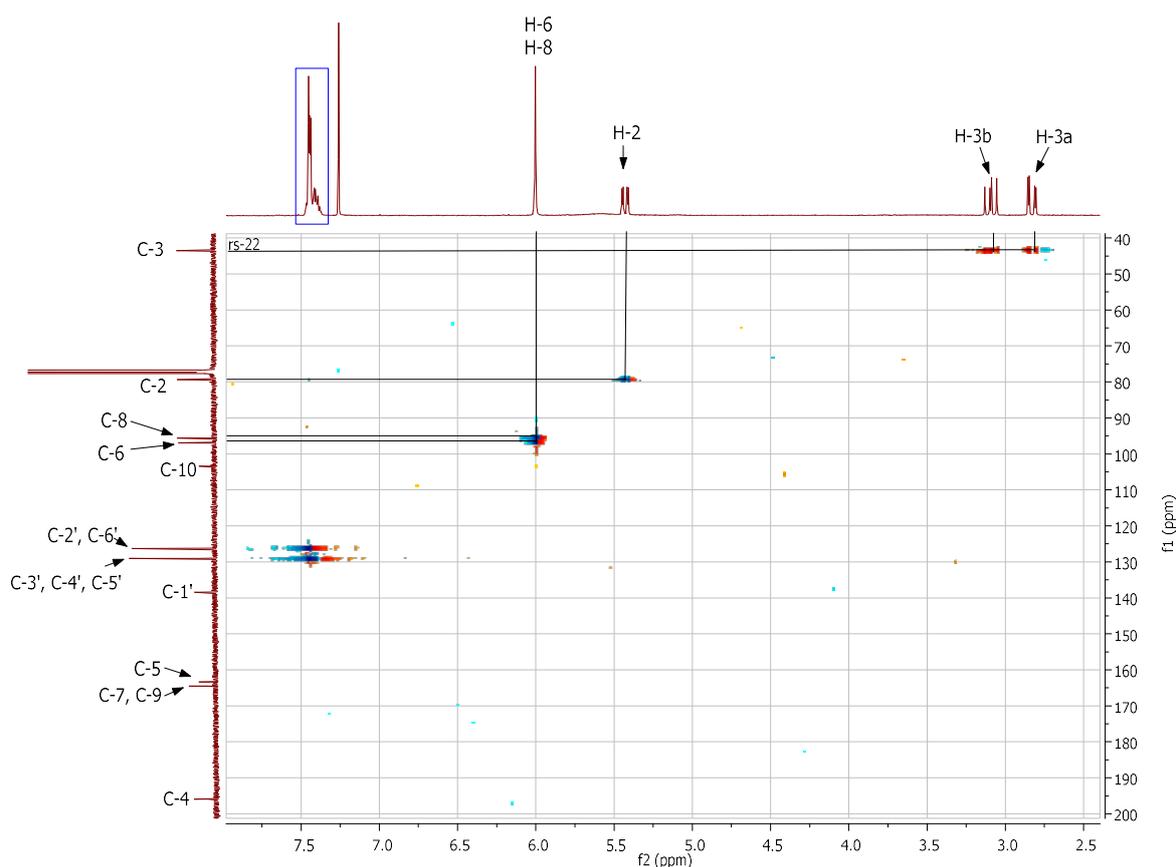


Figure 66 : Spectre RMN HSQC du composé TST139-26-1

. Analyse des spectres 2D COSY et HMBC

Les corrélations proton-proton (spectre COSY) et proton-carbone (spectre HMBC) observées confirment l'hypothèse de structure du composé TST139-26-1 (**Figure 69**).

