



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE
UFR ENVIRONNEMENT

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail
.....

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de
la Recherche Scientifique

ANNEE : 2021- 2022

N° D'ORDRE : 064

CANDIDAT

Nom : KOUADIO

Prénoms : KOUASSI BLAISE

THESE DE DOCTORAT

Mention : Géosciences et Environnement

Spécialité : Chimie Organique

Etude chimique et biologique des feuilles
de *Turraea heterophylla* Sm.(Meliaceae),
une plante médicinale de la Côte d'Ivoire

JURY

Président : M. KONE Tidiani, Professeur Titulaire,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Co-Directeur : M. DONGUI Bini Kouamé, Professeur Titulaire,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Co-Directeur : M. ATTIOUA Koffi Barthélemy, Professeur Titulaire,
Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY

Rapporteur : M^{me}. N'GAMAN Kohué Christelle Chantal épouse KOUASSI,
Maître de Conférences, Université Nangui ABROGOUA

Examineur : M. SORO Yaya, Professeur Titulaire,
Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUET-BOIGNY

Examineur : M. KOUADIO David Léonce, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Soutenu publiquement

le jeudi 08 décembre 2022

TABLE DES MATIERES	Pages
DEDICACE.....	vi
REMERCIEMENTS.....	vii
LISTE DES SIGLES, ABREVIATIONS ET FORMULES CHIMIQUES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ANNEXES.....	xvi
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I.1. PLANTES MEDICINALES.....	5
I.1.1. Définition.....	5
I.1.2. Importance socio-économique des plantes médicinales.....	5
I.1.3. Présentation de la plante étudiée	6
I.1.3.1. Famille des Meliaceae	6
I.1.3.2. Description botanique des Meliaceae	6
I.1.3.3. Quelques utilisations traditionnelles des Meliaceae.....	7
I.1.3.4. Travaux antérieurs sur la famille des Meliaceae	7
I.1.3.4.1. Composition chimique des Meliaceae.....	7
I.1.3.4.2. Activités biologiques des Meliaceae	10
I.1.3.5. Présentation du genre <i>Turraea</i>	10
I.1.3.6. Quelques utilisations traditionnelles des <i>Turraea</i>	11
I.1.3.7. Travaux antérieurs sur le genre <i>Turraea</i>	11
I.1.3.7.1. Composition chimique des <i>Turraea</i>	11
I.1.3.7.2. Activités biologiques des <i>Turraea</i>	22
I.1.3.8. Présentation de l'espèce <i>Turraea heterophylla</i> (Smith).....	23
I.1.3.8.1. Description botanique.....	24
I.1.3.8.2. Utilisations traditionnelles de <i>Turraea heterophylla</i>	25
I.1.3.8.3. Travaux antérieurs sur <i>Turraea heterophylla</i>	26
I.1.3.8.3.1. Etudes phytochimiques antérieurs sur <i>Turraea heterophylla</i>	26
I.1.3.8.3.2. Activités biologiques de <i>Turraea heterophylla</i>	26
I.2. METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES	27
I.2.1. Définition.....	27

I.2.2. Quelques composés phénoliques des plantes	27
I.2.2.1. Acides phénoliques.....	28
I.2.2.2. Tanins	28
I.2.2.3. Quinones et dérivés anthracéniques	29
I.2.2.4. Flavonoïdes.....	30
I.2.2.5. Coumarines.....	30
I.2.3. Quelques composés terpéniques des plantes	31
I.2.4. Quelques limonoïdes des plantes.....	37
I.3. QUELQUES TECHNIQUES DE DETERMINATION STRUCTURALE	38
I.3.1. Spectrométrie de masse	38
I.3.2. Spectroscopie ultraviolet-visible	40
I.3.3. Spectrométrie HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS	40
I.3.4. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).....	40
I.4. BACTERIES ETUDIEES.....	41
I.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	41
I.4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
I.4.3. <i>Escherichia coli</i>	42
I.5. TOXICOLOGIE.....	42
I.5.1. Toxicité aiguë	42
I.5.2. Toxicité subaiguë.....	42
I.5.3. Toxicité chronique	42
I.6. GENERALITES SUR QUELQUES TESTS ANTIOXYDANTS.....	43
I.6.1. Définition.....	43
I.6.2. Quelques techniques de mesure de l'activité antioxydante.....	43
I.6.2.1. Technique DPPH	43
I.6.2.2. Technique ABTS	44
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	45
II.1. MATERIEL.....	46
II.1.1. Matériel végétal.....	46
II.1.2. Matériel technique et solvants utilisés pour l'étude chimique	46
II.1.2.1. Appareillage	46
II.1.2.2. Verrerie	47

II.1.2.3. Autres matériels techniques	47
II.1.2.4. Solvants organiques	47
II.1.3. Matériel pour l'étude biologique.....	48
II.1.3.1. Matériel animal pour l'étude de la toxicité	48
II.1.3.2. Matériel pour l'étude de l'activité antibactérienne	48
II. 2. METHODES D'ETUDE CHIMIQUE.....	49
II.2.1. Récolte, séchage et broyage des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	49
II.2.2. Préparation de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	50
II.2. 3. Fractionnement de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	51
II.2.4. Criblage phytochimique de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> et ses fractions	52
II.2.4.1. Etude qualitative de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> et ses fractions	52
II.2.4.1.1. Test des polyphénols par réaction au chlorure ferrique	52
II.2.4.1.2. Test des stérols et des polyterpènes par la réaction de Lieberman et Burchard.....	53
II.2.4.1.3. Test des flavonoïdes par réaction à la cyanidine.....	53
II.2.4.1.4. Test des tanins	53
II.2.4.1.5. Test des alcaloïdes.....	53
II.2.4.1. 6. Test des quinones	54
II.2.4.1.7. Test des saponines.....	54
II.2.4.1.8. Chromatographie sur couche mince	54
II.2.4.2. Etude quantitative de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> et fractions.....	55
II.2.4.2.1. Détermination des teneurs en polyphénols totaux	55
II.2.4.2.2. Détermination des teneurs en flavonoïdes totaux	56
II.2.5. Identification des constituants chimiques de l'extrait méthanoliques de <i>Turraea heterophylla</i>	56
II.2.5.1. Analyse de l'extrait méthanolique de de <i>Turraea heterophylla</i> par spectroscopie ultraviolette.....	56
II.2.5.2. Analyse de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> par HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	56
II.3. METHODE BIOLOGIQUE	58
II.3.1. Etudes biologiques de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> et ses fractions.....	58

