

Criblage phytochimique, dosages des polyphénols totaux et flavonoïdes totaux, et évaluation de l'activité antibactérienne des feuilles de *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae)

[Phytochemical screening, determination of total polyphenols and flavonoids, and evaluation of the antibacterial activity of leaves of *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae)]

Kouadio Kouassi Blaise¹⁻³, Kablan Ahmont Landry Claude², Ahoua Angora Rémi Constant⁴, Konan Dibi Jacques³, Oussou Kouamé Raphael¹, Attioua Koffi Barthélemy³, and Dongui Bini kouamé¹

¹Laboratoire de Sciences et Technologies de l'Environnement, UFR Environnement, Université Jean Lorougnon GUEDE, Daloa, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

²Département de Mathématiques, Physique et chimie, UFR des Sciences Biologiques, Université Peleforo GON COULIBALY, BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire

³Laboratoire de Constitution et Réaction de la Matière, UFR Sciences des Structures de la Matière et Technologie, Université Félix HOUPOUËT-BOIGNY, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

⁴Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Copyright © 2021 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae) is a species used in Ivorian's traditional for its antimalarial and aphrodisiac properties. The objectives of this study are the phytochemical screening, the determination of polyphenols and flavonoids present in the leaves and the determination of the antibacterial activity of the methanolic extract of the leaves. The screening phytochemical was carried out using chemical characterization tests. The determination of total polyphenols and total flavonoids was carried out using a spectrophotometer. Antibacterial activity was assessed using the agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (CIP 54127AF) and *Pseudomonas aeruginosa* (CIP 103467). Phytochemical screening revealed the presence of polyterpenes, steroids, alkaloids, saponins, flavonoids and phenolic compounds. The assay indicates a very high concentration of flavonoids and polyphenols in the ethyl acetate and aqueous extracts. In terms of biological tests, the study indicates that the methanolic extract of the leaves of *T. heterophylla* has bacteriostatic properties against the germs tested with MIC values greater than 3000 µg / mL.

KEYWORDS: *Turraea heterophylla*; phytochemistry; total polyphenols; antibacterial.

RESUME: *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae) est une espèce végétale utilisée en médecine traditionnelle ivoirienne pour ses propriétés antipaludiques et aphrodisiaques. Cette étude a pour objectifs le criblage phytochimique, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes présents dans les feuilles et la détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles. Le tri-phytochimique a été réalisé avec les tests de caractérisation chimique. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion par puits sur gélose contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (CIP 54127AF) et *Pseudomonas aeruginosa* (CIP 103467). Le criblage phytochimique a révélé la présence de polyterpènes, de

stéroïdes, d'alcaloïdes, de saponines, de flavonoïdes et de composés phénoliques. Le dosage indique une très forte concentration de flavonoïdes et polyphénols dans les contre-extraits à l'acétate d'éthyle et aqueux. Ces différents extraits sont issus de l'extrait méthanolique. Au niveau des tests biologiques, l'étude indique que l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* possède des propriétés antibactériennes contre les germes testés avec des valeurs de CMI supérieures à 3000 µg/mL. Ils sont bactériostatiques.

MOTS-CLEFS: *Turraea heterophylla*; phytochimie; polyphénols totaux; antibactérien.

1 INTRODUCTION

La famille des Meliaceae est composée d'arbres et d'arbustes dicotylédones. Elle comprend environ 51 genres et 600 espèces d'origine tropicale, selon la classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG) ^[1,2]. Les espèces de cette grande famille botanique sont très employées en médecine traditionnelle africaine et principalement ivoirienne; cependant leur composition chimique pouvant garantir leur emploi n'est pas suffisamment établie. En effet, les travaux réalisés à ce jour sur certaines de ces espèces révèlent la présence d'alcaloïdes, de triterpénoïdes, de-saponoïdes, de flavonoïdes, de polyphénols, de stéroïdes, de coumarines et généralement de limonoïdes (tétranortriterpénoïdes) ^[3,4,5]. En vue de contribuer à l'enrichissement de la composition chimique des espèces de cette famille botanique, nous avons sélectionné *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae). Les précédents travaux réalisés sur cette espèce végétale se limitent aux écorces de racines. En effet, l'étude phytochimique a conduit à l'isolement de trois composés connus dont deux limonoïdes, le rohituka-7, l'obacunone et un diterpénoïde, le margocinine ^[6]. Au niveau activité biologique, les travaux réalisés par Akrofi et al. [6] indiquent que les extraits méthanolique et chlorométhylénique des écorces de racine ont des activités antimicrobiennes intéressantes. La présente étude concerne les feuilles de *T. heterophylla* où nous envisageons réaliser le tri-phytochimique de l'extrait méthanolique, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux puis évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 MATÉRIEL

