

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES, TECHNOLOGIE ET
GEOSCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Word-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

POST GRADUATE SCHOOL FOR
SCIENCES, TECHNOLOGY AND
GEOSCIENCES

**UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION DOCTORALE EN CHIMIE ET
APPLICATION**

DOCTORALE RESEARCH UNIT FOR CHEMISTRY AND APPLICATION

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

DEPARTEMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

**Isolation and structural elucidation of biflavonoids
from *Margaritaria discoidea* with Potent
Antiplasmodial activity: *in silico* docking.**

MEMOIRE

Présenté et soutenu publiquement en accomplissement partiel en vue de l'obtention du
Diplôme de Master II en Chimie Organique

Par :

HYONKEU MBAKOP LETICIA CATHY

Licence ès Sciences

18Q2106



Sous la direction de :

Dr MESSI Angélique Nicolas

Chargé de Cours, Université de Yaoundé I

Année académique : 2023/2024

DEDICACE

Je dédie ce mémoire :

A la mémoire de mon défunt père : Mr MBAKOP EMMANUEL

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué dans le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) dirigé par le Pr Raphael GHOGOMOU TIH et celui de Pharmacochimie des Substances Naturelles (LPSN) dirigé par le Pr Dieudonné Emmanuel PEGNYEMB, actuel chef du Département de Chimie Organique de l'université de Yaoundé I et recteur de l'université de Bertoua.

Je tiens à remercier mon Directeur de mémoire, Dr Nicolas Angélique MESSI, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser et de finaliser ce mémoire. Je lui suis particulièrement reconnaissant et je tiens à lui exprimer ici ma très vive gratitude pour la confiance et le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de ce travail.

Je remercie vivement le Pr Karel Von ESCHWEGE, Dr Wilhelm ANKE et Dr Susane BONNET à l'université de Free State en Afrique du Sud dont la collaboration a été fructueuse dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier le botaniste M. Jean Baptiste BINWE de l'université de Ngaoundéré pour avoir participé à la récolte, l'indentification de ma plante et aux diverses enquêtes ethnobotaniques.

J'exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à tous les enseignements du Département de Chimie Organique.

Je tiens également à remercier tous les chercheurs du Département de Chimie Organique, en particulier ceux de mon laboratoire, il s'agit de Dr Denis TENE, Mme Raïssa DZUKOUG, M. Abdias SEBDOU, M. Thite KOUAM, M. Oscar BILONG, M. Stany TSOMENE, M. Gendarme MBAIT-BAINA pour leur accueil, leur sympathie, leur conseil et leur disponibilité. Toutes ces initiatives ont contribué à la facilitation de mon apprentissage.

Je ne pourrais terminer sans remercier mes camarades de promotions en particulier ceux de mon laboratoire pour leur confiance, valorisation et travail. Ces remerciements s'adressent particulièrement à Bétilla TAFRIE et Sophie MEWOLO.

Je remercie vivement mes ami(e)s en particulier :

Mlles Lesly KENFACK, Glawdys JOUMESSI, Kevine NOBE, Armelle TCHOYI, Laurette SAFO, Laurence KOKO et M. Joannekind NOUMSI, M. Romarique KUETE, Didier DJOSSU, Yann BASSECK, Junior ASSOUMOU, Eli KENGNE, pour les multiples conseils et encouragements.

Les membres de ma famille : Mme Towa Nicole, Mr Albert ZOUEKEU, Mme Collette ZOUEKEU, Mme Christine NYAMSI, Mr Brice BATOUMEN, Mme Sidonie NOUOH, Mr Rodrigue CHOUTA , Mme Elvira CHOUTA , Mr Béranger MBAKOP, Mme Blandine PETTO ,Mr Christian NOUTCHEU , Mme Vanessa NOUTCHEU , Mlle Ornela CHOUMI, Mme Rachel MEBA, Mr Jean Faustin MEBA , Mlle Keriane CHOUTA, Mme Prisca MASSIS, Mme Chloé YOBI, à mes neveux : MATHIS, EMMANUEL , BRIELLE , AARON , JAYDEN, ELIA, retrouvez ici le fruit conjugué de vos efforts, votre amour et votre soutien dans la genèse et l'édification de mon apprentissage.

SOMMAIRE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
SOMMAIRE	iv
LISTES DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SCHEMAS	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
RESUME	xiii
ABSTRACT	14
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE	4
I.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES FLAVONOÏDES	5
I.1.1. Structures chimiques des flavonoïdes	5
I.1.2. Classification des flavonoïdes	5
I.1.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes.....	6
I.2. GÉNÉRALITÉ SUR LES BIFLAVONOÏDES	9
I.2.1. Biosynthèse des biflavonoïdes	9
I.3. METHODES SPECTROSCOPIQUES UTILES DANS LA DETERMINATION DES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES	10
I.3.1. Spectrométrie de masse	10
I.3.2. Spectroscopie UV-visible	11
I.3.3. Infra-Rouge	12
I.3.4. RMN 1D et 2D	12
I.4. GÉNÉRALITÉS SUR LE GENRE <i>MARGARITARIA</i>	16
I.4.1. Différents types des espèces du Genre <i>Margaritaria</i>	16
I.4.2. Description botanique du genre <i>Margaritaria</i>	16
I.4.3. Distribution géographique des espèces de <i>Margaritaria</i>	17
I.2.3. Usage ethnopharmacologique des plantes du genre <i>Margaritaria</i>	17
I.4.4. Constituants chimiques du genre <i>Margaritaria</i>	18
I.4.4.1. Monoflavonoïdes isolés du genre <i>Margaritaria</i>	18
I.4.5. Biflavonoïdes isolés du genre <i>Margaritaria</i>	19
I.5. AUTRE MÉTABOLITES SECONDAIRES ISOLÉS DU GENRE <i>MARGARITARIA</i>	20
I.5.1. Généralités sur les coumarines	20
I.5.2. Quelques coumarines isolées du genre <i>Margaritaria</i>	20

I.5.2.1. Généralité sur les terpénoïdes.....	22
I.5.2.2. Quelques terpénoïdes isolés du genre <i>Margaritaria</i>	22
I.6. ETUDE BIOLOGIQUE DU GENRE <i>MARGARITARIA</i>	25
I.6.1. Activités cytotoxique.....	25
I.7. GÉNÉRALITÉS SUR L'ESPÈCE <i>MARGARITARIA DISCOIDEA</i>	26
I.7.1. Distribution géographique.....	26
I.7.2. Classification botanique.....	27
I.7.3. Noms vernaculaires du genre <i>Margaritaria</i>	27
I.7.4. Description botanique de <i>margaritaria discoidea</i>	30
I.7.5. Usages ethnopharmacologies de <i>Margaritaria discoidea</i>	33
I.7.5.1. Usages agroforestiers.....	34
I.7.6. Etudes phytochimiques antérieure.....	34
I.7.6.1. Monoflavonoïdes isolés du genre <i>Margaritaria discoidea</i>	Erreur ! Signet non défini.
I.7.7. Quelques biflavonoïdes isolées du genre <i>Margaritaria discoidea</i>	35
I.7.8. Généralité sur les alcaloïdes.....	35
I.7.8.1. Quelques alcaloïdes isolés de <i>Margaritaria discoidea</i>	35
I.7.8.2. Terpénoïde isolée de <i>Margaritaria discoidea</i>	37
I.8. ETUDE BIOLOGIQUE DE <i>MARGARITARIA DISCOIDEA</i>	37
I.7.9.1. Activité anti plasmodiale.....	37
I.7.9.2. Activité anti microbiennes, antioxydantes, et anti-inflammatoire.....	37
I.7.9.3. Activité anti-inflammatoire.....	37
I.7.9.4. Activité anti bactériennes.....	38
CHAPITRE II : RESULTAT ET DISCUSSION.....	39
II.1. Extraction et isolement des composés de <i>margaritaria discoidea</i>	40
II.2. Détermination chimique des composés purs isolés.....	42
II.2.1. Identification du composé MD1.....	42
II.2.2. Détermination structurale du composé MD3.....	54
II.3. Évaluation de l'activité inhibitrice de MD1 ET MD3 sur le <i>plasmodium falciparum</i> NF54.....	62
II.3.1. Activité anti plasmodiale.....	62
II.4. Analyse du docking moléculaire.....	63
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	66
CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE.....	68
III.1. MATERIELS VEGETAL, EXTRACTION ET CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE.....	69
III.1.1. Appareillage.....	69
III.1.2. Matériel végétal.....	70
III.1.3. Extraction et isolement des constituants des racines de <i>Margaritaria discoidea</i>	70
III.1.3.1. Extraction des constituants des racines de <i>Margaritaria discoidea</i>	70
III.1.3.2. Isolement des constituants des racines de <i>Margaritaria discoidea</i>	70
III.2. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE.....	73

III.2.1. Test au chlorure ferrique	73
III.2.2. Test de Shinoda	73
III.3. MÉTHODES CHROMATOGRAPHIES SUR COUCHE MINCE	74
III.4. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE	75
III.5. MÉTHODES DE PURIFICATIONS ET SÉPARATIONS	75
III.6. MÉTHODES ET APPAREILLAGES	ERREUR ! SIGNET NON DÉFINI.
III.6.1. Méthodes	Erreur ! Signet non défini.
III.6.2. Appareillages	Erreur ! Signet non défini.
III.7. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES	76
III.7.1. L'Évaluation de l'essai antiplasmodique	76
III.7.2. Analyse statistique	76
III.8. Protocole du Docking moléculaire (Amarrage moléculaire)	76
III.9. Données physico-Chimiques des composés isolés MD1: 2,3-dihydroflavone-7'',7-O-diméthyl ether	78
REFERENCES	81

LISTES DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

µg : microgramme

AcOEt : Acétate d'éthyle

APG: Angiosperm Phylogeny Group

APT: Attache Proton Test

CC : Chromatographie sur colonne

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CH₂Cl₂/MeOH : Chlorure de méthylène/Méthanol

CI₅₀ : Concentration correspondant à 50% d'inhibition

COSY : Correlation spectroscopy

d : Doublet

dd : doublet de doublet

DCM/MeOH : Chlorure de méthylène/Méthanol

DMSO : Dimethylsulfoxyde

δ : Echelle de déplacement chimique

ESI : Electrospray Ionization

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HRESIMS : High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry

HSQC : Heteronuclear single quantum cohérence

Hz : Hertz

IC : Ionisation Chimique

IR : infrarouge

J : Constante de couplage

m : multiplet

m/z : Rapport de masse (**m**) sur la charge (**z**)

MeOH : Méthanol

MHz : Mégahertz

nm : Nanomètre

MD : *Margaritaria discoidea*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ppm : partie par million

RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone

RMN 1D : Résonance Magnétique Nucléaire à 1 dimension

RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du Proton

RMN 2D : Résonance Magnétique Nucléaire à 2 Dimensions

ROESY : Rotating Overhauser Enhancement Spectroscopy

s: Singulet

UV: Ultra-Violet

WCVP: World Checklist Vascular Plants

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Squelettes de bases des flavonoïdes (Bruneton, 1999 ; Gontijo et <i>al.</i> , 2017)	5
Figure 2 : Mécanisme de formation du précurseur de la biosynthèse des biflavonoïdes à partir de la Noringenin-chalcone (Jackson et al., 1971).	10
Figure 3 : Photographie de quelques espèces du genre <i>Margaritaria</i>	16
Figure 4 : Distribution géographique des espèces du genre <i>Margaritaria</i> . (WCVP, 2022).	17
Figure 5 : Squelette de base d'une coumarine (Bruneton, 1999).	20
Figure 6 : Distribution géographique de <i>Margaritaria Discoidea</i> au Cameroun (HNC, 2024).	26
Figure 7 : Arbuste de <i>Margaritaria discoidea</i> Photo Leticia, 2023.	30
Figure 8 : Les racines de <i>Margaritaria discoidea</i> , photo Leticia, 2024.	30
Figure 9 : Feuilles de <i>Margaritaria discoidea</i> , photo Leticia, 2024.	31
Figure 10 : Fleur de la plante <i>Margaritaria discoidea</i>	31
Figure 11 : Fruit de <i>Margaritaria discoidea</i> photo Leticia, 2024.	32
Figure 12 : Graines de <i>Margaritaria discoidea</i> photo Leticia, 2024.	32
Figure 13 : Tronc de <i>Margaritaria Discoidea</i>	33
Figure 14 : Protocole d'extraction et d'isolement des composés à partir des racines de <i>Margaritaria discoidea</i>	41
Figure 15 : Spectre de masse HRESIMS du composé MD1	42
Figure 16 : Spectre de RMN ¹ H (600 MHz, Acetone-d ₆) de MD1	43
Figure 17 : Spectre COSY ¹ H- ¹ H (600 MHz, Acetone-d ₆) de MD1	45
Figure 18 : Corrélations clés du spectre COSY	46
Figure 19 : Spectre APT (150 MHz, Acetone-d ₆) de MD1	46
Les données RMN ¹³ C et APT présentent 32 atomes de carbones parmi lesquels :	46
Figure 20 : Quelques sous structures impliquées dans la structure MD1	47
Figure 21 : Spectre HMBC de MD1	48
Figure 22 : Quelques corrélations clés du spectre HMBC	49
Figure 23 : Spectre ROESY ¹ H- ¹ H (600 MHz, Acetone-d ₆) de MD1	49
Figure 24 : Corrélations clés du spectre ROESY	49
Figure 25 : Spectre de masse HRESIMS du composé MD3	54
Figure 26 : Spectre RMN ¹ H (600 MHz, Acetone-d ₆) de MD3.	55
Figure 27 : Spectre COSY ¹ H- ¹ H (600 MHz, Acetone-d ₆) de MD3	56
Figure 28 : Corrélations clés du spectre COSY	56
Figure 29 : Spectre APT/ (150 MHz, Acetone-d ₆) de MD3	57
Figure 30 : Quelques sous structure impliquées dans la structure de MD3.	58
Figure 31 : Spectre HMBC de MD3	58
Figure 32 : Corrélations clés du spectre HMBC de MD3.	59
Figure 33 : La représentation graphique 2D et 3D du score d'amarrage moléculaire de C1@6YCX, C2@6YCX, Arte@6YCX, et Chloro@6YCX, visualisés avec Biovia Discovery Studio et PyMOL.	63
Figure 34 : La représentation graphique 2D et 3D du score d'amarrage moléculaire de Arte@6YCX et Chloro@6YCX, visualisée avec les logiciels Biovia Discovery Studio and PyMOL.	64

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Voie de biosynthèse générale des squelettes de base des différentes classes de flavonoïdes (Harbone et wiliams, 2000).	8
---	---

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Déplacements chimiques des différents types de protons présents dans les flavonoïdes.....	14
Tableau II : Déplacements chimiques des atomes de carbone du cycle C des différents types de flavonoïdes (Heller et Forkman, 1988).....	14
Tableau III : Quelques monoflavonoïdes isolés du genre <i>Margaritaria</i>	19
Tableau IV : Quelques biflavonoïdes isolés de <i>Margaritaria</i>	20
Tableau V : Quelques coumarines isolées du genre <i>Margaritaria</i>	22
Tableau VI : Quelques terpénoïdes isolées du genre <i>Margaritaria</i>	24
Tableau VII : Classification botanique tropicale de <i>Margaritaria discoidea</i> (Lineaus et al., 1782 ; APG III, 2009).....	27
Tableau VIII : Quelques noms vernaculaires du genre <i>Margaritaria</i>	28
Tableau IX : Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Margaritaria discoidea</i> ... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	
Tableau X : Quelques biflavonoïdes isolés de <i>Margaritaria discoidea</i>	35
Tableau XI : Quelques alcaloïdes isolés de <i>Margaritaria discoidea</i>	36
Tableau XII : Données spectrales de RMN ¹ H (600 MHz, Acetone-d ₆), RMN ¹³ C (150 MHz, Acetone-d ₆) de MD1 comparées à celle trouvé dans la littérature.	52
Tableau XIII :..... Données spectrales RMN ¹ H (600 MHz, Acétone -d ₆), RMN ¹³ C (150 MHz, Acétone-d ₆) de MD3.....	61
Tableau XIV : Activité antiplasmodiale de l'extrait au méthanol des composés 1 et 2 isolés des racines de <i>Margaritaria Discoidea</i>	62
Tableau XV : Résultats de l'amarrage moléculaire, comparant l'interaction entre les composés étudiés (C1 et C2) et les médicaments standard Artésunate (Arte) et chloroquine (Chloro) contre la protéine réceptrice.	65
Tableau XVI : Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de <i>Margaritaria discoidea</i> après dégrossissement.....	71

RESUME

Le présent travail porte principalement sur la recherche des biflavonoïdes isolés des racines de *Margaritaria discoidea*, et l'évaluation de leur activité antiplasmodiale, enfin de valider l'effet thérapeutique de ces biflavonoïdes en simulation du Docking moléculaire. *Margaritaria discoidea* a été récolté dans la région de l'Adamaoua au Cameroun plus précisément dans la localité de Karna Manga. Les extraits de cette plante ont été obtenus en utilisant les solvants de polarité croissante (hexane, acétate d'éthyle et méthanol). L'extrait à l'acétate d'éthyle a fait l'objet de notre étude. Le fractionnement de cet extrait à l'aide de diverses techniques chromatographiques (Chromatographie sur colonne et chromatographie sur couche mince) a conduit à l'isolement de 4 composés indexés MD1, MD2, MD3, MD4. L'analyse structurale de ces composés réalisé à l'aide des techniques spectroscopiques modernes par comparaisons avec les données disponibles dans la littératures, nous ont permis d'identifier deux structures à savoir la 2,3-dihydroflavone-7'',7-O-dimethyl ether (MD1) et la 7,4'-dihydroxyflavonol-(C-3'(I)-O-C-4''(II))-7-hydroflavonol (MD3). Ces composés ont ensuite été évalués pour leur activité inhibitrice sur la souche résistante *NF₅₄* du *plasmodium falciparum*. Les résultats ont montré que le composé (MD1) présente une très bonne activité antiplasmodiale avec une $IC_{50} = 0,72 \pm 0,11 \mu M$, ce qui pourrait être attribué à la présence de 2 groupements méthoxylés fixés en position (C-7/C-7''). Le composé (MD3) a également démontré une activité antiplasmodiale avec une $IC_{50} = 8.16 \pm 1,50 \mu M$, en comparaison à la chloroquine et artésunate pris comme médicament de référence, présentant des IC_{50} respectives, tel que $IC_{50} = 0,006 \pm 0,002 \mu M$, et $IC_{50} = 0,002 \pm ND \mu M$. La bonne activité du composé MD3 pourrait être lié à la présence des deux groupements hydroxyles fixé en position (C-3/C-3'').

Les composés **1** et **2** ont montré des affinités de liaisons plus fortes contre la protéine réceptrice le 6YCX (à -10,0 kcal/mol et -9,4 kcal/mol respectivement), par rapport à l'artésunate (-8,7 kcal/mol) et à la chloroquine (-5,7 kcal/mol), ce qui suggère une meilleure interaction avec la protéine réceptrice, justifiant ainsi des études supplémentaires et un développement ultérieur en tant que nouveaux agents antipaludiques.

Cette étude souligne l'importance de la structure dans les recherches thérapeutiques sur les composés cibles et contribue à la recherche en cours de nouveaux médicaments contre le paludisme résistant aux médicaments causé par le parasite *P. falciparum*.

Mots clés : *Margaritaria discoidea*, biflavonoïdes, Docking moléculaire, *activité antiplasmodiale*.

ABSTRACT

The current work is principally on the research of isolated biflavonoids from the roots of *Margaritaria discoidea*, the evaluating of their antiplasmodial activities and finally to validate the therapeutic effects of these biflavonoids by molecular docking simulation. *Margaritaria discoidea* was collected in the adamaoua region of Cameroon, more precisely in the locality of Karna Manga. The extracts of this plant were obtained using the solvents of increasing polarity (hexane, ethyl acetate and methanol). The ethyl acetate extract was the subject of our study. Fractionation of this extract using various chromatographic techniques (column chromatography and thin layer chromatography) led to the isolation of 4 compounds indexed MD1, MD2, MD3, MD4. The structural analysis of these compounds using modern spectroscopy techniques and comparisons with literature data enabled us to identify the structure of two compounds, namely **2,3-dihydroflavone-7'',7-O-dimethylether (MD1)** and the second compound **7,4'-dihydroxyflavonol-(C-3'(I)-O-C-4''(II))-7-hydroxyflavonol (MD3)**. These compounds were subsequently evaluated for their inhibitory activity on the *NF₅₄* resistant strain of malaria *plasmodium falciparum*. This study showed that compound (MD1) had very good antiplasmodial activity with a $CI_{50} = 0,72 \pm 0,11 \mu M$, because (MD1) has 2 methoxylated groups attached to (C-7/C-7'') position and compound (MD3) also has good antiplasmodial activity with $CI_{50} = 8.16 \pm 1,50 \mu M$, compared with chloroquine and artesunate taken as reference drugs, with respective CI_{50} , such $CI_{50} = 0.006 \pm 0,002 \mu M$ and $CI_{50} = 0.002 \pm ND \mu M$. The low activity of compound 3 is due to the fact that, this compound has two hydroxyl groups attached to the (C-3/ C-3'') position.

Compounds 1 and 2 showed higher binding affinities against the 6YCX receptor protein at (-10,0 kcal/mol, -9,4 kcal/mol respectively), compared with artesunate (-8,7 kcal/mol) and chloroquine (-5,7 kcal/mol), suggesting a better interaction with the receptor protein, justifying further studies and subsequent development as new antimalarial agents.

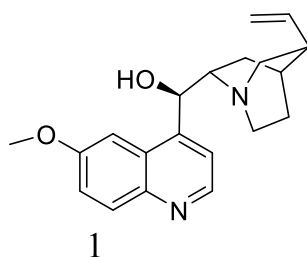
This study highlights the importance of structure in therapeutic research on target compound and is contributing to the ongoing search for new drugs to combat drug-resistant malaria caused by the *Plasmodium falciparum* parasite.

Key Words: *Margaritaria discoidea*, biflavonoids, molecular docking, antiplasmodial activity.



INTRODUCTION

Le paludisme est considéré comme l'un des plus grands défis de santé publique auxquels sont confrontées les régions tropicales du monde aujourd'hui. Selon l'OMS, le paludisme est une maladie potentiellement mortelle qui est transmise à l'être humain par des piqûres de certains types de moustiques (OMS, 2024). Il s'agit d'une maladie évitable et dont on peut guérir. En effet, il existe 4 formes de parasites liés à des paludismes différents tel que : *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, et le *Plasmodium Falciparum* qui est le plus dangereux. Cette maladie est causée par le parasite protozoaire *Plasmodium spp.*, qui touche de manière disproportionnée l'Afrique en raison d'une combinaison de facteurs environnementaux et socio-économiques qui favorisent sa propagation sur le continent (Mbacham W. et al.,2019) (Okoro O. et al.,2023) (Okwa O. et al.,2012). L'Organisation mondiale de la santé estime qu'en 2021, le paludisme a été responsable de 247 millions de cas et de 619000 décès, dont plus de 95% ont été enregistrés en Afrique, en particulier chez les enfants de moins de cinq ans (Fu G. et al.,2024). Au Cameroun, le paludisme reste la première cause de morbidité, il représente environ 45,5% des consultations de santé, et 23% des hospitalisations (Edmondson.,2024). La situation est d'autant plus préoccupante que depuis plusieurs années les parasites développent des résistances aux molécules antipaludiques. D'où la recherche de nouveaux médicaments antipaludiques issus des produits naturels contre des nouveaux mécanisme d'action sur les souches *NF54* du *Plasmodium falciparum*. La Quinine **1** est l'un de ces médicaments antipaludiques isolée des écorces de *Cinchona officinalis* (*Quinquina officinal*), appartenant à la famille des Rubiaceae. Mais on constate une augmentation de la résistance à ce médicament qui est une véritable source d'inquiétude pour le milieu médical. Si rien n'est fait, le milieu médical peut se retrouver appauvri face à cette maladie. Il est donc urgent de trouver les nouveaux médicaments pour l'être humain à faible toxicité et accessible à tous.



Dans le cadre de la préparation de mon mémoire de master, il m'a été confié la tâche de contribuer à ce vaste programme en procédant à l'isolement et la caractérisation des biflavonoïdes extraits des racines de *Margaritaria discoidea* en vue d'évaluer leur potentiel antipaludéens puissant en simulation avec le Docking moléculaire. Cette plante est couramment utilisée par les guérisseurs traditionnels dans la région de l'Ouest Cameroun pour traiter le paludisme, les plaies et les infections cutanées (Mensah et al., 1990), et les œdèmes (Obiri et al., 2014).

Cependant les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes caractérisé par une structure de base commune constitué de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne de trois atomes de carbones (C6-C3-C6), souvent cyclisée pour former un hétérocycle oxygéné à six chaînons (**Harbone et Baxter 1999**). Les biflavonoïdes quant à eux, sont des composés phénoliques constitué de deux unités flavonoïdiques identiques ou différents reliées de manière symétriques ou asymétriques par la liaison de type C-C ou C-O-C. Bien que les biflavonoïdes soient présentés dans les diverses espèces végétales, peu d'études en ce qui concerne notre famille de plante ont été menées sur leurs activités antiplasmodiales. Pourtant les biflavonoïdes présentent un avantage sur leurs monomères flavonoïdiques du fait qu'elles sont capables de survivre lors de la première étape de leur métabolisme, là où les flavonoïdes deviennent inactifs (**Messi et al., 2022**). La présence et la position des groupements hydroxyles et méthoxyles sur leur structure moléculaire seraient déterminantes dans l'expression de leur activité antiplasmodiale.