II.3.1.1. Evaluation de la toxicité aiguë et effet sur le poids de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	58
II.3.1.1.1. Préparation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	58
II.3.1.1.2. Administration des doses aux rates	59
II.3.1.1.3. Détermination du poids corporel des rates	60
II.3.1.2. Etude <i>in vitro</i> des activités antibactériennes de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	60
II.3.1.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien	60
II.3.1.2.2. Détermination des diamètres d'inhibition	60
II.3.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	61
II.3.1.3.1. Mesure de l'activité antiradicalaire par le test DPPH	62
II.3.1.3.2. Mesure de l'activité antiradicalaire par le test ABTS	62
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	64
III.1. ETUDE CHIMIQUE	65
III.1.1. Rendements d'extraction de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> et de ses fractions.....	65
III.1.2. Etude qualitative et quantitative de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> et de ses fractions	66
III.1.2.1. Etude qualitative	66
III.1.2.1.1. Tri-phytochimique	66
III.1.2.1.2. Profil chromatographique	67
III.1.2.2. Etude quantitative de l'extrait méthanolique de <i>T. heterophylla</i> et de ses fractions	69
III.1.2.2.1. Teneurs en polyphénols totaux	69
III.1.2.2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux	71
III.1.3. Identification des constituants chimiques de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	73
III.1.3.1. Analyse par spectrométrie ultraviolet-visible	73
III.1.3.2. Analyse par HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.....	74
III.1.3.3. Identification des limonoïdes	76
III.1.3.3.1. Identification du composé 7	76
III.1.3.3.2. Identification du composé 24	80

III.1.3.3.3. Identification du composé 25	82
III.1.3.3.4. Identification des stéroïdes	86
III.1.3.3.4.1. Identification du composé 8	87
III.1.3.3.4.2. Identification du composé 20	91
III.1.3.3.4.3. Identification du composé 23	94
III.1.3.3.4.4. Identification du composé 30	96
III.1.3.3.4.5. Identification du composé 38	99
III.1.3.3.4.6. Identification du composé 39	101
III.1.3.3.5. Identification des sesquiterpènes	104
III.2. ETUDE BIOLOGIQUE.....	108
III. 2.1. Toxicité aiguë et effet de poids corporel de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	108
III. 2.1.1. Toxicité et signes cliniques observées chez les rates après administration de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	108
III. 2.1.2. Evolution du poids corporel des rates après administration de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	109
III. 2. 2. Activités antibactériennes de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	109
III. 2.3. Activité antioxydante de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> et de ses fractions	111
III. 2.3.1. Activité antiradicalaire par le test de DPPH	111
III. 2.3.2. Activité antiradicalaire par le test de ABTS	114
CONCLUSION GENERALE.....	119
REFERENCES	122
ANNEXES	142

DEDICACE

- A mon père KRAMO Kouadio et à ma mère N'GUESSAN Amino
- A ma chérie KOUAKOU N'guessan Alice
- A mes filles KOUADIO Ahou Jocelyne et KOUADIO Adjoua Bernadine

REMERCIEMENTS

Cette œuvre n'aurait pas atteint son terme si des personnes disponibles et aimables ne nous avaient pas accordé un précieux temps. C'est pourquoi, il nous sied ici de leur adresser nos remerciements.

Nous remercions le Professeur TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE, Présidente de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE (UJLoG) de Daloa.

Mes sincères remerciements à Monsieur KONE Tidiani, Professeur Titulaire à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE (UJLoG) de Daloa, qui malgré son emploi du temps chargé me fait l'honneur de présider le Jury de mon mémoire de thèse.

Nous remercions le Professeur KOUASSI Kouakou Lazare, Directeur de l'UFR Environnement de l'UJLoG qui a accepté mon inscription au sein de son UFR, me donnant ainsi l'opportunité de faire la formation doctorale.

Mes remerciements vont également à l'endroit de Professeur DIBY Brou, Directeur du Laboratoire des Sciences et Technologies de l'Environnement (LSTE) (UFR Environnement / UJLoG), pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son Laboratoire.

Mes vifs remerciements :

- Au Professeur OUATTARA Lassiné, Directeur du Laboratoire de Constitution et Réaction de la Matière (LCRM), UFR Sciences des Structures de la Matière et Technologie, Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY (Abidjan) pour avoir accepté que je réalise mes manipulations dans le laboratoire qu'il dirige.

- A Monsieur BRUNO Figadère, Maître de Conférences, Directeur du Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry de l'Université Paris Sud XI, pour avoir accepté mes échantillons dans son laboratoire et permis d'effectuer toutes mes analyses.

Nous exprimons mes profonds remerciements à mon Co-directeur de thèse, Professeur DONGUI Bini Kouamé, Professeur titulaire de Chimie-Physique, à l'UFR Environnement de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE (Daloa). Vous avez cru en moi et vous avez accepté de m'encadrer durant toutes ces années. Nous vous remercions de m'avoir permis de mener à bien ce travail malgré toutes les difficultés rencontrées. Votre rigueur, disponibilité, perfectionnisme, détermination et passion pour le travail bien fait ont été les clés de la réussite de ce travail. Au-delà de l'encadrement scientifique, nous avons trouvé en vous un conseiller, qui ne cessait de m'écouter et de me donner des conseils.