2.1.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les feuilles de *T. heterophylla* ont été collectées en avril 2016 à Gadouan dans le département de Daloa à l'ouest de la Côte d'Ivoire. L'identification a été faite au CNF (Centre National de Floristique) de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY où un spécimen est conservé sous le numéro d'herbier 31235.

2.1.2 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Les souches bactériennes de référence et la souche hospitalière utilisées ont été fournies par trois centres de recherche: le Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur d'Abidjan (CIP), le Laboratoire National de Santé Publique de Côte d'Ivoire et le Centre Suisse de Recherches Scientifiques de Côte d'Ivoire (CSRS).

Les tests ont été réalisés au Centre Suisse de Recherches Scientifiques à Abidjan (CSRS). Les souches de référence sont des cocci à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* CIP 483, et Bacilles à Gram négatif (*Escherichia coli* CIP 54127AF et *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467). La souche de *Staphylococcus aureus*, d'origine hospitalière, est sensible à la pénicilline. Les germes ont été conservés à la température du laboratoire (25°C) dans de la gélose nutritive coulée en tubes, puis étiquetés.

2.2 MÉTHODES

2.2.1 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES FEUILLES DE *T. HETEROPHYLLA*

Pour préparer l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla*, 200,0 g de matière végétale séchée et broyée ont été extraites par macération dans 600 mL de méthanol pendant 24h. Après filtration sur papier Wattman n°2, le Marc est extrait deux fois de suite avec la même quantité de méthanol pour une durée de 24h chacune. Les différents filtrats sont réunis,

concentrés puis évaporés à sec sous pression réduite à la température de 60 °C, à l'aide d'un évaporateur rotatif de type BUCHI 461. L'extrait brut méthanolique (E_{MeOH}) ainsi obtenu a été conservé dans un bocal étanche, dans un dessiccateur en verre, pour la suite des travaux.

2.2.2 FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE

Une partie de l'extrait brut méthanolique (E_{MeOH}) a été dissous dans l'eau distillée puis filtrée. Dans une ampoule à décanter, le filtrat aqueux (100 mL) est épuisé successivement avec l'hexane (4x 100 mL), le dichlorométhane (4x 100 mL) et l'acétate d'éthyle (4x 100 mL). La phase aqueuse résiduelle est séchée à l'étuve puis extraite avec le méthanol (3x 50 mL). L'extrait obtenu est considéré comme étant un extrait aqueux. Les différentes phases organiques obtenues sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre, filtrées sur papier Wattman n°2 avant d'éliminer les solvants sous pression réduite. Ce traitement a abouti à quatre contre-extraits: hexane (F_{HEX}), dichlorométhane (F_{DCM}), acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueux résiduel (F_{Aq}).

2.2.3 CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE

2.2.3.1 TEST DES POLYPHÉNOLS PAR RÉACTION AVEC LE CHLORURE FERRIQUE

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner^[7]. A 2 mL d'extrait est ajoutée une goutte de chlorure ferrique alcoolique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée indique la présence de polyphénols.

2.2.3.2 TESTS DES STÉROLS ET DES POLYTERPÈNES PAR LA RÉACTION DE LIEBERMAN ET BURCHARD

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner^[7]. Dans une capsule, 5 mL d'extrait sont évaporés sur un bain de sable. Le résidu est dissous à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique, puis transféré dans un tube à essai où 0,5 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. L'apparition à l'interphase d'un anneau violet, virant au bleu puis au vert, indique la présence de stérols et de terpènes.

2.2.3.3 TESTS DES FLAVONOÏDES PAR RÉACTION À LA CYANIDINE

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner^[7]. Dans une capsule, 2 mL d'extrait sont évaporés sur bain de sable. Le résidu froid est repris avec 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué à moitié et transféré dans un tube à essai. La formation de coloration rose-orange ou violacée, après l'ajout de 2 à 3 copeaux de magnésium, révèle la présence de flavonoïdes.

