

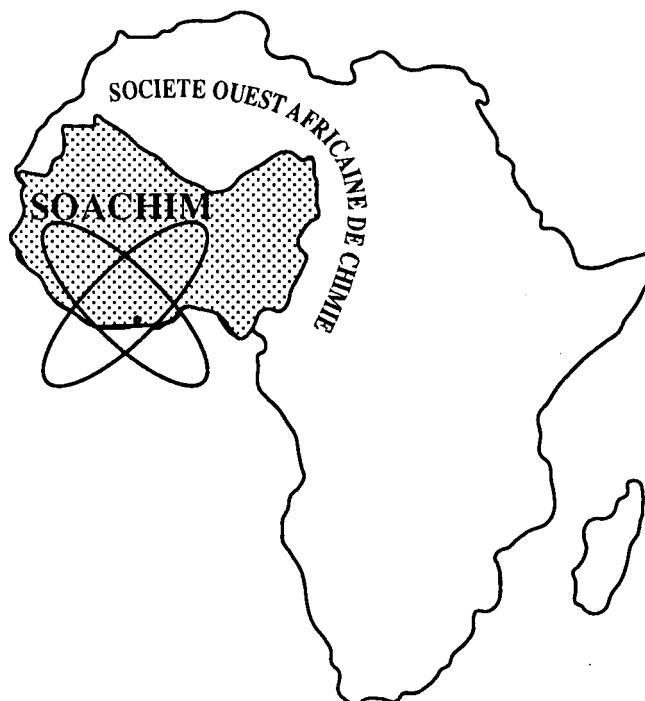
Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

J. Soc. Ouest-Afr. Chim.

Code Chemical Abstracts : JSOCF2
Cote INIST (CNRS France) : <27680>

ISSN 0796-6687

18^{ème} Année, Juin 2013, N° 035



Site Web: <http://www.soachim.org>

Structural determination of new flavones C-glycosides and *trans* (*S, E*)- (-) clovamide isolated *Icacina senegalensis* Juss leaves (Icacinaceae)

Anastasié Manga^{a,b}, Abdoulaye Gassama^{*b}, Gata yoro Sy^a,
Emmanuel Bassene^a, Catherine Lavaud^c

a: Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Laboratoire de Pharmacognosie (FMPOS-UCAD)

b: Université Assane Seck de Ziguinchor (Sénégal), Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux (LCPM)

c: Université de Reims, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR UMRS CNRS 6229), Groupe Isolement – Caractérisation

(Reçu le 28/02/2013 – Accepté après corrections le 25 /05/2013)

Résumé : Les jeunes feuilles de *Icacina senegalensis* Juss (*Icacinaceae*) récoltées en février 2012 dans l'enceinte de l'Université Assane Seck de Ziguinchor (Sénégal) sont mis en décoction pendant 4 heures dans des solvants de polarités croissantes (hexane, dichlorométhane, éthanol, et eau). Après évaporation à sec le résidu d'éthanol est fractionné par chromatographie sur gel de silice avec deux systèmes de solvant: acétate d'éthyle /cyclohexane 7/3 (v/v) et acétate d'éthyle / méthanol 9/1 (v/v). La fraction éluée à l'acétate d'éthyle / méthanol évaporée à sec est purifiée par HPLC sur colonne en phase inverse (RP18). Deux nouveaux flavones C-glycosides (**AG2**, **AG3**) et un *trans* (*S, E*)-(-) clovamide **AG4** ont été isolés et caractérisés par les méthodes spectroscopiques (RMN et Spectrométrie de Masse par Electrospray).

Mots-clés : *Icacina senegalensis* Juss, HPLC, RMN (1D, 2D), Masse mode ionisation par Electrospray, flavone C-glycoside, *trans* (-) clovamide.

Détermination structurale de nouvelles flavones C-glycosides et le *trans* (-) (*S, E*)- clovamide isolés de la feuille de *Icacina Senegalensis* Juss (*Icacinaceae*)

Abstract : Young leaves of *Icacina senegalensis* Juss (*Icacinaceae*) collected in February 2012 in the grounds of the University Assane Seck of Ziguinchor (Senegal) are set for 4 hours decoction in solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethanol, and water). After evaporation to dryness, the residue of ethanol was fractionated by chromatography on silica gel with two gradients of solvents: ethyl acetate / cyclohexane 7/3 (v/v) and ethyl acetate / methanol 9/1 (v/v). The fraction eluted with ethyl acetate / methanol evaporated to dryness was purified by HPLC on a reverse phase column (RP18). Two new flavones C-glycosides (**AG2**, **AG3**) and *trans* (-) clovamide (**AG4**) were isolated and characterized by spectroscopic methods (NMR and Electro Spray Ionisation-mass spectrometry).

Keywords: *Icacina senegalensis* Juss, HPLC, NMR (1D, 2D), ESI-MS, flavone C-glycoside, *trans* (*S, E*)-(-) clovamide.

* Corresponding author: Abdoulaye Gassama : agassama@univ-zig.sn

1. Introduction

Icacina senegalensis Juss (*Icacinaceae*) est une plante de la pharmacopée traditionnelle sénégalaise dont les feuilles sont utilisées au Sénégal dans le traitement de plusieurs affections. Les études ethnopharmacologiques menées sur la plante ont montré son utilisation dans le traitement traditionnelle du diabète^[1,2], du paludisme^[3] et la prévention du rachitisme^[1,2] au Sénégal. Les études phytochimique^[3, 4,5] faite sur le tubercule de la plante révèle la présence de icacenone (0,08%), icacinol (0,03%), β -sitostérol (55%), stigmastérol (45%) et hardwikiol linoleate.

Les feuilles de *Icacina senegalensis* n'ont pas encore fait l'objet d'investigation axée sur l'isolement et la caractérisation de molécules. Des travaux antérieurs^[1,2], portant sur les extraits aqueux et éthanoliques de la feuille de *Icacina senegalensis* ont montré une activité anti-hyperglycémiant intéressante chez des rats normoglycémiques et sur un modèle de diabète induit par l'alloxane chez les rats. Nous avons entrepris de rechercher le principe actif responsable de l'activité anti-hyperglycémiant, les feuilles de *Icacina senegalensis* Juss. ont été choisies.