Nous tenons aussi à remercier mon Co-directeur de thèse, Professeur ATTIOUA Koffi Barthélemy, Professeur Titulaire de Chimie Organique et des Substances Naturelles, UFR Sciences des Structures de la Matière et Technologie, Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY (Abidjan), pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et a permis de réaliser cette thèse. Votre dynamisme pour la recherche des substances naturelles a été pour moi une source de motivation. Vous m'avez enseigné non seulement la chimie mais vous m'avez inculqué l'amour de la recherche et la persévérance, qualités indispensables dans le monde de l'investigation scientifique. Votre disponibilité, votre sagesse, votre grandeur d'esprit, vos qualités intellectuelles, votre sens du devoir bien accompli et la rigueur m'ont orienté dans ce travail. Vous avez su par votre savoir-faire me donner une motivation supplémentaire à des moments difficiles de ce travail. Vous avez toujours été un modèle de réussite et de compétence. Je vous remercie vivement pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail, pour avoir relu et corrigé tous les rapports scientifiques que nous avons réalisés y compris cette thèse. Nous avons ici l'honneur de vous exprimer ma profonde gratitude, pour avoir accepté de participer à ma formation. Vous m'avez guidé dans mes différentes extractions tout au long de mes travaux de recherche. Vous m'avez rassuré chaque fois qu'un résultat nous semblait ambiguë. Merci Professeur et que Dieu vous le rende au centuple.

Nous remercions notre rapporteur : Madame N'GAMAN Kohué Christelle Chantal, épse KOUASSI, Maître de Conférences à l'Université Nangui ABROGOUA (Abobo-Adjamé) ainsi que nos instructeurs : Monsieur TOURE Abdoulaye, Maître de Conférences à l'Université Péléforo Gon COULIBALY (Korhogo), Monsieur OUATTARA Abou, Maître de Conférences à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE (Daloa).

Mes remerciements vont également à l'endroit des examinateurs : Monsieur SORO Yaya, Professeur Titulaire à l'Institut Polytechnique Félix HOUPHOUET-BOIGNY (Yamoussoukro) et Monsieur KOUADIO David Léonce, Maître de Conférences à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE (Daloa) pour avoir accepté de sacrifier un peu de leur temps pour moi en améliorant mon mémoire de thèse.

Nous remercions Docteur OUSSOU Kouamé Raphaël, Maître de Conférences de Chimie Organique et Biologique à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa, pour son assistance, son soutien et ses conseils tout le long de mon travail de thèse. Vous m'avez donné une motivation supplémentaire aux difficultés rencontrées au long de ce travail.

Nous tenons aussi à exprimer ma gratitude à Docteur KABRAN Faustin, Maître de Conférences de Chimie Organique et des Substances Naturelles de l'Université Felix HOUPHOUET-

BOIGNY (Abidjan). Vous m'avez guidé dans mes différentes extractions tout au long de mes travaux de recherche. Merci infiniment.

Mes remerciements vont à l'endroit de Docteur KABLAN Ahmont Landry Claude, Maître de Conférences de Chimie Organique et des Substances Naturelles à l'Université Péléforo Gon COULIBALY de Korhogo, pour son assistance, son aide pour la réalisation des tests biologiques et le suivi tout au long de mon travail de thèse.

Mes remerciements vont également à l'endroit de Docteur KONAN Dibi Jacques, Assistant Chimie Organique et des Substances Naturelles à l'université Nangui ABROGOUA (Abidjan) et son épouse Diane, pour leur aide sans faille pour l'analyse de mes échantillons en France dans un Laboratoire des Substances Naturelles. Nous tenons à vous assurer de notre sincère reconnaissance et notre profond respect.

Mes remerciements vont également à l'endroit de Monsieur N'GUESSAN Kouadio Laurent, Maître de Conférences, Enseignant de Grammaire et Linguistique en Français à l'Université Alassane OUATTARA de Bouaké, pour votre aide, votre disponibilité et vos conseils tout le long de mon travail de thèse.

Je tiens à remercier l'honorable KOUAKOU Abel pour son aide et son soutien sans faille.

Je remercie également mes ami(es) : Docteur GNAORE Toussaint, Docteur NIEKIMA Diakatidja, Docteur KOFFI Jean-Michel, DEGNY Anne Litse, KIMOU Anderson, TANOHEvelyne pour leur soutien et leurs conseils tout au long de notre manipulation au Laboratoire de Constitution et Réaction de la Matière (LCRM) de l'Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY (Abidjan).

Mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui de près ou de loin nous ont aidé à l'élaboration de notre travail et qui n'ont pas été cités.

LISTE DES SIGLES, ABREVIATIONS ET FORMULES CHIMIQUES

AcOET :	Acétate d'éthyle
ACN :	Acétonitrile
C :	Concentration de l'échantillon
CH ₂ Cl ₂ :	Dichlorométhane
C ₆ H ₁₄ :	Hexane
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl ₃ :	Chloroforme deutérié
CI ₅₀ :	Concentration provoquant 50 % d'inhibition
CL ₁₀₀ :	Concentration létale provoquant 100 % de mort
CLHP :	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CNF :	Centre National de Floristique
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
D :	Facteur de dilution
EI :	Ionisation par impact d'électron
ESI :	Ionisation par électrospray
ESI-MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem avec Ionisation par électrospray
FeCl ₃ :	Chlorure ferrique
H ₂ O :	Eau
H ₂ SO ₄ :	Acide sulfurique
Ir :	Indice de rétention
LC :	Chromatographie en phase liquide
LC/MS :	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
MeOD :	Méthanol deutérié
MeOH :	Méthanol
mg EAG /g :	Milligramme Equivalent Acide gallique par gramme
mg/mL :	Milligramme par millilitre
mg EQ/g :	Milligramme Equivalent Quercétine par gramme
mL :	Millilitre