A cet effet, l'objectif général du présent travail est d'identifier et caractériser les biflavonoïdes des racines de *Margaritaria discoidea*, d'évaluer leur activité anti plasmodiale sur les souches résistantes *NF₅₄* du *Plasmodium falciparum*, et élucider leur mécanisme d'action à l'aide du Docking moléculaire.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Extraire les métabolites secondaires des racines de *Margaritaria discoidea* en utilisant les solvants organiques selon le gradient de polarité croissante.
 - Isoler et caractériser les biflavonoïdes des racines de *Margaritaria discoidea* à l'aide des techniques d'analyses spectroscopiques et spectrométriques modernes.
 - Evaluer l'activité inhibitrice des biflavonoïdes isolées des racines de *Margaritaria discoidea* sur les cellules souches résistantes *NF₅₄* du *plasmodium falciparum*.
 - Valider l'effet thérapeutique de ces biflavonoïdes par les études du Docking moléculaire.
-
- Ce mémoire s'articule autour de trois chapitres :
 - Le premier est consacré à la revue de littérature ;
 - Le second porte sur les travaux personnels recherchés ;
 - Le troisième présente la partie expérimentale.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE

I.1. Généralités sur les flavonoïdes

Le nom flavonoïde dérive du mot latin « *flavus* » signifiant jaune (Gerhard.,1993). Cependant les premiers flavonoïdes qui ont été obtenus à l'état pur (le Morin) ont été isolés par E. Chevreul, en 1814 et bien après cela, plus précisément en 1937 les travaux du hongrois, Szent-Györgyi (prix Nobel) sur le scorbut ont révélé la présence des flavonoïdes (dans le Zest d'un citron). A cet effet il donna donc le nom de ce flavonoïde « vitamine P », P signifiant perméabilité (Bruneton.,1993). Les flavonoïdes sont par ailleurs des pigments colorés largement rependu dans le règne végétal. Il s'agit des composés poly phénoliques ayant la forme des métabolites secondaires des végétaux (Marouf et Joel.,2007). Ces derniers peuvent être considérés comme les micronutriments, ceci grâce à leur multiple propriété biologique dans la mesure où il en existe plus de 6000 flavonoïdes identifiés. (Erlund et al., 2004).

I.1.1. Structures chimiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique qui leurs sont communes et possèdent tous un squelette de base à 15 atomes de carbones, constitués de deux cycles aromatiques C6 (A et B), reliés entre eux par une chaîne (pont) possédant trois atomes de carbones. Les noyaux peuvent être portés par des atomes de carbone 1 et 3 pour les flavonoïdes- réguliers, ou 1 et 2 de la courte chaîne (flavonoïde transposé) (figure 3). Les réguliers connu forme environ 80% tandis que les transposé connus constituent 20%. (Bruneton,1999). Ceci étant, la cyclisation de cette chaîne en utilisant l'un des noyaux aromatiques conduit à la formation d'un noyau benzopyranes (cycle C), laissant ainsi désignés le type phenyl-benzopyrane de structure C6-C3-C6. (Roman et al., 2006). Quant à la numérotation, elle débute sur le noyau benzopyrane et suit le sens des aiguilles d'une montre, donc la position 1 est sur l'atome O (Oxygène) du noyau pyranique. La numérotation sur le cycle B est parallèle à celle du noyau benzopyrène sauf qu'ici, on ajoute l'indice (') (Bruneton, 1999 ; IUPAC, 2017 ; Gontijo et al., 2017).

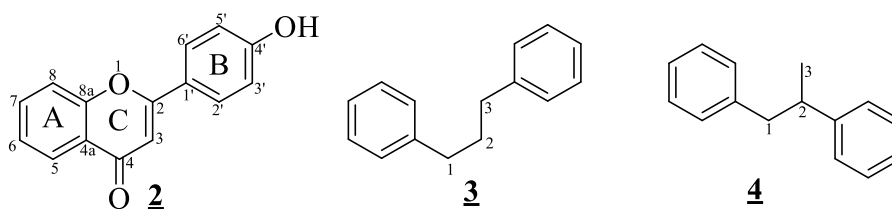
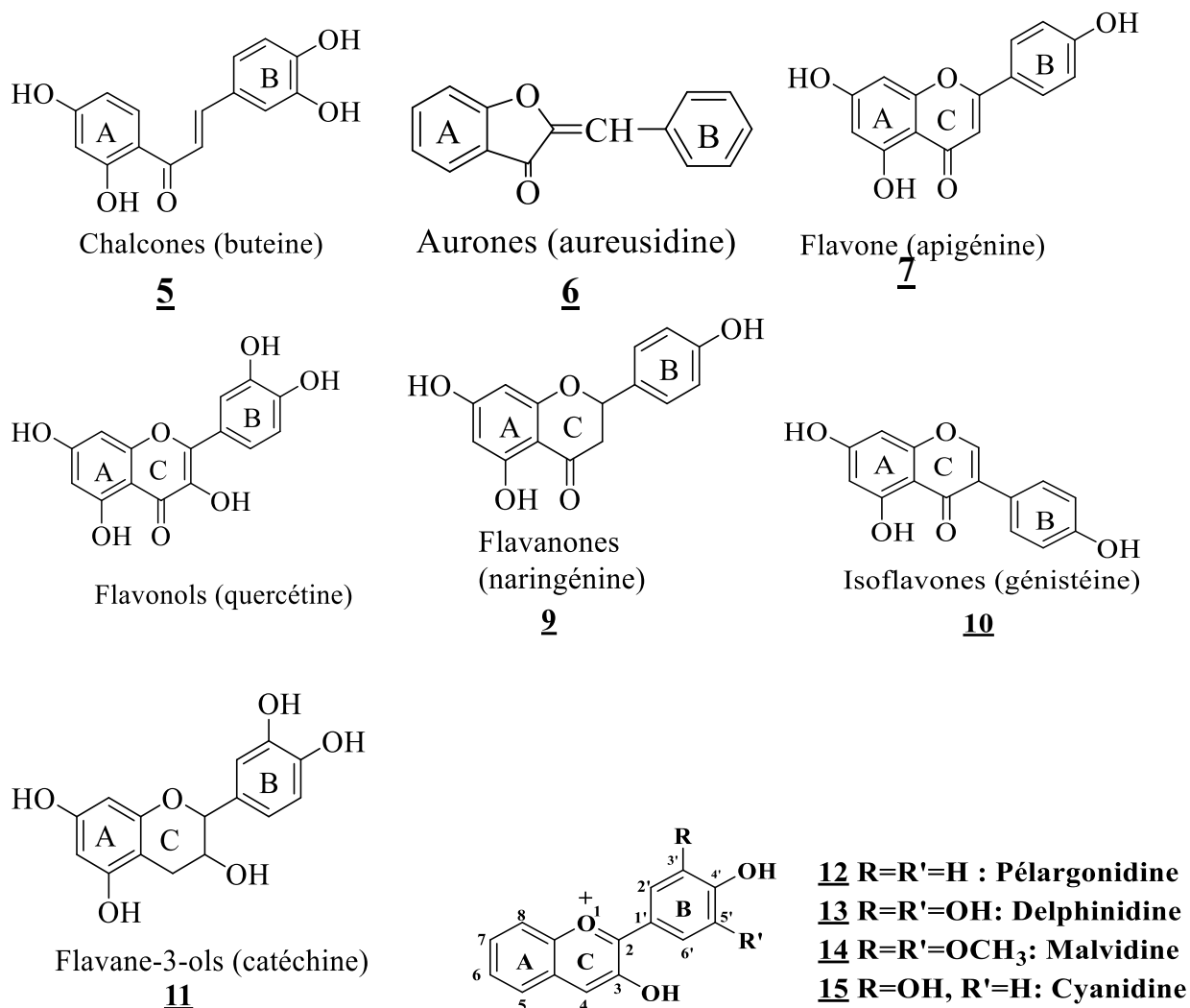


Figure 1 : Squelettes de bases des flavonoïdes (Bruneton, 1999 ; Gontijo et al., 2017)

I.1.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent également une diversité structurale très importante. En 2020, plus de 10000 structures ont été identifiés (Glevitzky et al., 2019). Ces diverses structures se rencontrent

aussi bien sous la forme libre ou (aglycones) ou sous la forme glycosides. Ainsi, les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation des différents cycles (cycles pyrones en particulier), le niveau de méthylation et hydroxylation (groupement O-CH₃ et OH). Enfin le niveau de glycosylation (**Macheix et al., 2005**). La figure ci-dessous représente les différentes classes de flavonoïdes.



I.1.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes

Au vu de ce qui précède, le classement ainsi représenté ci-dessus nécessite la présence d'un schéma de biosynthèse pour mieux comprendre la genèse des flavonoïdes. Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes, mais certains sont ensuite transporté et accumulé dans les vacuoles (**Kawaltowski et al., 2001**). Le squelette de bases des flavonoïdes présente une double origine métabolique : celle de la voie shikimique qui fournit le noyau B et la courte chaîne de trois carbones le précurseur cinnamate CoA et celle d'une condensation des unités acétates pour former son précurseur, le malonate CoA. (**Harbone et wiliam, 2000**).

Dans la première origine, une molécule de para-coumaryol CoA issues de la désamination de phénylalanine par une enzyme appelée PAL, qui est une voie bien connue de l'acide shikimique pour le cycle B et l'hétérocycle C (**Pascale et véronique, 2006**).

Dans la deuxième origine, la formation des flavonoïdes est la condensation catalysée par la chalcone synthétase de trois molécules de malonyl CoA, avec une molécule de para-coumaryole CoA, donnant ainsi naissance à une chalcone qui a son tour, grâce à une cyclisation (formation du noyau pyrone) donnera naissance aux flavonoïdes de diverses classes. (**Pascale et véronique, 2006**).

A cet effet, la biosynthèse des flavonoïdes nécessite un bon nombre de réactions complexe comprenant des hydroxylations, méthylation, glycosylation ainsi que bien d'autres 5tel que représenté sur le schéma ci-dessous.

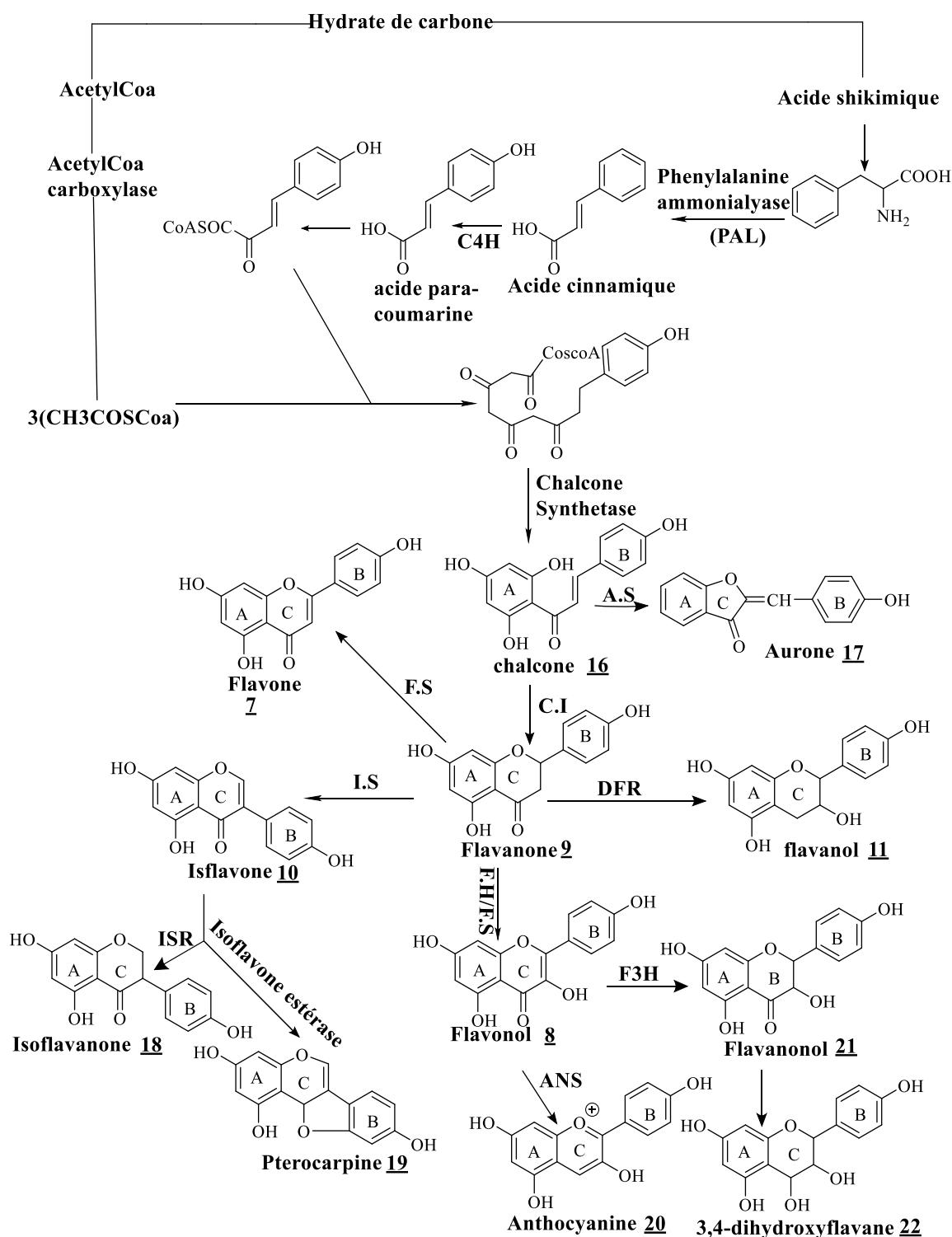


Schéma 1 : Voie de biosynthèse générale des squelettes de base des différentes classes de flavonoïdes (Harbone et wiliams, 2000).

Mots clés : **C.I.** : Chalcone isomérise, **F3H** : Flavanone-3-hydroxylase ; **If.S** : isoflavane synthase, **F.S** : flavone synthase, **AN.S** : Anthocyanidine synthase **DFR** : dihydroflavone réductase, **FLS** : flavonol synthase, **C4H** : Cinnamate 4-hydroxylate, **A.S** : Aurone synthase, **F.S** : flavone hydroxylase, **IS.R** : Isoflavonone réductase, **I.S** : Isoflavonone synthase

I.2. Généralité sur les biflavonoïdes

Le genre *Margaritaria* est reconnu très riche en biflavonoïdes. Structurellement, les biflavonoïdes sont des molécules polyphénoliques comprenant deux unités flavonoïdiques identiques ou différentes jointes de manière symétrique ou asymétrique par des liaisons (C-C) ou (C-O-C). Cette possibilité confère aux biflavonoïdes, une variation structurale qui pourrait être amplifiée par les positions des groupements fonctionnels à l'instar des groupements OH, MeO, C=O ou C=C et des centres stéréogéniques. A notre connaissance, plusieurs biflavonoïdes de type flavone-flavone (29) ont été isolés du genre *Margaritaria*. Les biflavonoïdes sont aussi les dimères de flavonoïdes monomères, à savoir la flavone, la chalcone, le flavanol, qui varient en fonction du schéma d'oxygénation de leurs monomères sur C-2/3/4/5/6/8/2'/3'/4' dans les anneaux A, B, C tel que -OH, -OCH₃, etc.

Les biflavonoïdes naturels existent principalement dans les fougères et les gymnospermes, en particulier dans les genres de plantes. Elles ont des activités pharmacologiques variées, telle que l'anticancéreux, l'anti-inflammatoire, l'anti-oxydation, l'antivirus, la dilatation vasculaire périphérique.

Jusqu'à présent, près de 100 biflavonoïdes différents ont été signalés d'après les données des références connexes et des recherches ultérieures (**Jiang et al., 2017**).

I.2.1. Biosynthèse des biflavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes est une étape importante pour façonner les biflavonoïdes dans les plantes. Les principales voies de biosynthèse des flavonoïdes partent du métabolisme des phénylpropanoïdes, jusqu'à la chalcone (trihydroxychalcone). La tétra hydroxychalcone est isomérisée à partir de la naringénine, un intermédiaire clé, qui peut se transformer en plusieurs flavonoïdes terminaux (**Alzand et al., 2012**).

En outre, la biosynthèse des biflavonoïdes peut améliorer le rendement des biflavonoïdes dans les plantes en modifiant les différents enzymes catalytiques ou éliciteurs. Par la suite, Gommès-Copeland ont constaté que la biosynthèse de l'Amentoflavone était supérieure à celle de l'agatisflavone. Cela semble être lié au type de liaison entre unités de flavonoïdes (**Gommès-Copeland et al., 2018**).

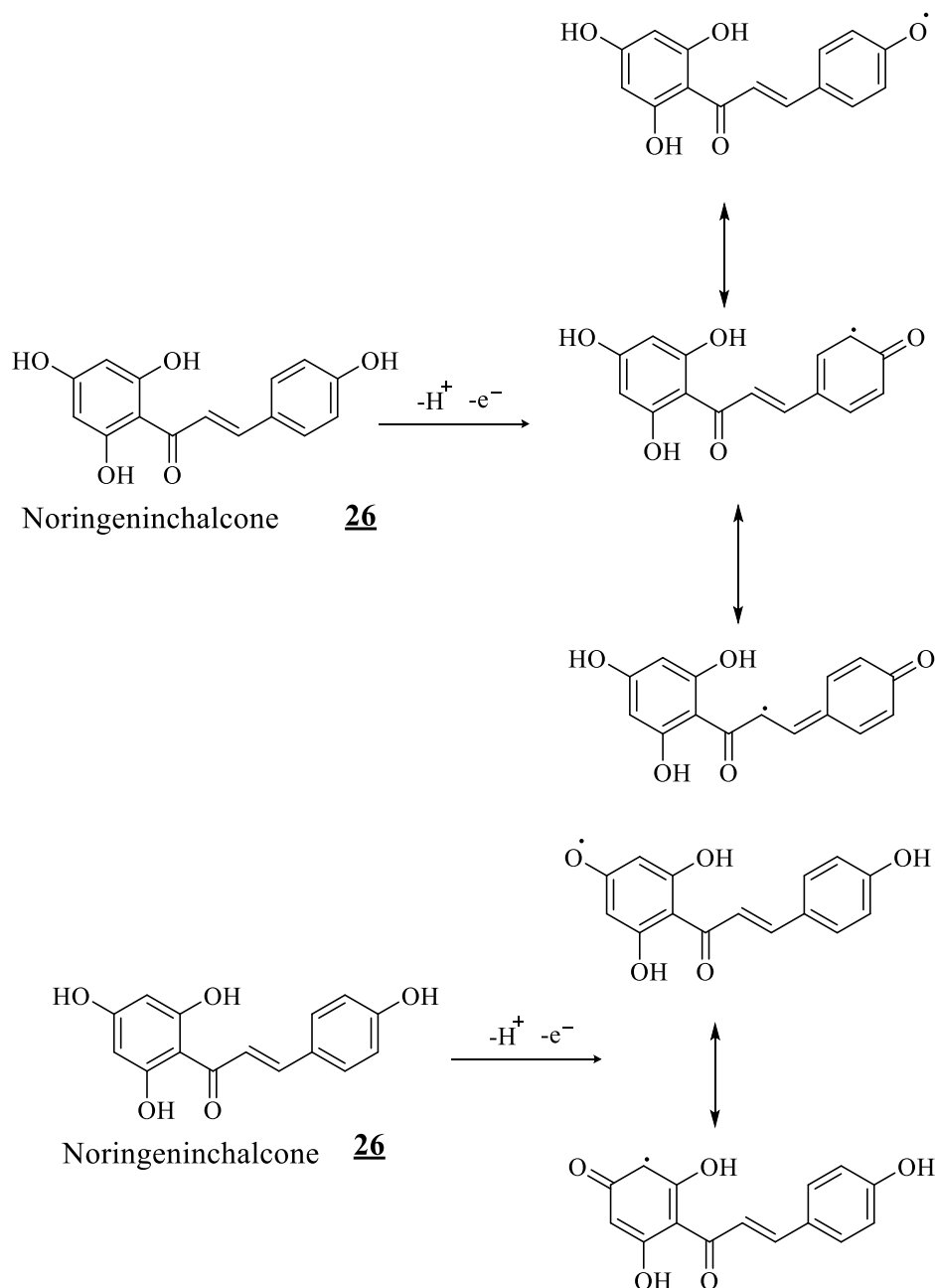


Figure 2 : Mécanisme de formation du précurseur de la biosynthèse des biflavonoïdes à partir de la Noringeninichalcone (Jackson *et al.*, 1971).

I.3. METHODES SPECTROSCOPIQUES UTILES DANS LA DETERMINATION DES STRUCTURES DES FLAVONOÏDES

I.3.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode de détermination des structures parfois indispensable. C'est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer la masse moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus. Elle a pour avantage sur les autres techniques qu'elle nécessite de très faibles

quantités de produits. Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduites dans l'appareillage. Dans le cas des flavonoïdes, les spectres de masse peuvent être enregistrés en mode d'ionisation positif ou négatif. La masse de l'ion quasi moléculaire y est observée.

Il existe plusieurs méthodes d'analyses en spectrométrie de masse. Celles généralement utilisées sont énumérées ci-dessous :

- L'électrospray ou l'ionisation par électronébulisation (ESI)
- L'ionisation par impact électronique (IE)
- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)
- L'analyseur à temps de vol ou « Time of Flight » (TOF)
- Le Fast Atom Bombardment (FAB)

I.3.2. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur les propriétés des molécules à absorber les radiations lumineuses de longueurs d'onde déterminées, comprises entre 200 et 400 nm pour l'UV et entre 400 et 800 nm pour le visible. Ces longueurs d'ondes varient selon les différents types de flavonoïdes, on observe pour chaque cas :

Flavones et flavonols

Les spectres UV-visibles des flavones et des flavonols présentent généralement deux maximas d'absorption (**Mabry *et al.*, 1970**) :

- la bande II entre 240 et 280 nm associée à l'absorbance du cycle A.
- la bande I entre 300 et 380 nm associée à l'absorbance du cycle B.

La position de la bande I sur le spectre UV est caractéristique du type de flavonoïde considéré et de son degré d'oxygénation. Pour les flavones, cette bande se situe ainsi entre 304 et 350 nm, tandis que pour les flavanols, elle se situe entre 352 et 385 nm.

Cependant dans le cas des flavonols substitués en position 3 par un méthoxyle ou un glycosyle, la bande 1 se situe entre 328 et 357 nm, soit aux mêmes valeurs que la bande I des flavones.

Isoflavones, flavanones et dihydroflavonols

Les isoflavones, flavanones et dihydroflavonols se distinguent des flavones et des flavanols par un spectre UV qui comporte une bande II très intense avec seulement un épaulement et un pic de faible intensité représentant la bande I.

Le maximum d'absorption des isoflavones se situe entre 245 et 270 nm, alors que celui des flavanones et des dihydroflavonols se situe entre 270 et 295 nm. Le degré d'oxygénation du cycle B des isoflavones n'affecte pas le spectre UV tandis que dans le cas du cycle A, l'augmentation de celui-ci produit un effet bathochrome (**Mabry *et al.*, 1970**).

Anthocyanes

Les spectres UV-visibles des anthocyanes (sous forme de cation flavylium en condition acide dans le méthanol-HCl) possèdent deux maximas d'absorption :

- la bande I entre 465 et 560 nm de forte intensité associée à l'absorbance du cycle B.
- la bande II entre 265 et 280 nm d'intensité moyenne associée à l'absorbance du cycle A.

I.3.3. Infra-Rouge

La spectroscopie Infra-Rouge permet d'identifier les différents groupements fonctionnels présents dans une molécule à partir des fréquences de vibration observables sur le spectre. On observe sur les spectres, diverses fréquences de vibrations caractéristiques. Elles sont comprises entre 900 et 4000 cm^{-1} . Les vibrations des liaisons simples se situent entre 900 et 1500 cm^{-1} , celles des liaisons C=O, C=N et C=C se situent entre 1500 et 1800 cm^{-1} , celles des triples liaisons entre 2100 et 2300 cm^{-1} , les liaisons C-H entre 2800 et 3200 cm^{-1} et enfin les liaisons hétéroatomes -H entre 3200 et 4000 cm^{-1} . Chez les flavonoïdes nous observons généralement la vibration de valence du carbonyle (C=O) qui donne une bande très intense entre 1700-1750 cm^{-1} , celle des doubles liaisons C=C entre 1625-1660 cm^{-1} , celles des vibrations de valence du noyau aromatique entre 1500-1600 cm^{-1} , celles de la liaison C-O généralement entre 1050-1150 cm^{-1} et une large bande d'absorption entre 3200-3600 cm^{-1} caractéristique des groupements hydroxyyles.

I.3.4. RMN 1D et 2D

❖ RMN 1D

En général, le cycle A des flavonoïdes est hydroxylé en position 5 et 7. Les protons H-6 et H-8 apparaissent sous forme de doublets ($J = 2,5$ Hz) entre 5,7 et 6,5 ppm. Le signal du H-8 est toujours légèrement plus déblindé que celui du H-6. La présence d'une glycosylation en position 7 déplace les deux signaux d'environ + 0,2 ppm. Dans le DMSO, le déplacement chimique du proton d'une

fonction hydroxyle en 5 se situe entre 12 et 14 ppm, ce fort déblindage étant dû à une liaison hydrogène contractée avec la fonction carbonyle en position 4.

Les protons du cycle B présentent habituellement des déplacements chimiques entre 6.5 et 8.1 ppm. Ces signaux peuvent apporter des informations sur le degré d'oxygénation des cycles B et C. Si le cycle B est oxygéné uniquement en position 4', on observera alors deux doublets ($J = 8,5\text{Hz}$). Le doublet des protons équivalents H-3' et H-5' est toujours plus blindé (déplacement chimique compris entre 6,5 et 7,1 ppm) que celui des protons H-2' et H-6', quel que soit le type de flavonoïde. Par contre, le déplacement chimique du doublet associé aux H-2' et H-6' dépend du degré d'oxydation du cycle C. Le spectre de RMN des flavonoïdes oxygénés en position 3' et 4' est plus complexe car le cycle B comporte alors trois protons non-équivalents. Pour les flavones et flavanols, le H-5' apparaît sous forme de doublet ($J = 8,5\text{Hz}$) entre 6,7 et 7,1 ppm, le H-6' sous forme de doublet dédoublé ($J = 2,5$ et $8,5$ Hz) et le H-2' sous forme de doublet ($J = 2,5$ Hz). Ces deux derniers ont souvent des déplacements chimiques proches voire identiques, entre 7,2 et 7,9 ppm. Dans le cas des flavonoïdes trihydroxylés sur le cycle B, les protons H-2' et H-6' sont magnétiquement équivalents. Il en résulte un unique singulet entre 6,5 et 7,5 ppm (**Mabry *et al.*, 1970**).