2.2.3.4 TEST DES TANINS CATÉCHIQUES PAR LE RÉACTIF DE STIASNY

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner^[7]. Dans une capsule, 5 mL d'extrait sont évaporés sur bain de sable avant d'ajouter au résidu 15 mL de réactif Stiasny. Le mélange est maintenu au bain-marie à 80 °C pendant 30 min, puis laissé refroidir. L'observation des précipités sous forme de gros flocons indique la présence de tanins catéchiques.

2.2.3.5 RECHERCHE DE TANINS GALLIQUES

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner^[7]. La solution précédente, issue de la caractérisation des tanins catéchiques, est filtrée et le filtrat est saturé d'acétate de sodium. L'ajout à la solution saturée de 3 gouttes de chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 2% provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense en cas de présence de tanins galliques.

2.2.3.6 TEST DES ALCALOÏDES

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Harbone^[8]. Dans une capsule, 6 mL d'extrait sont évaporés sur bain de sable puis le résidu est repris dans 6 mL d'alcool à 96%. La solution alcoolique est distribuée dans deux tubes à essai. Dans le premier tube n°1, sont ajoutées 2 gouttes de réactifs de Dragendorff. L'apparition d'un précipité ou d'une coloration orange indique la présence d'alcaloïdes. Dans le deuxième tube n°2, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Bouchardât. L'apparition de coloration brune-rougeâtre confirme la présence d'alcaloïde.

2.2.3.7 TESTS DES QUINONES ET ANTHRAQUINONES

Le réactif Borntraegen (ammoniaque à moitié dilué) permet la détection de quinones libres. Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Harbone [8]. Dans une capsule, évaporer 2 mL d'extrait sur bain de sable puis triturer le résidu dans 5 mL d'acide chlorhydrique 1/5. Dans un tube à essai, porter la solution dans un bain d'eau bouillante pendant une demi-heure. Après refroidissement, extraire l'hydrolysat avec 20 mL de dichlorométhane dans un tube à essai. Recueillir la phase chlorométhylénique dans un tube à essai puis ajouter 0,5 mL d'ammoniaque à moitié dilué. L'apparition d'une couleur allant du rouge au violet indique la présence de quinones.

2.2.3.8 TESTS DES SAPONINES

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Harbone [8]. Dans un tube à essai, dissoudre 1 g d'extrait dans 100 mL d'eau distillée, chauffer légèrement le mélange, filtrer, refroidir et compléter à 100 mL avec de l'eau distillée. Dans un tube à essais, introduire 20 mL du filtrat et agiter vigoureusement pendant 15 secondes. Placer le tube verticalement pendant 15 minutes. Au bout de cette période, si la mousse persiste, alors la drogue végétale contient des saponines.

2.2.4 DOSAGES DES POLYPHÉNOLS ET DES FLAVONOÏDES

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre et les droites d'étalonnage sont tracées en utilisant l'acide gallique et la quercétine comme standards respectivement pour les polyphénols et les flavonoïdes. Les teneurs (concentrations) en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux sont calculées à partir de la formule :

$$\varepsilon = \frac{CVD}{m}$$

ε : Teneur ou concentration (mg.AG/g ou mg.Qc/g d'extrait sec).

C: concentration de l'échantillon donnée par le spectrophotomètre (mg/mL).

V: volume de la solution préparée (mL)

D: facteur de dilution

m: masse de l'extrait (g)

2.2.4.1 DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE DES POLYPHÉNOLS TOTAUX

La méthode décrite par Patricia et al [9]. a été utilisée pour le dosage des polyphénols totaux. Un volume de 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1/10) est ajouté à 30 μ L d'extrait. Le mélange est maintenu pendant 2 minutes dans l'obscurité à température ambiante, puis 2 mL de solution de carbonate de sodium (75 g.L⁻¹) sont ajoutés. Le mélange est ensuite placé pendant 15 minutes au bain-marie à 50°C, puis refroidi rapidement. L'absorbance est mesurée à 760 nm, avec de l'eau distillée comme blanc. Une droite d'étalonnage est réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations. Chaque analyse est réalisée en triple et la concentration en polyphénols est exprimée en milligramme par millilitre d'extrait équivalent acide gallique (mg/mL). L'acide gallique est utilisé ici comme standard de référence pour la quantification des teneurs en polyphénols totaux; cette grandeur est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg.éq.AG/g extrait).