2. Matériel et méthodes

Les feuilles de *Icacina senegalensis* Juss (*Icacinaceae*) sont récoltées en février 2012 dans l'enceinte de l'Université de Ziguinchor (Sénégal). L'échantillon est séché à l'abri des rayons solaires et à la température ambiante du laboratoire. Les drogues séchées sont broyées à l'aide d'un broyeur (type Bradender OHG Duisburg). La poudre fine (230g) ainsi obtenue après pulvérisation a été utilisée comme matière première pour faire les extractions. Un épuisement successif de la poudre est réalisé par des solvants de polarités croissantes (hexane, dichlorométhane, éthanol, et eau). En effet 230g de poudre sont introduits dans un ballon de 5L contenant 3L de solvant puis porté au reflux pendant 2heures. Cette procédure est reprise pour

chaque solvant après filtration et séchage de la marcs. L'extrait éthanolique est évaporé à sec pour donner un résidu de masse 8,45g.

Cet extrait brut est fractionné par chromatographie sur gel de silice avec deux systèmes de solvants: acétate d'éthyle /cyclohexane 7/3 (v/v) et acétate d'éthyle / méthanol 9/1 (v/v). La fraction éluée à l'acétate d'éthyle / méthanol est évaporée à sec. Elle est ensuite soumise à une HPLC semi préparative (**Tableau I**) [colonne: LUNA 5 μ , C18 (2) 100A, 250x15 mn, température de la colonne 30°C, solvant d'éluion: H₂O + acide trifluoroacétique (TFA) (0,025%) (solution A) / CH₃CN (solution B) dans un rapport de 20% d'acétonitrile en isocratique, injection par 100 μ l d'une solution d'EEt de C = 100mg/ml] donnant respectivement les flavones C-glycosides **AG2**, **AG3** et le *trans* (*S*, *E*)- (-)-clavamide **AG4**^[6, 7, 8, 9].

Les spectres RMN ¹H et ¹³C sont réalisés avec un appareil de 600MHz, sonde TCI Avance III, marque Brüker. Les spectres de masse mode ionisation par Electrospray (ESI) sont obtenus avec le spectromètre G1019 A (Hewlett Packard).

3. Résultats et discussion

Les masses de **AG2**, **AG3**, et **AG4** de l'extrait éthanolique (100mg) sont les suivantes: m_{AG2}=6mg, m_{AG3}=7mg et m_{AG4}=5mg. Nous présentons ici la procédure adoptée pour caractériser et identifier ces trois molécules **AG2**, **AG3** et **AG4** (cf. **Figure 1**). La numérotation utilisée est basée sur les travaux précédents de même nature dans le but de rendre l'interprétation plus lisible. Les déplacements chimiques en ppm des spectres RMN ¹H et ¹³C de **AG2**, **AG3** et **AG4** figurent respectivement dans les tableaux 2, 3, et 5. Dans les corrélations HMBC (figure 2, 4, 5 et 6), les coordonnées de chaque pic observé dans la trace de concours sont un ¹H et ¹³C séparé de 2, 3, voir 4 liaisons. Cela est extrêmement utile pour faire des affectations et de la cartographie à la structure covalente.

Tableau I : Temps de rétention HPLC et UV λ_{max}

Composés	Temps de rétention (Tr mn)	UV λ_{max} (nm)
AG2 (pic 20)	5,69	211,6; 269,3; 347,3
AG3 (pic 22)	6,62	211,1; 255,8 ; 346,9
AG4 (pic 23)	7,12	201,8; 218,5; 321,2

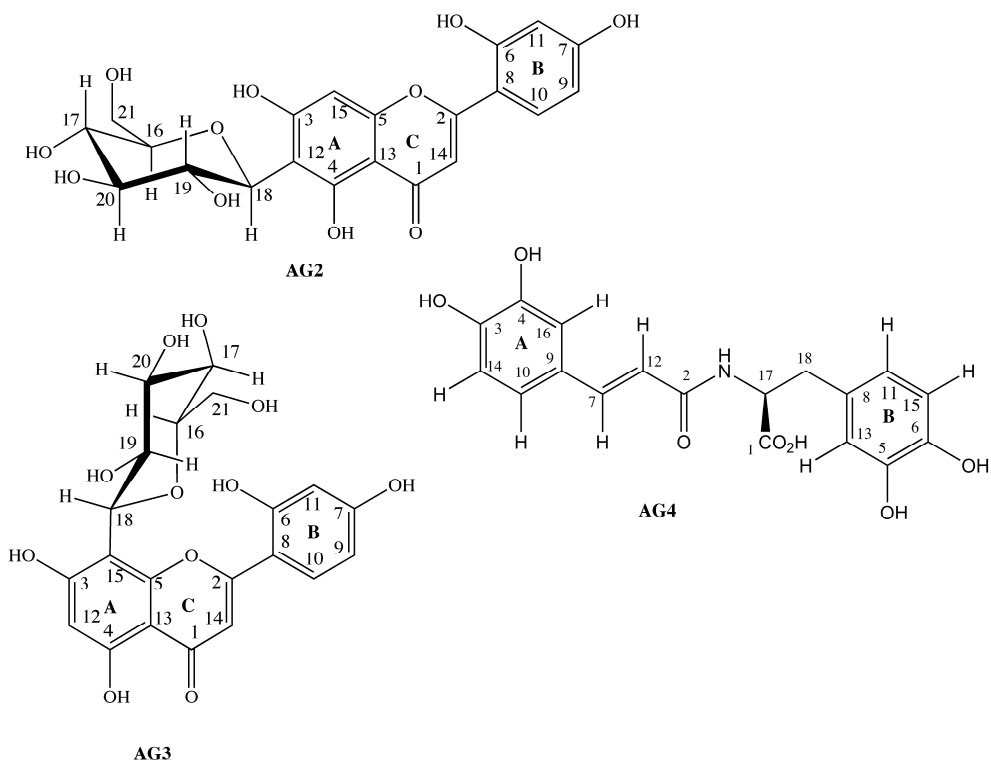


Figure 1 : Structure des composés AG2, AG3, AG4

Tableau II : Données RMN ¹H et ¹³C de AG2 dans DMSO-d₆.