Certains déplacements chimiques sont caractéristiques du type de flavonoïde étudié (Tableau IV). Par exemple, le proton H-2 d'une isoflavone apparaît sous forme de singulet entre 7,5 et 8,0 ppm, alors que le proton H-3 d'une flavone est en général plus blindé (environ 6,3 ppm). Le spectre de RMN-¹H des flavanones montre des signaux caractéristiques résultant des interactions entre H-2, H-3 *trans* et H-3 *cis*. Le proton H-2 apparaît comme un doublet dédoublé entre 5 et 6 ppm et les deux protons en position 3 apparaissent sous la forme d'un multiplet entre 2,5 et 3 ppm. La situation des dihydroflavonols est plus simple puisque seuls deux hydrogènes sont présents sur ces positions, chacun apparaissant sous la forme d'un doublet : H-2 à environ 5,2 ppm et H-3 à environ 4,2 ppm. Les protons des cycles A et B des aurones présentent des déplacements chimiques similaires à ceux des autres flavonoïdes. La seule différence provient du proton =C-H, résonnant entre 6,4 et 6,9 ppm. Sur le spectre de RMN-¹H des chalcones, les protons α et β de la double liaison apparaissent sous forme de doublets ($J = 14-17$ Hz), respectivement entre 6,7 – 7,4 et 7,3 – 7,7 ppm. La RMN du proton est aussi très utile dans la détermination des structures des flavonoïdes glycosylés. Par exemple, le proton anomérique du glucose a un déplacement chimique (environ 5,85 ppm) bien différent de celui du rhamnose (environ 4,2 ppm)

Tableau I : Déplacements chimiques des différents types de protons présents dans les flavonoïdes.

¹ H	δ,ppm
5-OH	12-14
Cycle B	6,5-8,1
Cycle A	5,7-6,9
H-4 anthocyanes	6,0-8,0
H-2 isoflavones	7,5-8
H-3 flavones	6,3 environ
H-2 flavanones	5,0-6,0
H-3 flavanones	2,5-3
Protons anomériques des sucres	4-6
Autres protons des sucres	3-4
Méthoxyles	3,5-4

Le spectre de RMN-¹³C des flavonoïdes peut aussi être utile dans leur détermination structurale. Les différents types d'aglycones ne sont pas distinguables sur la base des déplacements chimiques des carbones aromatiques des cycles A et B. Par contre les déplacements chimiques des 3 carbones du cycle C sont souvent distinctifs. Le Tableau V résume les déplacements chimiques de ces 3 carbones pour les différents types d'aglycones.

Tableau II : Déplacements chimiques des atomes de carbone du cycle C des différents types de flavonoïdes (Heller et Forkman, 1988)

Type aglycone	C-2	C-3	>C=O
Chalcones	136,9-145,4 (C _α)	116,6-128 (C _β)	188,6-194
Flavanones	75,0-80,3	42,8-44,6	189,5-195,5
Flavones	160,5-165	103-111,8	176,3-184
Flavonols	145-150	136-139	172-177
Isoflavones	149,8-155,4	122,3-125,9	174,5-181

Aurones	146,1-147,7	111,6-111,9 (=CH)	182,5-182,7
Anthocyanes	155-168	136-158	135-144

❖ **RMN 2D**

Les techniques RMN 2D fournissent plusieurs renseignements dans la détermination des structures. A cet effet, il existe plusieurs types de techniques spectroscopiques de RMN 2D : COSY ^1H - ^1H , COSY ^{13}C - ^{13}C (INADEQUATE), NOESY (homonucléaire) et HMQC, HSQC et HMBC (hétéronucléaire).

➤ **Le spectre COSY ^1H - ^1H**

Il permet à l'aide des pics d'intersections de mettre en évidence les couplages entre protons. Ces corrélations entre protons apportent des informations sur la proximité des protons dans la structure moléculaire du composé.

➤ **Le spectre COSY ^{13}C - ^{13}C (INADEQUATE)**

Il permet de mettre en évidence la connexion entre les atomes de carbone et permet de construire directement le squelette carboné de la molécule. Sachant que la probabilité d'observer un couplage ^{13}C - ^{13}C est de 1/10000, il faut que le produit soit en grande quantité pour que l'expérience puisse être réalisée.

➤ **NOESY :couplage dipolaire**

Cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

➤ **HSQC ($^1\text{JH-C}$)**

Cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons qui leur sont directement liés. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

➤ **Spectres HMQC et HMBC**

L'application des expériences HMQC et HMBC conduit à la détermination plus aisée des structures moléculaires. Elles permettent une augmentation de la sensibilité des noyaux autres que celui du proton. Le HMQC met en évidence les couplages $^1\text{J } ^1\text{H}$ - ^{13}C et le HMBC les couplages ^2J et ^3J . Cette technique permet ainsi d'attribuer les déplacements chimiques aux carbones quaternaires et à ceux liés à un hétéroatome et même de relier les sous-structures.

I.4. Généralités sur le genre *Margaritaria*

Margaritaria est une plante à fleur appartenant à la famille des Euphorbiaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle. Il se trouve précisément, dans les régions tropicales d'Asie, d'Afrique, d'Australie, d'Amérique du Nord, du Sud et de divers îles océaniques (Govaert et al.,2000). Selon *plant List en 2022*, on dénombre 41 espèces de *Margaritaria*, donc les plus usuelles sont : *Margaritaria nobilis*, *Margaritaria discoidea*, *Margaritaria indica*, *Margaritaria anormala*.

I.4.1. Différents types des espèces du Genre *Margaritaria*



Margaritaria nobilis (L.f.,1782)



Margaritaria discoidea (Webster.,1967)



Margaritaria indica (Airy .,1967)



Margaritaria anormala (Baill.,1969)

Figure 3 : Photographie de quelques espèces du genre *Margaritaria*.

Les études phytochimiques antérieures ont révélé que le genre *Margaritaria* est une source prolifique de flavonoïdes, biflavonoïdes, coumarines et terpénoïdes. Certains de ces composés ainsi que leurs extraits bruts présentent des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antioxydantes, antibactériennes et enfin antiplasmodiale (Lawal et al.,2015).

I.4.2. Description botanique du genre *Margaritaria*.

Les plantes du genre *Margaritaria* sont des arbustes ou petits arbres à feuilles caduques avec une couronne étalée. Ces feuilles sont simples, alternées et entières (Hutchinson et al.,1931), atteignant généralement 20 cm de longueur. Les fleurs sont parfumées et visitées par les abeilles et

d'autres insectes (**Burkil et al.,2004**). Ces fleurs sont petites, jaunes ou vertes et apparaissent en inflorescences (**Airy et al.,1975**). Ces fruits sont des capsules ou des baies (**Webster et al.,1976**). L'arbuste de *Margaritaria* est généralement très ramifié, de 1 à 5 m de haut ou arbre jusqu' à 25m de haut.

Les branches de *Margaritaria* sont généralement pendantes, ses rameaux sont grisâtres ou brunâtres, et lenticelles. Ses écorces sont grises ou brunes, légèrement striées, molles, épaisses, s'écaillant ensuite en longue bande irrégulières. (**Radcliffe et al.,1996**).

Le fruit subglobuleux bleue comestible mesure jusqu'à 13mm de large et contient une seule grosse graine. Elle a légèrement ou profondément (2) (4) -lobes, lisses ou verruqueux.

Les graines sont exotesta charnues, planoconvexes, lisses. Les feuilles sont simples, ovales à obovales ; vert vif. Les fleurs sont discrètes, vert jaunâtres (**Bredenkamp et al.,2019**).

I.4.3. Distribution géographique des espèces de *Margaritaria*.

Margaritaria est présente dans les regions tropicales et subtropicales de l'Afrique, de l'Asie, et de l'Amerique. Les espèces de *Margaritaria* sont reparties dans les regions d'Asie, d'Afrique , d'Amérique du Nord et du Sud, enfin dans les îles océaniques (**Govaert et al .,2000**).

La figure geographique ci-dessous du genre *Margaritaria* est reparti de la manière suivante.

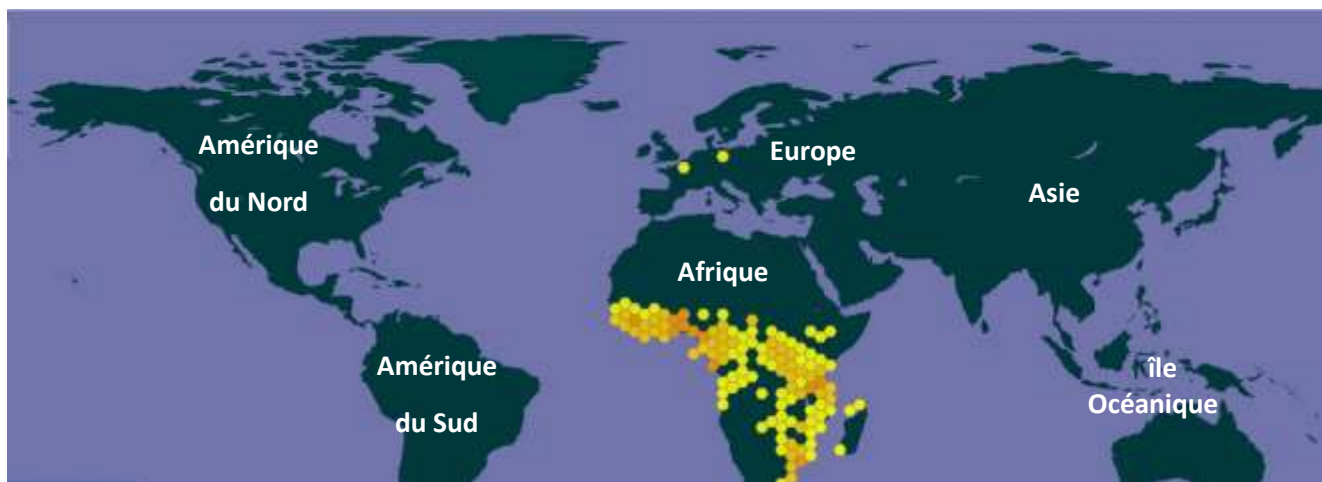


Figure 4 : Distribution géographique des espèces du genre *Margaritaria*.(**WCVP,2022**).

I.2.3. Usage ethnopharmacologique des plantes du genre *Margaritaria*

Plusieurs espèces du genre *Margaritaria* ont longtemps été utilisées en Asie, en Australie, en Amérique du nord et du sud, dans les diverses îles océaniques et en Afrique, comme médicaments traditionnelle. Par exemple *Margaritaria discoidea*, communément appelé « kotika » au Cameroun, est un arbuste dont les rameaux feuillus sont utilisés traditionnellement par décoction pour le traitement des affections digestives, dysenteries, hémorroïdes (**Randrianarivony et al.,2017**). En

chine les feuilles et leurs prescriptions sont utilisées pour traiter l'hépatite B, l'hypertension, l'hydropisie et les maux de gorges (Martimucci et al.,2022).

Puis nous avons *Margaritaria indica*, communément appelé « indian » en Inde et « *Margaritaria* » en Afrique du Sud, est utilisée pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, diarrhées, vomissements (Chopra et al.,1956). Elle est aussi appelée « Ma ji ao hua » en chine et est utilisée pour le traitement des infections urinaires et le traitement des troubles nerveux (Oyemitan et al.,2013),et

Ensuite *Margaritaria nobilis*, encore appelé « noble » au Cameroun et en République Centrafricaine est utilisée pour le traitement des infections respiratoires, toux et les fièvres (Adjanohoun et al.,1989). On appelle aussi *Margaritaria nobilis* « Mwambao » chez le swahili en Tanzanie. Elle est utilisée pour traiter la fièvre, les troubles gastriques (Akhtar et al.,2018).

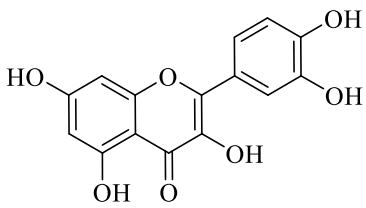
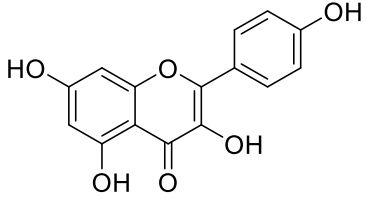
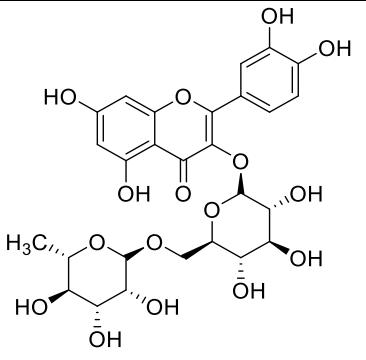
I.4.4. Constituants chimiques du genre *Margaritaria*.

Dans la littérature, le genre *Margaritaria* compte à notre connaissance plusieurs constituants chimiques à l'instar des flavonoïdes, des biflavonoïdes, des coumarines et des terpénoïdes, des alcaloïdes. Il est à noter que les biflavonoïdes et les flavonoïdes font l'objet de notre recherche.

I.4.4.1. Monoflavonoïdes isolés du genre *Margaritaria*.

A notre connaissance, plusieurs flavonoïdes ont été isolés du genre *Margaritaria* (Ekuadzi et al., 2014). C'est ainsi que nous avons la **Quercétine 8** qui est l'un des plus puissants et abondants des flavonoïdes, elle a été isolée de *Margaritaria nobilis* (Len et al.,2015) ; par ailleurs la **Kaempférol 22** a été isolée de *Margaritaria nobilis* (Len et al.,2015) ; et *Margaritaria rubra* (Kanchanapoom et al., 2017). Enfin, la **rutine 24** isolé à partir des espèces tels que la *Margaritaria formosana*. (Ferreira et al., 1985).

Tableau III : Quelques monoflavonoïdes isolés du genre *Margaritaria*

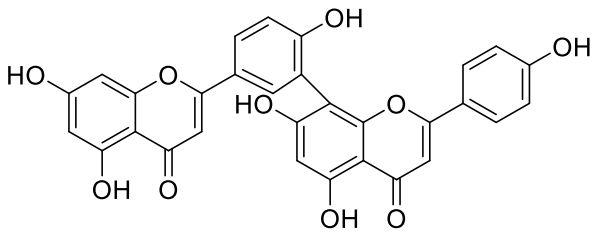
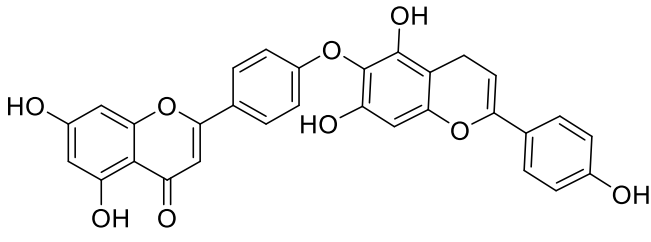
Structure	Sources	Références
 <p>Quercétine <u>8</u></p>	<i>Margaritaria nobilis</i>	(Len et al., 2015).
 <p>Kaempférol <u>22</u></p>	- <i>Margaritaria nobilis</i>	-(Len et al., 2015)
 <p>Rutine <u>24</u></p>	<i>Margaritaria formosana</i>	(Ferreira et al., 1985).
	- <i>Margaritaria rubra</i>	-(Kanchanapoom et al., 2017).

I.4.5. Biflavonoïdes isolés du genre *Margaritaria*.

En effet, Amentoflavone 27 : c'est la biflavonoïde la plus courant et la plus largement rependu dans le genre *Margaritaria*. Il a été isolé de plusieurs espèces, notamment *Margaritaria Sinensis* (Ngadjui et al., 2004). Elle présente de nombres activités biologiques intéressantes, notamment des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices (Foyet et al., 2013).

Hinokiflavone 28 : cette biflavonoïde a été identifié dans *Margaritaria Sinensis* : (Kanchanapoom et al.,2017).

Tableau IV : Quelques biflavonoïdes isolés de *Margaritaria*.

Structure	Sources	References
 <p>Amentoflavone <u>27</u></p>	<i>-Margaritaria sinensis</i>	(Ngadjui et al., 2004)
 <p>Hinokiflavone <u>28</u></p>	<i>Margaritaria sinensis</i>	(Kanchanapoom et al., 2017).

1.5. Autre métabolites secondaires isolés du genre *Margaritaria*

1.5.1. Généralités sur les coumarines

Le nom coumarine vient de “coumarou”, nom vernaculaire de la « fièvre tonka » qui est le fruit d’un arbre (*Dipterix odorata Wild, syn. Coumarouna odorata Aubl.*) appartenant à la famille des Fabacées (papilionacée ou légumineuse) et qui est cultivé en Amérique du Sud. De ce fruit, on a pu isoler en 1820 pour la première fois une substance cristalline appelée coumarines (**Hostettmann, 1992**). Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base la benzo-2-pyrone (C6-C3) (**Muanda, 2010**), que l’on peut considérer comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-z-cinnamiques (**Brueneton, 1999**).

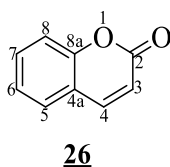


Figure 5 : Squelette de base d’une coumarine (Brueneton, 1999).

1.5.2. Quelques coumarines isolées du genre *Margaritaria*

Au total 5 coumarines ont été isolées de plusieurs espèces de *Margaritaria*. Parmi eux, la scopolétines (31) : c’est l’une des coumarines les plus communes dans le genre *Margaritaria*. Elle a

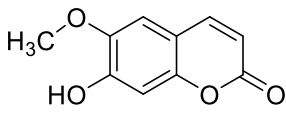
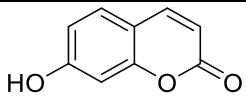
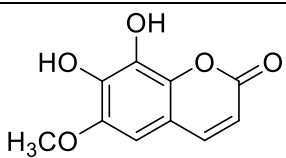
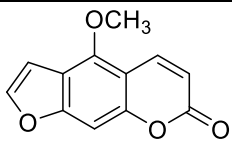
été identifiée dans plusieurs espèces comme *Margaritaria rubra*. La **scopolétine** présente des activités biologiques intéressantes, notamment des propriétés antioxydantes et anti inflammatoire. **(Kanchanapoom et al.,2017)**.

L'umbelliferone (32) : c'est une coumarine qui a également été détectée dans diverses espèces de *Margaritaria*, tel que *Margaritaria rubra*. Tout comme la Scopolétine, elle présente des effets bénéfiques potentiels, notamment des activités antibactériennes et antifongiques. **(Kanchanapoom et al.,2017)**.

La fraxétine (33) : c'est une autre coumarine identifiée dans certains extraits de *Margaritaria indica* **(Kumar et al., 2015)**. Ses propriétés pharmacologiques, et ses activités antiprolifératives sur certaines lignées cellulaires cancéreuses, ont été étudiées.

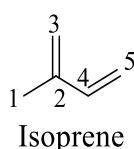
Bergaptène (34) : c'est une coumarine qui a été isolée à partir des extraits du genre *Margaritaria*, telque : *Margaritaria sinensis* **(Ngadjui et al., 2004)** et *Margaritaria rubra* **(Kanchanapoom et al.,2017)**.

Tableau V : Quelques coumarines isolées du genre *Margaritaria*.

Structure	Sources	Références
 <p>scopolétine (31)</p>	- <i>Margaritaria rubra</i>	(Kanchanapoom et al.,2017).
 <p>Umbelliférone (32)</p>	<i>Margaritaria rubra</i>	(Kanchanapoom et al.,2017).
 <p>Fraxétine (33)</p>	<i>Margaritaria indica</i>	(Kumar et al.,2015)
 <p>Bergaptène (34)</p>	- <i>Margaritaria sinensis</i> - <i>Margaritaria rubra</i>	-(Ngadjui et al., 2004). (Kanchanapoom et al.,2017)

I.5.2.1. Généralité sur les terpénoïdes.

De nombreuses plantes produisant des terpènes ont été utilisées depuis des milliers d'années comme aromates, plantes médicinales ou plantes à parfum (huile essentielle) (Martinelli, 2020). Ces derniers (terpènes) sont issus de la grande famille des substances naturelles communément appelés terpénoïdes (ou isoprénoïdes). Ils possèdent au sein de leurs structures un motif commun constitués de cinq atomes de carbones appelés unités isopréniques ou encore en nomenclature selon l'UIPAC (2-méthyl-but-1,3-diène), de formule brute C₅H₈. (Dewick, 2002).



I.5.2.2. Quelques terpénoïdes isolés du genre *Margaritaria*.

Les principaux terpénoïdes isolées de la plante *Margaritaria* sont :

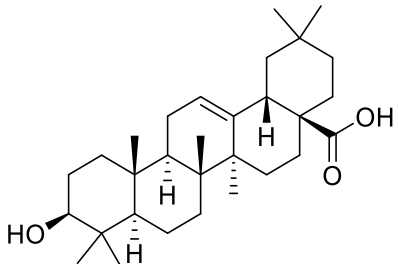
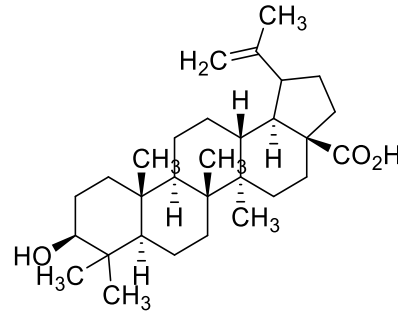
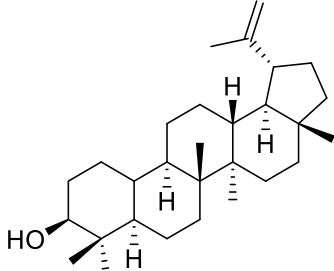
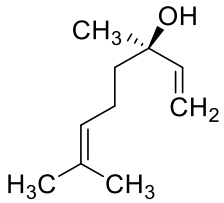
Les acides oléaniques (36) qui ont été isolés des racines de *Margaritaria rubra* (Kanchanapoom et al.,2017).

Les **acides bétuliniques (37)** ont été isolés à partir des racines de *Margaritaria rubra* (Kanchanapoom et al.,2017) ; des racines de *Margaritaria sinensis* (Ngadjui et al., 2004).

Les **lupéols (38)** qui ont été isolés à partir des racines de *Margaritaria rubra* (Kanchanapoom et al.,2017) ; des racines de *Margaritaria nobilis* (Liu et al.,2007).

Les **linalols (39)** qui sont les monoterpénoïdes isolés à partir des racines de *Margaritaria sinensis* (Ngadjui et al., 2004).

Tableau VI : Quelques terpénoïdes isolées du genre *Margaritaria*.

Structure	Sources	Références
 <p>Acide oléanique (36)</p>	- <i>Margaritaria rubra</i>	(Kanchanapoom et al., 2017).
 <p>Acide bétulinique (37)</p>	- <i>Margaritaria rubra</i> - <i>Margaritaria sinensis</i>	-(Kanchanapoom et al., 2017). -(Ngadjui et al., 2004).
 <p>Lupéol (38)</p>	<i>Margaritaria rubra</i> - <i>Margaritaria nobilis</i>	(Kanchanapoom et al., 2017) -(Liu et., 2007).
 <p>Linalol (39)</p>	<i>Margaritaria sinensis</i>	(Ngadjui et al., 2004)

I.6. ETUDE BIOLOGIQUE DU GENRE *MARGARITARIA*

I.6.1. Activités cytotoxique

Les composés purs (Kaempférol **(22)**, Quercétine **(7)**, la palmitine **(64)** isolés de l'extrait méthanoïque de *Margaritaria nobilis* ont montré une activité cytotoxique significative contre les deux lignées cellulaires, avec une IC₅₀ de 12,5µg/ml pour MCF-7 et 20 µg/mL pour A549 (**Kumar et al., 2015**). De plus, l'extrait éthyl-acétyl-acétate de *Margaritaria discoidea* sur les lignées cellulaires du cancer du côlon (HT-29) et du foie HepG2 a montré une activité cytotoxique significative contre les deux lignées cellulaires, avec une IC₅₀ de 15µg/mL pour HepG2 (**Srivastava et al., 2015**).

1.7. GÉNÉRALITÉS SUR L'ESPÈCE *MARGARITARIA DISCOIDEA*

1.7.1. Distribution géographique

L'espèce *Margaritaria discoidea* se trouve uniquement dans la zone septentrionale du Cameroun plus précisément à Ngaoundéré dans la localité de Karna Manga.