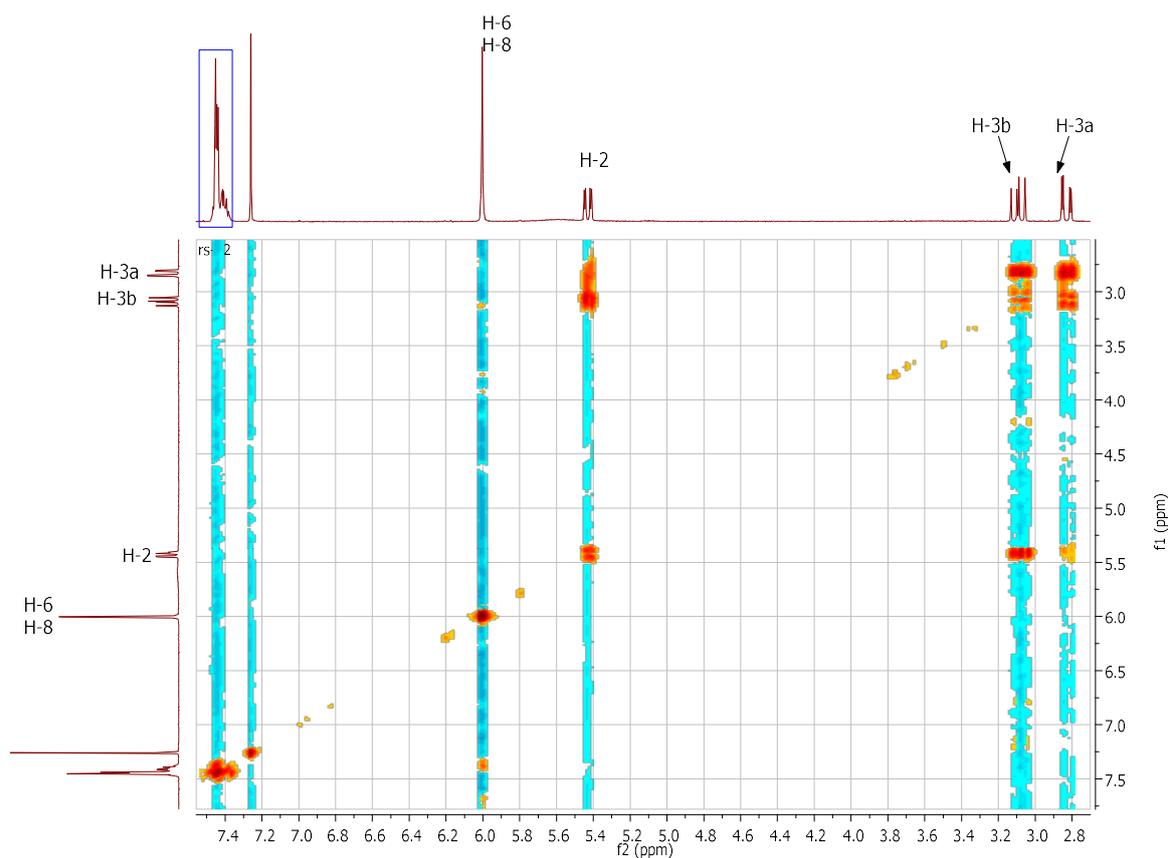


Figure 67 : Spectre COSY de TST139-26-1

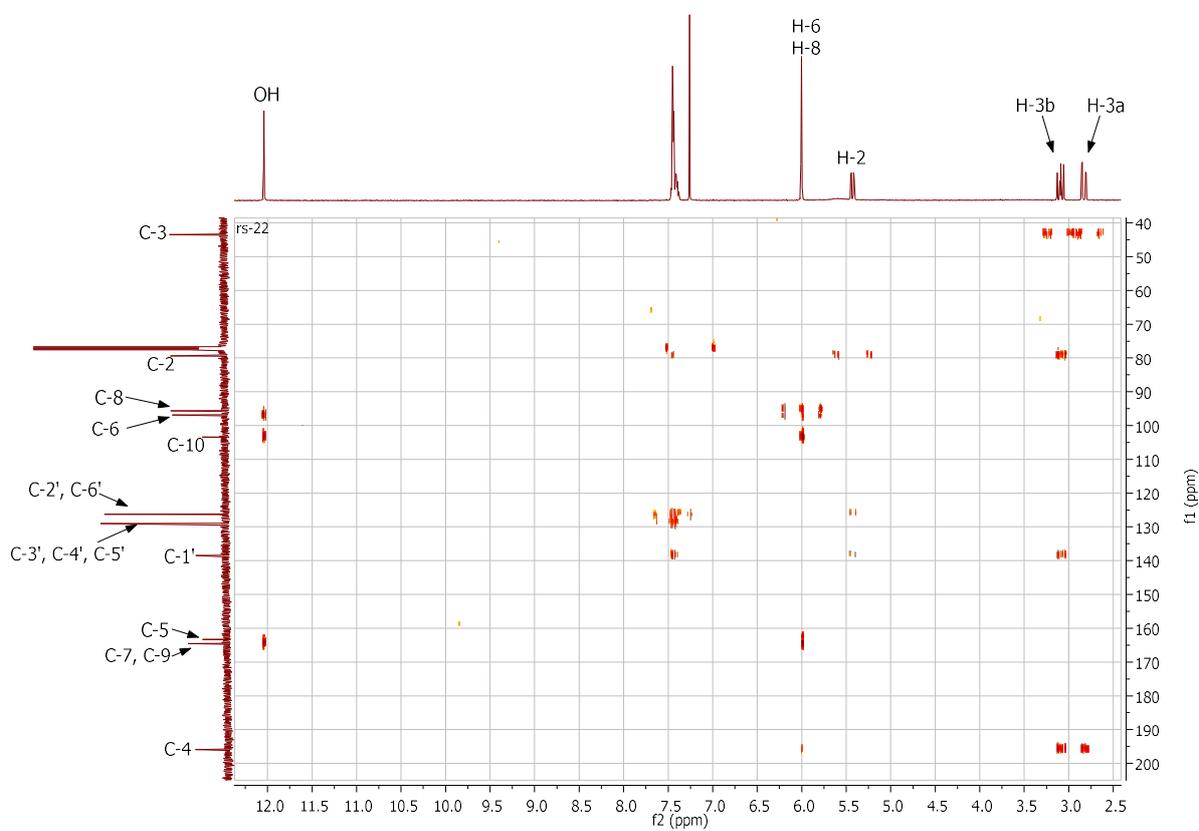


Figure 68 : Spectre HMBC du composé TST139-26-1

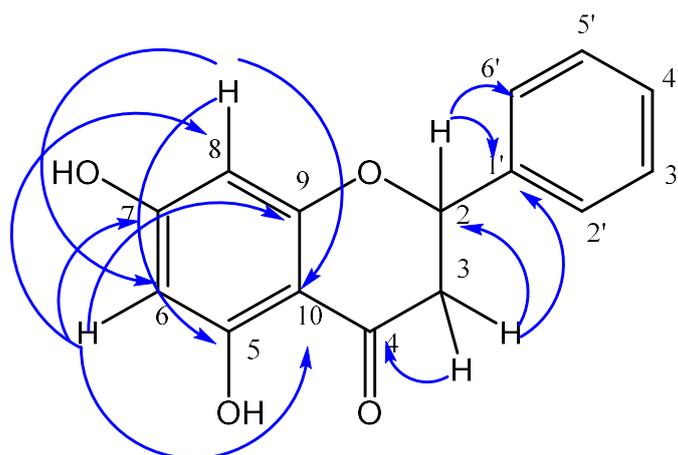


Figure 69 : Principales corrélations HMBC du composé TST139-26-1, **Pinocembrine**

Conclusion

En comparant avec les données disponibles dans la littérature [Diaz-Napal et Palacios 2013, Allard *et al.*, 2011., Ching *et al.*, 2007], il nous est possible d'identifier que les composés TST139-26-1 et TST139-26-2 ont la même structure que le **pinocembrine** (Figure 70).