mn :	Minute
MTA :	Médicament Traditionnel Amélioré
m/z :	Masse/charge
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PC :	Poids Corporel
Q-TOF :	Quadripôle -Temps de Volt
S M :	Spectrométrie de Masse
Tr :	Temps de rétention
UV :	Ultra-violet
V :	Volume (mL)
£ :	Teneur ou concentration (mg EAG/g ou mg EQ/g d'extrait sec).
µg/mL :	Microgramme par millilitre
UFC :	Unité Formant Colonie
<i>T. heterophylla</i> :	<i>Turraea heterophylla</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Programme d'éluion des échantillons sur le système HPLC-Q-TOF	57
Tableau II : Différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> correspondants aux doses administrées aux rates.	58
Tableau III : Rendement de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	65
Tableau IV : Rendements et aspects physiques des fractions issues de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	65
Tableau V : Tri-phytochimique de l'extrait brut méthanolique des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i> et de ses fractions	66
Tableau VI : Familles de composés identifiés par CCM de l'extrait méthanolique et de ses fractions	68
Tableau VII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 701,3527	77
Tableau VIII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 425,2688	80
Tableau IX : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 457,2954.....	83
Tableau X : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 415,2062	88
Tableau XI : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 333,2417.....	91
Tableau XII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 345,2428	94
Tableau XIII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 413,3399	97
Tableau XIV : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 429,3720.....	99
Tableau XV : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 305,2454	102
Tableau XVI : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 239,2002.....	105
Tableau XVII : Signes cliniques observés chez les rates	108
Tableau XVIII : Suivi des poids corporels des animaux sur une période de 15 jours	109
Tableau XIX : Diamètres d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i> sur les bactéries testées	110
Tableau XX : Valeurs des absorbances du test DPPH de l'extrait méthanolique, des fractions et de l'acide ascorbique	111
Tableau XXI : Valeurs des différentes absorbances du test de l'ABTS de l'extrait méthanolique, des fractions et du Trolox.....	114

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique d'une limonine (Manners, 2003).....	7
Figure 2 : Triterpénoïdes et coumarines isolés des extraits méthanoliques des graines et des écorces de tige d' <i>Ekebergia capensis</i>	8
Figure 3 : Composés isolés des extraits méthanoliques des feuilles d' <i>Ekebergia pterophylla</i>	9
Figure 4 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des feuilles, des racines et des écorces de tige de <i>Turraea nilotica</i>	12
Figure 5 : Composés glycosylés isolés des feuilles, des racines et des écorces de tige <i>Turraea nilotica</i>	13
Figure 6 : Composés isolés des feuilles, des racines et des écorces de tige de <i>Turraea holstii</i>	13
Figure 7 : Triterpénoïdes et limonoïdes isolés des écorces de racine de <i>Turraea robusta</i>	14
Figure 8 : Triterpénoïdes et limonoïdes isolés des graines et des racines de <i>Turraea parvifolia</i>	15
Figure 9 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des graines de <i>Turraea floribunda</i>	16
Figure 10 : Protolimonoïdes et Triterpénoïdes isolés des feuilles de <i>Turraea pubescens</i>	17
Figure 11 : Protolimonoïdes et Triterpénoïdes isolés des feuilles de <i>Turraea pubescens</i>	18
Figure 12 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des écorces de racine et de tige de <i>Turraea holstii</i>	19
Figure 13 : Protolimonoïdes et Triterpénoïdes isolés des graines de <i>Turraea obtusifolia</i>	20
Figure 14 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des écorces de racine de <i>Turraea wakefieldii</i> et de <i>Turraea mombassana</i>	21
Figure 15 : Triterpénoïdes isolés des feuilles de <i>Turraea vogelii</i>	22
Figure 16 : Limonoïdes isolés des écorces de racine de <i>Turraea cornucopia</i>	22
Figure 17 : Photographie de <i>Turraea heterophylla</i> Smith (Meliaceae).....	24
Figure 18 : Structures de quelques composés isolés des écorces de racine de <i>Turraea heterophylla</i>	26
Figure 19 : Structures des acides hydroxy benzoïques et hydroxy cinnamiques.....	28
Figure 20 : Structures de quelques tanins	29
Figure 21 : Structures de quelques quinones et dérivés anthracéniques	30
Figure 22 : Structure de la Flavan-3-ol	30
Figure 23 : Structures de quelques coumarines.....	31
Figure 24 : Structure chimique de l'isoprène	33
Figure 25 : Structures de quelques monoterpènes.....	34
Figure 26 : Structures de quelques sesquiterpènes.....	34
Figure 27 : Structures de quelques diterpènes.....	35
Figure 28 : Structures de quelques sesterpènes.....	35
Figure 29 : Structures de quelques triterpènes	36
Figure 30 : Structures du β -carotène et du Lycopène	36
Figure 31 : Structures de quelques limonoïdes	38
Figure 32 : Photographie du système HPLC-ESI-Q-TOF, série TOF/ 6530	47
Figure 33 : Photographie des rates blanches de souche Wistar	48