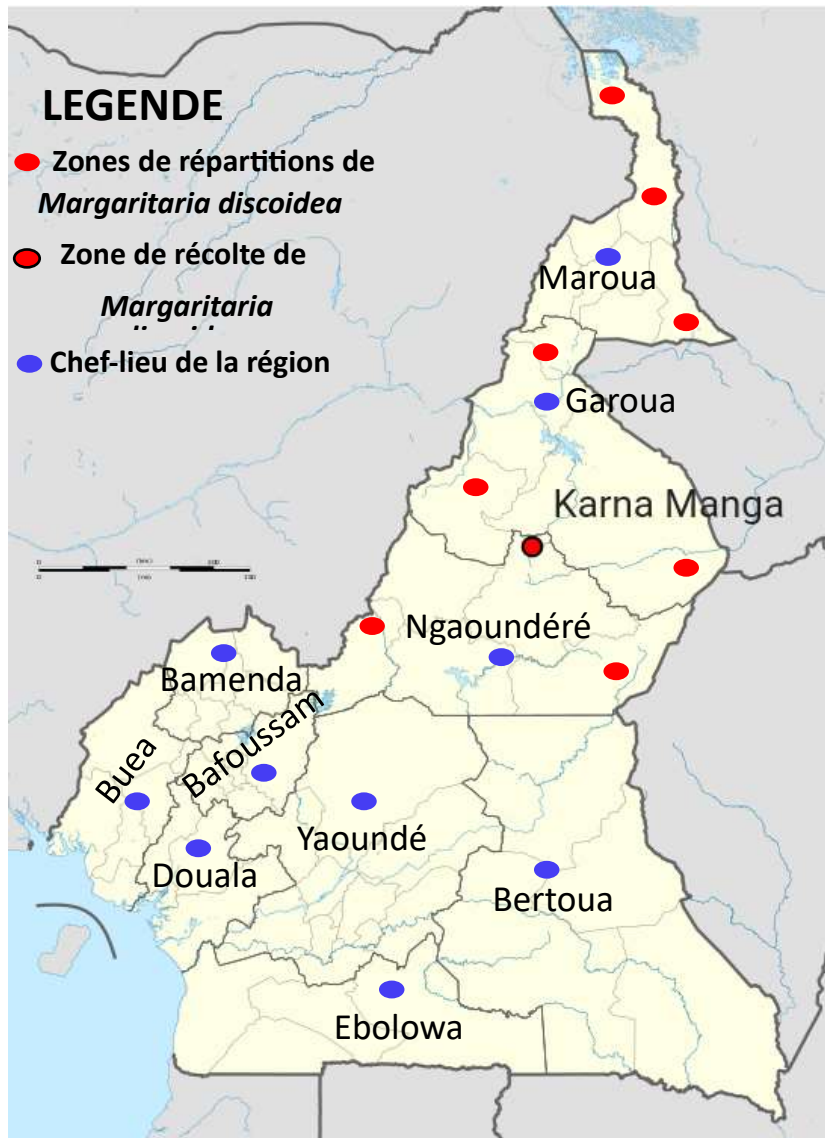


Figure 6 : Distribution géographique de *Margaritaria Discoidea* au Cameroun (HNC, 2024)

I.7.2. Classification botanique

Tableau VII : Classification botanique tropicale de *Margaritaria discoidea* (Lineaus et al., 1782 ; APG III, 2009).

Règne	Plantae
Ordre	Malpighiales
Famille	Euphorbiaceae/ Phyllanthaceae
Classe	Magnoliopsida
Classe	Magnoliidae
Genre	<i>Margaritaria</i>
Super-ordre	Rosanae
Espèce	<i>Margaritaria Discoidea</i>

I.7.3. Noms vernaculaires du genre *Margaritaria*.

Cette plante est reconnue sur plusieurs appellations en fonction des différentes tribus. En langue zaïre au Congo, la plante s'appelle « ikaang » et en langue lingala, les populations indigènes l'appellent « yansi ». (Lubini et al., 1990).

En Afrique de l'Est, la plante est reconnue sur plusieurs appellations en fonction des tribus. En langue "gai" en Ouganda, la plante s'appelle « Ategu » (Okello et al., 2007) ; et en langue Muda en Mozambique, les populations indigènes l'appellent « mugurahamba », et d'autre l'appelle « Chidau ». (Bruschi et al., 2011).

En Afrique de l'ouest spécialement en Côte d'Ivoire, cette plante est reconnue sur le nom de « ba-kogo » et d'autre l'appelle « Dioula ». (Ambe et al., 2010).

Au Venezuela, cette plante est connue sur le nom de « Ojo de grulla » (Grady L. et al., 1781), et au Suriname on l'appelle « Boesi kofi tiki » (Pulle et al., 1966).

Tableau VIII : Quelques noms vernaculaires du genre *Margaritaria*

Tribus	Langues	Noms vernaculaires	Références
Au Congo	Zaïre	“Ikaang”	(Lubini et al., 1990).
Au Congo	Lingala	“Yansi”	(Lubini et al., 1990).
Afrique de l’est (Ouganda)	Gai	“Ategu”	(Okello et al., 2007)
Afrique de l’est (Mozambi)	Muda	“Mugurahamba chidau”	(Brushi et al., 2011)
Afrique de l’Ouest (côte d’ivoire)	Baoulé	“Bakogo Dioula”	(Ambe et al., 2010)
Au Venezuela	Castillan	“Ojo de grulla ”	(Grady L. et al.,1781)
Au Suriname	Paramaribo	“Boesi kofi tiki ”	(Pulle et al.,1966).

I.7.4. DESCRIPTION BOTANIQUE DE *MARGARITARIA DISCOIDEA*

Du point de vue général, *Margaritaria discoidea* est une espèce qui se présente sous forme d'arbuste ou un arbre à feuilles caduques avec une couronne étalée, atteignant généralement 20cm de diamètre. C'est un arbre qui mesure jusqu'à 35m de hauteur et 60cm de diamètre. Ces rameaux sont le plus souvent lenticelles gables. (Frans J et al., 2012).



Figure 7 : Arbuste de *Margaritaria discoidea* Photo Leticia, 2023

❖ Les Racines

Le genre *Margaritaria* possède des racines pivotantes qui peuvent atteindre une profondeur de 50 à 100cm dans le sol. Elle permet à la plante de puiser les nutriments et l'eau en profondeur. Les racines sont généralement de couleur blanchâtre ou beige clair. Elles sont assez charnues et denses, ce qui leur confère une bonne résistance.



Figure 8 : Les racines de *Margaritaria discoidea*, photo Leticia ,2024.

- **Les Racines**

Les feuilles de *Margaritaria discoidea* sont larges, alternés et de couleurs vertes. Elle présente des pétioles canaliculés au-dessus, de 4 à 10 mm, glabre ; un limbe elliptique ou parfois oblong à obovale. Une cunée arrondi ou parfois obtus à la base, aigu brièvement acuminé et parfois mucroné au sommet, glabre ; les nervures latérales sont assez fines et contiennent de 9 à 14 paires. Sur les branches, les feuilles sont disposées sous formes de rameaux. (Frans *et al.*, 2012).



Figure 9 : Feuilles de *Margaritaria discoidea*, photo Leticia, 2024.

- ❖ **Les fleurs**

Les fleurs males présentent des pédicelles de 3 à 4 mm, glabres ; des sépales plus ou moins elliptiques de 1 à 1,5 mm de longueur, glabre. Les étamines libres ayant une longueur plus ou moins de 1,5mm. Le disque est plus ou moins plat, et plus ou moins lobule.

Les fleurs femelles ont un pédicelle de 1 à 1,5 mm ; la longueur du pistil est de 1 à 1,5 mm ; un style de plus ou moins 1 mm (Frans J. *et al.*,2012).



Figure 10 : Fleur de la plante *Margaritaria discoidea*

❖ Les Fruits

Comme toutes les autres espèces du genre *Margaritaria*, les fruits sont 2-3 -4- lobes ayant un diamètre de de 7-10 mm, glabre. (Fans J. et al. ;2012).



Figure 11 : Fruit de *Margaritaria discoidea* photo Leticia ,2024

❖ Les Graines

Les graines se présentent plus ou moins 2 par loges. Elles sont serrées et ayant une longueur de (2,5)4,5 *(2)3,4 mm. Ces graines sont très lisses et ayant une couleur bleuâtre (Frans J. et al. ,2012).



Figure 12 : Graines de *Margaritaria discoidea* photo Leticia ,2024

❖ **Le Tronc**

Margaritaria possède un tronc allant de 2 à 10 m de hauteur, et un diamètre allant de 5 à 30 Cm de hauteur. L'écorce est lisse ou rugueuse, de couleur grise ou brune. La texture du tronc est dure ou flexible. La forme du tronc est cylindrique ou légèrement tapéré. Les branches sont étalées ou dressés, pubescentes ou glabres. (Kew et al.,2019).



Figure 13 : Tronc de *Margaritaria Discoidea*

❖ **La Tige**

La tige de *Margaritaria* est de nature herbacée, c'est à dire qu'elle n'est pas ligneuse mais composée de cellules parenchymateuses molles. Elle est généralement dressée, pouvant atteindre 40 à 80 cm de hauteur. La tige est souvent ramifiée avec plusieurs branches latérales portant les fleurs.

I.7.5. Usages ethnopharmacologies de *Margaritaria discoidea*

Dans la phytothérapie traditionnelle, les vertus de la plante *Margaritaria discoidea* sont nombreuses. Dans l'étude d'une enquête ethnobotanique, il en ressort que :

Margaritaria discoidea (Bail.) GL (synonyme phyllanthus discoideus (Baill.) Müll.Arg.) est un arbre originaire d'Afrique et a été traditionnellement utilisée pour le traitement de l'onchocercose, des plaies et des infections cutanées (Mensah et al., 1990) et des œdèmes (Obiri et al.,2014).

Au Nigeria et au Ghana, la décoction de l'écorces de *Margaritaria discoidea* est utilisé dans le traitement des plaies et des ulcères, tandis qu'au Malawi, l'extrait d'écorce en poudre est appliqué sur les gonflements et les inflammations pour un soulagement rapide (Irvine., 1961).

L'écorce de *Margaritaria discoidea* est anodine, anthelminthique et purgative. Une décoction est utilisée pour soulager les douleurs, les maux d'estomacs, des reins, et pour faciliter la parturition.

Le traitement par décoction d'écorce provoquerait un arrêt plus ou moins prolongé du cycle menstruel, mais à l'inverse, elle serait utilisée pour soulager les douleurs de l'estomac et des reins ; et l'aménorrhée. L'écorce séchée et pulvérisée est frottée sur le corps pour traiter les états fébriles **(Burkil et al.,2004)**.

La décoction des feuilles et des racines de cette plante sont utilisées par les peuples en Afrique de l'Ouest pour traiter toutes les formes de malaria. Les racines sont aphrodisiaques, purgatives et stimulantes. La décoction des racines est également utilisée dans le traitement de la schistosomiase, de la gonorrhée et des abcès durs. **(Burkil et al.,2004)**.

Ensuite, l'infusion des feuilles ou des fleurs de cette plante sont aussi utilisées pour le traitement des fièvres, tel que les fièvres de la typhoïde et les fièvres paludiques. **(Ibrahim et al.,1993)**.

Puis les feuilles et les racines de cette plante sont utilisées pour traiter les infections respiratoires tel que la toux, la bronchite, et l'asthme **(Nganou et al.,2012)**, elles sont aussi utilisées pour traiter les dermatites et les eczémas **(Ibrahim et al.,1993)**. Elles sont enfin utilisées pour traiter les troubles menstruels tels que les règles douloureuses, les métrorragies. **(Nganou et al.,2012)**.

I.7.5.1. Usages agroforestiers

Le bois de *Margaritaria discoidea* n'est pas résistant aux insectes et à la pourriture. Il peut être scié en planche et utilisé pour la construction ordinaire de bateaux, et convient à l'ébénisterie, avec une finition lisse et un poli fin. Il est coupé pour les bardeaux de toit et est utilisé pour la construction de bateaux, car on dit que le bois se plie idéalement après avoir été étuvé pour façonner les nervures **(Burkil et al.,2004)**.

De plus, les jeunes tiges et les racines sont utilisées comme bâtonnets à mâcher pour nettoyer les dents, renforcer les gencives et maintenir l'hygiène bucco-dentaire **(Burkil et al.,2004)**.

I.7.6. Etudes phytochimiques antérieure.

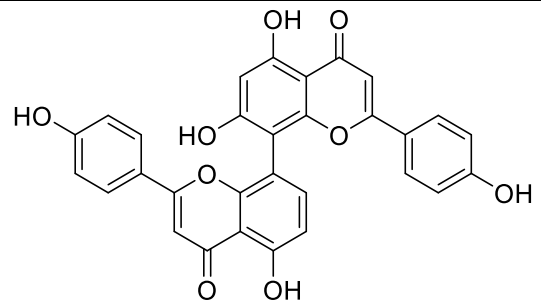
Selon nos investigations, plusieurs études phytochimiques ont été menée sur la plante *Margaritaria discoidea*.

Il a été démontré que les espèces de *Margaritaria discoidea* sont sources d'alcaloïdes, de composés phénoliques et de terpénoïdes **(Patel et al., 2011)**. Auparavant, des alcaloïdes tels que la viroallosecurine et la sécurine **(Mensah et al., 1999)** ; des flavonoïdes ont été isolés de *Margaritaria discoidea* **(Ekuadzi et al., 2014)**.

I.7.7. Quelques biflavonoïdes isolées du genre *Margaritaria discoidea*.

En effet, **Cupressuflavone 29** est une biflavonoïdes isolée à partir des racines de *Margaritaria discoidea* (Ito et al.,2002).

Tableau IX : Quelques biflavonoïdes isolés de *Margaritaria discoidea*

Structure	Sources	Références
 <p>Cupressuflavone <u>29</u></p>	<i>Margaritaria discoidea</i>	(Ito et al.;2002)

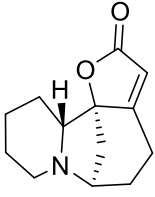
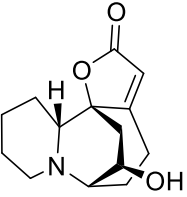
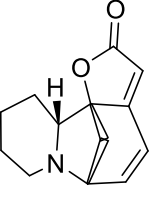
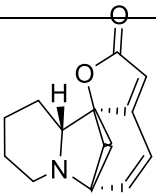
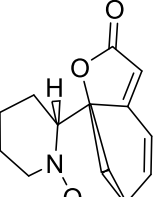
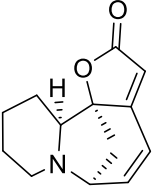
I.7.8. Généralité sur les alcaloïdes.

A l'origine, le terme alcaloïde a été employé pour décrire toute base de Lewis contenant un hétérocycle azoté (ou improprement une amine). Cette propriété basique est due à la présence du doublet non liant sur l'atome d'azote. On trouve des alcaloïdes, principalement chez les végétaux, les champignons et quelques groupes animaux peu nombreux, biologiquement, les alcaloïdes sont des dérivés des acides aminés (Foley, 2003).

I.7.8.1. Quelques alcaloïdes isolés de *Margaritaria discoidea*.

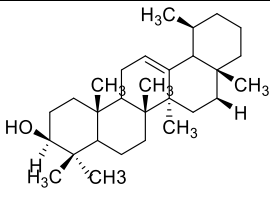
La sécurinine (41), la securinol (42), la viroallosecurine (43), l'allosécurinine (44), l'entphyllanthidine (45), et la 14,15-dihydroallosecurine -15-Bêta -ol (46) sont tous isolées à partir des racines des écorces de *Margaritaria discoidea*.(Diallo et al.,2015).

Tableau X : Quelques alcaloïdes isolés de *Margaritaria discoidea*.

Structure	Sources	Références
 <p>la sécurinine</p>	<i>Margaritaria discoidea</i>	(Diallo et al.,2015).
 <p>la securinol</p>	<i>Margaritaria discoidea</i>	
 <p>la viroallosecurine</p>	<i>Margaritaria discoidea</i>	
 <p>I allosecurinine</p>	- <i>Margaritaria discoidea</i>	
 <p>Ent-phyllanthine</p>	<i>Margaritaria discoidea</i>	
 <p>14,15-dihydroallosecurine-15Beta-ol</p>	<i>Margaritaria discoidea</i>	

I.7.8.2. Terpénoïdes isolée de *Margaritaria discoidea*.

L' α Amyrines (40) a été isolée par les racines de *Margaritaria discoidea* (Kanchapoom et al.,2017).

Structure	Sources	Références
 <p>Alpha-amyrine (40)</p>	<i>Margaritaria discoidea</i>	(Kanchapoom et al. ,2017)

I.7.9. ETUDE BIOLOGIQUE DE *MARGARITARIA DISCOIDEA*

I.7.9.1. Activité anti plasmodiale

L'extrait brut des racines de *Margaritaria discoidea* a présenté une activité antiplasmodiale sur les souches résistantes du *plasmodium falciparum*. Ces extraits de *Margaritaria* ont été testés sur la souche ghanéenne de *plasmodium* sensible à la *chloroquine falciparum*. Le parasite a été maintenu en croissance continue en phase logarithmique dans un milieu RPMI-1640 additionné d'une solution P/S à 2% d'hyposcanthine 0,37 μ m, d'HEPES 25 μ m, de NaHCO₃ 25 μ m et 10% de sérum Human O⁺ selon la méthode de Trager et collaborateurs en 1976. Les activités (In vitro) ont été évaluées en utilisant une adaptation de la procédure par (Mahler et al.,1993). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du *plasmodium falciparum*.

I.7.9.2. Activité anti microbiennes, antioxydantes, et anti-inflammatoire

Les extraits des différentes parties de *Margaritaria discoidea* ont montré des activités antimicrobiennes, antioxydantes et anti inflammatoires significatives (Lawal et al., 2015), un potentiel analgésique (Adedapo et al., 2009) et une activité gastrique (Sofidiya Mo et al., 2015). Une étude précédente a montré que les extraits et les alcaloïdes de *Margaritaria discoidea* présentaient des activités gastro protectrices, antimicrobiennes, antiplasmodiques, et anti -VIH modérées (Diallo et al., 2015). Un extrait hydrosoluble de *Margaritaria discoidea* à induit une forte activité acaricide chez les nymphes et les adultes de *Rhipiciphalus appendiculatus* et *Amblyomma variégatum* (Kaaya et al., 1995).

I.7.9.3. Activité anti-inflammatoire

Les composés purs isolés de l'extrait éthanoïque des écorces de *Margaritaria discoidea* ont donné l'activité la plus élevée avec une zone d'inhibition 16,33 \pm 0,88 mm contre *Bacillus subtilis*.

La IC₅₀ pour ces extraits vont de 500µg /ml à plus de 1000µg/ml contre les organismes testés (Dickson RA et *al.*,2010).

I.7.9.4. Activité anti bactériennes

Les composés purs isolés des feuilles de *Margaritaria discoidea* tel que la **sécurine (41)**, et la **viroallosécurine (43)** présentent une activité bactérienne sur les cellules leucémiques humaines HL-60 (Ohsaki et *al.*, 2009). De ce fait, la **viroallosécurine** a présenté une IC₅₀ de 0,48µg/ml pour *Pseudomonas Aeruginosa* et *Staph.aureus*. Cette alcaloïde est batéricide puisque les rendements est inférieur à 1, et le **(41)** présente une IC₅₀ de 0,5 µg/ml pour *E. coli*, *staph.aureus* et *Myc. Smegmas*. (Mensah et *al.*, 1990).

CHAPITRE II : RESULTAT ET DISCUSSION

II.1. Extraction et isolement des composés de *Margaritaria discoidea*

Les racines de *Margaritaria discoidea* ont été découpées, séchées à l'air libre durant trois semaines, puis broyées afin d'obtenir une poudre fine de coloration marron et de masse 1,21 kg. Cette poudre a été macérée à température ambiante pendant 72 h dans le méthanol. Après filtration à l'aide du papier filtre wattman (porosité 2), la solution obtenue (filtra) a été concentrée sous évaporateur rotatif pour donner 86 g d'extrait brute dont 10g ont été réservés pour les activités biologiques.

L'extrait brut restant (76 g) a subi un épuisement avec les solvants de polarité croissante pour donner deux fractions, l'une à l'Hexane (3 g) et l'autre à l'acétate d'éthyle (60 g). La fraction à l'acétate d'éthyle a fait l'objet de notre étude.

En effet, grâce aux méthodes chromatographiques et aux divers révélateurs, six sous fractions indexées de 'A' à 'G' ont été regroupées comme suit : A (CH₂Cl₂/MeOH ; 50 :1), B (CH₂Cl₂/MeOH ; 30 :1), C (CH₂Cl₂/MeOH ; 20 :1), D (CH₂Cl₂/MeOH ; 10 :1) et E (CH₂Cl₂/MeOH ; 5 :1), F (CH₂Cl₂/MeOH ;3/1) et G (1:1 CH₂CL₂/MeOH 100% MeOH).

De ces six sous fractions, quatre composés ont été obtenus et indexés de MD1 à MD4, en utilisant les méthodes chromatographiques.

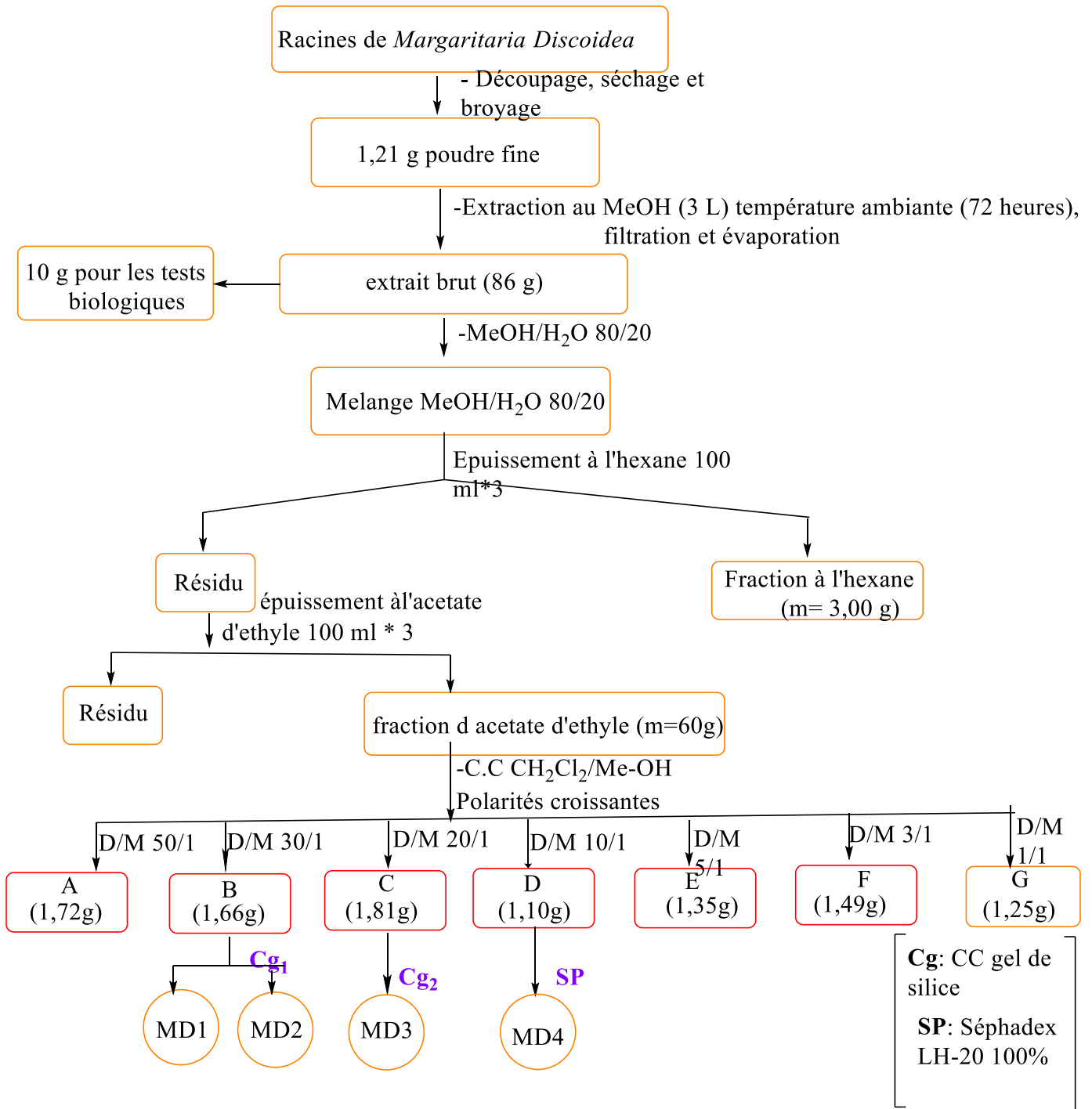


Figure 14 : Protocole d'extraction et d'isolement des composés à partir des racines de *Margaritaria discoidea*

II.2. Détermination chimique des composés purs isolés

II.2.1. Identification du composé MD1

Le composé MD1 a été obtenu sous forme de poudre vert dans un système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (30/1). Il répond positivement au test de shinoda caractéristique des flavonoïdes. Son spectre HRESIMS présente le pic de l'ion pseudo- moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 569,1446 correspondant à la formule brute $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ (calculé 568,1440), comportant 21 sites d'insaturations.