Carbone N°	¹³ C (ppm)	Type et δ ¹ H (ppm); signal (J(Hz))	Proton lié à l'atome d'oxygène
1	182,33	C	OH; 13,57
2	164,09	C	OH; 10,62
3	163,70	C	OH; 9,95
4	161,18	C	OH; 9,44
5	156,64	C	
6	149,56	C	
7	146,20	C	
8	121,87	C	
9	119,43	CH; 7,40; dd (8,16; 1,87)	
10	116,50	CH; 6,92; d (8,16)	
11	113,75	7,39; d (1,86)	
12	109,32	C	
13	103,86	C	
14	103,25	CH; 6,57; s	
15	93,93	CH; 6,45; s	
16	82,06	CH; 3,44; m	
17	79,40	CH; 3,46-3,50; m	
18	73,48	CH; 4,88; d(9.90)	
19	71,07	CH; 4,22; m	
20	70,62	CH; 3,46-3,50; m	
21	61,95	CH ₂ ; 3,75-3,77; m	

3.1 Attribution des résonances et interprétation des spectres de **AG2**

Ce travail commence par la numérotation des résonances des δ du carbone ^{13}C , par ordre décroissant sur le spectre "J-modulé" (C_1 pour celui résonant à 182,33 ppm, C_{21} pour celui à 61,95 ppm). Sur le spectre du DEPT 135, les CH_2 apparaissent négatifs, les CH et CH_3 en positif. Le signal à 40,45 ppm correspond au solvant (DMSO-d_6). Cette numérotation sera reportée sur l'ensemble des projections 1D (pour ^1H , DEPT 135, ^{13}C) et 2D des spectres HSQC (couplages ^1J), HMBC (couplages $n\text{J}$, $n>1$) et COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$. Il y a plusieurs stratégies pour arriver à l'attribution complète : les étapes détaillées ci-dessous en proposent une. Le **tableau II** de **AG2** a été réalisé en exploitant les

Sur le spectre de COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$, on repère les trois groupes de protons dont ceux du cycle B ortho-para-trisubstitué (3 protons), et les deux protons singulets appartiennent à deux cycles différents A (1 proton) et C (1 proton). Ceci se confirme sur le spectre HMBC, car on observe deux corrélations entre le carbone C-12/H-15 et C-13/H-15 via 3 liaisons, ce qui signifie que ces deux carbones et l'hydrogène H-15 appartiennent au même cycle. Cependant la corrélation de C-13/H-14 observée et la corrélation C-12 / H-14 non observée permet de conclure que les protons H-14 et H-15 ne sont pas dans le même cycle.

Sur le spectre de HSQC, sont attribués les 5 carbones CH correspondants dans la région aromatique (100 – 160 ppm). Il faut noter une particularité du déplacement chimique des carbones CH de la position 12 et 15 des flavonoïdes qui varie entre 92 à 99 ppm.

Sur le spectre de HMBC (correspondant à la région aromatique), les carbones quaternaires sont attribués. On se base en particulier sur les corrélations suivantes:

C-1 (en particulier le plus déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène dans un état d'hybridation sp^2): C-1/H-14 (2 liaisons), C-1/H-15 (4 liaisons); C-2 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène): C-2/H-14 (2 liaisons), C-2/H-11 (3 liaisons), C-2/H-9 (4 liaisons) et C-2/H-10 (4 liaisons); C-3 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène): C-3/H-15 (2 liaisons), C-3/OH (à 13,57ppm, 4 liaisons); C-4 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-4/OH (13.57ppm, 2 liaisons), C-4/H-14 (4 liaisons); C-5 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-5/H-15 (2 liaisons); C-6 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-6/H-9 (4 liaisons), C-6/H-10 (3 liaisons), C-6/H-11 (2 liaisons) et C-6/OH (9,95 et 9,44ppm, 2 et 3 liaisons); C-7

spectres du proton ^1H , du carbone ^{13}C , du DEPT 135, et la corrélation HSQC. Le déplacement du proton phénolique à 13,3 ppm a été déterminante car ce type de déplacement est dû à la liaison hydrogène du proton OH avec l'oxygène du carbonyle du noyau chromone.

Le spectre de masse de **AG2** ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11} = 448$ g/mol) est réalisé en électrospray (ESI) mode positif. On observe un pic à m/z 471 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$ correspondant à la masse molaire moléculaire cationisée par un Na. Le spectre IR révèle les bandes d'absorption suivantes : 3348, 1653, 1621, 1579, 1453, 1490, 869, 817.

3.1.1 Attribution des noyaux aromatiques

(déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-7/H-9 (2 liaisons), C-7/H-10 (3 liaisons), et C-7/H-11 (2 liaisons); C-8: C-8/H-14 (3 liaisons), C-8/H-10 (2 liaisons), C-8/H-11 (3 liaisons), C-8/H-9 (3 liaisons) (résultat observé dans HMBC réalisé dans le MeOD); C-9 : C-9/H-11 (3 liaisons), C-9/H-10 non observée; C-10 : C-10/H-10 (1 liaison), C-10/H-9 et C-10/H-11 non observées; C-11 : C-11/H-9 (2 liaisons), C-11/H-11 (1 liaison), C-11/H-10 non observée; C-12 : C-12/H-15 (3 liaisons); C-13: C-13/H-14 (3 liaisons) et C-13/H-15 (3 liaisons).

Il faut remarquer que nous avons réalisé la RMN dans le méthanol CD_3OD en premier, cependant on n'observe pas de corrélation des carbones quaternaires avec les protons des phénols. Ainsi, nous avons refait l'expérience dans le DMSO-d_6 , qui n'échange pas les groupements hydroxyles. Cette corrélation HMBC entre les phénols et les carbones quaternaires a été la clé pour trancher sur la position du sucre sur le noyau B des flavonoïdes **AG2** et **AG3**.

3.1.2 Attribution de la jonction du cycle A avec le sucre

On utilise les trois corrélations C-3/H-18, C-4/H-18 et C-12/H-18 sur le spectre HMBC (**Figure 2**). D'après les spectres ^1H et HSQC, H-18 est le proton anomérique du glucose (doublet déblindé à 4,9 ppm).

3.1.3 Attribution de la Jonction bicyclic A et C

On utilise les deux corrélations C-1/H-15 (4 liaisons), et C-4/H-14 (4 liaisons).

3.1.4 Attribution de la Jonction noyau système chromone (cycle A-C) avec le noyau aromatique B

On utilise les quatre corrélations C-8/H-14 et C-2/H-11 (3 liaisons), C-2/H-9 (4 liaisons) et C-2/H-

10 (4 liaisons) sur le spectre HMBC. D'après les spectres HSQC et COSY ^1H - ^1H , les protons H-14 et H- 9, 10,11 appartiennent à deux noyaux aromatiques différents.