Figure 34 : Photographie des feuilles (A) et du broyât des feuilles (B) de <i>T. heterophylla</i>	50
Figure 35 : Schéma d'extraction solide-liquide	51
Figure 36 : Schéma d'extraction liquide-liquide.....	52
Figure 37 : Photographie du gavage des rates avec l'extrait méthanolique de <i>Turraea heterophylla</i>	59
Figure 38 : Schéma simplifié adapté de la méthode de diffusion sur puits en milieu solide ..	61
Figure 39 : Profil chromatographique des empreintes moléculaires.....	69
Figure 40 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	70
Figure 41 : Histogrammes des teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et de ses fractions.....	70
Figure 42 : Droite d'étalonnage de la quercétine	71
Figure 43 : Histogrammes des teneurs en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique et de ses fractions.....	72
Figure 44 : Chromatogramme UV 254 nm de l'extrait MeOH des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	73
Figure 45 : Chromatogramme UV 280 nm de l'extrait MeOH des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	74
Figure 46 : Spectre en LC-ESI-MS de l'extrait méthanolique de feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	74
Figure 47 : Chromatogramme HPLC-ESI-Q-TOF-MS de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	75
Figure 48 : Spectre en ESI-MS du composé 7	76
Figure 49 : Structure du 28-nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-14,15- déoxyhavanensin-1,7-diacétate.....	77
Figure 50 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 7	78
Figure 51 : Schéma de fragmentation du 28- nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-14,15-déoxyhavanensin-1,7-diacétate (7)	79
Figure 52 : Spectre ESI-MS du composé 24	80
Figure 53 : Structure de la 1,2- dihydroazadirone (24).....	81
Figure 54 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 24	81
Figure 55 : Schéma de fragmentation de la 1,2-dihydroazadirone (24).....	82
Figure 56 : Spectre ESI-MS du composé 25	82
Figure 57 : Structure des isomères du composé 25 (25A et 25B).....	84
Figure 58 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 25A	84
Figure 59 : Schéma de fragmentation du Mzikonol (25A)	85
Figure 60 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 25B	85
Figure 61 : Schéma de fragmentation de la Turranolide (25B)	86
Figure 62 : Spectre ESI-MS du composé 8	87
Figure 63 : Structure du β -sitostérol (8).....	88
Figure 64 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 8	89
Figure 65 : Schéma de fragmentation du β -sitostérol (8).....	90
Figure 66 : Spectre ESI-MS du composé 20	91
Figure 67 : Structure de villostérol (20).....	92
Figure 68 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 20	92

Figure 69 : Schéma de fragmentation du villostérol (20)	93
Figure 70 : Spectre ESI-MS du composé 23	94
Figure 71 : Structure de la 3 β -acétoxy-5 α -prégn-7,20-dién-6-one (23).....	95
Figure 72 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 23	95
Figure 73 : Schéma de fragmentation de la 3 β -acétoxy-5 α -prégn-7,20-dién-6-one (23)	96
Figure 74 : Spectre ESI-MS du composé 30	96
Figure 75 : Structure de Stigmastérol (30)	97
Figure 76 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 30	97
Figure 77 : Schéma de fragmentation du Stigmastérol (30)	98
Figure 78 : Spectre ESI-MS du composé 38	99
Figure 79 : Structure de l'Oxo- β -sitostérol (38)	100
Figure 80 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 38	100
Figure 81 : Schéma de fragmentation de l' Oxo- β -sitostérol (38)	101
Figure 82 : Spectre ESI-SM du composé 39	102
Figure 83 : Structure de la 3 β -hydroxy-5 α -prégn-6-one (39)	102
Figure 84 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 39	103
Figure 85 : Schéma de fragmentation de la 3 β -hydroxy-5 α -prégn-6-one (39).....	104
Figure 86 : Spectre ESI-MS du composé 21	105
Figure 87 : Structure du Cyperusol C (21).....	105
Figure 88 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 21	106
Figure 89 : Schéma de fragmentation de Cyperusol C (21).....	106
Figure 90 : Droites d'étalonnage des pourcentages d'inhibition du DPPH par l'extrait méthanolique, des fractions et l'acide ascorbique.....	112
Figure 91 : Diagramme des différentes valeurs de CI ₅₀ du test DPPH	113
Figure 92 : Droites d'étalonnage des pourcentages d'inhibition de l'ABTS par l'extrait méthanolique, des fractions et de Trolox	116
Figure 93 : Diagramme des différentes valeurs de CI ₅₀ du test de l'ABTS	117

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Composés identifiés de l'extrait des feuilles de <i>Turraea heterophylla</i>	xvii
Annexe 2 : Composés limonoïdes	xviii
Annexe 3 : Composés stéroïdes	xix
Annexe 4 : Composés sesquiterpenoïdes.....	xxii
Annexe 5 : Tableaux recapitulatifs des composés identifiés.....	xxiii
Annexe 6 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux.....	xxv
Annexe 7 : Tableaux biologiques.....	xxvi

INTRODUCTION GENERALE

Dans le monde, en particulier en Afrique subsaharienne, plus de 80% de la population apprécie les vertus thérapeutiques des plantes pour leurs besoins médicaux (OMS, 2013 ; Aké, 2011 ; Rhattas *et al.*, 2016 ; Jamila, 2018). En effet, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu par nos ancêtres et transmis de génération en génération de façon empirique (Aké, 1988 ; Nacoulma, 1996). Cet engouement pour les plantes médicinales s'explique par les difficultés d'ordre socio-économique liées à la pauvreté de la population, au coût élevé des médicaments conventionnels et à l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les zones rurales (Sanogo, 2006). Il s'explique également par des habitudes socio-culturelles des populations et par la résistance de plus en plus élevée de certains agents pathogènes aux médicaments modernes (Rivière *et al.*, 2005 ; Kouadio, 2013 ; Fankam *et al.*, 2014). Ainsi, le développement de l'utilisation des connaissances sur les espèces végétales médicinales pour traiter diverses maladies telles que le paludisme, les hémorroïdes, l'hypertension artérielle, les diarrhées, les maladies cardiaques, le rhume, la toux, la tuberculose et l'ulcère de Buruli, est fréquent dans bon nombre de pays (Bouquet & Debray, 1974 ; Adjanooun & Aké, 1985 ; Aké, 2011 ; Betti, 2011 ; Konan *et al.*, 2019 ; Gnaoré *et al.*, 2020). Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) présentent des limites (Andrew, 2021). De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (Andrew, 2021). Les remèdes à bases de plantes médicinales montrent une certaine efficacité ce qui fait qu'elles sont encore sollicitées en phytothérapie. En plus, les plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs qui sont issus de leurs métabolismes primaires ou secondaires (Novais, 2004 ; Chaabi, 2008). Par ailleurs, de nombreuses recherches scientifiques ont permis de confirmer les activités pharmacologiques de certaines espèces végétales utilisées traditionnellement (Pousset, 2006 ; Aké, 2011). Ainsi, la recherche de principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale, car elle permet la mise au point de médicaments essentiels. On peut citer comme exemples, la tubocurarine, le relaxant musculaire le plus puissant qui dérive du curare (Menispermaceae) et la morphine l'analgésique puissant, tirée du *Papaver somniferum* (Papaveraceae). D'autres anesthésiants proviennent des plantes : la cocaïne par exemple, est tirée du coca (Erythroxylaceae) (Andrew, 2021). Aujourd'hui, *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) « arbre aux mille écus », une des plantes médicinales les plus anciennes, favorise la circulation du sang et est aussi utilisée dans l'industrie pharmaceutique (Andrew, 2017).