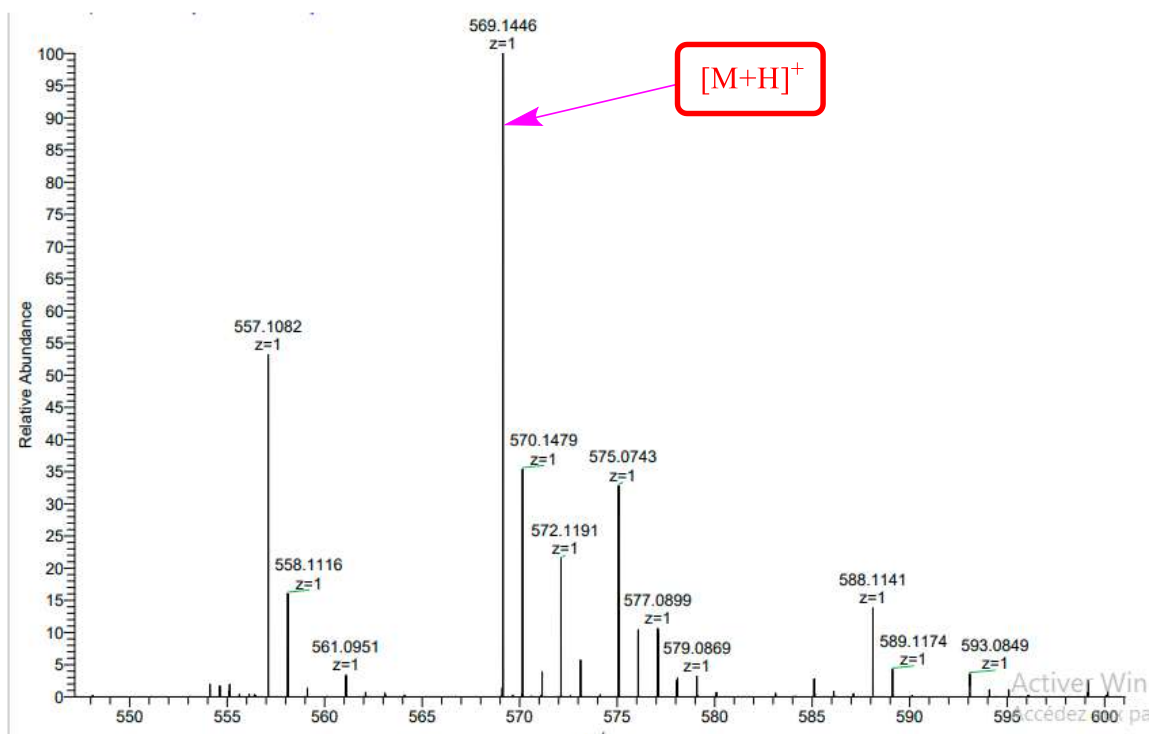


Figure 15 : Spectre de masse HRESIMS du composé MD1

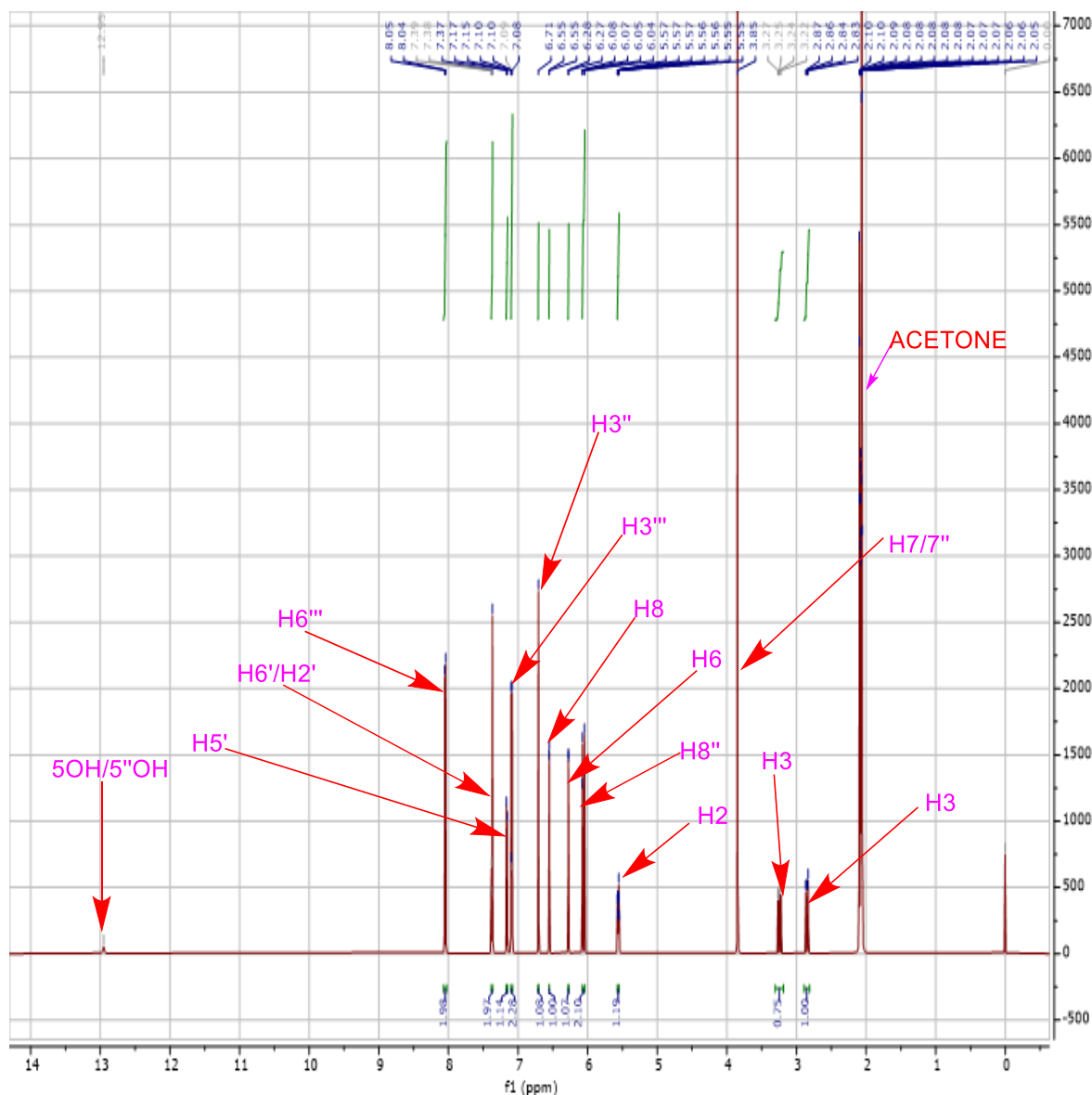


Figure 16 : Spectre de RMN ^1H (600 MHz, Acetone- d_6) de MD1

Le spectre RMN ^1H de MD1 (Figure 16) présente :

Deux signaux singulets intégrant pour deux protons à δ_{H} 12,93 (2H, s, 5-OH/5''-OH) attribuable aux protons de l'hydroxyle chélaté en *péri* du carbonyle en position 5-OH et 5''-OH du noyau A.

Deux signaux intégrant pour deux protons chacun à δ_{H} 5,54 (1H, dd, $J=12,7, 3,0$ Hz, H-2) et à δ_{H} 2,86 (1H, dd, $J=17,1 ; 3,0$ Hz, H-3) / 3,24(1H, dd, $J=17,1 ,12,7$ Hz, H-3), suggérant que MD1 possède un squelette de type flavanone.

De plus, le spectre RMN ^1H présente un systèmes AB dont les protons apparaissent à δ_{H} 6,04 (1H, d, $J=2,4$ Hz, H-6) et l'autre à δ_{H} 6,06 (1H, d, $J=2,4$ Hz, H-8), de couplage en *méta*.

Le spectre RMN ^1H présente en outre les signaux caractéristiques d'un système ABX à δ_{H} 7,36 (1H, dd, $J=8,1 ; 2,1$ Hz, H-6') et à δ_{H} 7,35 (1H, d, $J=2,2$ Hz, H-2'), 7,15(1H, d, $J= 8,1$ Hz, H-5') correspondant à un noyau B trisubstitué [1-3].

Un signal restant à δ_{H} 3,91, intégrant pour six protons, indiquant la présence de deux groupements méthoxyles.

Bien que le composé MD1 étant une biflavonoïde, possède une partie flavanone ; elle pourra aussi posséder une autre partie , qui peut être une flavone.

Un singulet d'intégration d'un proton à 6,70 (1H, s, H-3''). Ce signal est caractéristique des protons en position H-3'' du noyau C des flavones. Ce qui suggère qu'il s'agit d'une flavone.

Deux doublets attribuables à deux protons en *méta* sur un noyau aromatique tétra substitué (noyau A) des flavones : 6,27 (1H, d, $J=2,2$ Hz, H-6'') et 6,55 ppm (1H, d, $J=2,2$ Hz, H-8'').

Le spectre RMN ^1H présente en outre les signaux caractéristiques d'un systèmes AA'BB' à δ_{H} 8,04 (2H, d, $J=9,1$ Hz, H-2'''/ H-6''') et à δ_{H} 7,03 (2H, d, $J=9,1$ Hz, H-3'''/H-5'''), correspondant à un noyau C parasubstitué [1-4]. Cette affirmation est en accord avec le spectre 2D COSY ^1H - ^1H (figure 17) qui présente les corrélations entre les protons aromatiques à 7,03 (H-3'''/H-5''') et à δ_{H} 8,04 (H-2'''/H-6''') pour la flavone.

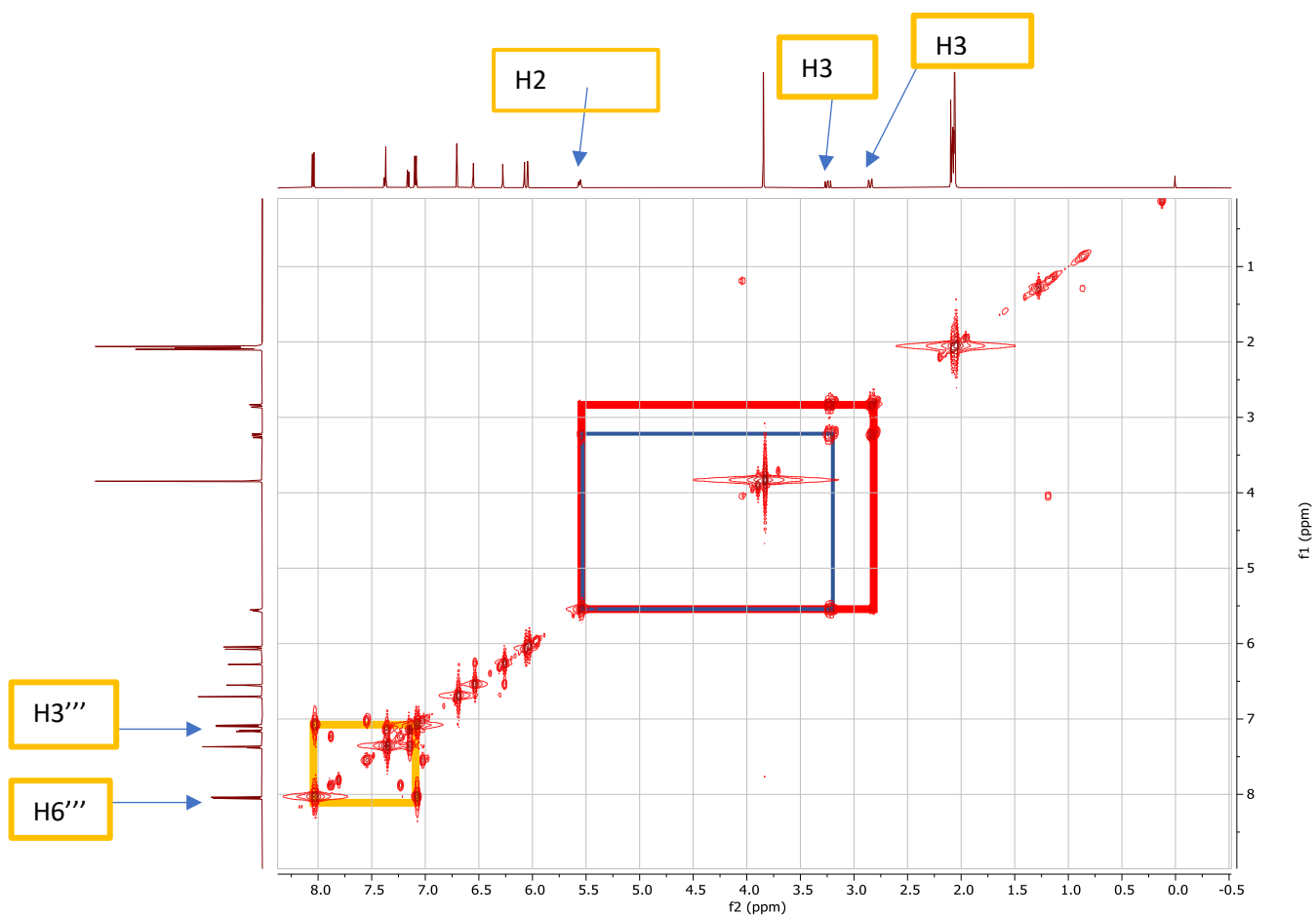


Figure 17 : Spectre COSY ^1H - ^1H (600 MHz, Acetone- d_6) de MD1

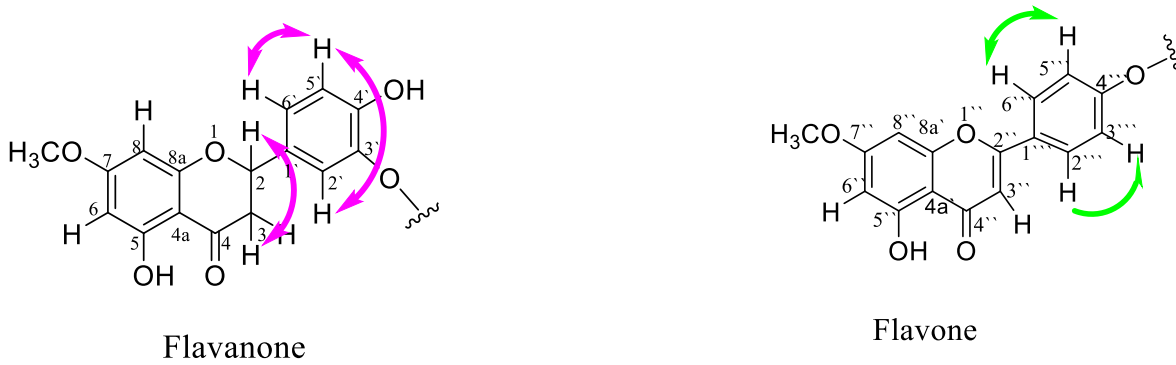


Figure 18 : Corrélation clés du spectre COSY

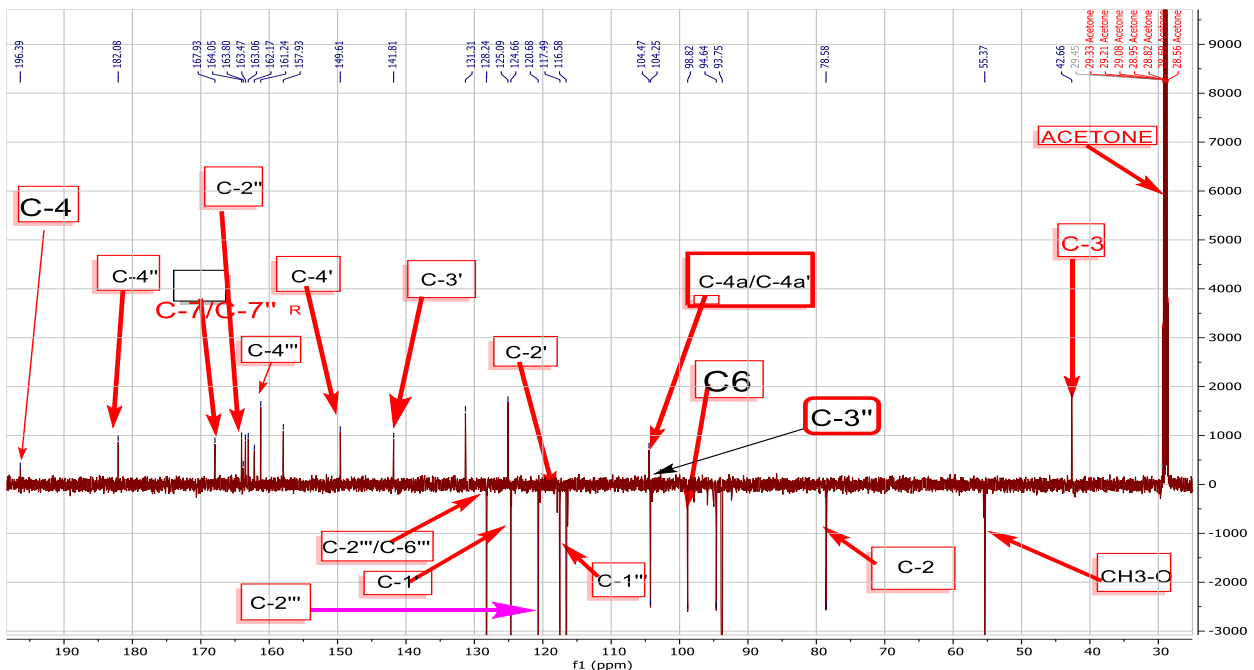


Figure 19 : Spectre APT (150 MHz, Acetone-d₆) de MD1

Les données RMN ¹³C et APT présentent 32 atomes de carbones parmi lesquels :

- Deux groupements carbonyles, donc l'un à δ_c 196,4 ppm et l'autre à δ_c 182,0 ppm
- 26 signaux d'atomes de carbone autres Sp³, donc 4 Sp³ sont observé avec un signal représentant deux carbones à 55,5 ppm (Confirmant la présence de deux groupements méthoxyls), et deux carbones résonnant à 42,6 (C-3) et 78,5 (C-2), qui confirment la présence de la partie flavanone.
- Deux atomes de carbones sp² à δ_c 167,9 (C-7'') ppm et à δ_c 102,5 (C-3'') ppm confirmant la présence d'un squelette de type flavones.

De plus, le spectre de masse HRESIMS nous présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire correspondant à m/z 569,1441. Ce qui confirme que notre structure est une biflavonoïdes de type flavone-flavanone.

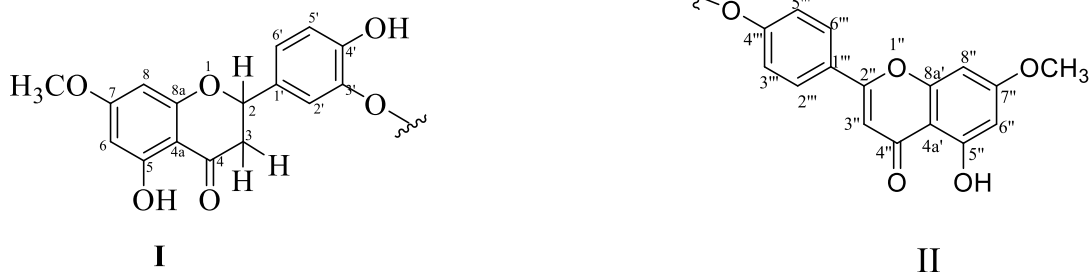


Figure 20 : Quelques sous structures impliquées dans la structure MD1

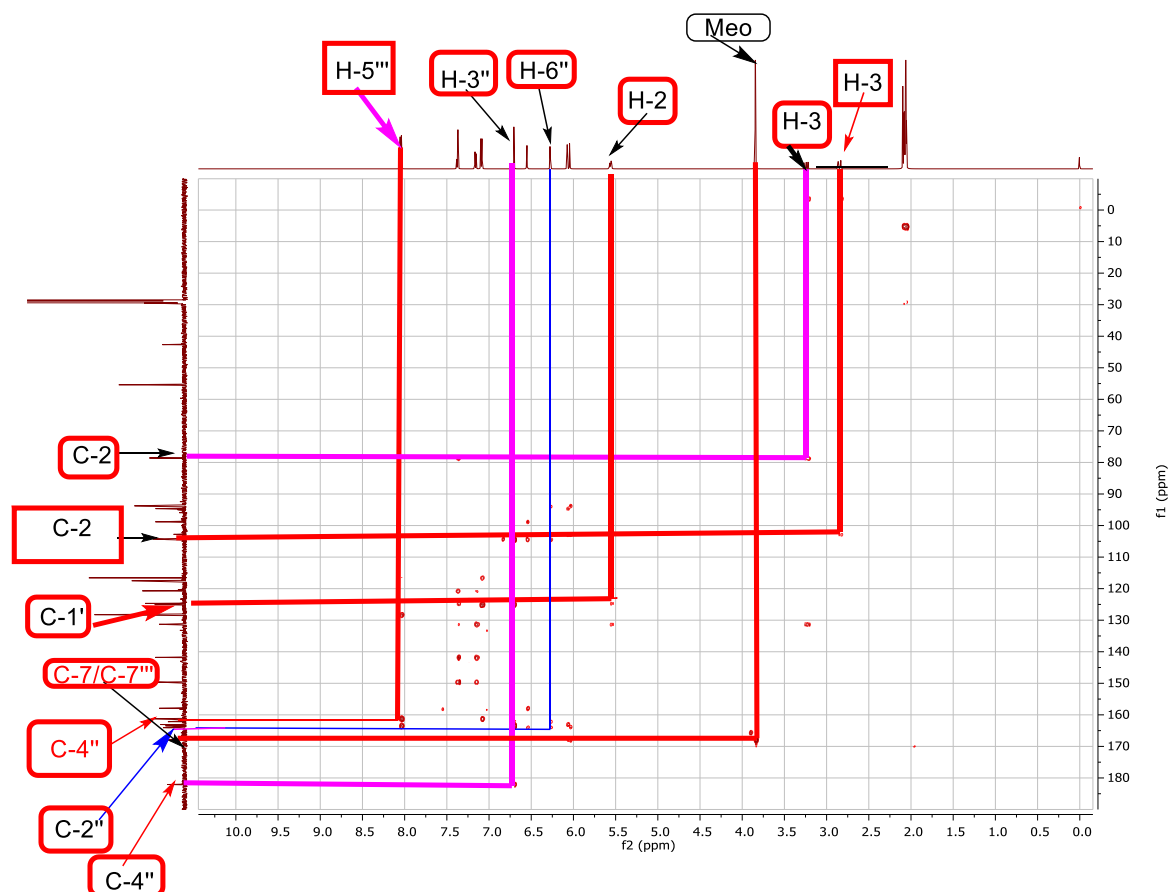


Figure 21 : Spectre HMBC de MD1.

Le spectre HMBC à 2D (**Figure 21**) nous présente les protons méthoxylés à δ_H 3,91, qui corrélient avec les atomes de carbones à δ_C 167,9 (C-7) de l'unité flavanone et δ_C 167,9 (C-7'') de l'unité flavone.

L'existence des deux unités de flavone-flavanone est d'avantage confirmé par le spectre ROESY (**Figure 23**) qui présente une corrélation entre l'un des protons à δ_H 7,36 (H-2') de l'unité **I** et les protons aromatiques à δ_H 8,04 (H-2''') de l'autre unité **II**.

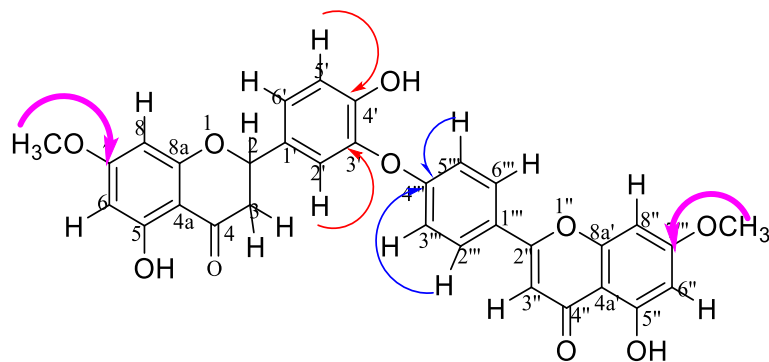


Figure 22 : Quelques corrélations clés du spectre HMBC

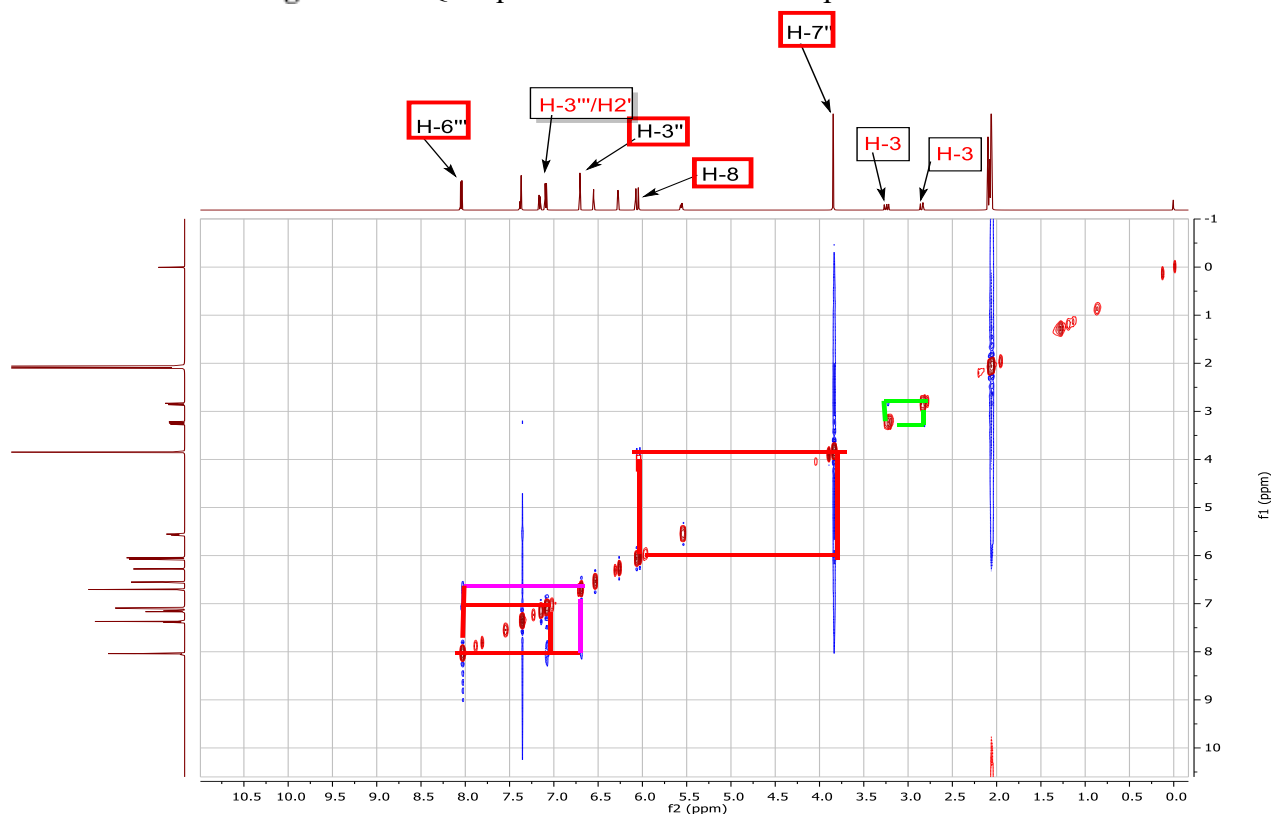


Figure 23 : Spectre ROESY ^1H - ^1H (600 MHz, Acetone- d_6) de MD1.

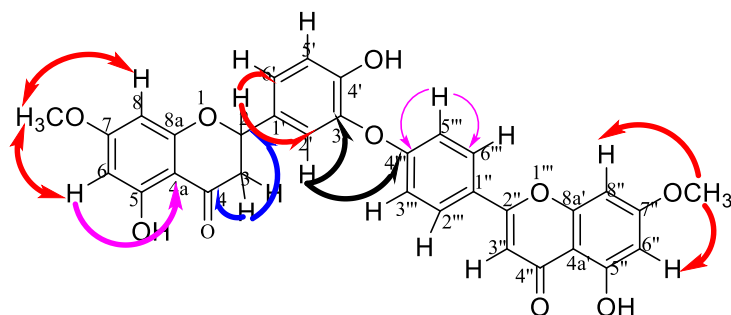


Figure 24 : Corrélation clé du spectre ROESY

Le spectre ROESY montre les pics croisés importants suivants, qui confirme la position des groupes méthoxyles de : MeO-7/ H-6/8 pour la fraction flavanone, et MeO-7''/H-6''/8'' pour l'unité flavone.