2.2.4.2 DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE DES FLAVONOÏDES TOTAUX

La méthode décrite par Patricia et al [9]. a été utilisée pour le dosage des flavonoïdes totaux. Dans une fiole de 25 mL, 0,75 mL de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5% (m/v) a été ajouté à 2,5 mL d'extrait. Le mélange a été additionné de 0,75 mL de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10% (m/v), puis incubé pendant 6 minutes à l'obscurité. Après l'incubation, 5 mL de soude (NaOH 1N) ont été ajoutés puis le volume a été complété à 25 mL. Le mélange a été agité vigoureusement avant d'être dosé au spectrophotomètre UV-visible. La lecture a été faite à 510 nm. Les essais ont été réalisés en triple. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg.éq.Qc/g d'extrait). La quercétine est utilisée ici comme standard de référence pour la quantification des teneurs en flavonoïdes totaux.

2.2.5 EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

2.2.5.1 PRÉPARATION DE L'INOCULUM BACTÉRIEN

Une grosse colonie bien isolée d'une culture bactérienne de 18 heures a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis écrasée sur la paroi d'un tube contenant 10 mL d'eau distillée. A l'aide d'une pipette Pasteur, 5 à 6 gouttes de cette pré-culture sont prélevées et diluées dans 10 mL d'eau distillée. Cette suspension bactérienne réalisée permet d'avoir environ 10^6 UFC/mL (condition standard) et constitue l'inoculum bactérien de dilution 10^0 selon la George et al [10].

2.2.5.2 TEST DE SENSIBILITÉ

Le principe repose sur la diffusion du produit antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un bref moment de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition. En fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante. Selon Etuaful et al [11], la souche est qualifiée non sensible ou résistante en fonction du diamètre d'inhibition. Ainsi, on notera:

- Souche non sensible ou résistante: diamètre inférieur à 8 mm,
- Souche sensible: diamètre compris entre 9 et 14 mm,
- Souche très sensible: diamètre compris entre 15 et 19 mm,
- Souche extrêmement sensible: diamètre supérieur à 20 mm.

Pour le mode opératoire, la boîte gélosée de Muller-Hinton pour les bactéries a été uniformémentensemencée par inondation avec une suspension de l'inoculum microbien de dilution 10^0 . Le surplus a été aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur surmontée d'une pro-pipette. La boîteensemencée a été séchée pendant 15 minutes à la température ambiante. Ensuite, des puits ont été faits à l'aide d'une pipette Pasteur dans des conditions de stérilité et une quantité de 50 μ L de la substance à tester (1,5 mg/mL) y est déposée. La boîte de Pétri a ensuite été incubée à 37 °C pendant 18 heures. Cette opération est répétée 3 fois de suite. La tétracycline et la gentamycine (25 μ g/mL) ont servi de contrôles positifs. La lecture s'est faite par la mesure du diamètre (mm) de la zone d'inhibition autour de chaque cupule à l'aide d'un pied à coulisse à affichage automatique. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition, et seuls les diamètres d'inhibition supérieurs à 8 mm ont été pris en compte [12].

2.2.5.3 DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI)

L'extrait méthanolique ayant montré un diamètre d'inhibition supérieur ou égal à 9 mm ont été sélectionnés pour déterminer les CMI par la méthode de diffusion par puits sur gélose. Après lecture de la CMI, les contenus des puits ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sontensemencés en stries de 5 cm en boîtes de pétri sur de la gélose de Muller-Hinton à l'aide d'une anse puis incubés à 37 °C pendant 18 h.