3.1.5 Nature du sucre

On utilisera préférentiellement les corrélations COSY ^1H - ^1H . Tous les protons H-16, 17, 18, 19, 20 et 21 ont été attribués par le spectre HSQC. Sur le spectre COSY ^1H - ^1H , on observe les corrélations des protons H-18/H-19, H-19/H-20, H-20/H-17, H-17/H-16 et H-16/H-21. L'idée de la présence d'un sucre est confirmée par les groupements CH et CH₂

attribués par le spectre DEPT 135 ou les CH₂ apparaissent négatifs, les CH en positif.

Il faut remarquer que la valeur des déplacements chimiques des CH et CH₂ sur le spectre du carbone a permis de confirmer la présence du sucre en particulier le glucose. Cependant le déplacement chimique du carbone anomérique observé (à **75.29 ppm**) qui est habituellement entre **95 à 98 ppm** a permis de confirmer une C-glycosylation entre le sucre et le noyau aromatique A (cf. **Figure 2**, corrélation C-12/H-18, 2 liaisons). De même la constante de couplage $J_{\text{H-18}} / J_{\text{H-19}}$ de l'ordre de 10Hz confirme un β -C-Glycosylation.

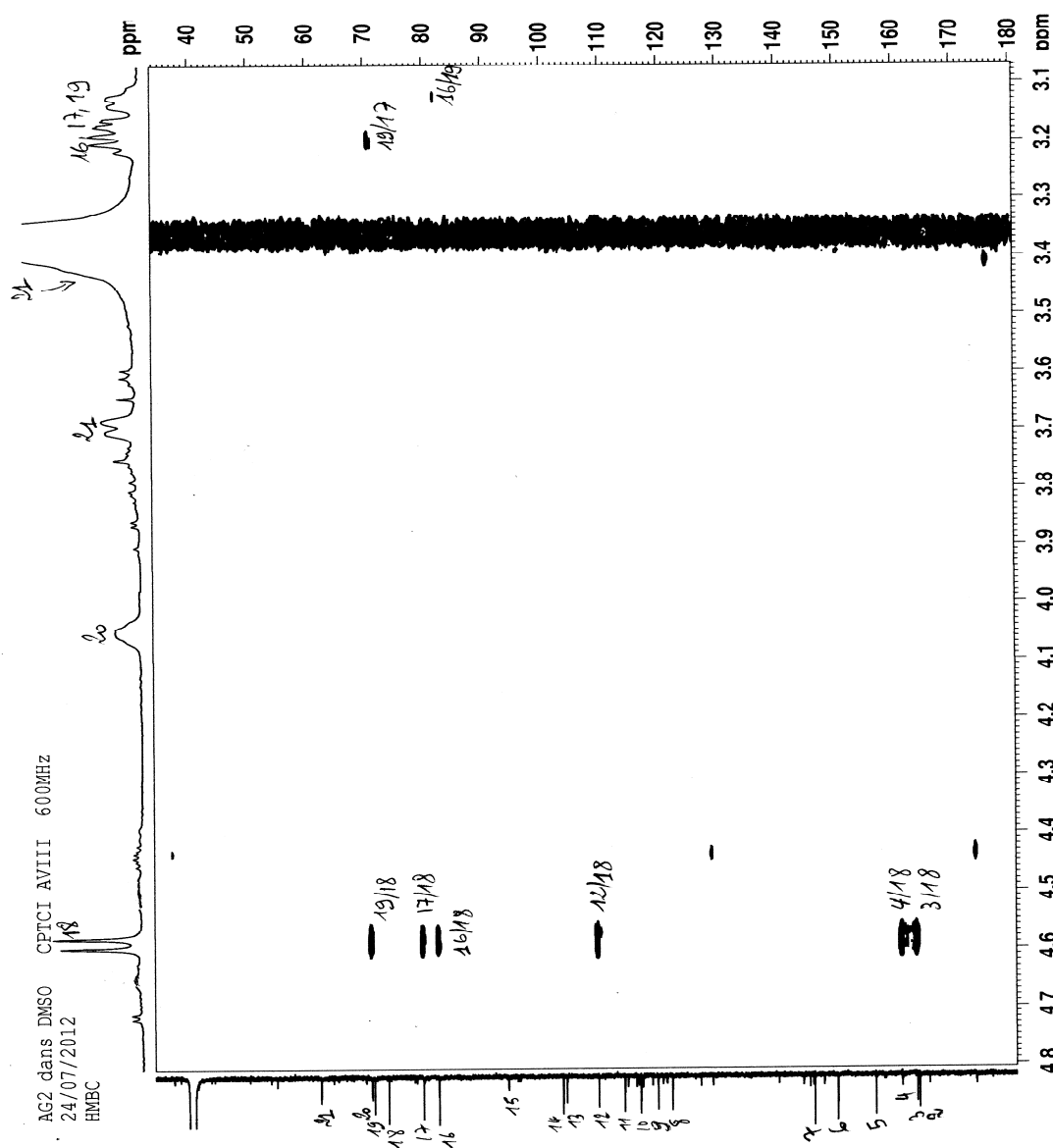


Figure 2 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone osidique.

Pour élucider la nature du sucre, nous avons repris la structure de **AG2** (cf : **Figure 3**) avec le numéro conventionnelle, puis de comparer les valeurs (déplacement chimique des carbones du sucre) avec celle d'écrite dans la littérature par l'équipe de Rikke Norbaek ^[10]. La différence entre ces deux molécules se trouve aux niveaux de la disposition et du nombre de groupements hydroxyles du cycle aromatique B, qui est très éloigné du sucre pour avoir une influence. La valeur de la constante de couplage $J_{1''-2''} = J_{2''-3''} = 9.9\text{Hz}$, montre que H1'', H2'', et H3'' sont axiales, ainsi la Jonction C-6 et C-1'' est un β glycosylation. L'expérience RMN a été réalisée dans les mêmes conditions, à savoir un RMN 600 MHz, dans le DMSO₆. D'après les (13.3ppm), ont permis de placer les 3 phénols aromatiques. Les C-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 placés à côté d'un atome d'oxygène ont un déplacement chimique élevé. En observant les deux spectres

HSQC et données physico-chimiques (cf. **Tableau III**) de notre fragment sucre, et celle de la littérature, nous pouvons conclure sans ambiguïté que c'est un glucose C-glucoside.