Le **pinocembrine** a été isolé dans d'autres espèces de *Cryptocarya* : *C. strictifolia* [Juliawaty *et al.*, 2000], *C. chartacea* [Allard *et al.*, 2011], *C. chingii* [Feng *et al.*, 2012] et aussi retrouvé dans d'autres plantes, *Dalbergia odorifera* [Lee *et al.* 2013] et *Flourensia oolepsis* [Diaz-Napal et Palacios, 2013].

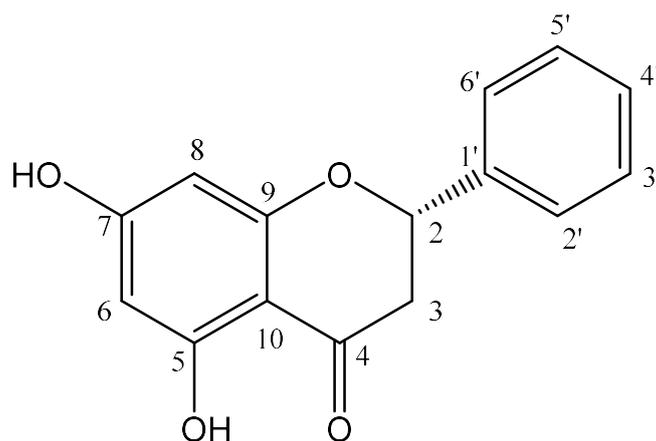


Figure 70 : Structure du composé TST139-26-1, **Pinocembrine**

Relevé des spectres RMN

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 12.04 (1H, *s*, 5-OH), 7.47-7.38 (5H, *m*, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6') ; 6.00 (2H, *brs*, H-6, H-8) ; 5.43 (1H, *dd*, $^3J_{2-3b} = 13$ Hz, $^3J_{2-3a} = 3.1$ Hz, H-2) ; 3.09 (1H, *dd*, $^2J_{3a-3b} = 17.2$ Hz, $^3J_{3a-2} = 3.1$ Hz, H-3a) ; 2.83 (1H, *dd*, $^2J_{3b-3a} = 17.2$ Hz, $^3J_{3b-2} = 13$ Hz, H-3b)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 195.9 (C-4), 164.6 (C-7), 164.5 (C-9), 163.3 (C-5), 138.4 (C-2'), 129.1 (C-3', C-5'), 129.0 (C-4'), 126.3 (C-2', C-6'), 103.4 (C-10), 96.9 (C-6), 95.6 (C-8), 79.4 (C-2), 43.4 (C-3).

Tableau 11 : Données spectrales en RMN de TST139-26-1, **Pinocembrine**

Position	δ ^1H ppm (<i>J</i> en Hz)	δ ^{13}C ppm	COSY	HMBC
2	5.43 <i>dd</i> (13, 3.1) 1H	79.4	H-3a, H-3b	C-1', C-2', C-6'
3b	3.09 <i>dd</i> (17.2, 13) 1H	43.2	H-3a, H-2	C-2, C-4, C-1'
3a	2.85 <i>dd</i> (17.2, 3.1) 1H		H-3a, H-2	C-4
4		195.9		
5		163.3		
6	6.00 <i>s</i> , 1H	96.9		C-7, C-8, C-9, C-10
7		164.6		
8	6.00 <i>s</i> , 1H	95.6		C-5, C-6, C-10
9		164.5		
10		103.4		
1'		138.4		
2'	7.4-7.38 <i>m</i> , 5H	126.3		
3'		129.1		
4'		129.0		
5'		129.1		
6'		126.3		

4. Etude phytochimique de la fraction AcOEt de *Cryptocarya rigidifolia* (MG442-2)

Suite aux résultats des tests biologiques, la fraction AcOEt, MG442-2, a été choisie pour effectuer une étude phytochimique approfondie (revoir page 57).

4.1. Fractionnement et isolement

Un premier fractionnement de la fraction MG442-2 sur chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex LH-20 (éluant : mélange H₂O/MeOH, 50/50) a donné cinq fractions (MG442-21 à MG442-25).