2.2.5.4 MILIEUX DE CULTURE ET AGENTS ANTIMICROBIENS

Pour les conditions d'aseptise, une hotte à flux laminaire (CYTAIR, France) a été utilisée. D'autres matériels techniques tels que l'incubateur bactériologique (JOUAN type: EB 170 EL SANS, Afghanistan), l'autoclave (Trade Raypa, modèle AE-75BRY Espagne), des microplaques dont les cupules à un fond en U (12 x 8 rangées), une balance électronique de précision (AG 204 Delta Range), de la verrerie de laboratoire comprenant des micropipettes et des pipettes de précision et des embouts adaptables ont été employés. Le diméthylsulfoxyde (DMSO), la gentamycine poudre (Fluca; biochimika, Suisse), la tétracycline (Sigma-Aldrich; USA), l'Amphotéricine B (Sigma-Aldrich; USA), la Nystatine (Sigma-Aldrich; USA), la gélose Müller-Hinton (Bio-Rad®, USA) et la méthode de diffusion par puits sur gelose (HIMEDIA; le Dextrose Agar; Bio-Rad®, USA) ont servi pour l'étude de la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis de l'extrait méthanolique de la plante.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 RENDEMENT DE L'EXTRACTION ET DES FRACTIONNEMENTS

L'extraction réalisée sur 200,0 g de poudre des feuilles de *T. heterophylla* a conduit à 13,5 g d'extrait brut méthanolique (E_{MeOH}), soit un rendement de 5,40%. Ce rendement, relativement élevé, indique que les feuilles de *T. heterophylla* contiennent

suffisamment de métabolites secondaires extractibles par le méthanol. Les épuisements successifs d'une partie (7,2 g) de l'extrait E_{MeOH} par l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol ont abouti respectivement aux fractions F_{HEX} (0,95 g; 13,2%), F_{DCM} (1,38 g; 19,2%), F_{AE} (1,92 g; 26,7%) et F_{AQ} (2,52 g; 35,0%). On note que les rendements les plus importants sont obtenus avec la fraction aqueuse résiduelle (F_{AQ} : 35,0%), suivi de la fraction acétate d'éthyle (F_{AE} : 26,7%). Ces deux fractions renferment environ 62%, en masse, des métabolites contenus dans l'extrait brut méthanolique. Le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'eau étant des solvants hydrophiles, c'est normal qu'ils aient la même affinité à extraire les composés hydrosolubles^[13].

3.2 COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT BRUT MÉTHANOLIQUE

Le criblage phytochimique réalisé sur l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* (E_{MeOH}) a visé principalement huit (8) familles de métabolites secondaires: les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les stérols, les polyterpènes, les quinones et les saponines. Les résultats indiquent que sur les huit (8) familles recherchées, seuls les tanins et les quinones sont absents (**Tableau 1**). Ces résultats sont similaires à ceux précédemment obtenus sur les écorces de tige de la même plante^[6, 4]. Cependant, l'absence de tanins dans l'extrait brut méthanolique des feuilles est contraire au résultat des travaux réalisés sur les écorces de racine de la même plante par Bouquet and Debray^[14]; qui indiquent la présence des tanins. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les deux organes (feuilles et racines) jouent des rôles différents chez la plante et aussi, par plusieurs facteurs tels qu'agro-pédologiques, climatiques et géographique^[15]. Le triphytochimique montre que la composition chimique des feuilles de *T. heterophylla* est similaire à celle des espèces genre *Turraea*^[3, 4, 5]. Le **Tableau 1** montre aussi que toutes les familles chimiques caractérisées dans l'extrait brut méthanolique (E_{MeOH}) se répartissent dans les fractions F_{HEX} , F_{DCM} , F_{AE} et F_{AQ} . Le fait que les polyphénols et les flavonoïdes se retrouvent dans tous les extraits (apolaires et polaires) permet d'affirmer qu'il y a coexistence des formes aglycone et glycoside dans les feuilles de *T. heterophylla*. Concernant les stérols et les polyterpènes, ils ne se retrouvent que dans les solvants apolaires: hexane et dichlorométhane. Cette observation est normale, puisque ces composés sont généralement très solubles dans les solvants lyophiles tels que les hydrocarbures.