Il est difficile d'imaginer le monde sans la quinine (dérivée du genre *Cinchona*), qui est employée contre le paludisme, sans la digoxine (du genre *Digitalis*), qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine (du genre *Ephedra*), qui soigne l'asthme, l'obésité et les rhumes (Andrew, 2021). Malgré les nombreuses vertus des plantes et leurs usages courants comme remèdes par les populations, fort est de reconnaître que la méconnaissance des compositions chimiques entraîne régulièrement les intoxications pouvant conduire la mort. Face à ces accidents, il s'impose d'élucider la composition chimique des espèces végétales les plus employées comme remèdes contre les affections de la population. Le présent travail a pour objectif général de contribuer à la valorisation des constituants chimiques des feuilles de *Turraea heterophylla* par la détermination de sa composition chimique. De façon spécifique il s'agira :

- de mettre en évidence les métabolites secondaires présents dans les extraits des feuilles ;
- de doser certains métabolites secondaires mis en évidence ;
- de déterminer les structures de certains métabolites secondaires ;
- d'évaluer la toxicité aiguë, les activités antibactériennes *in vitro* et antioxydantes.

Ce document, qui présente les travaux réalisés et les résultats obtenus, est structuré autour de trois grands chapitres. Le premier chapitre traite de la revue bibliographique. Ensuite, le deuxième chapitre est consacré à la description du matériel et des méthodes utilisés pour la réalisation du travail. Enfin, le troisième chapitre présente les résultats obtenus assortis d'une discussion. Le mémoire se termine par une conclusion générale et quelques perspectives de développement du thème de recherche.

CHAPITRE I :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce premier chapitre est consacré à la revue bibliographie sur les plantes médicinales, les métabolites secondaires des plantes, les techniques de détermination structurale, les bactéries utilisées et la plante investiguée. Quelques informations sur la toxicité aiguë et les antioxydants y sont exposées.

I.1. PLANTES MEDICINALES

I.1.1. Définition

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine, etc.) peut être employée dans le but de se soigner. Elles sont utilisées depuis au moins 7 000 ans avant notre ère par les hommes et sont à la base de la phytothérapie. Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents (Andrey, 2017). La phytothérapie vient du grec et signifie « soigner par les plantes ». Elle repose en partie sur des pratiques traditionnelles, fondée sur l'utilisation ancestrale et/ou locale des plantes. Les plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques. Ces composés actifs ont souvent été étudiés et reproduits chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments (Andrey, 2017).

Par ailleurs, la pharmacopée française, définit les plantes médicinales comme des drogues végétales qui peuvent être utilisées entières ou sous forme d'une partie de plante et qui possèdent des propriétés médicamenteuses (Chevallier & Crouzet-Segarra, 2004).

I.1.2. Importance socio-économique des plantes médicinales

Malgré l'urbanisation, les populations continuent de se soigner avec les plantes médicinales. A travers les villes ivoiriennes, on rencontre plusieurs points de vente de plantes médicinales : dans les marchés, dans les artères et des vendeurs ambulants. De plus en plus, la vente des plantes médicinales s'organise et s'améliore pour faire face aux exigences du marché. Les plantes médicinales ont une importance économique, car leur commercialisation constitue une activité lucrative. En effet, une étude menée au Burkina-Faso en 2003, a estimé la consommation par personne et par an à environ 480 g pour une valeur d'environ 2200F CFA par personne (Banque mondiale-PROMETRA-Burkina-Faso-2003). De plus, le marché mondial de médicaments traditionnels à base de plantes est actuellement estimé à 60 milliards de dollars US (Sanogo, 2006).

I.1.3. Présentation de la plante étudiée

La plante étudiée appartient à la famille des Meliaceae et au genre *Turraea*.

I.1.3.1. Famille des Meliaceae

La famille des Meliaceae est répandue dans les régions tropicales du monde entier, avec quelques espèces se trouvant en zones plus tempérées (Mabberley *et al.*, 2007 ; Mabberley, 2011 ; Chase & Reveal, 2016).

I.1.3.2. Description botanique des Meliaceae

La famille des Meliaceae comprend des arbres et des arbustes dicotylédones. Elle comprend environ 53 genres et 600 espèces d'origine tropicale (ATIBT, 2016). Les principaux genres sont *Aglaia* (100 espèces), *Trichilia* (65 espèces), *Turraea* (65 espèces), *Dysoxylum* (61 espèces) et *Toona* (12 espèces) (Chase & Reveal, 2009). Les feuilles sont souvent alternes, composées pennées sans stipules. Quelques espèces sont à feuilles caduques, perdant leur feuillage soit en saison des pluies, soit pendant la saison sèche. Cette famille renferme des plantes sempervirentes. Leurs fleurs actinomorphes sont de petites tailles renfermant jusqu'à 4-5 sépales et des pétales au nombre de 3 à 7. Les étamines au nombre de 8 à 10 sont souvent soudées en tube. L'ovaire supère comprend 2 à 6 péricarpes. Ces fleurs sont en général unisexuées. La famille des Meliaceae renferme les plantes monoïques et dioïques. La présence de staminodes ou phyllodes leur donne parfois un aspect de fleurs bisexuées. Les inflorescences sont variées en général cymes ou grappes, parfois épis. Les fruits sont généralement des capsules, des drupes ou des baies. Les graines des Meliaceae sont disséminées par le vent, les animaux et les oiseaux. Les espèces à petites graines ailées anémochores (dispersées par le vent) sont en général héliophiles (aiment la lumière) et celles à plus grosses graines non ailées avec ou sans arille (pulpe colorée enrobant la graine) disséminées par les animaux (zoophores) sont sciaphiles (aiment l'ombre du sous-bois). L'activité biologique des plantes de cette famille est aussi dû aux limonoïdes, un groupe de composés terpénoïdes (Yu & Wang, 2005 ; Wang *et al.*, 2011). Ainsi la structure chimique d'un limonoïde est présentée dans la figure 1.