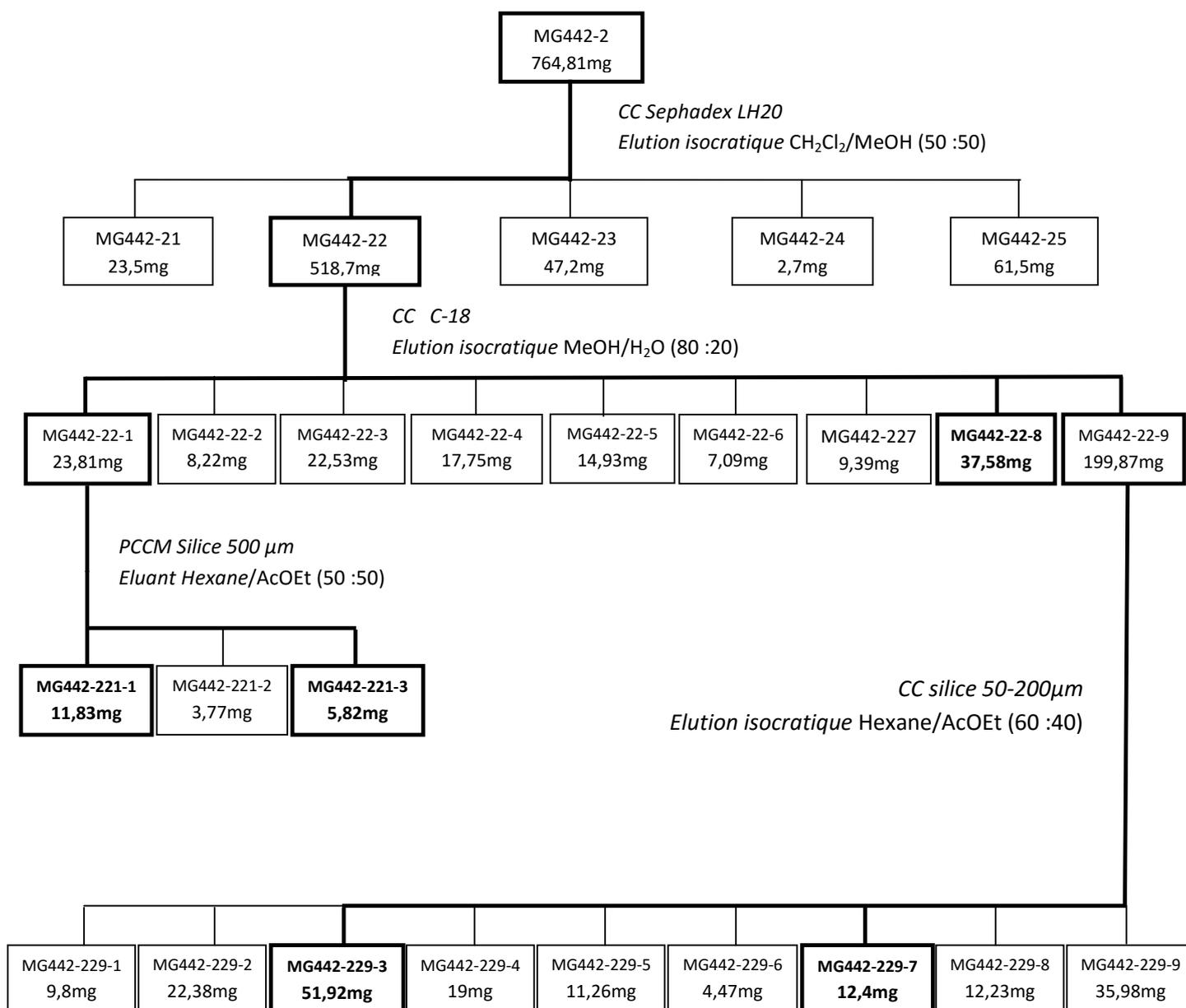


Diagramme 8 : Fractionnement et isolement des produits de MG442-2

Après un fractionnement de la fraction MG442-22 sur colonne C18 à moyenne pression (élution isocratique H₂O/ MeOH, 80/20), 9 fractions (MG442-22-1 à MG442-22-9) ont été obtenues.

L'analyse de la fraction MG442-22-1 par CCM préparative (éluant : Hexane/AcOEt, 50/50), permet d'isoler 2 produits MG442-221-1 et MG442-221-3.

La fraction MG442-22-9 après fractionnement par chromatographie d'adsorption sur silice 60, (élution isocratique Hexane/AcOEt, 60/40) a fourni les produits MG442-229-3 et MG442-229-7 (**Diagramme 8**).

4.2. Déterminations structurales des composés isolés

4.2.1. Détermination de la structure du composé MG442-221-1

La fraction MG442-22 a été traitée successivement par colonne de Sephadex LH-20 suivie d'une colonne C-18 puis la purification par CCM préparative de MG442-22-1 a donné le produit MG442-221-1 sous forme d'huile de couleur pâle (11,8 mg).

. Spectre de masse ESI-MS

Le spectre de masse, sorti par ESI-MS en mode positive expose un pic à $m/z = 393$, correspondant à l'ion pseudo moléculaire $[M+Na]^+$, attribuable à une masse moléculaire de $M = 370$ (**Figure 71**).