Tableau 1. Résultats du tri-phytochimique réalisé sur l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* et les fractions

Métabolites secondaires	Test chimique	Extrait E_{MeOH}	Fractions			
			F_{HEX}	F_{DCM}	F_{AE}	F_{AQ}
Alcaloïdes	Dragendorff + Bouchardat	+	-	-	+	+
Polyphénols	Chlorure ferrique	+	+	+	+	+
Flavonoïdes	Cuivres de magnésium	+	+	+	+	+
Tanins galliques	Réactif Stiasny	-	-	-	-	-
Tanins catéchiques	Chlorure ferrique	-	-	-	-	-
Stérols et polyterpènes	Réactif de Lieberman	++	+	+	-	-
Quinones	Ammoniac dilué	-	-	-	-	-
Saponines	Mousse	+	-	-	+	+

NB: Abondant (++); Présence (+); Absent (-)

Les résultats positifs obtenus ici sont certainement liés aux stérols; qui peuvent facilement se retrouver dans les solvants tels que l'acétate d'éthyle et le méthanol; grâce aux groupements hydroxyles qu'ils portent. La richesse de l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* pourrait justifier l'utilisation de la décoction dans de nombreux traitements traditionnels^[16].

3.3 TENEURS EN POLYPHÉNOLS TOTAUX ET EN FLAVONOÏDES TOTAUX

La droite d'étalonnage tracée en utilisant l'acide gallique comme standard a donné un coefficient de régression $R^2 = 0,9935$. La teneur en polyphénols totaux est de $75 \pm 0,00$ mg éqAG/g pour l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* (E_{MeOH}) et de 25 ± 0 mg éqAG/g; 50 ± 0 mg éqAG/g; 125 ± 7 mg éqAG/g et de 125 ± 7 mg éqAG/g pour les fractions F_{HEX} , F_{DCM} , F_{AE} et F_{AQ} respectivement (**Tableau 2**).

Tableau 2. Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles de *T. heterophylla*

Teneur	Extrait et fractions				
	E _{MeOH}	F _{HEX}	F _{DCM}	F _{AE}	F _{Aq}
Teneur en polyphénols (mg éq.AG/g d'extrait sec)	75±0	25±0	50±0	125±7	125±7
Teneur en flavonoïdes (mg éq.Qc/g d'extrait sec)	150,0±0,0	82,5±0,0	107,0±0	150,0±0,0	175,0±0,0

Ces valeurs ont été traduites sous forme d'histogramme (**Figure 1A**). On note que les fractions acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueux résiduel (F_{Aq}) sont deux à trois fois plus riches en polyphénols que les fractions hexane (F_{HEX}) et dichlorométhane (F_{DCM}). Cette différence confirme que les polyphénols présents dans l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* sont majoritairement glycosylés; et donc plus solubles dans le méthanol, l'eau et l'acétate d'éthyle; qui extraient mieux les polyphénols [17, 18]. Les aglycones, qui sont faiblement solubles dans les solvants hydrophiles, ont été très peu extraits par le méthanol. Ces résultats concordent avec les données du tri-phytochimique.

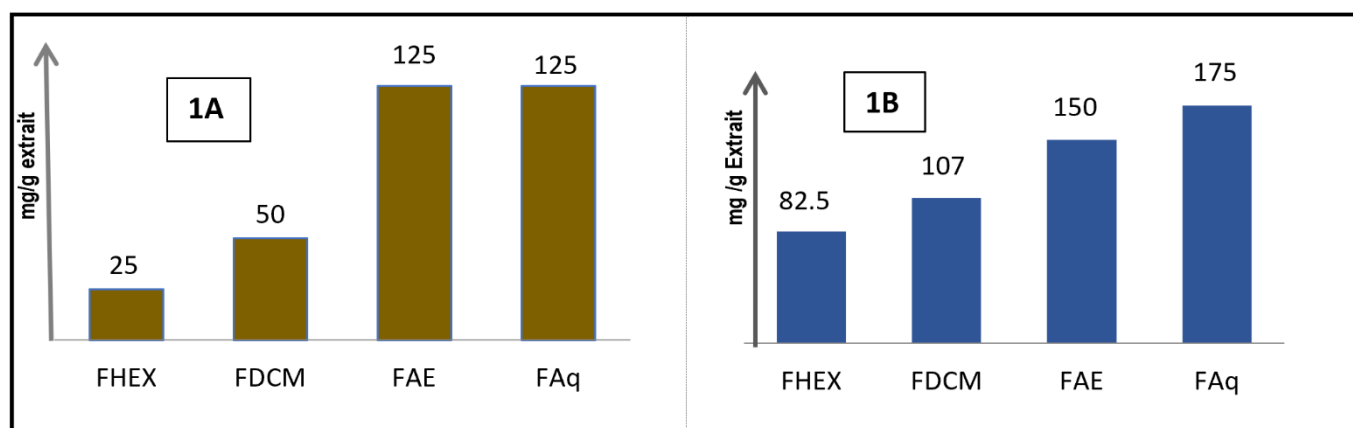


Fig. 1. Histogramme des teneurs en polyphénols totaux (1A) et flavonoïdes totaux (1B) des fractions