3.2 Attribution des résonances et interprétation des spectres de **AG3**.

Nous avons identifié la molécule **AG3** par le même raisonnement décrit pour **AG2**. Le spectre de masse de **AG3** (C₂₁H₂₀O₁₁ = 448 g/mol) est réalisé en électrospray (ESI) mode positif. On observe sur le spectre, les pics $[M+H]^+ = 449$ et $[M+Na]^+ = 471$. Le spectre IR révèle les bandes d'absorption suivantes : 3353, 1658, 1613, 1578, 1431, 869, 815.

Le **tableau IV** de **AG3** a été réalisé en exploitant les spectres du proton ¹H, du carbone ¹³C, et la corrélation HSQC. Les corrélations HMBC de C-4/OH (13.3ppm), C-12/OH (13.3ppm), et C-15/OH

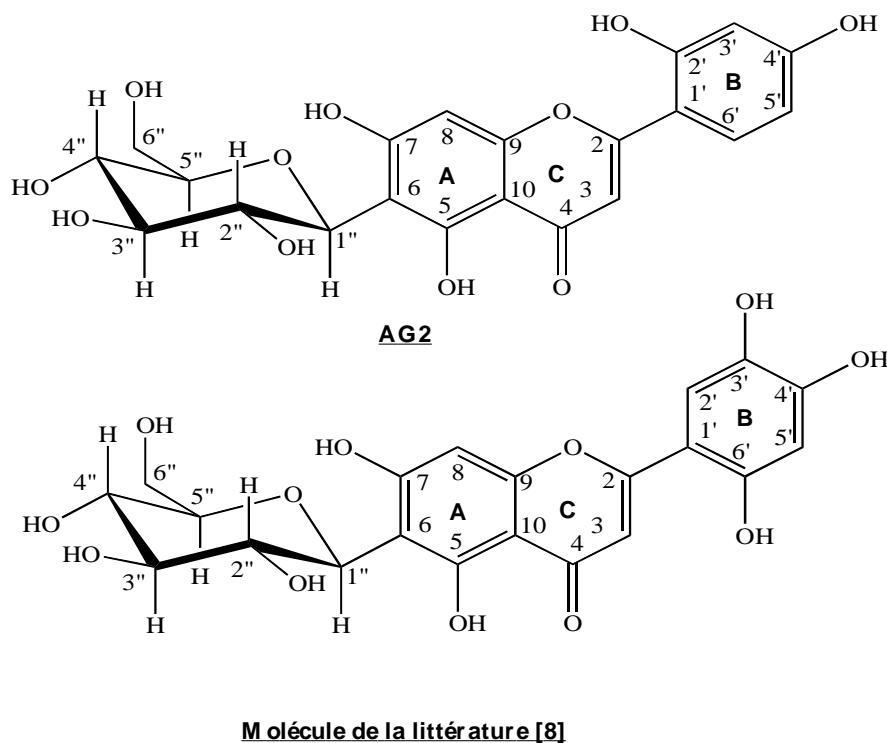


Figure 3: numérotation conventionnelle de la molécule **AG2**

Tableau III : Tableau de comparaison du $\delta^{13}\text{C}$ de la zone osidique

AG2-$\delta^{13}\text{C}$	Molécule Litt.- $\delta^{13}\text{C}$	AG3-$\delta^{13}\text{C}$
C1'' : 73,48	C1'': 73,00	C1'': 73,38
C2'' : 71,07	C2'': 70,10	C2'': 70,71
C3'' : 79,40	C3'': 78,80	C3'': 78,75
C4'' : 70,62	C4'': 70,40	C4'': 70,68
C5'' : 82,06	C5'': 81,5	C5'': 82,00
C6'' : 61,95	C6'': 61,4	C6'': 61,62

COSY ^1H - ^1H , on identifie les carbones quaternaires, car étant absent dans le HSQC. Le reste de l'analyse est identique à celle effectuée sur la molécule de **AG2**. Les composés **AG2** et **AG3** sont des isomères de position : la question, est de savoir comment on a pu les différencier d'une part et d'autre part n'est elle pas la même molécule en équilibre obtenu par un réarrangement de Wessely-Moser^[11].

La réponse à la première question, est sur les deux

spectres HMBC de **AG2** et de **AG3**. Sur le spectre HMBC de **AG2** (cf. **Figure 4**) on observe deux types de corrélation : **C-4/H-18** anomérique (3 liaisons) et **C-5/H-15** (2 liaisons), alors que dans le spectre de **AG3** (cf. **Figure 5** et **6**) c'est l'inverse à savoir **C-4/H-15** et **C-5/H-18** anomérique. Ainsi grâce aux corrélations **C-4/H-18** dans **AG2** et **C-5/H-18** dans **AG3** (non observé dans **AG2**) l'isomérisation de position entre les deux structures a été élucidée.

Tableau IV : Données RMN ^1H et ^{13}C de **AG3** dans DMSO- d_6

Carbone N°	^{13}C (ppm)	Type et $\delta^1\text{H}$ (ppm); signal (J(Hz))	Proton lié à l'atome d'oxygène
1	182,03	C	OH, 13,18
2	164,08	C	OH, 10,85
3	162,53	C	OH, 10,07
4	160,38	C	OH, 9,09
5	155,99	C	
6	149,56	C	
7	145,78	C	
8	122,03	C	
9	119,37	CH, 7,54; dd (8,34; 2,1)	
10	115,63	CH; 6,84; d; (1,86)	
11	114,06	CH; 7,48; d; (8,24)	
12	104,52	C	
13	104,03	C	
14	102,41	CH; 6,64; s	
15	98,09	CH; 6,27; s	
16	82,00	CH; 3,40-3,44, m	
17	78,75	CH; 3,45-3,50, m	
18	73,83	CH; 4,90; d; (10,00)	
19	70,76	CH; 3,74-3,88; (10,00)	
20	70,68	CH; 3,45-3,50; (10,00)	
21	61,63	CH ₂ ; 3,74-3,88 (m) et 3,56 (m)	