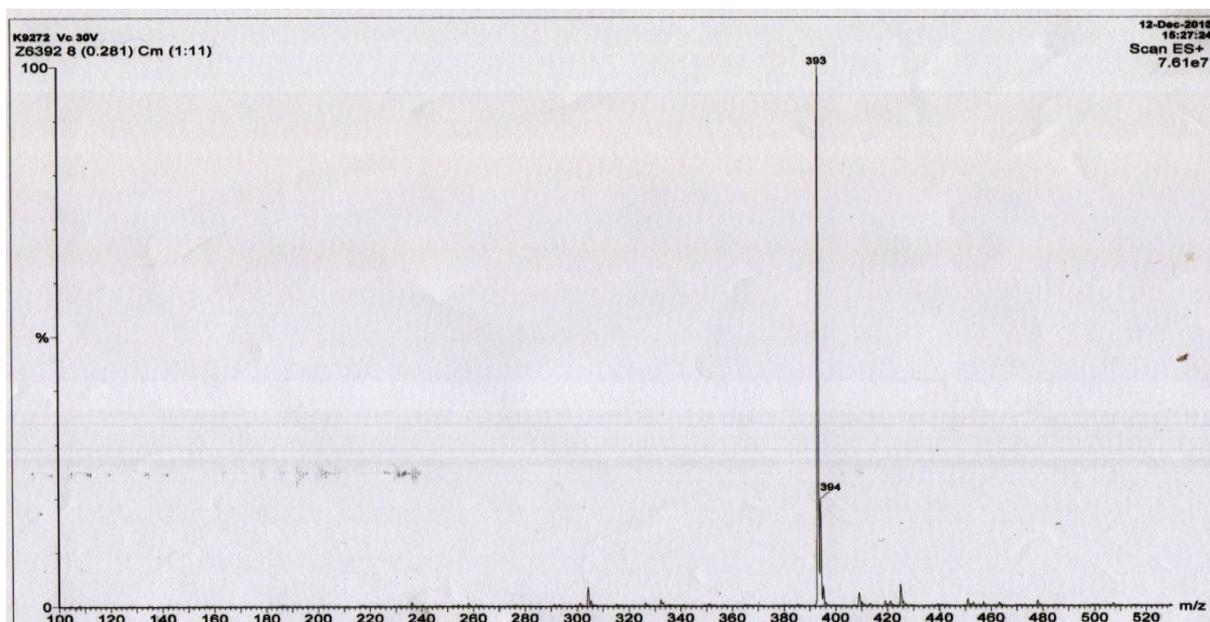


Figure 71 : Spectre de masse ESI-MS du composé MG442-221-1

. Spectre du proton RMN ^1H

Le spectre RMN ^1H (**Figure 72**), effectué dans CDCl_3 à 400 MHz, montre un multiplet à 6.86 ppm et un doublet à 6.01 ppm, avec une constante de couplage de 9.8 Hz, caractéristiques de protons oléfiniques. Les multiplets à 5.06, 4.98, 4.93 et 4.48 ppm correspondent aux déplacements chimiques de 4 protons portés par des carbones oxygénés. Les 3 singuliers à 2.07, 2.06 et 2.03 ppm indiquent la présence de 3 $-\text{CH}_3$ rattachés à des carbonyles. La présence de signaux de protons résonant entre 2.18 ppm et 1.71 ppm indique la présence d'une chaîne hydrocarbonée ($-\text{CH}_2-$).

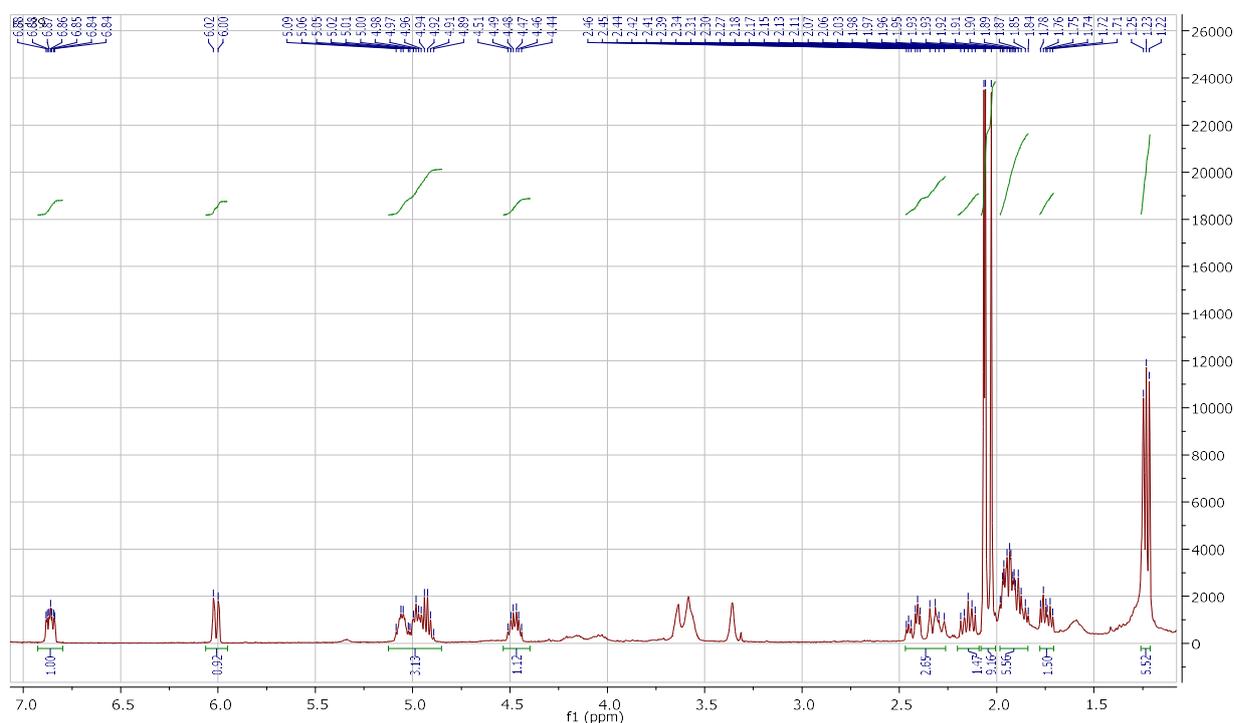


Figure 72 : Spectre RMN ^1H du composé MG442-221-1

. Spectre du carbone RMN ^{13}C

Le spectre de RMN ^{13}C (**Figure 73**) enregistré dans CDCl_3 à 100 MHz fait apparaître 18 signaux correspondant à 18 carbones. Les signaux à 170.8, 170.7, 170.6 et 163.9 ppm correspondent à 4 carbonyles, et les 3 signaux à 21.4, 21.3 et 21.2 ppm concordent aux signaux des $-\text{CH}_3$ rattachés aux carbonyles. Ces informations nous indiquent la présence des 3 groupements acétyles dans la structure du composé.