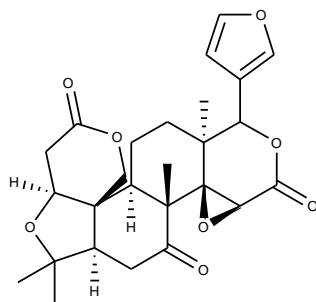


Figure 1 : Structure chimique d'une limonine (Manners, 2003)

I.1.3.3. Quelques utilisations traditionnelles des Meliaceae

En Afrique subsaharienne, les Meliaceae sont utilisées pour le traitement des maux d'estomac, la toux, des douleurs dorsales, de la fièvre, des troubles rénaux, des rhumatismes, la diarrhée muqueuse, des maladies cardiaques (Mulholland *et al.*, 2000 ; Aké, 2011), la fièvre typhoïde (Konaté *et al.*, 2011), le paludisme (Mpondo *et al.*, 2017), les maladies vénériennes, comme remède anthelminthique et téniaicide (Olayinka *et al.*, 1992 ; Iwu, 1993) et la trypanosomiase bovine (Noudèkè *et al.*, 2017). Elle est également utilisée contre l'empoisonnement, l'hépatite, l'hypertension artérielle, les infections de la peau et les infections buccales (Kouitchou *et al.*, 2017). Les Meliaceae sont perçues comme anti-inflammatoire dans la médecine traditionnelle (Weber *et al.*, 2009 ; Mbaye *et al.*, 2013). De plus, les Meliaceae sont aussi connues pour leurs propriétés bactéricides, fortifiante sur la gencive, immunostimulantes, anti-inflammatoires, fébrifuges, fongicides, antivirales, antidiabétiques, vulnérinaires, vermifuges, antipaludéennes et contraceptives (Ermel *et al.*, 1986 ; Roger, 1992 ; Ouayogode, 2021).

I.1.3.4. Travaux antérieurs sur la famille des Meliaceae

I.1.3.4.1. Composition chimique des Meliaceae

Des études antérieures ont mentionné la présence d'alcaloïdes, de triterpénoïdes, de saponosides, de flavonoïdes, de polyphénols, de stéroïdes, de coumarines et généralement de limonoïdes (tétranortriterpénoïdes) dans la famille des Meliaceae (Tan & Luo, 2011 ; Boua *et al.*, 2013). En effet, certains triterpénoïdes tels que l'acide oléanolique, l'acide oléanonique, l'acide 3-épi-oléanolique, l'acide 3,11-dioxooléan-12-èn-28-oïque, le melliférone et l'acide 3-oxo-11,13 (18) oléandièn-28-oïque ont été identifiés des extraits méthanoliques des graines et des écorces de tige d'*Ekebergia capensis* (Murata *et al.*, 2008).

En plus, les coumarines comme l'ekersenine, le 4,6-diméthoxy-5-méthylcoumarine, le 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine et les prégnanes : ékeberine A, ékeberine B et (Z)-volkendousine ont été isolés de cette même espèce (Sewram *et al.*, 2000). Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 2.