Les études spectrales ci-dessus suggèrent que le composé 1 pourrait être une biflavonoïde avec les liaisons C-O-C. La comparaison des données spectrales RMN¹³C avec celle de la naringénine et de la chrysin montre que C-4'' et C-3' sont impliqués dans la liaison éther inter flavonoïde (**Sanner M. et al.,2007**). Ainsi, d'après des études spectrales ci-dessus, le composé 1 a été identifié comme étant l'éther, sur le nom de 2,3-dihydroflavone-7''-7-O-diméthyle.

Sur la base des interprétations des données spectrales ci-dessus et par comparaisons avec ceux de la littérature, le composé MD1 a été identifié comme étant **la 2,3-dihydroflavone-7'',7-O-dimethyl éther7. (Composé nouveau).**

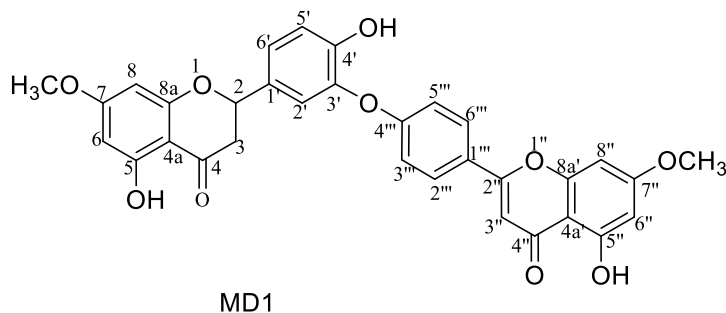


Tableau XI : Données spectrales de RMN¹H (600 MHz, Acetone-d₆), RMN¹³C (150 MHz, Acetone-d₆) de MD1 comparées à celle trouvé dans la littérature.

N°C	MD1		
	δ_C	APT	δ_H (nH, m, <i>J</i> en Hz)
2	78,5	CH	5,54 (1H, dd, <i>J</i> =12,7 Hz et <i>J</i> =3.0 Hz)
3	42,6	CH	2,86 (1H, dd, <i>J</i> =17,1Hz et <i>J</i> =3,0 Hz) 3,24(1H, dd=17,1Hz et <i>J</i> = 3,0 Hz)
4	196,4	C	-
4a	104,4	C	-
5	163,8	C	12,93 ; s (OH)
6	94,6	CH	6,04 (1H, d, <i>J</i> = 2,4Hz)
7	167,9	C	-
7-OMe	55,5		3,84 (s)
8	93,9	CH	6,06 (1H, d, <i>J</i> = 2,4 Hz)
8a	163,0	C	-
1'	131,3	C	-
2'	120,7	CH	7,35 (1H, d, <i>J</i> =2,2 Hz)
3'	141 ,8	C	-
4'	149,6	C	8,76 (s, (OH)
5'	117,4	CH	7,15(1H ; d ; 8,1Hz)
6'	124,6	CH	7,36(1H ; dd ; <i>J</i> =8,1 et <i>J</i> =2,2 Hz)
2''	163,4	C	-
3''	102,7	CH	6,70(1H, s)
4''	182,0	C	-
5''	162,1	C	12,93(s, (OH))
6''	98,8	CH	6,27(1H, d ; <i>J</i> =2,2 Hz)
7''	167,9	C	-
7''-OMe	55 ,5	C	3,91 (s)
8''	93,9	CH	6,55(1H, d, <i>J</i> =2,2Hz)
4a''	102,2	C	-
8a''	157,8	C	-
1'''	125,0	C	-

CHAPITRE II: RESULTAT ET DISCUSSION

2''/6''	128,2	2CH	8,04(2H, d, J=9,1Hz)
3''/5''	116,4	2CH	7,03(2H, d, J=9,1 Hz)
4''	162,1	C	-

II.2.2. Détermination structurale du composé MD3

Le composé MD3 a été obtenu sous forme de cristaux poudre jaune dans un système (20/1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Il répond positivement au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes (Shinoda, 1928). Son spectre de masse HRESIMS présente le pic de l'ion pseudo moléculaire à m/z 537,0848 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (masse calculée de 538,0827), correspondant à la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$, et possédant 22 insaturations.

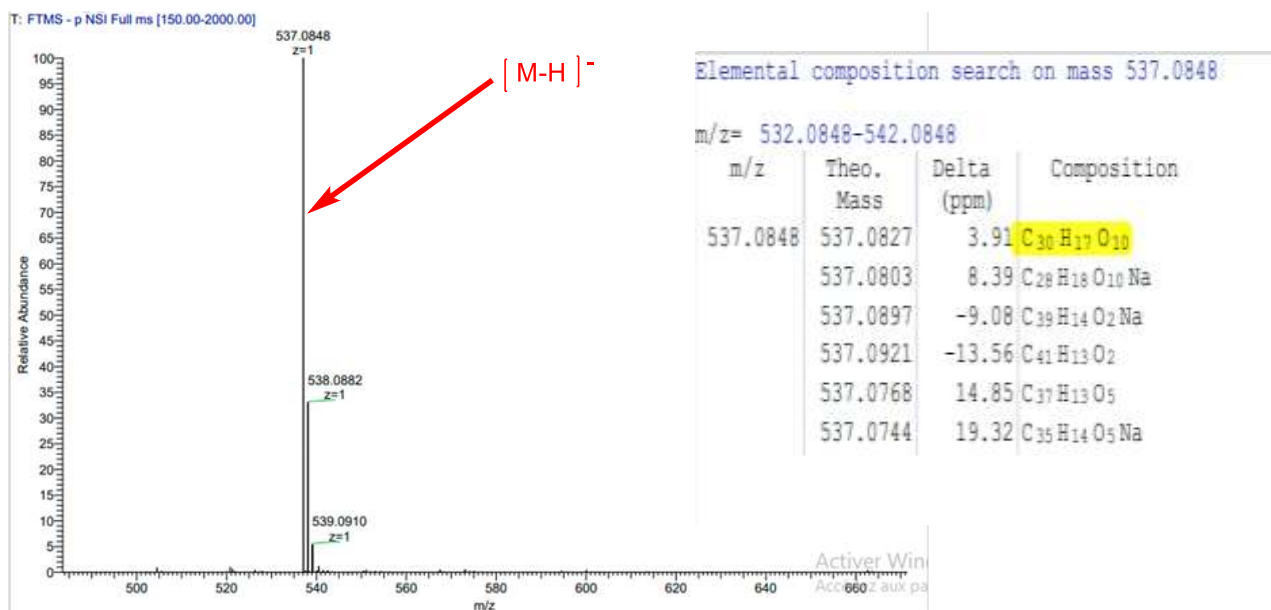


Figure 25 : spectre de masse HRESIMS du composé MD3

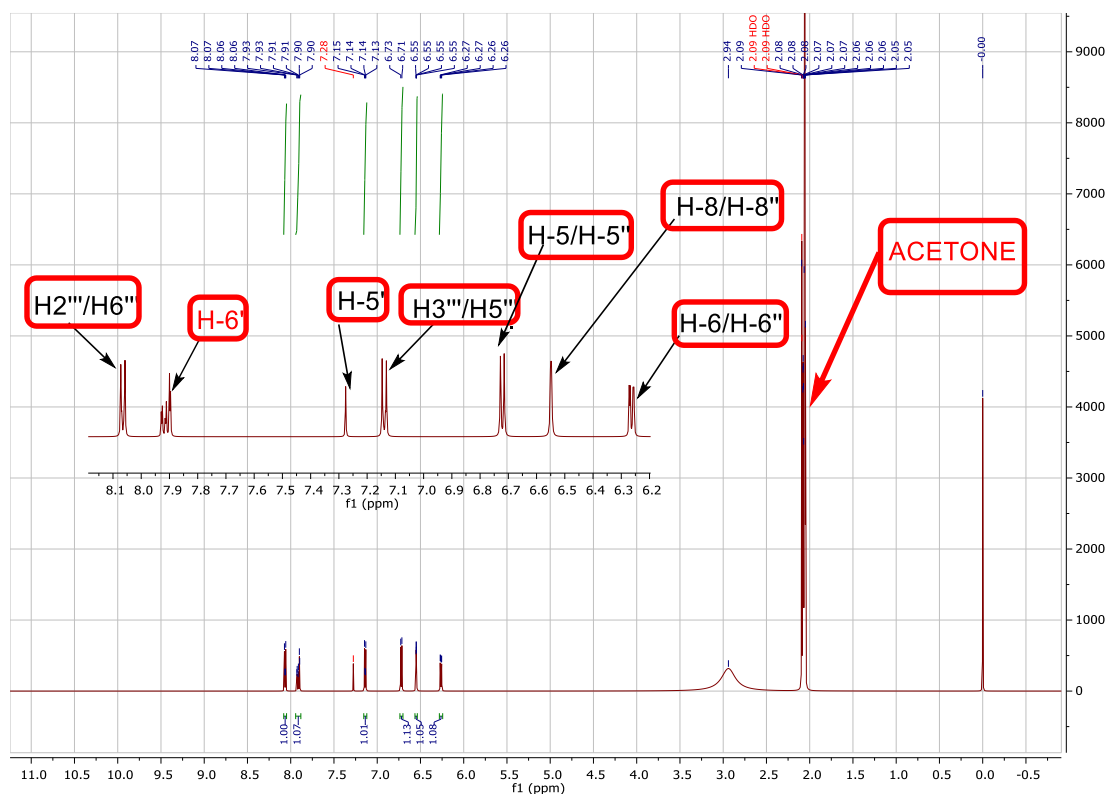


Figure 26 : Spectre RMN¹H (600 MHz, Acetone-d₆) de MD3.

Le spectre RMN¹H de MD3 (Figure 26) présente :

Deux signaux singulets intégrant pour deux protons à δ_H 2,94 (2H,s,H-3/H-3'') caractéristiques de 2 groupements hydroxyles liés par hydrogène à H-3 (**I**) et H-3'' (**II**) indiquant la présence d'un squelette biflavonol (Figure 18). Ce signal est caractéristique du proton de OH en position H-3/H-3'' du noyau C des flavanols, ce qui suggère qu'il s'agit d'un flavonol.

De plus, le spectre RMN ¹H présente deux systèmes ABX les protons apparaissent à δ_H 6,55 (2H, d, $J=2$ Hz ; H-8/H-8''), δ_H 6,28 (2H, dd , $J=6,7$ Hz , $2,0$ Hz ; H-6/6''), et enfin δ_H 6,74(2H, d, $J=6,7$ Hz , H-5/H-5'') ; (**I**) et (**II**) de couplage montrant qu'il s'agit de deux noyaux **A** (**I**) et **A** (**II**) tris substitués. Suggérant que MD3 possède un squelette de type biflavonol.

Le spectre RMN ¹H présente en outre les signaux caractéristiques de deux systèmes ; d'une part, nous avons un système ABX à δ_H 7,24 (1H, d, $J=8,6$ Hz ; H-5') ; l'autre à δ_H 7,94 (1H, dd, $J=2,2$, $8,6$ Hz ; H-6') et enfin l'autre à δ_H 7,91 (1H, d , $J=2,0$ Hz ;H-2') , correspondant au noyau **B** (**I**) trisubstitué [1-3].

Par la suite, nous avons un système AA'BB' à δ_H 7,16 (2H, d, $J= 8,8$ Hz, H-3'''/H-5''') et à δ_H 8,09 (2H, d, $J=8,8$ Hz ; H-2'''/H-6'''), correspondant au noyau **B** (**I**) para substitue [1-4]. Cette affirmation est en accord avec le spectre 2D COSY (**Figure 27**) qui présente les corrélations entre les protons aromatiques à δ_H 8,09 (H-2'''/H-6''') et à δ_H 7,16 (H-3'''/H-5'''). De plus le spectre 2D COSY,

nous présente encore les corrélations entre les protons du cycle A à δ_H 6,55 (2H, d, H-8/H-8'') ; puis à δ_H 6,28 (2H, d, H-6/H-6'') et enfin le proton à δ_H 6,74 (2H, d, H-5/H-5'').

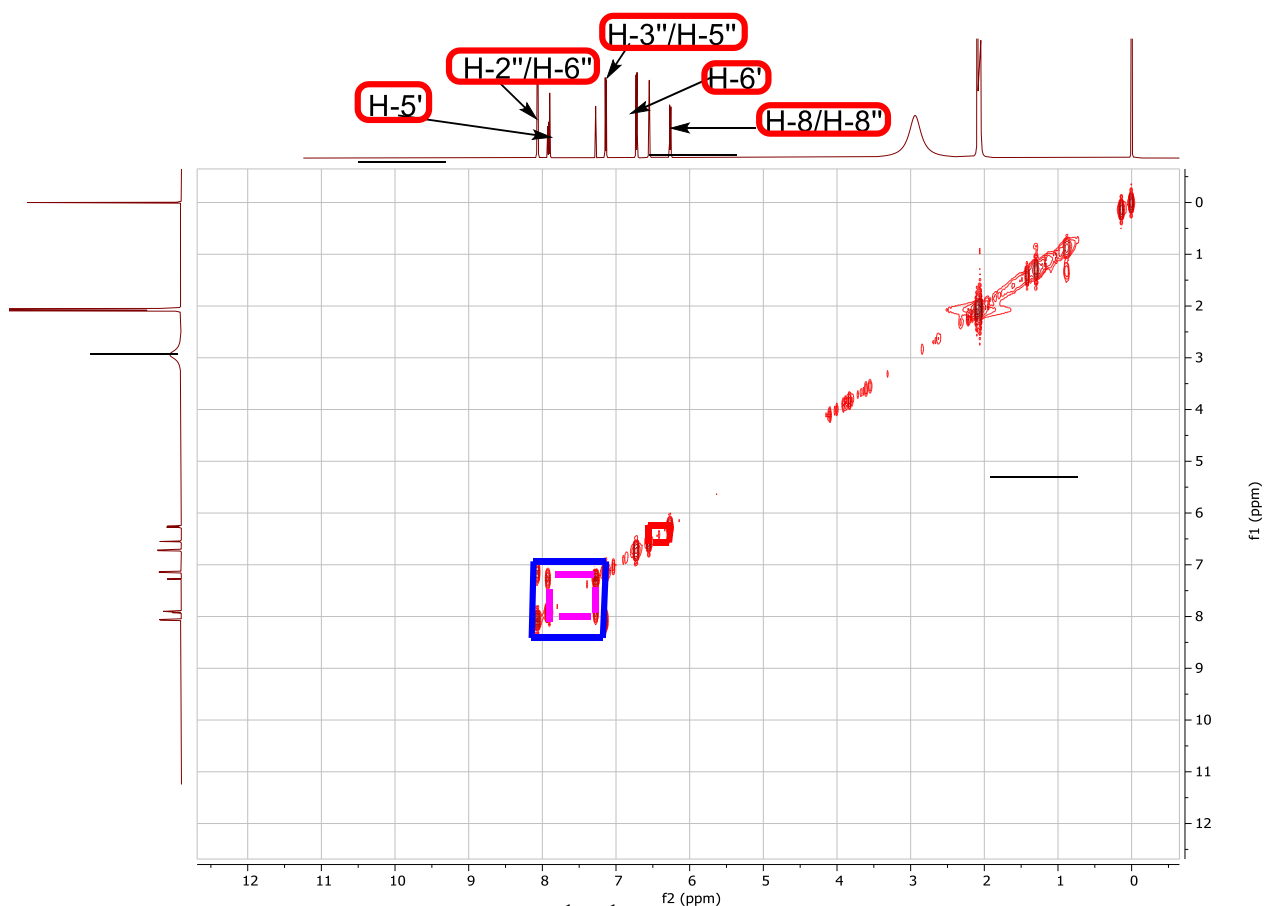


Figure 27 : Spectre COSY ^1H - ^1H (600 MHz, Acetone- d_6) de MD3

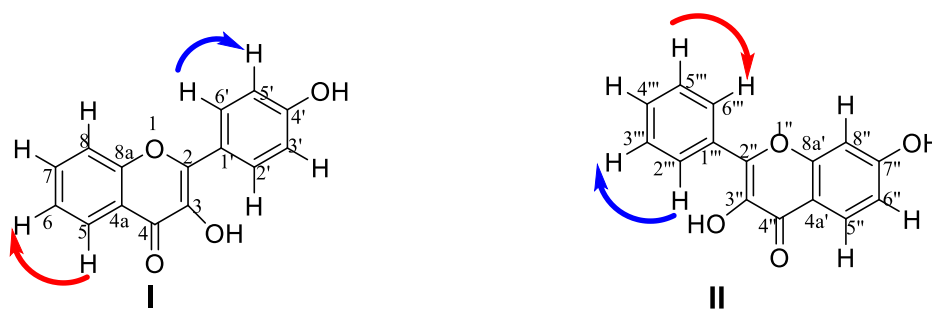


Figure 28 : Corrélation clés du spectre COSY.

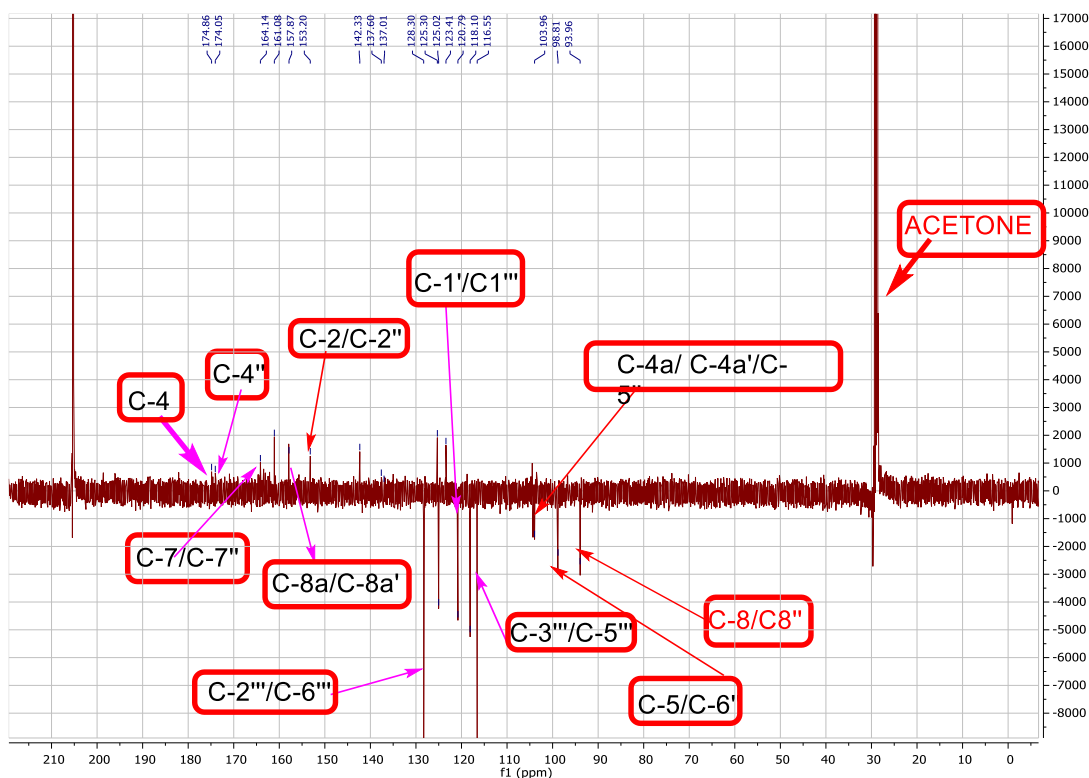


Figure 29 : Spectre APT/ (150 MHz, Acetone-d6) de MD3

Les données RMN¹³C et APT présentent trente atomes de carbones, qui ont été résolues par des expériences APT (J-mol) et 2D HSQC, parmi lesquels :

Deux groupements carbonyles cétoniques à δ_C 174,05 et δ_C 174,3 ppm, confirmant ainsi la présence de deux unités de flavonols dans la structure.

Deux atomes de carbones sp^2 à δ_C 137,5 (C-3/C-3'') ppm confirmant la présence d'un squelette de type flavanol.

Douze atomes de carbones sp^2

Onze carbones quaternaires

De plus, le spectre de masse HRESIMS nous présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire correspondant à m/z 537, 0848. Ce qui confirme que notre structure est une biflavonoïde de type flavanol-flavanol.

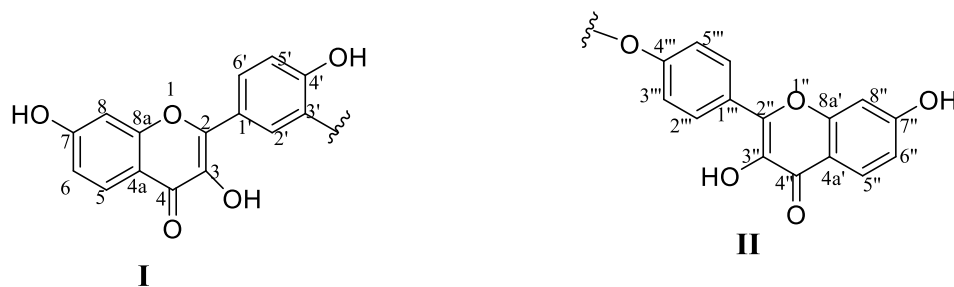


Figure 30 : Quelques sous structure impliquées dans la structure de MD3.

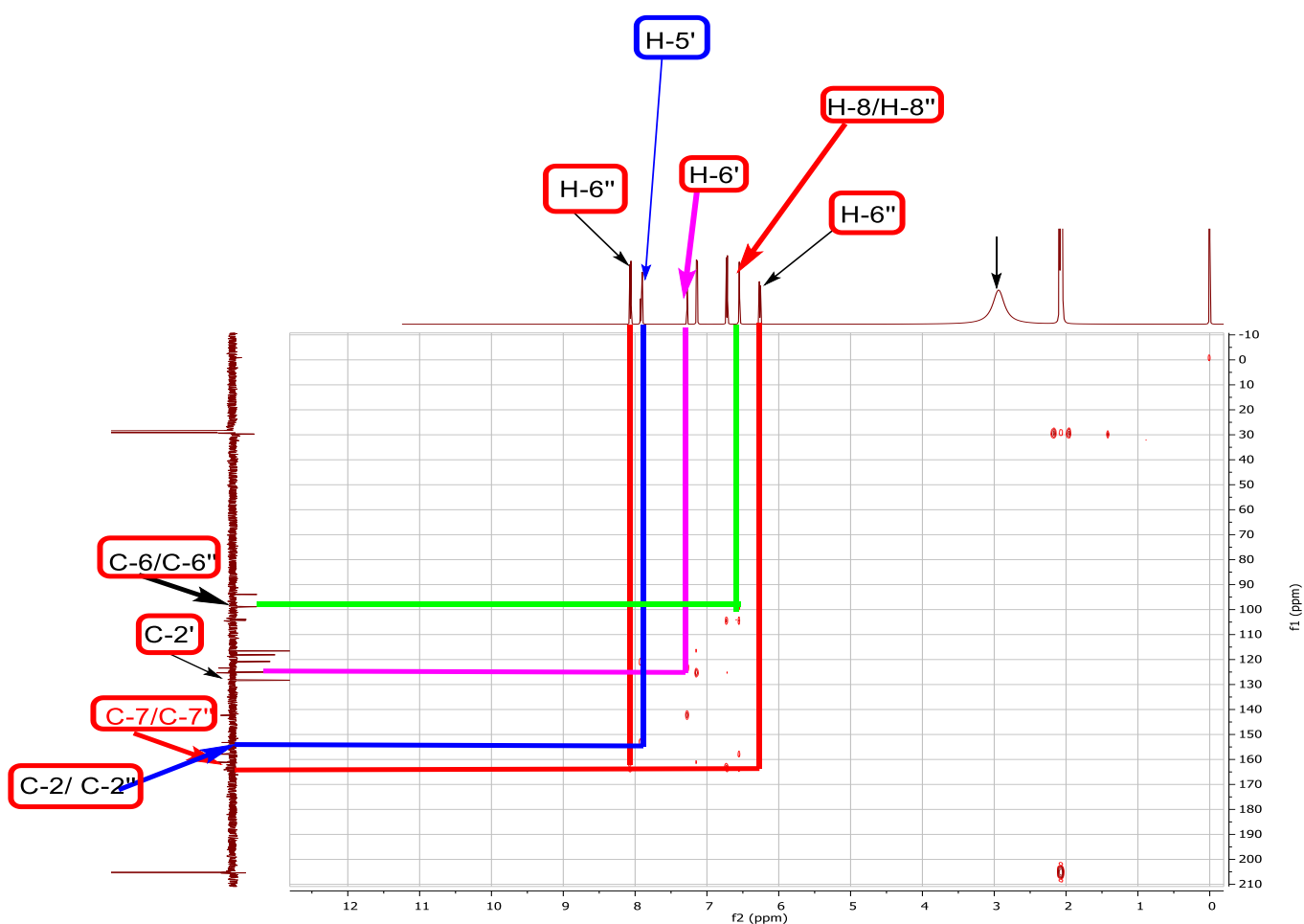


Figure 31 : Spectre HMBC de MD3.

La jonction entre les deux unités flavonols a été possible grâce aux corrélations observées sur le spectre RMN¹³C et aussi d'après la revue de littérature de la quercétine et Kaempférol (Schroedinger L., 2007), suggérant que les deux unités de flavones sont liées en position C-3' (I) - C-4'' (II). Le spectre HMBC (Fig 31) confirme la liaison inter-flavonoïde C-3' (I)-O-C-4'' (II) présentant des corrélations avec H-2' (I) (δ_H 7,91), H-5' (I) (δ_H 7,24); et C-4''' (II) avec H-3'''/5''' (δ_H 7,16) and H-2'''/6''' (δ_H 7,16); H-2'''/6''' (δ_H 8,09), respectivement.