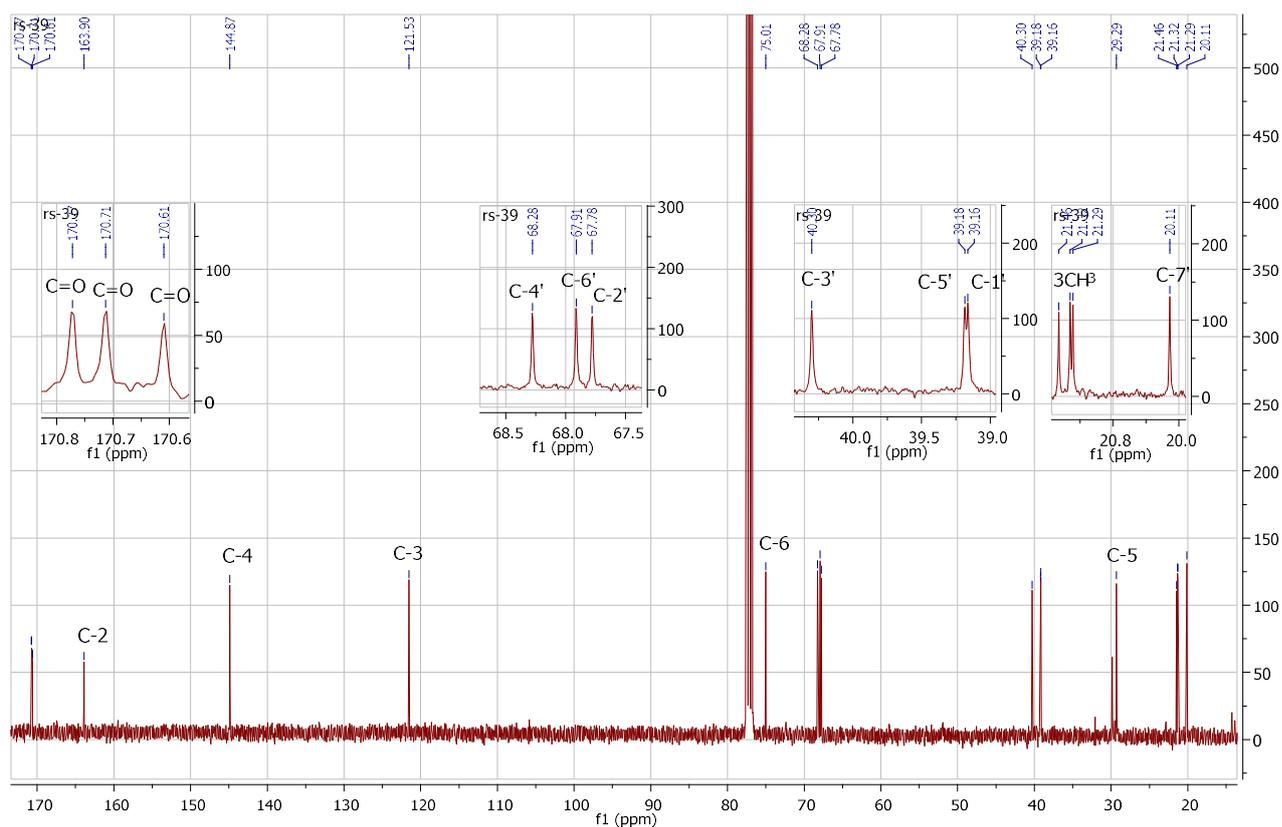


Figure 73 : Spectre RMN ^{13}C du composé MG442-221-1

. Spectre HSQC

L'expérience en HSQC (**Figure 74**) nous a confirmé la présence de 4 carbones quaternaires (à 170.8, 170.7, 170.6 et 163.9 ppm), 6 $-\text{CH}$ dont 2 porteurs des protons oléfiniques (C-3 à 121.5 ppm et C-4 à 144.9 ppm), 4 $-\text{CH}_2$ (40.3 à 29.3 ppm) et 4 $-\text{CH}_3$ (à 21.4, 21.3, 21.2 et 21.1 ppm).

Les protons à 6.01 et à 6.86 ppm sont respectivement portés par les carbones à 121.4 ppm (C-3) et à 144.7 ppm (C-4). Ces données permettent d'avancer la formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_8$ correspondant à la masse moléculaire $M = 370$.