Pour déterminer les teneurs en flavonoïdes, la droite d'étalonnage a été tracée en utilisant la quercétine comme standard, et le coefficient de régression a pour valeur $R^2 = 0,9983$. On note que la teneur en flavonoïdes totaux est de $150,0 \pm 0,0$ mg éqQc/g pour l'extrait brut méthanoïque des feuilles de *T. heterophylla* (E_{MeOH}), et de $82,5 \pm 0,0$ mg éqQc/g; $107,0 \pm 0$ mg éqQc/g; $150,0 \pm 0,0$ mg éqQc/g et de $175,0 \pm 0,0$ mg éqQc/g pour les fractions F_{HEX}, F_{DCM}, F_{AE} et F_{Aq} respectivement (**Tableau 2**). Les histogrammes représentant les teneurs en flavonoïdes des fractions (**Figure 1B**) montrent des valeurs croissantes lorsqu'on passe des solvants les moins polaires aux plus polaires.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec le tri-phytochimique et la teneur en polyphénols des fractions. Par conséquent, on peut aussi affirmer que les flavonoïdes contenus dans l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* sont en majorité glycosylés; c'est-à-dire possédant une partie sucre. Ainsi, les flavonoïdes non glycosylés (algycones) sont identifiés dans les fractions hexane (F_{HEX}) et dichlorométhane (F_{DCM}); quant aux flavonoïdes glycosylés, c'est plutôt dans les fractions acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueux résiduelles (F_{Aq}) qu'ils se retrouvent. Ce résultat est en accord avec le principe selon lequel les composés possédant des groupements hydroxyles sont plus solubles dans les solvants hydrophiles tels que le méthanol, l'eau et l'acétate d'éthyle [17, 18].

3.4 ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

L'activité antibactérienne de l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* (E_{MeOH}) a été évaluée contre cinq (5) souches bactériennes: *P. aeruginosa* ATCC, *P. aeruginosa* CIP, *S. aureus* sensitive, *S. aureus* CIP et *E coli* ATCC. Les diamètres d'inhibitions sont tous supérieurs à 9 mm (valeurs comprises entre 9 et 9,50 mm), ce qui signifie que ces bactéries sont sensibles à cet extrait [19, 11]. Bien que l'extrait E_{MeOH} soit bactériostatique, les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont toutes supérieures 3000 µg/ml (**Tableau 3**). Les CMI de l'extrait E_{MeOH} sont négligeables devant celles de la Tetracycline et

de la Gentamicine, prises comme contrôle positifs, dont les CMI sont comprises entre de 0,19 et 50 µg/mL et 1,56 et 50 µg/mL respectivement.

Tableau 3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (µg / mL) de l'extrait des feuilles de *T. heterophylla*

		<i>P. aeruginosa</i> ATCC	<i>P. aeruginosa</i> CIP	<i>S. aureus</i> sensitive	<i>S. aureus</i> CIP	<i>E. coli</i> ATCC
Extrait méthanolique E _{MeOH}		>3000	>3000	>3000	>3000	>3000
Contrôle positif	Tétracycline	0,19	3,125	50	0,19	> 50
	Gentamicine	3,125	1,56	> 50	1,56	> 50

Ce résultat montre que les feuilles de *T. heterophylla* possèdent des propriétés antibactériennes comme les racines de la même plante [6]. Cette activité, même faible, de l'extrait méthanolique pourrait justifier l'utilisation en médecine traditionnelles, en Côte d'Ivoire, des feuilles de *Turraea heterophylla* dans le traitement de diverses maladies telles que les blessures à l'estomac, la fièvre typhoïde, les diarrhées et les crises hémorroïdaires [16, 4].