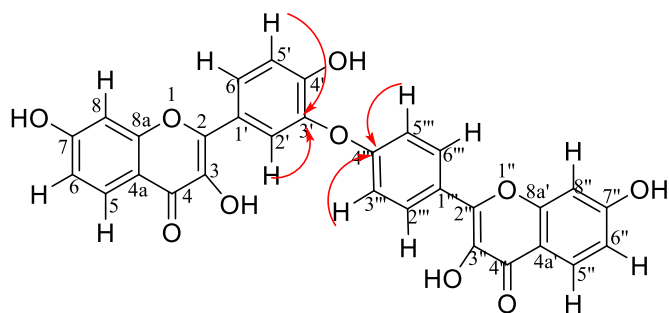


Figure 32 : Corrélation clé du spectre HMBC de MD3.

Sur la base des interprétations des données spectrales ci-dessus et par comparaison avec ceux de la littérature, le composé MD3 a été identifié comme étant le **7,4- dihydroxyflavonol -C-3'(I)-O-C-4'(II) -7-hydroxyflavonol (nouveau composé)**.

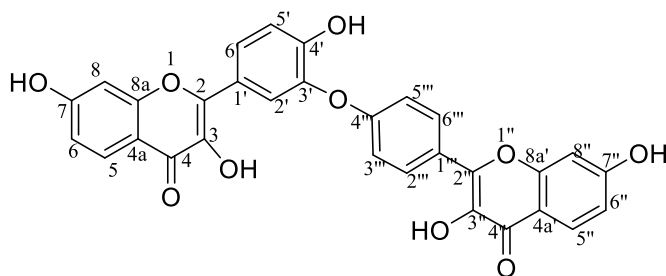


Tableau XII : Données spectrales RMN¹H (600 MHz, Acétone -d₆), RMN¹³C (150 MHz, Acétone-d₆) de MD3

Position	δ_c ppm	Type C	δ_H (ppm), N° H, m, J(Hz)
2	145.5	C	-
3	137.5	C	2,94 (2H;s)
4	174.3	C	
5	104.4	C	6,74(1H ,d , 6,7)
6	98.7	CH	6.28 (1H, dd; 2,0 ; 6,7)
7	164,6	C	
8	93.9	CH	6.55 (1H, d, 2,0)
8a	153.4	C	
4a	105.0		
1'	120.8	C	
2'	123.5	CH	7.91 (1H, d, 2,2)
3'	142.8	C	
4'	153.4	C	
5'	118.1	CH	7.24 (1H ,d , 8,6)
6'	126.3	CH	7.94 (1H, dd, 2,2 ; 8,6)
2''	145.1	C	
3''	137.5	C	2,94 (2H;s)
4''	174,1	C	
5''	104.3	C	6,74(1H ,d , 6,7)
6''	98.7	CH	6.28 (1H,dd, 2,0 ; 6,7)
7''	164.4	C	
8''	94.3	CH	6.55 (1H, d, 2,0)
8a'	153.1	C	
4a'	103.9	C	
1'''	125.0	C	
2'''	128,3	CH	8.09 (1H, d , 8,8)
3'''	116.5	CH	7.16 (1H, d, 8,8)
4'''	161.0	C	
5'''	116.5	CH	7,16 (1H,d, 8,8)
6'''	128,3	CH	8,09(1H, d, 8,8)

II.3. Évaluation de l'activité inhibitrice de MD1 ET MD3 sur le *plasmodium falciparum* NF₅₄.

II.3.1. Activité antiplasmodiale

L'activité des composés isolés, a été réalisée sur la souche résistante du *Plasmodium falciparum* NF₅₄. Il en ressort de cette étude que le composé 1 a montré la plus grande activité antiplasmodiale avec une CI₅₀ de 0,72µM, tandis que le composé 2 avec une CI₅₀ de 8,16µM montre aussi une bonne activité comparée à l'artésunate utilisé comme composé de référence. (Tableau 6). Néanmoins, une comparaison plus poussée avec les résultats de l'analyse d'amarrage moléculaire fournit une comparaison supplémentaire. L'effet inhibiteur du composé 1 (CI₅₀=0,72µM) sur le *Plasmodium falciparum* NF₅₀ peut s'expliquer par la présence de deux groupements méthoxyles en C-7 et C-7''. L'influence d'un groupement méthoxyl dans l'activité antiplasmodiale des composés biflavonoïdes n'est pas une surprise, car une tendance similaire a été observé dans un rapport précédent (Messi et al., 2016). Ces flavones méthoxylées sont connues pour leur potentiel thérapeutique (Stellerova D. et al., 2022). En outre l'augmentation du nombre de groupements méthoxyles dans un flavonoïde renforce la nature lipophile de la flavonoïde (Bagla.V et al.,2014).

Concernant le composé 2, ce composé comporte les groupements hydroxyyles en position (C3 et C3''), et par conséquent présente une activité élevée, mais moins élevée par rapport au composé 1. Dans nos recherches, sur le mode d'action de ces composés contre les souches NF₅₄ de *P. falciparum*, une analyse du docking moléculaire a été réalisé afin de déterminer leur affinité pour les interactions électrophiles ou nucléophiles.

Tableau XIII : Activité antiplasmodiale de l'extrait au méthanol des composés 1 et 2 isolés des racines de *Margaritaria Discoidea*.

Composés isolés	IC ₅₀ (NF ₅₄ strain of P.F).
Composé 1	0,72 ± 0,11 ^b µM
Composé2	8.16 ± 1,50 ^c µM
Chloroquine	0,006 ± 0,002 ^a µM (référence)
Artésunate	0,002 ± ND ^a µM

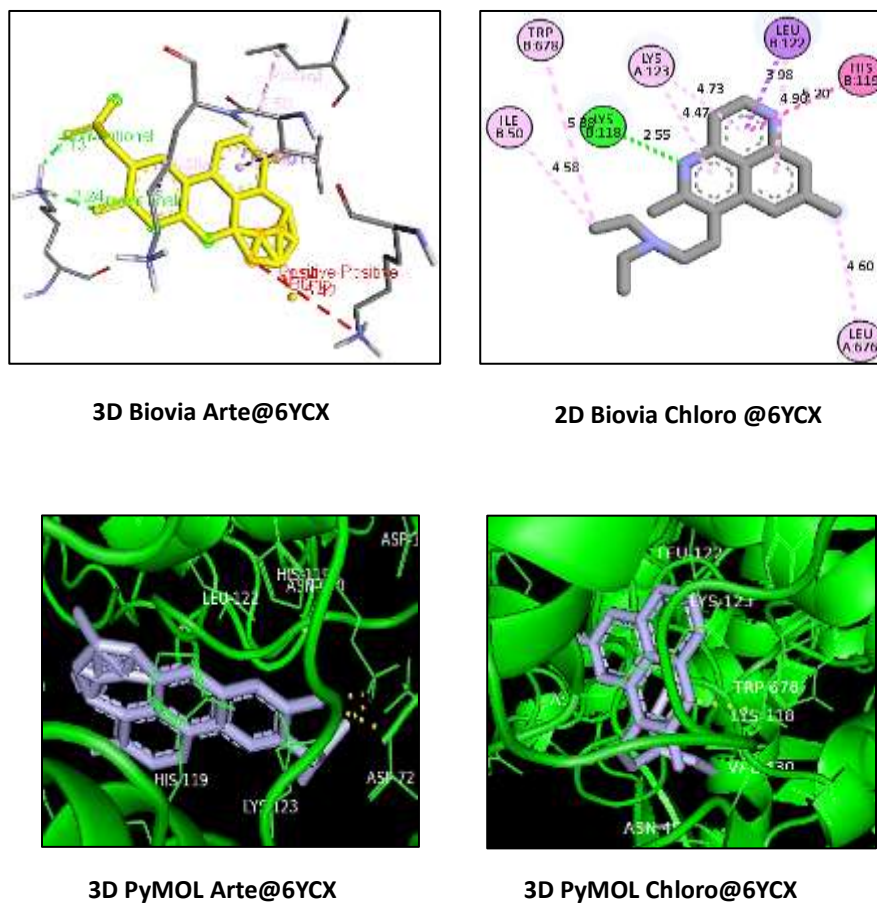


Figure 33 : La représentation graphique 2D et 3D du score d’amarrage moléculaire de Arte@6YCX et Chloro@6YCX, visualisée avec les logiciels Biovia Discovery Studio and PyMOL.

La stabilité et la réactivité des ligands sont déterminées par la force de liaison à laquelle ils sont censés se lier à la protéine. Il convient de noter que les affinités de liaison pour C1, C2, étaient respectivement de -10,0 kcal /mol et -9,4 kcal/mol, (voir tableau 14). Ces valeurs indiquent que les composés étudiés révèlent des potentiels efficaces lorsqu’ils interagissent avec le récepteur cible (6YCX), notamment pour inhiber le *Plasmodium falciparum* NF₅₄ résistant à la chloroquine.

En outre, il a été démontré qu’une quantité adéquate de liaisons hydrogènes conventionnelles a été formée, ce qui améliore l’interaction entre les ligands et les protéines. Les figures 14a et 14b illustrent les interactions 2D et 3D entre les composés étudiés et les médicaments standard, contre la protéine réceptrice (6YCX), telles qu’elles ont été visualisées par les logiciels d’application Biovia Discivery Studio et PyMOL. C1@6YCX possède des liaisons hydrogènes conventionnelles substantielles dans les résidus d’acides aminés suivants, avec leurs longueurs de liaisons associées : A :ASP :511 (2,43 Å), A : ARG :706 (2.10, 2.22 Å).

D'autre part, C2@6YCX a montré une liaison hydrogène conventionnelle significative intégrée comme :

A: LYS :183 (2,02Å), A : ARG :706 (2,10, 2,22 Å), et A : ARG 706 (2,12 Å).

Parmi les deux médicaments standard, l'artésunate présente une affinité de liaison plus que chloroquine (-5,7 kcal/mol), alors que deux liaisons hydrogènes sont enregistrées pour l'un, et une seule pour l'autre. Plus le nombre de liaisons d'hydrogènes conventionnelles est élevé, plus l'interaction est forte. Par conséquent, les composés de cette étude ont obtenu une meilleure interaction avec la protéine réceptrice que les médicaments standards. Les résultats démontrent que chaque composé se lie à la protéine cible par une liaison hydrogène connue. Par rapport aux autres composés et médicaments étudié, C1 et C2 présentent les affinités de liaisons globales les plus élevés avec les résidus d'acides aminés appropriées, ce qui suggère qu'ils sont les plus efficaces pour inhiber le plasmodium falciparum résistant à la chloroquine, et qu'ils sont donc de bons candidats pour des études plus approfondies et un développement ultérieur en tant qu'agent antipaludiques puissants.

Tableau XIV : Résultats de l'amarrage moléculaire, comparant l'interaction entre les composés étudiés (C1 et C2) et les médicaments standard Artésunate (Arte) et chloroquine (Chloro) contre la protéine réceptrice.

Interaction	Affinité de liaison(kcal/mol)	Residue d'amino acide	Bond distance (Å)	Nombre d'obligation d'hydrogenes
C1@6YCX	-10.0	A:ASP:511 A:THR:659 A:ARG:706	2.41 2.64 2.34	3
C2@6YCX	-9.4	A:LYS:183 A:PRO:661 A:ARG:706 A:ARG:706	2.02 2.43 2.10, 2.22 2.12	5
Arte@6YCX	-8.7	B:LYS:118	2.13, 2.24	2
Chloro@6YCX	-5.7	B:LYS:118	2.55	1

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail portait sur l'étude phytochimique des biflavonoïdes des racines de *Margaritaria discoidea*, comme nouvelle mesure antipaludéens et thérapeutique sur les souches résistantes *NF₅₄* du *Plasmodium falciparum*. Suites aux résultats obtenus, une investigation phytochimique sur l'extraits à l'acétate d'éthyle de cette plante a conduit à l'isolement de quatre composés dont deux ont été caractérisés. L'analyse structurale s'est fait grâce aux techniques de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire 1D et 2D.

Dans le but de la recherche des composés a potentiel antiplasmodiale de cet extrait, nous avons évalué l'activité inhibitrice des composés MD1 et MD3 sur les souches résistantes *NF₅₄* du *Plasmodium falciparum*. Les résultats montrent que le composé 1 à savoir 2,3-dihydroflavone-7'',7-O-diméthyléther (**MD1**) a présenté une très bonne activité inhibitrice avec une IC₅₀ de 0,72 ± 0,11 µM, à cause de la présence des deux groupements méthoxylés fixé en position (C-7/C-7'') de (MD1). Cependant, le composé 7,4'-dihydroxyflavonol-(C-3'(I)-O-C-4''(II)) -7-hydroflavonol (**MD3**) présente aussi une bonne activité antiplasmodiale avec une IC₅₀ de 0,002±ND µM, dû à la présence de deux groupement hydroxyles fixé en position (C-3/C-3'').

À partir des résultats obtenus, nous sommes arrivés à conclure que (MD1) et (MD3) ont montré des liaisons plus fortes contre la protéine réceptrice 6YCX par rapport à l'artésunate et à la chloroquine, ce qui suggère une meilleure interaction avec la protéine réceptrice.

Dans ce projet, nous nous sommes familiarisés avec différentes techniques d'isolement, de caractérisation et de modélisation moléculaire ; voire l'optimisation de géométrie, des molécules, de la visualisation de structures enzymatiques. Le Docking moléculaire représente un outil essentiel dans la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

Nous comptons ainsi dans nos prochaines investigations :

- Terminer la purification des fractions restantes afin d'élucider leurs structures, ainsi que celles des composés MD2 et MD4
- Étendre nos investigations sur les autres parties de la plante restante
- Entreprendre les études par dynamique moléculaire afin de corrélérer les deux paramètres énergétiques expérimentaux

- Entreprendre des investigations biologiques plus poussées *in vivo* sur les modèles animaux des composés MD1, MD2, MD3 et MD4.

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. MATERIELS VEGETAL, EXTRACTION ET CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

III.1.1. Appareillage

Les pesées ont été réalisées à l'aide d'une balance électronique de type 'Sartorius'.

La chromatographie sur colonne a été réalisée sur 02 types de phases stationnaires : le séphadex LH₂₀ et la silice gel 60.

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques finies fluorescentes de dimensions 20×20 cm et d'épaisseur 0,2 mm. Le développement des plaques chromatographiques s'est fait avec les systèmes d'éluant CH₂Cl₂/MeOH (50/1), (30/1), (10/1), (5/1), (3/1), (100/100) (DCM/MeOH).

Les taches sur les plaques de CCM ont été révélées par pulvérisation avec une solution d'acide sulfurique diluée (H₂SO₄ 5%) suivie d'un chauffage à environ 60° pendant quelques minutes.

Les plaques préparatives de gel de silice sur les verres ont été utilisées pour séparer des mélanges et développées avec les mêmes systèmes d'éluant. Les bandes résultant de cette séparation ont été visualisées à l'aide d'une lampe UV (λ 254 nm) et raclées, puis élués avec le MeOH pour les composés purs.

L'évaporation du solvant a été faite au moyen d'un évaporateur rotatif de type BUCHI 461. Les spectres RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) ont été enregistrés sur un appareil Brüker WM 600 MHz, les composés étant dissous dans de l'Acétone deutéré. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS qui a été pris comme référence.

Les spectres ont été référencés par rapport à l'étalon interne Me₄SI à 0 ppm. Les constantes de couplages J ont été rapportées en Hz.

Les HRESIMS ont été obtenus à l'aide d'un instrument MSQ Thermo Finnigan.

Les spectres de masse ont été obtenus par la technique + TOF MS sur un appareil Piber-Nermag V₃₀. Les spectres IR ont été réalisés sur un appareil de marque JASCO FTIR-3000E en utilisant les pastilles transparentes de KBr.

III.1.2. Matériel végétal

Les racines de *Margaritaria discoidea* dans le cadre de cette étude ont été récoltées le 30 Novembre 2023 en matinée, dans la région de l'Adamaoua, plus précisément à Karna Manga, petite localité située à 13 km de Ngaoundéré au Cameroun par moi et assisté par le botaniste M. Binwé Jean Baptiste et un échantillon de référence se trouve à l'Herbier National du Cameroun sous le n°10749 /SRFCam.

III.1.3. Extraction et isolement des constituants des racines de *Margaritaria discoidea*

III.1.3.1. Extraction des constituants des racines de *Margaritaria discoidea*

Les racines (écorce et bois) de *Margaritaria discoidea* ont été découpées, séchées à l'air libre pendant trois semaines, puis broyées avant d'obtenir la poudre fine de coloration marron et de masse 1,21 Kg. Cette poudre a été macérée dans 3 L de méthanol à température ambiante pendant 72 heures tout en homogénéisant le mélange (poudre + méthanol). Le filtra obtenu après macération (par filtration avec un papier filtre wattman de porosité 2) a été concentré à partir d'un évaporateur rotatif sous pression réduite à 65°C, pour donner 86 g d'extrait brute. Une partie de cet extrait (76 g) a été mélangé dans un système MeOH/H₂O (80 : 20) avant d'être partitionné à l'hexane (3 g) pour le débarrasser des huiles et de la chlorophylle. L'épuisement de la phase résiduelle MeOH/H₂O (80 : 20) avec l'acétate d'éthyle a donné un extrait à l'acétate d'éthyle (60 g).

III.1.3.2. Isolement des constituants des racines de *Margaritaria discoidea*

Nous avons commencé par effectuer un profil chromatographique sur l'extrait à l'acétate d'éthyle, afin de connaître quel sera notre meilleur profil chromatographie lors de l'élution de la colonne puis préparer l'amalgame de silice et le gel de silice. 24h après, nous avons monté la colonne de dégrossissement. Grâce au système de solvant binaire CH₂Cl₂/MeOH aux proportions : 50/1, 30/1, 20/1, 10/1, 5/1 3/1, et 100% MeOH (polarité croissante). Nous avons au total, obtenus 141 fractions, collectées (ou récoltées) chacune dans 150 ml d'erenmeyer avant de concentrer à l'évaporateur rotatif puis de conserver dans de petits flacons de 10 ml, avant de procéder au regroupement sur la base de la CCM analytique et des divers révélateurs pour donner 6 fractions majors de A-G : A (CH₂Cl₂/MeOH ; 50:1), B (CH₂Cl₂/MeOH ; 30:1), C (CH₂Cl₂/MeOH ; 20:1), D (CH₂Cl₂/MeOH ; 10:1) et E (CH₂Cl₂/MeOH ; 5:1), F (CH₂Cl₂/MeOH ; 3/1) et 100% MeOH). Le chromatogramme de cet extrait est présenté dans le tableau suivant.

Tableau XV : Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de *Margaritaria discoidea* après dégrossissement

Eluant (CC) CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Fractions Regroupés	Masses	Colorations	Solubilité	Observations
50/1	A1 (1-19)	1,72 g	Verdâtre	MeOH	Forme huileuse et présentant un mélange de composés comme le montre les revelateurs.
30/1	B (20-55)	1,66 g	Vert pale	MeOH	Cristaux présentant deux tâches vertes après calcination
20/1	C (56-70)	1,81 g	Jaune	MeOH	Cristaux présentant une tâche jaune clair après calcination.
10/1	D (71-105)	1,10 g	Jaune	MeOH	Poudre ne comportant qu'une seule tache et de légères trainés
5/1	E (106-119)	1,35g	Orange pale	MeOH	Aspects pâteux et collants, présentant un mélange de composés.

3/1	F 120-130	1,49 g	Blanc cassé	Acétone	Poudre comportant plusieurs tâches, d'où un mélange de composé.
1	G 131-141	1,25 g	Noire	Acétone	Aspects pâteux et noirs, rendent impossible l'interprétation.
100% MeOH					

Une fois le dégrossissement terminé, nous avons procédé à la purification de nos différentes fractions. Au vu de ce qui précède, certaines fractions n'ont pas pu être purifiées parce qu'elles n'ont pas été cristallisées et se présentaient sous forme huileuses.

- **Les fractions A et G**

La fraction A (,172 g) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 50 :1) n'a pas pu être purifiée à cause de sa forme huileuse et F (2,1g) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) et G ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; et 100% MeOH) à cause de sa forme pâteuse tel que présenté par le tableau ci-dessus.

- *** Chromatographie de la fraction B**

La fraction B (1,66 g) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 30 :1) a été chromatographiée sur la colonne de gel de silice avec comme éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ aux systèmes (20/1, 15/1, 10/1, 5/1, 2/1, 1/1 et 100% MeOH) suivant un gradient de polarité croissant. Après la collecte de 80 sous-fractions de 50 ml, nous avons obtenu deux composés purs (de tâche vert clair et vert sombre) indexés : MD1 (0,76) et MD2 (0,56 g).

- **Chromatographie des fractions C**

La fraction C a été obtenues lors du dégrossissement dans un système ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 20 :1), De masse 1,81 g. Lors de la purification sur gel de silice, nous avons constaté que cette fraction contenait principalement un composé indexé MD3, de masse respective 1,02 g.

- **Chromatographie de la fraction D**

La fraction D a été obtenues lors du dégrossissement dans un système ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 10 :1), De masse 1,81 g. Lors de la purification au 100/100 Séphadex LH-20, nous avons constaté que cette fraction contenait principalement un composé indexé MD4, de masse respective 0,52 g.

***Chromatographie des fractions E**

L'analyse CCM de la fraction E a été obtenue lors du dégrossissement dans un système ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 5 :1), de masse 1,49 g, Ce produit a été séparé en ayant recours à la colonne de gel de silice (63-200 μm) avec un système isocratique $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 5 :1 conduisant ainsi à un composé mélangé.

- **Chromatographie des fractions F**

La fraction F ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 3 :1) de masse 1,25 g, analysée par CCM a présenté plusieurs tâches avec des trainées minimales. Cependant ce composé ne pouvait pas être purifier ni au séphadex LH-20, ni dans une colonne de gel à silice (63-200 μm) du simple fait qu'il ne se dissolvait pas. Nous l'avons donc lavé avec de l'acétone et nous avons toujours constaté que se composé est un mélange.

III.2. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique permet d'identifier les différentes familles de composés présents dans les extraits. Il a été réalisé par la méthode décrite par (Sofowora 1993 ; Harbone 1998).

III.2.1. Test au chlorure ferrique

- **But :**

Identifications des phénols

- **Protocole expérimentale**

Dans 5 ml d'éthanol contenus dans un tube à essais, nous avons mis quelques cristaux du composé (0,50 g). En suite à la solution obtenue, on ajoute trois gouttes d'une solution aqueuse de chlorure ferrique.

- **Résultats et interprétation**

Une coloration violette très foncé nous confirme la présence des phénols

III.2.2. Test de Shinoda

- **But**

Ce test a pour but d'identifier les flavonoïdes

- **Protocole expérimentale**

On dissout 1mg du produit isolé dans 1mL d'éthanol placé dans un tube à essais et on ajoute cinq gouttes d'acide chlorhydriques (HCl) concentré puis quelques copeaux de magnésium.

- **Résultats et interprétation**

Un constat s'en suit d'une coloration rouge brique qui caractérise la présence des flavonoïdes

III.3. Méthodes chromatographies sur Couche Mince

La chromatographie sur couche mince est basée sur le phénomène de partage. Autrement dit, son principe repose sur la différence d'affinité entre les différents composés contenus dans un mélange où règne deux phases et donc l'une est stationnaire et l'autres mobile. Cette méthode a pour but de vérifier l'état de pureté des produits obtenus ainsi que de chercher le système d'éluant à utiliser lors de la chromatographie sur colonne. Des plaques fines de gel de silice 60 F₂₅₄ fluorescent sur l'aluminium ont été utilisées. Le développement de cette plaque s'est réalisé avec un mélange de CH₂Cl₂/MeOH comme éluant. Cependant, la chromatographie sur couche mince comporte plusieurs étapes.

- **Préparation de la plaque chromatographique**

Pour cela, nous avons pris une lame de plaque CCM de 20/20 Cm à laquelle nous avons coupé une lamelle de 5/20 (au ¼), puis découpés cette dernière avec le cutter en quatre. Pour la ligne dépôt, prendre 1 cm et le front prendre 0,5 cm. Notons que la découpe dépend de l'utilisateur.

- **Dépôt de l'échantillon**

L'extrait à analyser est dissous dans un solvant organique. A l'aide d'un tube capillaire, les dépôts doivent être de l'ordre de 10 µL et concernant l'équidistance entre les spots, cela dépend de l'utilisateur. Mais généralement c'est de 8 mm au cas de plusieurs dépôts.

- **Révélation**

La révélation des taches est faite à l'aide d'une lampe UV $\lambda = 254$ nm et à $\lambda = 365$ nm et par pulvérisation avec une solution de H₂SO₄ diluée sous un hôte. L'ensemble est séché à l'étuve à 30°C pendant 10 minutes avant de chauffer sur la plaque chauffante, sur laquelle on a posé du papier d'Aluminium.

III.4. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne permet de séparer en vue d'isoler de petites quantités de chacun des constituants du mélange. La silice gel 60 a été utilisée comme phase stationnaire. Il existe deux modes d'élution en chromatographie sur colonne :

Le mode isocratique : la polarité de la phase mobile est maintenue du début jusqu'à la fin de l'élution.

- Le mode gradient de polarité : le système de l'éluant varie selon un ordre croissant.

Au vu de tout ce qui précède, la préparation de la colonne se fait en plusieurs étapes notamment :

- **Activation de la silice**

Le gel de silice est activé par abandon de 24 dans le solvant de préparation à la température ambiante. Ailleurs, le gel de silice est activé par chauffage dans une étuve à 110°C pendant 20 minutes.

- **Préparation de la colonne**

Le gel de silice est introduit dans la colonne à partir d'un solvant organique. Pour éviter la cassure de la phase stationnaire, le solvant doit être versé en continu ou de manière progressive.

- **Dépôt de l'extrait à fractionner**

L'extrait est mélangé avec un volume de Chlorure de méthylène puis on ajoute un peu de gel de silice. Le solvant est évaporé dans l'étuve jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le dépôt est préparé avec 2 g d'extrait et 50g de gel de silice (30 fois à la masse du dépôt).