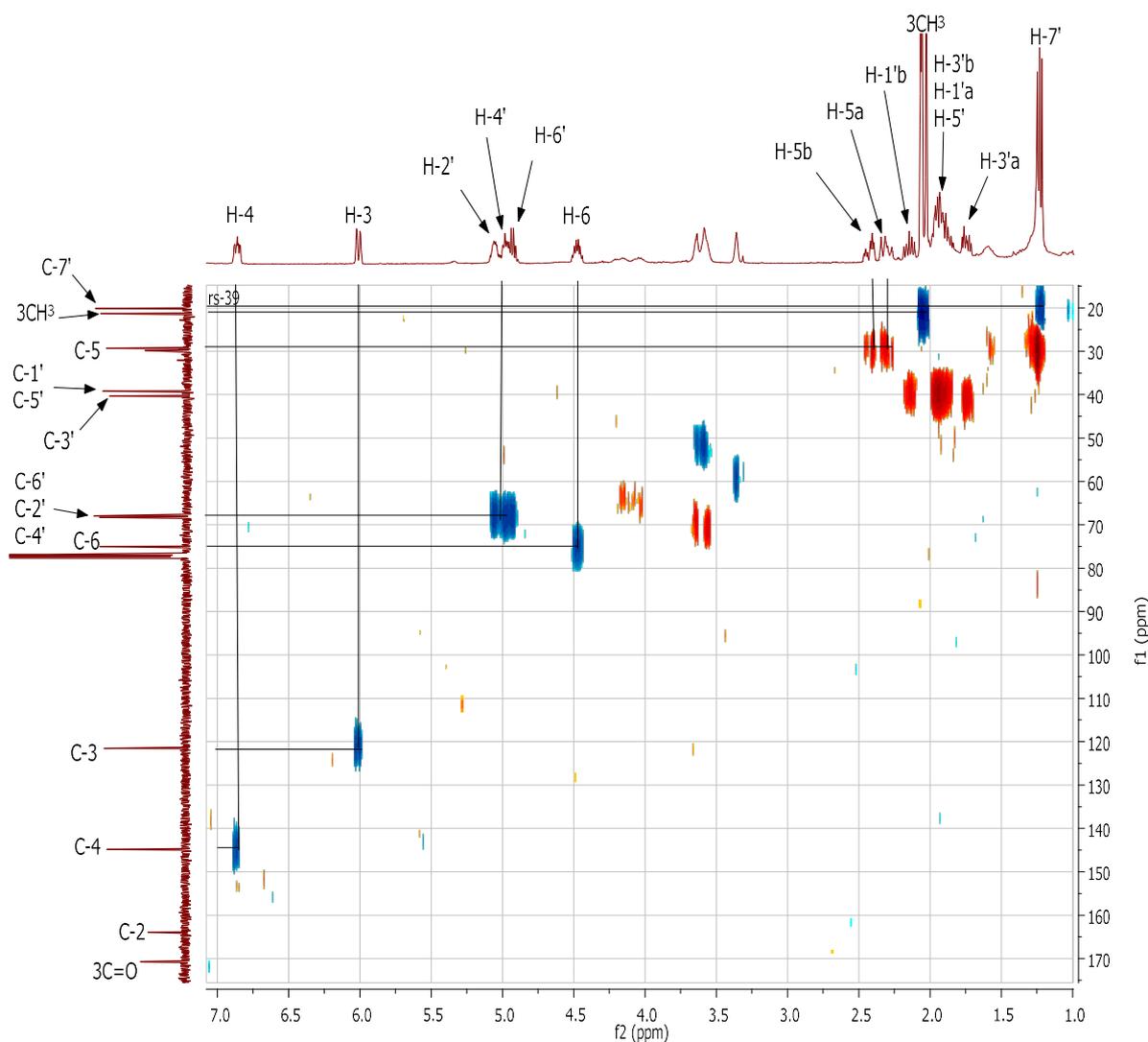


Figure 74 : Spectre HSQC du composé MG442-221-1

. Analyse du spectre 2D COSY

Les protons à 6.86 ppm (H-4) et 6.04 ppm (H-3) corrélient entre eux et corrélient avec les protons d'un $-\text{CH}_2$ à 2.43 ppm (H-5a) et 2.31 ppm (H-5b), caractéristique d'une pyrone (**Figure 75**). La corrélation entre les protons à 4.50 ppm (H-6) et 2.17 ppm (H-1') permet de justifier la présence d'un cycle lactonique α,β -insaturé, substitué en position 6. Ces informations correspondent à une pyrone monosubstituée de type alkyle. Les corrélations COSY sont présentées dans le **tableau 12**.