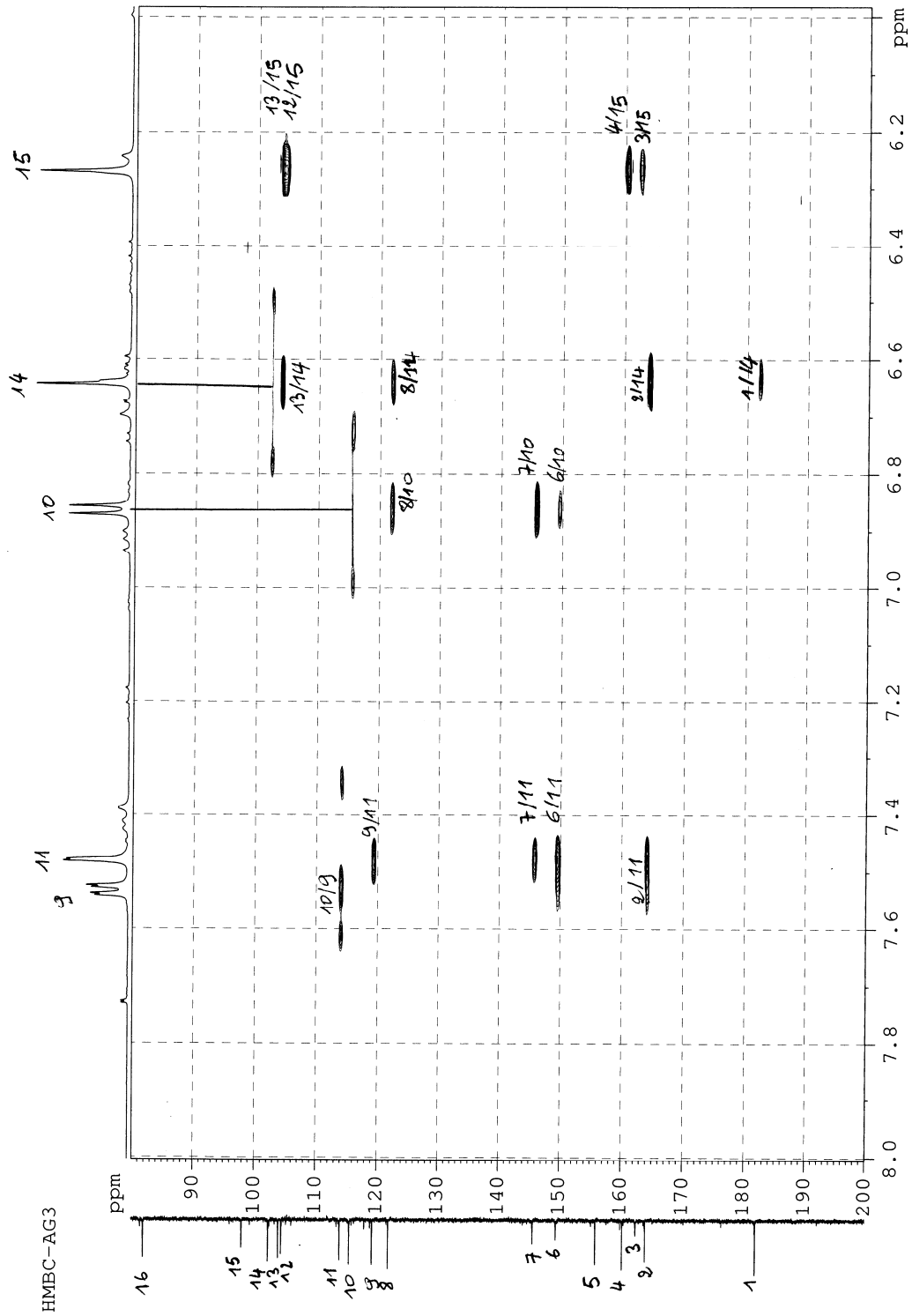


Figure 5 : Spectre HMBC avec agrandissement de la zone osidique de AG3.