4 CONCLUSION

L'étude réalisée sur les feuilles de *T. heterophylla* a concerné le tri-phytochimique, les dosages et les tests biologiques. Le tri-phytochimique réalisé à l'aide de tests de caractérisation chimique a révélé la présence de polyterpènes, stérols, alcaloïdes, saponines, polyphénols et de flavonoïdes. Aussi, cette étude montre que les feuilles de cette espèce synthétisent à la fois les polyphénols glycosylés et leurs génines (aglycones). En ce qui concerne les dosages, les résultats montrent que les extraits aqueux résiduels et acétate d'éthyle ont une plus forte teneur en polyphénols et en flavonoïdes. Enfin, les tests biologiques réalisés sur cinq (5) souches de bactéries indiquent que l'extrait méthanolique de *T. heterophylla* possède des propriétés antibactériennes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'initiative DELTAS Africa [Afrique One-ASPIRE / DEL-15-008] pour son soutien financier.

REFERENCES

- [1] APG III,). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161: 105-121, 2009.
- [2] ATIBT, (. Nomenclature générale des bois tropicaux. Paris, France, Association technique internationale des bois tropicaux (ATIBT), 152 p, 2016.
- [3] Tan, Q.-G. & Luo, X.-D. Meliaceae limonoids: chemistry and biological activities. Chemical Reviews, 111, 7437–7522, 2016.
- [4] Boua B B., Mamyrbékova-B., Akhanovna J., Kouame B A.& Bekro Y.A. Criblage phytochimique et potentiel érectile de *Turraea heterophylla* de Côte d'Ivoire. Journal of Applied Biosciences, 68, 5394 – 5403, 2013.
- [5] Yété P., A. Togbé, Y. Koudoro, P. Agbangnan, V. Ndahischimiye, T. S. Djenontin, D. Wotto, E. C. Azandegbe & D. Sohounhloou. Etude comparative des Composés of Plant Extracts for Production of Monosex Tilapia: Searching A Suitable Alternative to Synthetic Steroids in Tilapia Culture. Turk. J. Fish. Aquat. Sci., 18: 267 – 275, 2015..
- [6] Akrofi R, Extraction, Isolation et caractérisation de certains limonoïdes et composants de l'écorce de racine de *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae). Thèse de Doctorat, Département de Chimie de l'école des Sciences physiques, Université de Cape Côte (Ghana) 90 p, 2011.
- [7] Wagner H. Drogen analyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 522 p, 1983.
- [8] Harbone J. Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant analysis; New York, ISBN: 0-412-57260-5, 1998.
- [9] Patricia Amenan Kouadio, Barthélemy Koffi Attioua, Faustin Aka Kabran, Brise Amian Kassi, Rosmonde Affoué Yao, Herman Kouamé Yeboue, Marcel N'dri Kasse, Ernest Kouakou Amoikon. Comparative physico-chemical study of fermented and unfermented cocoa beans from Côte d'Ivoire. International Journal of Biosciences 16 (1), (2020): 355-362. ISSN: 2222-5234, 2020.

- [10] George K.M, Chatterjee D., Gunawardana G., Welty D., Hayman J & Lee R. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Sciences*, 5, 283, (5403): 854-857,1999.
- [11] Etuaful S., Carbonnelle B & Grosset J. Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3182-3186, 2005.
- [12] Aubry J. L'infection à *Mycobacterium ulcerans*: aspects épidémiologique, cliniques et thérapeutiques. Com Insem Paris, 43p.,2006.
- [13] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle D J. Spectrometric identification of organic compounds, seventh Edition, John Wiley & Sons, Ing, 2005.
- [14] Bouquet A. & Debray M, *Plantes médicinales de Côte-d'Ivoire*, Imprimerie Louis Jean, Paris (France), 232 p, 1974.
- [15] Lee KW, Kim YJ, Lee HJ & Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51: 7292–7295, 2003.
- [16] N'Guessan K., Tra Bi FH & Koné MW. Étude ethnopharmacologique de plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle chez les Abbey et Krobou d'Agboville (Côte d'Ivoire). *Ethnopharmacologia*, 44: 42-50, 2009.
- [17] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. Edition Technique et Documentation, 1120 p, 1999.
- [18] Azwanida NN A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*, 2015.
- [19] Ponce A. G., Fritz R., Del Alle C & Roura S. I.. Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm Wiss Technol.*, 36, 679-684, 2003.