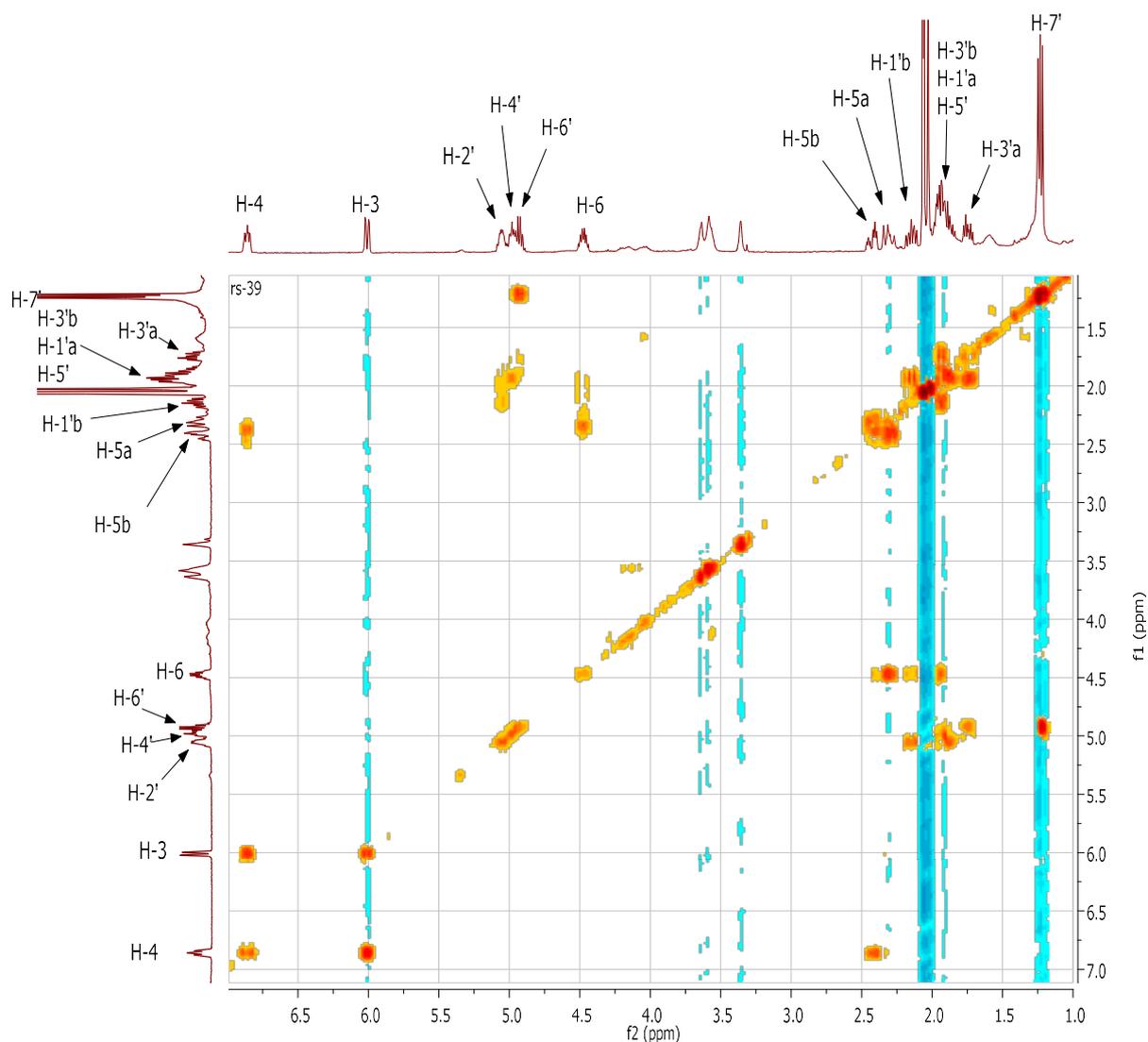


Figure 75 : Spectre COSY du composé MG442-221-1

Conclusion

Toutes ces données de RMN et SM, associées aux données des littératures, montrent que le composé MG442-221-1 correspond à la structure chimique de 5,6-Dihydro-6-[2,4,6-triacetoxyheptyl]-2*H*-pyran-2-one, dénommée **Cryptocarya triacetate (Figure 76)** [Melillo et Smith, 2013 ; Yadav et al., 2007 ; Smith et O'Doherty, 2003]. Le composé a été aussi isolé à partir des écorces de *C. latifolia* [Collett et al., 1997 ; Drewes et al., 1995], puis retrouvé dans les écorces de *C. liebertiana* [Drewes et al., 1997].

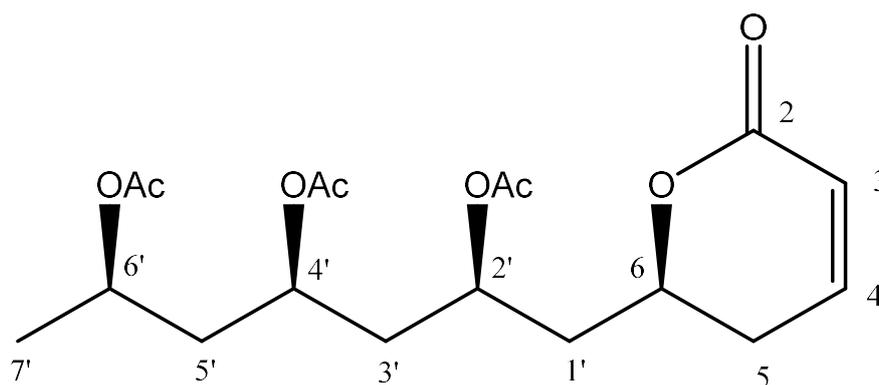


Figure 76 : Structure du composé MG442-221-1, **Cryptocarya triacetate** (pyrone 4)

Relevé des spectres RMN de **Cryptocarya triacetate** (pyrone 4)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 6.86 (1H, *m*, H-4); 6.01 (1H, *d*, $^3J_{3-4} = 9.8$ Hz, H-3); 5.06 (1H, *m*, H-2'); 4.98 (1H, *m*, H-4'); 4.93 (1H, *dt*, $^3J_{2'-3'} = 12.9$ Hz, $^3J_{2'-1'} = 6.5$ Hz, H-6'); 4.48 (1H, *td*, $^3J_{6-5} = 10.8$ Hz, $^3J_{6-1'} = 6.3$ Hz; H-6); 2.43 (1H, *m*, H-5b); 2.31 (1H, *dd*, $^2J_{a-b} = 17$ Hz, $^3J_{5-4} = 11$ Hz; H-5a); 2.15 (1H, *m*, H-1'b); 2.07 (3H, *s*, O-CH₃); 2.06 (3H, *s*, O-CH₃); 2.03 (3H, *s*, O-CH₃); 1.93 – 1.84 (4H, *m*, H-1'a, H-3'b, H-5'); 1.75 (1H, *m*, H-3'a); 1.23 (3H, *d*, $^3J_{7-6'} = 6.3$ Hz, H-7').

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 170.8 (-C=O acétyle), 170.7 (-C=O acétyle), 170.6 (-C=O acétyle), 163.9 (-C=O lactone, C-2), 144.9 (CH, C-4), 121.5 (CH, C-3), 75.0 (CH, C-6), 68.3 (CH, C-4'), 67.9 (CH, C-2'), 67.8 (CH, C-6'), 40.3 (CH₂, C-3'), 39.2 (CH₂, C-5'), 39.1 (CH₂, C-1'), 29.3 (CH₂, C-5), 21.4 (O-CH₃), 21.3 (O-CH₃), 21.2 (O-CH₃), 20.1 (CH₃, C-7')

Tableau 12 : Données spectrales en RMN de MG442-221-1

Position	δ ^1H en ppm (J en Hz)	δ ^{13}C (ppm)	^1H - ^1H Cosy
2		163.9	
3	6.01 d (9.8), 1H	121.4	H-4
4	6.86 m, 1H	144.9	H-3, H-5
5b	2.43 m (17, 5.1), 1H	29.3	H-6
5a	2.31 dd (17, 11) 1H		H-4
6	4.48 td (10.8, 6.3) 1H	75	H-5, H-1'b
1'b	2.15 m, 1H	39.1	H-1'a, H-2', H-6
1'a	1.93-1.84 m, 1H		H-1'b
2'	5.06 m, 1H	67.9	H-1'b
3'b	1.93-1.84 m, 1H	40.3	H-3'a, H-2'
3'a	1.75 m, 1H		H-3'b
4'	4.98 m, 1H	68.3	H-3', H-5'
5'	1.93-1.84 m, 2H	39.1	H-3'
6'	4.93 m, 1H	67.8	H-7'
7'	1.23 d (6.3), 3H	20.1	H-6'
-C=O		170.8	
-C=O		170.7	
-C=O		170.6	
-CH ₃	2.07 s, 3H	21.4	
-CH ₃	2.06 s, 3H	21.3	
-CH ₃	2.03 s, 3H	21.3	