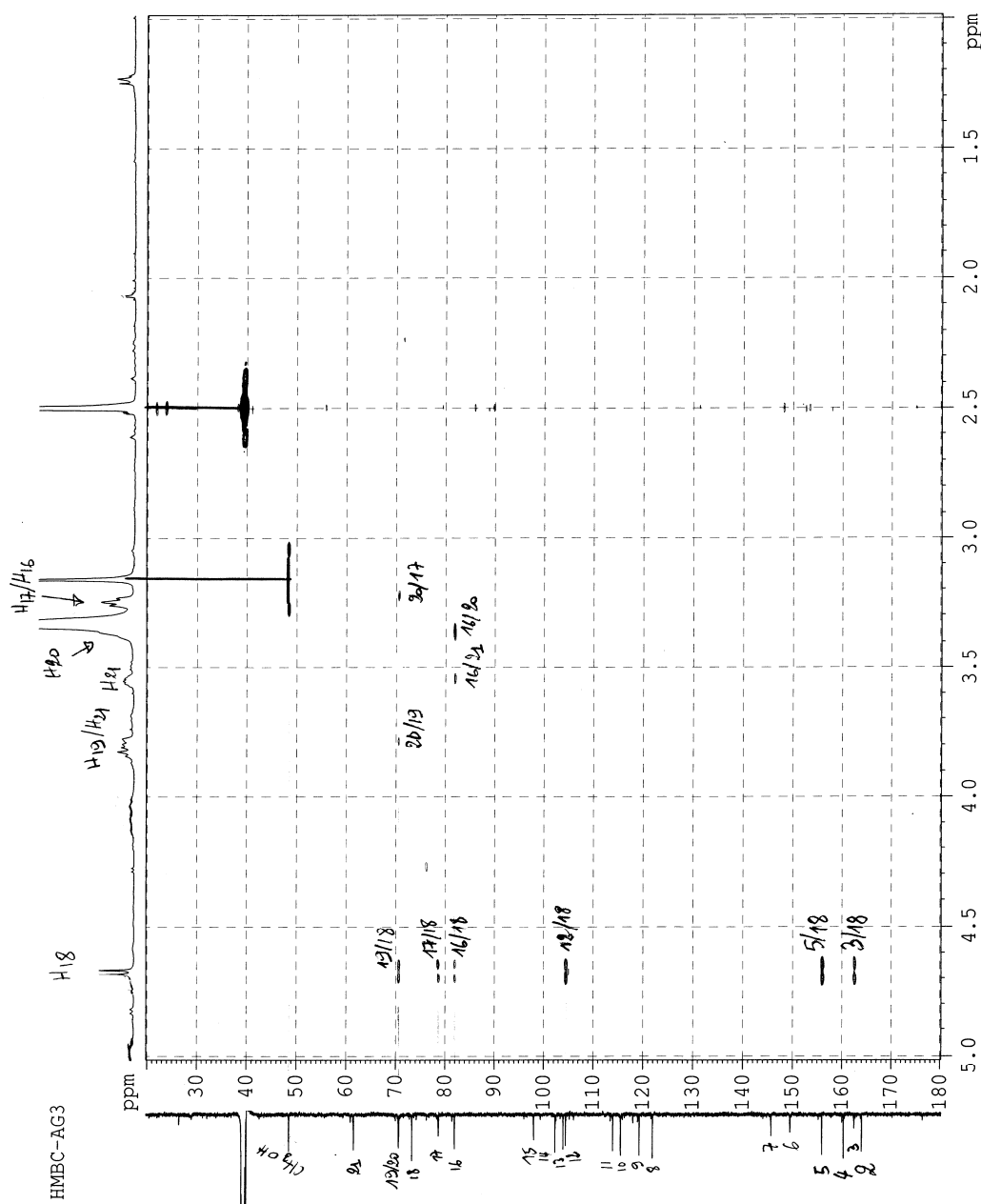


Figure 6 : Spectre HMBC avec agrandissement de la zone protons aromatique de **AG3**

Remarquons que les corrélations $^1J_{H-C}$ observé sur les spectres HMBC sont des corrélations résiduelles. Cette constante $^1J_{H-C}$ apparaît sous forme de deux taches espacées et symétriques par rapport au pic du proton. C'est le cas de C-10 / H-10 et C-14/H-14, CH₃ du solvant DMSO-d₆ et le méthanol. Pour la deuxième question rappelons que le réarrangement de Wessely-Moser qui a été un outil important dans la découverte de la structure des flavonoïdes, permet la conversion de 5, 7, 8-

triméthoxyflavones en 5, 6, 7-trihydroxyflavones par hydrolyse acide concentré des groupes methoxy en groupe hydroxy (phénols). Le réarrangement se produit à différentes étapes: ouverture du cycle pour donner la dicétone, rotation de la liaison avec formation d'un composé de type acétylacétone, et hydrolyse des deux groupes méthoxy et fermeture du cycle. La fraction EEt est purifié avec deux solvants d'éluions différents: H₂O (solution A) / CH₃CN (solution B) ou [H₂O + TFA

0.0025%] (solution A) / CH₃CN (solution B). Nous avons observé les deux isomères dans les deux cas. Les conditions de réarrangement de Wessely-Moser n'étant pas réunies dans le cas du solvant d'élution neutre, nous pouvons sans ambiguïté confirmée qu'il y a bien deux isomères **AG2** et **AG3**.

3.3. Attribution des résonances et Interprétation des spectres de **AG4**

Le *trans* (*S*, *E*)-(-)-clavamide **AG4** [6, 7, 8, 9] est connue de la littérature et des études ont montré ses activités anti-oxydantes. Le **tableau V** de **AG4** a été réalisé en exploitant les spectres du proton ¹H, du carbone ¹³C, du DEPT 135, et la corrélation HSQC. L'étape clé de cette caractérisation est l'expérience de la spectroscopie de masse, qui a permis d'identifier

la présence d'un atome d'azote dans cette molécule avec une masse moléculaire impaire de 359 u.m.a (Impaire) et le pic m/z = 163 correspondant au fragment [C₆H₅O₂CH=CHCO]⁺. La stéréochimie du carbone asymétrique a été déterminée par comparaison aux données de la littérature.

3.3.1 Attribution des noyaux aromatiques

Sur la COSY¹H-¹H, on repère trois groupes de protons dont ceux couplés correspondant au cycle ortho-para-trisubstitués A (3 protons, H-10, 14, 16 couplé entre eux) et B (H-11, 13, 15 couplé entre eux). Ceci est confirmé sur le spectre HMBC, car on observe les corrélations suivantes dans un même noyau: Noyau A : C-10/H-16, C-10 /H-14, et C-14/H-10 ; Noyaux B : C-11/ H-13, C-11/H-15. On n'observe pas de corrélation des protons du noyau A avec ceux du noyau B, ainsi cela signifie que les deux protons ne sont pas dans le même cycle.

Tableau V : Données RMN ¹H et ¹³C de **AG4** dans CD₃OD.

Carbone N°	¹³ C (ppm)	Type et δ ¹ H (ppm); signal (J(Hz))
1	173,55	C
2	167,61	C
3	147,50	C
4	145,29	C
5	144,80	C
6	143,81	C
7	141,39	CH; 7,40; d(15,75)
8	128,39	C
9	126,86	C
10	120,82	CH; 6,9; dd(1,98; 8,22)
11	120,25	CH; 6,55; dd(2,1; 2,0)
12	116,53	CH; 6,43; d(15,66)
13	115,91	CH; 6,69; d(2,02)
14	115,02	CH; 6,75; d(8,16)
15	114,87	CH; 6,67; d(8,22)
16	113,72	CH; 7,02; d(1,98)
17	54,10	CH; 4,72; dd(5,28; 5,34)
18	36,59	CH ₂ ; 3,13; dd(5,64; 5,28)
18	36,59	CH ₂ ; 2,9; dd(5,64; 5,34)

Sur le spectre de HSQC, sont attribués les 6 carbones correspondants dans la région aromatique (100 - 160). Les Hydrogènes H-7 et H-12 ne sont pas aromatiques car leur constante de couplage 3J très élevé, plus de 15 ppm est différente de celle des protons aromatiques.

Sur le spectre de HMBC (agrandissement correspondant à la région aromatique), les carbones quaternaires sont attribués. On se base en particulier sur les corrélations HMBC suivantes :

C-3 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-3/H-10 (3 liaisons), C-3/H-14 (2 liaisons), C-3/H-16 (3 liaisons); C-4 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-4/H-16 (2 liaisons), C-4/H-14(3 liaisons); C-5 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène): C-5/H-13 (2 liaisons), C-5/H-15 (3 liaisons); C-6(déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène): C-6/H-13 (3 liaisons), C-6-H15 (2 liaisons); C-8: C-8/H-13(2 liaisons), C-8/H-15 (3 liaisons); C-9: C-9/C-14 (3 liaisons).

Nous n'observons pas de corrélation entre les carbones quaternaires oxygénés avec les protons phénols. Ce constat est normal car ses protons ont été échangés dans le solvant utilisé du méthanol de référence (CD₃OD).