III.5. Méthodes de purifications et séparations

***Filtration sur gel**

A chaque fois que cette technique a été utilisée c'est-à-dire pour séparer ou purifier, la phase stationnaire a toujours été la silice ou le Séphadex-LH20 et celle mobile le solvant d'élution. Les échantillons étaient introduits sous forme liquide, le débit généralement lent n'excédait pas 2 ml/min. La taille des colonnes utilisées était sélectionnée en fonction de la quantité de l'échantillon à séparer ou à purifier.

- **Lavage**

Le lavage du produit consiste à verser dans un flacon contenant le produit quelque mL de solvant organique (de préférence choisir le solvant organique qui ne dissout pas le produit) et le liquide après mixage est siphonné à l'aide d'une pipette pasteur. L'expérience est répétée plusieurs fois avant de révéifier sa pureté.

III.6. Activités biologiques

III.6.1. L'Evaluation de l'essai antiplasmodique

L'évaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro* a été évaluée contre les stades érythrocytaires de la souche *NF₅₄* de *Plasmodium falciparum* résistante à la chloroquine en utilisant un test d'incorporation de ³H-hypoxanthine décrit précédemment (**Thaithong S. et al.,1983**), dont la souche *NF₅₄* résistante à la chloroquine et à la pyriméthamine provenant d'Afrique du Sud, et la chloroquine standard a été dissous dans du DMSO à 10 Ug/mL et ajoutés à des cultures de parasites incubées dans un milieu RPMI 1640 sans hypoxanthine, complété par du HEPES (5,94 g/L), de la néomycine (100U/mL), de l'Albumax et des globules rouges humains lavés A* à 2,5 d'hématocrite (0,3 de parasitémie). Des dilutions en série de l'échantillon de 113 fois couvrant une plage de 100 à 0,002 Ug/mL ont été préparées. Les plaques à 96 puits ont été incubées dans une atmosphère humidifiée à 37°C ; CO₂, 3% O₂ et 93% N₂. Après 48h, 50 µL de 3H-hypoxanthine (0,5 Ci) ont été ajoutés à chaque puits.

III.6.2. Analyse statistique

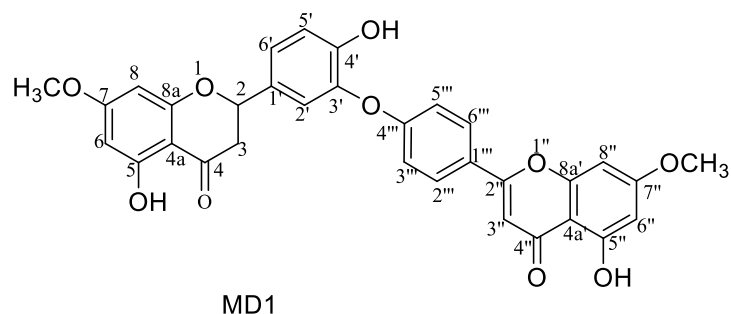
Les données ont été représentées sous forme de moyenne + écart-type. L'analyse de variance (ANOVA). Les différences avec une valeur p <0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

III.7. Protocole du Docking moléculaire (Amarrage moléculaire)

L'analyse Docking moléculaire est une technique essentielle dans la conception de médicaments, car elle fournit des informations utiles sur l'interaction entre les ligands et les protéines cibles. C'est pourquoi une partie au cœur du glidéosome, connue sous le nom de moteur de la myosine A de *Plasmodium falciparum* (PfMyoA) et dont l'ID protéine est 6YCX, a été sélectionnée et téléchargée à partir de la banque des données sur les protéines (PDB) (WWW.rcsb.org). Le glidéosome est un complexe macromoléculaire responsable de mobilité, de l'infectiosité et de la pathogénie du *Plasmodium Falciparum* (**Amara .C et al.,2014**). L'inhibition du glidéosome est une stratégie

thérapeutique viable contre le paludisme, causé par le *Plasmodium falciparum* résistant aux médicaments.

III.8. **Données physico-Chimiques des composés isolés MD1: 2,3-dihydroflavone-7'',7-O-dimethyl ether**



Aspect : Cristaux Vert

Solubilité : MeOH

Système de solvant : CH₂Cl₂/MeOH

Polarité : 30/1

Masse : 0,76g

Test de Shinoda positif

Formule brute : C₃₂H₂₄O₁₀

HRESIMS : m/z 568,1440 [M+H]⁺

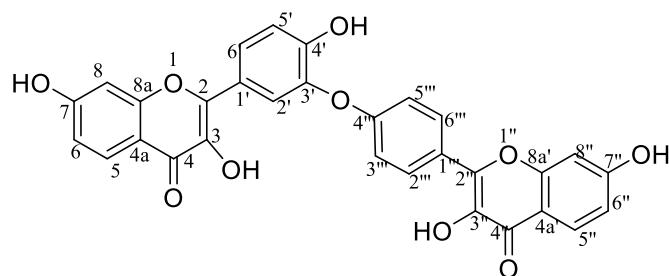
Spectre RMN ¹H(600 MHz, Acétone-*d*₆) : **Voire tableau XI Page 63**

δH(ppm) 5.54(1H, dd, 12,7 , 3,0 Hz, H-2), 2.86 (1H, dd, 17.1, 3,3 Hz, H-3) , 3.24 (1H ,dd, 17.7 , 12,7Hz , H-3) , 6.04 (1H ,d ,2.4 Hz, H-6) , 6.06 (1H, d ,2.4 Hz ,H-8), 7.36 (1H, dd, 8,1, 2.1Hz, H-6'), 7.35 (1H ,d ,2,2 Hz, H-2') , 6.44 (1H d 2.6), 7.15 (1H, d ,8.1Hz, H-5'), 12.03/12,93 (2H, s, 5OH/5''OH),

Spectre de RMN ¹H (600 MHz, Acétone-*d*₆) : Voire tableau XI Page 63.

δH(ppm) 78,5; 42,6 ; 196,4 ; 104,4 ; 163,8 ; 94,6 ; 167,9 ; 55,5 ; 93,9 ; 163,0 ; 131,3 ; 120,7 ; 141,8 ; 149,6 ; 117,4 ; 124,6 ; 163,4 ; 102,7 ; 182,0 ; 162,1 ; 98,8 ; 167,9 ; 55,5 ; 93,9 ; 102,2 ; 157,8 ; 125,0

MD3 : 7,4'-dihydroxyflavonol-(C-3'(I)-O-C-4''(II)) -7-hydroflavonol



Aspect: Cristaux jaune

Solubilité : MeOH

Système de solvant : CH₂Cl₂/MeOH

Polarité : 20/1

Masse : 1,81 g

Test de Shinoda positif

HRESIMS: m/z 538,0827 [M-H]⁻

Formule brute : C₃₀H₁₈O₁₀



Spectre RMN¹H (600MHz, Acétone-d₆) : Voir tableau VII Page 72

δH(ppm) 6,74 (1H, d, 6,7 Hz, H-5/H-5''); 6,28 (1H, dd, 2,0Hz, H-6/H-6''); 6,55(1H, dd, 2,0 Hz , H8/8''); 7,91(1H, dd , 2,2Hz, H-2') ; 7,94(1H,dd, 2,2 ;8,6 Hz,H-6') ; 7,24 (1H, d, 8,6 Hz, H-5'), 8,09(1H,d,8,8 Hz , H-2'''/H-6'''); ; 7,16(1H,d,8,8 Hz, H-3'''/H-5'''); ; 12,97 (1H,s,5-OH) ; 12,96(1H,s,5'-OH).

Spectre de RMN ¹³C (150MHz, Acétone-d₆) : Voir tableau VII Page 72

δ H(ppm) 145.5, 137.5, 174.3, 104.4, 98.7, 164.6, 93.9, 153.4, 105.0, 120.8, 123.5, 142.8, 153.4, 118.1, 126.3, 145.1, 137.5, 174.1, 104.3, 98.7, 164.4, 94.3, 153.1, 103.9, 125.0, 128.3, 116.5, 161.0, 116.5, 128.3

MD2

Aspect : Cristaux vert sombre

Solubilité : MeOH

Système de solvant : CH₂Cl₂/MeOH

Polarité : 30/1

Masse : 0,56 g

Test de Shinoda positif

MD4

Aspect : Cristaux orange

Solubilité : MeOH

Système de solvant : CH₂Cl₂/MeOH

Polarité : 10/1

Masse : 0,52 g

Test de Shinoda positif

REFERENCES

REFERENCES

- Adedapo AA, Sofidiya MO, Afolayan AJ (2009).** "Anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous extracts of *Margaritaria discoidea* (Euphorbiaceae) stem bark in experimental animal models". *Revista De Biología Tropical*. Vol. 57, pp. 1193–1200.
- Kew, Heywood, (2019).** Flowering plant of the world. 3th edition, Oxford University press, *Oxford*, P 141-152.
- Adjanohoun, E.J(1989).** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Cameroun. *Journal d'Agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée*, Vol.36, pp. 139-146.
- APG III., (2009).** Angiosperm Phylogeny Group an update of the angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: *bot. J. of the linnean society*: 16, 105-121.
- Airy Shaw (1967)** The international plant names index. *Kew Bull.* Vol. 20 (3) pp. 387
- Airy Shaw, H.K. (1975).** The euphorbiaceae of Borneo. *Kew Bulletin*, vol. 30 pp. 379-383.
- Akhtar, S. (2018).** Ethnopharmacological survey of plants used in the treatment of gastrointestinal disorders in Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 211, pp. 345-353.
- Alzand, K.I. and Mohamed, M.A. (2012)** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. *J. Pharm. Res.* vol. 5 pp. 4013-4020.
- Ambe, G. A. & F. Malaisse. (2010).** Diversité des plantes médicinales et ethnotaxonomie en pays malinke de Côte d'Ivoire. *Journal of ethnopharmacology* P331-338.
- Arama. C, M, Troye-Blomberg (2014).** The path of malaria vaccine development challenges and perspectives, *J. Intern. Med.* Vol. 275 (5) pp. 456-466.
- Bagla, V.P, McGawn L, Elgorashi.E (2014).** Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves BMC Complement. *Altern. Med.*, Vol. 14 pp. 383.
- (Baill.)G.L.Webster , J.Arnold Arbor. 50: 344 (1969).**
- Basilevskaia, V., 1969.** Plantes médicinales de Guinée, Imprimerie Patrice Lumumba. Guinee Conakry.
- Brendenkamp, C.L. (2019).** Euphorbiaceae. Flora of southern Africa, Vol. 13, pp. 137-140.
- Bruneton, J., (1993).** Pharmacognosie phytochimie et plantes médicinales. *Tec et doc Lavoisier Paris*, pp. 310-370.
- Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie : (phytochemistry, medicinal, plants). 2è Ed. Intercept Ltd., Hampshire, UK., Doct, 1136.

REFERENCES

- Martinelli, L. M. B., (2020)** : Etude de la biosynthèse des terpènes et de leur régulation chez les *Pelargonium x Hybridum*, thèse de doctorat au LBVPAM: 1, 21-26.
- Brushi, P., M. Morganti, M. Mancini, M.A. Signorini (2011)**. Traditional healers and laypeople: A quantitative approach to local knowledge on medicinal plants in Muda. *Journal of Ethnopharmacology* 138, pp. 543-563.
- Burkil H. (1985-2004)**. Jardin botanique royaux de kew. Pp. 332.
- Burkil H. (2004)**. The useful Plants of West Tropical Africa. Royal Botanic Gardens, Kew, vol 2, pp. 342-343.
- Chopra, R.N, Kirtikar et Basu (1956)**. Glossary of Indian Medicinal plants. Flora of china, Vol .11., Compounds. *Journal of Virological Methods* Vol. 20, pp. 309–321.
- Lineaus ,A.,(1782)**. An integrated system of classification of flowering plants,Columbia university press.
- Diallo A, Traore M, Keita S, Balde M, Keita A, Camara M, Van Miert S, Pieters L, Baldé A.(2012)**. Management of diabetes in Guinean traditional medicine: An ethnobotanical investigation in the coastal lowlands. *J Ethnopharmacol*. Vol. 44(2): pp. 361.
- Diallo M , Baldé M , Camara A, Traoré M , Bah M , Diallo AM, Camara A , Laurent S, Roch A, Muller R. N, Maes L, Pieters L, Baldé A. M (2015)** . Ethnomedical, Phytochemical and Biological Investigations of *Margaritaria discoidea* (Bail.) Webster, a Plant Species Widely Used in Guinean Traditional Medicine. *Journal of Plant Sciences*. Special Issue: Ethnopharmacological Investigation of Medicinal Plants. Vol. 3, No. 1-2, pp.4046.
- Dickson RA., Fleisher TC., Ekuadzi E., Mensah AY., Annan K., Woode E. (2010)**. Antibacterial, Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of *Margaritaria discoidea*, a Wound Healing Remedy from Ghana. *Pharmacognosy Journal*. Vol. 2 pp. 17.
- Edmondson, Ripert, C.I Same-Ekobo A. Tribouley J , Becker M.(2024)**. Etude sur le taux de morbidité du paludisme au cameroun. *C. Bull. Liais. Doc. OCEAC* n°97.
- Ekuadzi, E, Dickson, R, Fleischer, T, Annan, K, Pistoruis, D, Oberer, L, Gibbons, S, (2014)**. Flavonoid glycosides from the stem bark of *Margaritaria discoidea* demonstrate antibacterial and free radical scavenging activities. *Phytother* .V.28 P787.

REFERENCES

- Erlund, I., (2004).** Review of the flavonoids quercetin, hesperidin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities and bioavailability and epidemiology. *Nutr Res*: Vol. 24, pp. 74-851.
- Ferreira A.M.R., Coelho M.A. et Maciel M.A.M (1985).** ``Chemical constituents of *Margaritaria discoidea* `` *Journal of Ethnopharmacology*” vol 14 .no 2-3, p.165-169).
- Foley, P. B., (2003).** Beans, roots and leaves: A history of the chemical therapy of parkinsonism Tectum verlag.
- Foyet N., Wansi J.D., Tchuendem M.T., Ngouela R.T. et Sondengam B.L. (2013).** « Biflavonoids from *Margaritaria discoidea* ». *Phytochemistry Letters*. Vol. 6, pp.498-501.
- Frans. J. (2012).** “Euphorbiaceae” dans flora of tropical Africa, V11. Kew Royal Botanic Gartens.
- G. Fu, (2024).** Epidemiological patterns of mosquito-borne diseases globally, *J. Mosq. Res.* Vol.14.
- Gerhard, R., (1993).** Métabolismes des vegetaux, physiologie et biochimie, édition française press phytechniques et universitaires romandes. Paris: vol. 1, pp. 333.
- Glevitzky, I., Dumitrel, G, M, Pasca B., Otrisal, P, Bungau, S, Cioca, G, Pantis, C and Popa, M. (2019).** Statistical analysis of the relationship between antioxydantactivity and the structure of flavonoid compounds. *Bio. sci* : Vol. 70, pp. 3103.
- Gomes-Copelanda, K.K.P., Lédob, A.d.S., Almeidac, F.T.C.d., Moreirad, B.O., Santosd, D.C.d., Santosd, R.A.F., Jorge Mauricio Davidd, J.P.D. (2018).** Effect of elicitors in *Poincianella pyramidalis* callus culture in the biflavonoid biosynthesis. *Ind. Crop. Prod.* Vol. 126 pp 421-425.
- Gontijo, V. S., dos santos, M. H. and Viegas, J. C. (2017).** Biological and chemical aspects of natural biflavonoids from plants: A brief review. *Mini rev Med Chem*: Vol. 17, pp. 834.
- Goverts, R, Frodin, D.G. et Radcliffesmith. A (2000).** « World checklist and bibliography of Euphorbiaceae and pandaceae », dans the board of truslles of royal botanic gardens, vol.1-4 Kew P 415.
- Grady L, Webster et Paul E. Berry, 1782** « Flora of Venezuelan Guayana”, dans A.Steyermark, Paul E. Berry, kay Yastskievych, Bruce K.Holst, 37. *Margaritaria L.F .Suppl.Pl.* 66.V.5.
- Harbone, J. B and Williams, C. A., (2000).** Advances in flavonoid research sinse 1992. *Phytochemistry*. Vol. 55, pp. 481-504.

REFERENCES

- Harbone, J.B. and Baxter H. E. (1999).** The handbook of natural flavonoids joh wiley and Sons, Chichester. pp. 335-368.
- Heller W. and Forkman G. (1988).** "The flavonoids:Advances in Research since 1980", *Editor Harbone J.B. Chapman and Hall, London.* pp.138.
- Hostettmann, K., (1992).** Les plantes sources des médicaments phébotropes, la lettre de la phebologie. *Zymasa*, Nyon, Vol. 25.
- Hutchinson J. et Dalziel, J.M (1931).** Flora of West Tropical Africa, Vol. 2, pp. 4. Crown Agents for the Colonies,London.
- Ibrahim, I.M.U., et Maciel M. A. M. (1993).** Alcaloides de *Margaritaria discoidea*. *Phytochemistry*. Vol. 34, pp. 1133-536.
- Irvine. FR, 1961.** Plantes ligneuses du Ghana, avec référence spéciale à leurs utilisations. Oxford University press, Londres, Royaume-Uni. Pp. 868
- Ito C. (2002).** Chemical constituents of *Margaritaria discoidea* roots. *J. Nat. products*. Vol. 65, pp. 1470-1474.
- Jackson, B., Locksley, H. D., Scheinmann, F. and Wolstenholme, W. A.(1971)** *Phytochemistry J. ehern. Soc. C*, 3791.
- Jiang Yong-Mei, Li-Zhi Liang, Tian-Qing Gan, Dan Li, Gang Wang. (2017)** *Phytochemistry and Bioactivities of Biflavonoids: a Review. Pharmaco* Vol. 17 pp 105-108.
- Kaaya, GP, Mwangi, EN & Malonza, MM, (1995).** Activité acaride des extraits de *Margaritaria discoidea* (Euphorbiaceae) contre les tiques *Rhipicephalus appendiculatus* et *Amblyomma variegatum* (Ixodidae). *Revue interenationale d'acarologie* 21 (2) :123-129.
- Kanchanapoom,Tripetch (2002).**Biflavonoids from *Margaritaria sinensis*. *Journal of Natural products*, Vol. 60 (10), pp. 1470-1474.
- Harbone, J. B., (1998).** *Phytochemical method, a guide to moderm technique of plant analysis* London, New York 3rd edition, Chapman and hall 0412-57260.
- Kanchanapoom.Tripetch.(2017).**phytochemical investigation of *Margaritaria rubra* roots. *Journal of pharmaceutical Sciences*. 106 (4) pp. 1231-1238.

- Kawaltowski, A. J., Casyilho, R. E. and Vercesi, A. E. (2001).** Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*, pp. 12-15.
- Kerhaho J. et Adam J.G (1974).** -La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. *Plantes médicinales et toxiques*, Edit. Vigot Frère, Paris., Vol. 1, 1012 p. 69
- Kumar, S. (2015).** Biflavonoïds from indica. *J. Asian Nat. products*. Vol. 17, pp. 531-538.
L.F.(1782) *Margaritaria nobilis* suppl. PL.396.
- Lawal, I.A (2015).** ‘‘Margaritaria discoidea: A review of its phytochemical and pharmacological properties’’. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67 (8), 1114-1126.
- Len, M; Cao; UN; Ouyang, C ; Li, Y; Loui, Y. (2016).** Rapide srête et identification de Non-Tcible flavonoïde composants dans Envahissant Laliments par LC/MS-IT-TOF. *Anal. Méthodes*.
- Liu, X. (2007).** Triterpenoids from *Margaritaria Nobilis*. *Journal of Asian Natural products Research*, Vol. 9 (5), pp. 431-438.
- Lubini, A (1990).** Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg, Band Vol. 23, pp.1007-1020.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. (1970).** The systematic identification of flavonoids.
- Macheix, J. J, Annei, F. et Cheristian, J. A. (2005).** Les composés phénoliques végétaux, un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. *Press. polytechn et universitaires romandes*: pp. 6-28.
- Makler, M.T, Ries , J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L., Hinrichs, D.J. (1993).** Parasite lactate deshydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48: 741.
- Marouf A. and Joel R. (2007).** La botanique de A à Z. Dunod, Paris : Vol. 9, pp. 177.
- Martimucci G, Gostaglio C, Mariano M, D’andrea L, Napolitano p, D’Alessandro AG. F (2022).** Free radical properties source and larget antioxidant, Vol 2. pp. 48-70.
- Mbacham.W.F, L. Ayong, Guewo-Fokeng M, V. Makoge (2019),** current situation of malaria in Africa, *Mala.Cont. Eliminat.* pp. 29-44.
- Mensah J.L., Lagarde I., Ceschin C., Michel G., Gleye J., Fouraste I., (1990).** Antibac-terial activity of the leaves of *Phyllanthus discoideus*. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 28, pp. 129–133.
- Mermer A., Bayrak H., Alyar S., Alagumuthu M. (2020).** Synthesis, DFT calculations, biological investigation, molecular docking studies of β -lactam derivatives, *J.Molecul. Struct.*

- Messi A.N., Mbing J.N., Ndongo J.T., Nyegue M.A., Tiabou Tchinda A., Ladoh Yemeda F., Frédéric M., Pegnyemb D.E (2016).** Phenolic compounds from the roots of *Ochna schweinfurthiana* and their antioxidant and antiplasmodial activities. *Phytochem. Lett.* Vol. 17, pp. 119–125.
- Messi, A.N. ,Bonnet, S.L.; Owona, B.A.;Wilhelm, A.; Kamto,E.L.D.; Ndongo, J.T.; Siwe-Noundou,X.;Poka, M.; Demana, P.H.; Krause,R.W.M.; (2022).** *In Vitro* and *In Silico* Potential Inhibitory Effects of New Biflavonoids from *Ochna rhizomatoson* HIV-1 Integrase and *Plasmodium falciparum*. *Pharmaceutics*, Vol. 14.
- Muanda F. N., (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leur propriété biologique. Thèse Doctorat. En chimie organique, Univ. Paul verlaine –Metz : 296.
- Ngadjui, B.T (2004).** Phytochemical investigation of *Margaritaria Sinensis* roots. *Phytochemistry*. Vol. 65, pp. 1470-1474.
- Nganou, B.K., (2012).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavonoids from *Margaritaria indica*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 144 (1), pp. 217-224. 48, 214-220.
- Sofowora, E. A., (1993):** phytochemical screening Medicinal and traditional medicine in Africa (Nigeria). *Spectrum books Ltd, Ibadan*: P270-289.
- Obiri D.D., Osafo N., Oppong-Sarfo J., Prah J.K (2014).** *Margaritaria discoidea* (Euphorbiaceae) stem bark extract attenuates allergy and Freund's adjuvant-induced arthritis in rodents. *Pharmacogn. Res.* Vol. 6, pp. 163–171.
- Okello J, Segawa P (2007)** Medicinal plants used by communities of Ngai Subcountry, Apac District, northern Uganda. *African Journal of Ecology*, Vol. 45. Pp76-83
- Okoro, G.G.Deme, C.O. Okoye, S.C. Eze, E.C. Odii, J.T. Gbadegesin, C.Ebido (2023).** Understanding key vector-borne diseases associated with freshwater ecosystem across Africa: implications for public health, *Sci. Tot. Environ.* 862.
- Okwa O. (2012)** Malaria, a pending problem in sub-saharan Africa, *Malar, Para.*1-8.
- Oyemitan, IA. (2013)** Ethnopharmacological survey of plants used in the treatment of mental disorders in china. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 146(3), pp. 831-838.
- Pascale S. M. et Veronique C. (2006).** Les polyphenols en agroalimentaire. *Lavoisier tec et doc, paris.* Vol. 5, pp. 327.

REFERENCES

- Patel, J.R., Tripathi, P., Sharma, V., Chauhan, N.S., Dixit, V.K., (2011).** Phyllanthusamarus: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: a review. *J.Ethnopharmacol.* Vol. 138, pp. 286–313
-
- PerkinElmer Inc. (2016).** Chemdraw (version 15.1.0 .144).
- Pulle (1966),** flora of Suriname *DIALYPETALAE* vol II, part 1, Leiden, E.J.Brill-foundation van Eedenfonds, pp. 23
- Radcliffe-Smith, A. (1996).** Euphorbiaceae, part 2. Flora of Tropical East Africa. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 444-446.
- Randrianarivony, T.N., Ramarosandrata A.V , F.Rakotoarivony ,Jeannoda V.H , A. Randrianasolo and R.W. Bussmann.(2017) .** *Journal of ethnobiology and Ethnomedicine.*
- Roman, J, Thomas C, Pierre G. et Gerard B. (2006).** Sciences des aliments, Lavoisier londers, paris New York, 145.
- Sanner M, Huey R, Dallakyan S, S.Kamati S, W.Lindstrom, Morris G, Vareille G, AutoDockTools (2007).** The scripps Reseach Institute, La Jolla. version 1.4.5.
- Schrodinger L.L.C. (2021).** PyMol (Version 2.5) (software).
- Shinoda, J., (1928).** Color reactions of flavonoid derivatives and the like. *Yakugaku zasshi.* Vol. 48, pp. 214-220
- Stellerova D, Michalik M, LukesV (2022)** Methoxylated flavones with potential therapeutic and photo-protective attributes: theoretical investigation of substitution effect *Phytochem*, pp. 203.
- Thaithong, Beale S, G.H. , Chutmongkonkul, M. (1983)** Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: An *in vitro* study of isolates mainly from Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Vol. 77, pp. 228–231.
- Trager.W, and Jensen. J (1976).** Human malaria parasites in continuous culture. *Science*; 193: 675.
- Webster G.L (1994).** Ann Missouri Bot Garden. Review of the phytochemical and pharmacological studies of the genus *Margaritaria*. *Pharmacog Rev* Vol. 81, pp. 33-144.
- Webster G.L (Bail.), Govaerts (1967).** The World Checklist of Vascular plants *Margaritaria discoidea* (WCVP). Royal Botanic Gardens, Kew. Checklist dataset. Vol 6 P34.

REFERENCES

Dewick, P. M., (2002). Médicinal Naturals products, a biosynthetic Approach, 2nd edition, new york : john wiley and sons, 167-289.