3.3.2 Attribution de la chaîne aliphatique et de la double liaison

On utilise les corrélations H-17/CH₂-18 (aliphatique) et H-7/H-12 (double liaison disubstituée) sur le spectre COSY 1H - 1H d'une part et d'autre part C-9/H-7 (2 liaisons), C-7/H-10 (3 liaisons), et C-7/H-16 (3 liaisons), sur le spectre HMBC.

3.3.3 Chaîne aliphatique liée au cycle B et éthylénique liée au cycle A

On utilise les quatre corrélations C-8/H-17(3 liaisons), C-8/H-18 (2 liaisons), C-11/H-17 (4 liaisons), et C-13/H-18 (3 liaisons), sur le spectre HMBC.

3.3.4 Attribution de la Jonction entre A éthylénique et B aliphatique

A ce stade, il ne reste que l'attribution des carbones C-1 (173,55ppm, hybridation sp², plus déblindé car carbonyle d'acide ou d'ester), C-2 (167,61 ppm, hybridation sp², carbonyle d'amide) et l'atome d'azote identifié par la masse. Pour ce faire l'analyse du spectre HMBC, permette d'observe les corrélations suivantes : C-2/H-7 (3 liaisons), C-2/H-12(2 liaisons), C-2/H-17 (3 liaisons), C-1/H-17 (2 liaisons) et C-1/H-18 (3 liaisons).

Ainsi le COSY 1H - 1H donne les liaisons C₁₇-C₁₈ et C₇-C₁₂; le HMBC relie les fragments noyau **A**-C₇-C₁₂-C₂ et **B**-C₁₈-C₁₇-C₁.

Revenons sur le spectre de masse, car grâce à elle, nous avons trouvé la formule brute de la molécule (C₁₈H₁₇O₇N) et le fragment m/z=163 correspondant à [C₆H₅O₂CH=CHCO]⁺. Le degré d'insaturation étant égale à 11, dont 8 pour les deux cycles aromatiques, 1 pour la double liaison C₇-C₁₂ et les deux restantes ne peut être que les deux CO porté par les carbones C-1(à 174.95 ppm, CO acide ou ester) et C-2 (à 169.01ppm ; CO amide).

Sur la base de ses analyses énoncées ci-dessus, le placement de l'atome d'azote en alpha du carbone C-2 est élucidé. Le spectre IR révèle les bandes d'absorption suivantes : 3347, 1719, 1654, 1605, 846, 814.

3.3.5 Stéréochimie de la double liaison et la configuration du carbone C-17

La stéréochimie *trans-E*- de la double liaison à été établie par le calcul de la constante de couplage 3J = 15,72Hz. Quant à la configuration *S* (-), elle est déduite par comparaison avec celle décrite dans la littérature ^[6]. Autrement dit par mesure du pouvoir rotatoire de la molécule isolée, puis comparaison avec la valeur décrite dans la littérature, pour le *trans* (*S*, *E*) (-) clovamide : $[\alpha]_{D}^{18} = -30$ (C=0.5, H₂O), $[\alpha]_{D}^{mesuré} = -12$, (C=0,0043, H₂O).

4. Conclusion

L'étude de l'extrait éthanolique de l'*Icacina senegalensis* (*icacinaceae*) a permis d'isoler trois molécules et de déterminer les structures correspondantes par les méthodes spectroscopiques (RMN et masse Ionisation par Electrospray). Il s'agit de deux nouveaux flavonoïdes C-glycosylé **AG2** (flavone 6-β-C-glycoside) et **AG3** (flavone 8-β-C-glycoside) non connue des bases de données [cf. SciFinder, Reaxys, Dictionnaire of natural product (DNP)] ^[12, 13] et le *trans* (*S*, *E*)-(-)-Clovamide **AG4** connue de la littérature. A ce stade de caractérisation, nous n'avons pas encore élucidé si le sucre est un D- ou L- Glucose. Cependant nous avons admis que généralement c'est un D-glucose au regard des résultats décrite dans la littérature ^[10, 12, 13]. L'analyse et l'examen des autres extraits (hexane, dichlorométhane et eau) sont en cours. Un inventaire de l'ensemble des métabolites de l'*Icacina senegalensis* (*icacinaceae*), est en cours et chaque constituant sera soumis à des tests d'activité biologique ^[1, 2, 3].

Remerciement

Les auteurs remercient le Fond d'Impulsion de la Recherche Scientifique et Technique (FIRST) de l'état Sénégalaise pour le financement de ce projet et Groupe Isolement – Caractérisation, Université de Reims, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR UMRS CNRS 6229) pour les caractérisations physicochimies.

Bibliographie

[1]-N'Diaye M., Contribution à l'étude de la fraction active antidiabétique de l'*icacina senegalensis* juss (*icacinaceae*). DEA, Chim. Prod. Nat., Fac Sciences et Techn., 2004, n°16.
[2] N'Diaye M; Diatta W; Sy G. Y., Fall A. D., Faye B., Bassene E., *Médecine d'Afrique Noire*, (2007), 54(4), 236-240.
[3]- Sarr S. O, Parrotey S., Fall I., Said E., Minjie Z., Diop Y., Candolfi E., and Marchioni E., *Malar. J.* (2011), 2-10.
[4]- Vanhaelen M, Plancho C, Vanhaelen-Fastre R, On'okoko P, *J Natural Producta* 1987, 50 (Suppl2): 312.
[5]- Soicke H, Görler K, Waring H, *Planta Med* 1991,

57(Suppl 1) : 86-87

[6]- Yoshihara T., Yoshikawa H., Sakamura S., Sakuma T., *Agric. Biol.Chem.*, (1974), 38, 1107, (1977), 41, 1679 (isolation).
[7]-Robolot G., et Wylde R., *J. Nat. Prod.*, (1988), 51, 596-598.
[8]-Fancier R. Van H., Brandt E. V. and Roux D. G., *Phytochemistry*, (1980), 19, 2125-2129.
[9]- Chiaki S. S., Naomi O., Midori N., Toshio T. S. G., and Toshihiko O., *J. Agric. Food Chem.* (1998), 46, 454-457.
[10]-Rikke N., Kirsten B., Tadao K., *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48, 1703-1707.
[11]- Wessely F, Moser G., *Monatsh. Chem.*, (1930), 56(1), 97-105.
[12]- Norbaek R., Aaboer D. B. F., Bleeg I. S., Christensen B. T., Kondo T., Brandt K., *J. Agric. Food Chem.* (2003), 51, 809-813.
[13]- Shaheen F., Muhammad A., *Magn. Reson. Chem.* (2000), 38, 701-703.