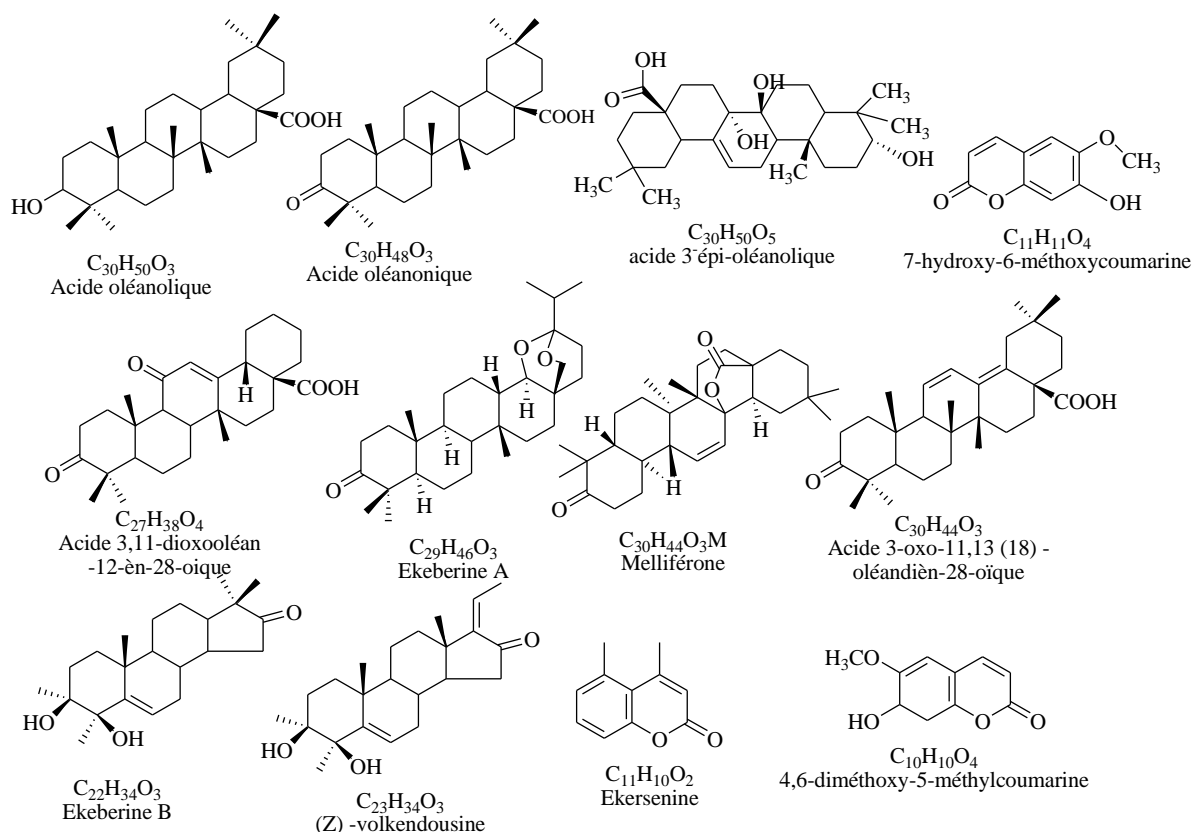


Figure 2 : Triterpénoïdes et coumarines isolés des extraits méthanoliques des graines et des écorces de tige d'*Ekebergia capensis* (Sewram *et al.*, 2000 ; Murata *et al.*, 2008)

Taylor & Taylor (1984) et Mulholland *et al.* (1998) ont isolé respectivement des extraits méthanoliques de l'écorce et des feuilles d'*Ekebergia pterophylla* les composés qui sont : l'acide atrarique, le β -amyrine, le β -amyrone, le β -sitostérylacétate, le β -sitostérol, le lupéol, le ptérophylline 1 et le ptérophylline 2. Les structures de ses composés sont représentées dans la figure 3.

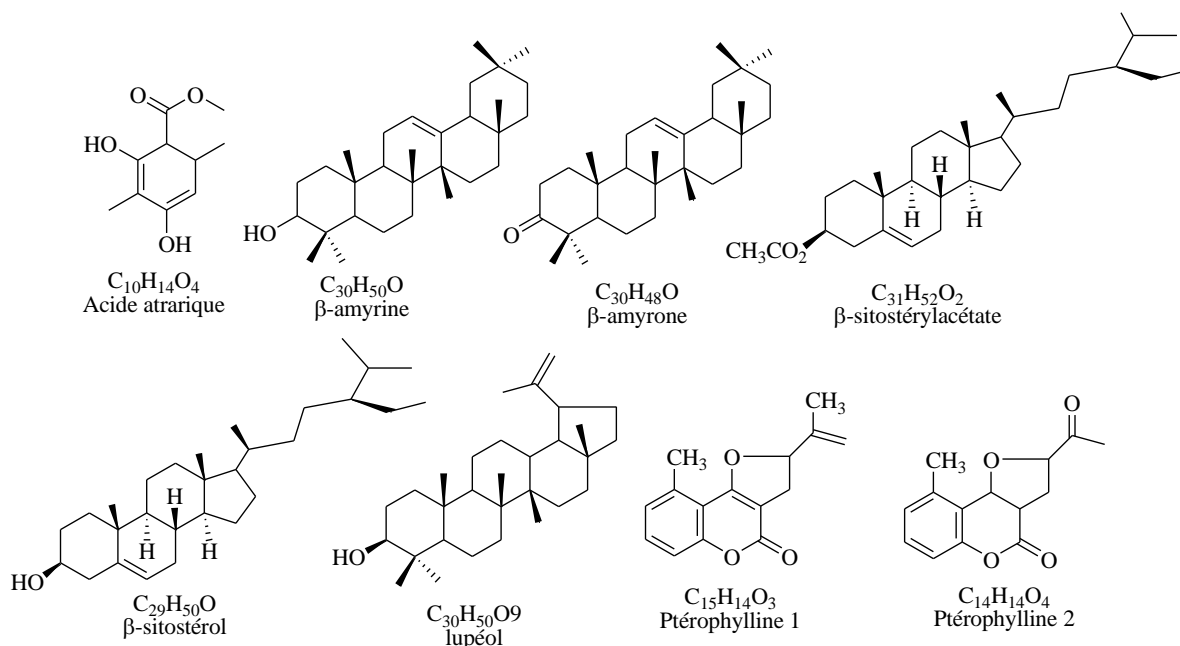


Figure 3 : Composés isolés des extraits méthanoliques des feuilles d'*Ekebergia pterophylla* (Taylor & Taylor, 1984 ; Mulholland *et al.*, 1998)

La rohitukine (un alcaloïde) a été isolée des feuilles et des tiges d'*Amoora rohituka* (Harmon *et al.*, 1979). Ce même composé est isolé des feuilles et des fruits de *Dysoxylum binectariferum* par Mohana *et al.* (2014) et Mahajan *et al.* (2015). L'étude chimique des racines d'*Entandrophragma congoënsis* (Meliaceae) a conduit à l'isolement de deux nouveaux triterpènes 3,4-seco-tirucallane qui sont les acides séco-tiaminiques B et C (Yakusu *et al.*, 2018). En outre, les limonoïdes et les composés tels que l'obacunone, le nomiline, le désacétylnomiline, l'isoobacunoate de méthyle, l'ichangensine, le désacétylnomilate de méthyle et l'isoobacunoate de méthyle ont été isolés des écorces de racine de *C. tabularis* (Manners *et al.*, 2003). A partir de cette espèce, Nakatani *et al.* (2004) ont identifié six nouveaux limonoïdes phragmalins tabulaline et tabulalides (A-E) des écorces de racine de *C. tabularis*. Les molécules 3 α ,7 α -didéacétylkhivorine, le 1 α ,3 α ,7 α -tridéacétylkhivorine, le khayanone, le 1-O-acétylkhayanolide B, le khayanolide B, le khayanolide E, le 1-O-désacétylkhayanolide E et le 6-déshydroxylactone ont été isolés des feuilles de *Khaya senegalensis* (Zhang *et al.*, 2007). De plus, deux flavonoïdes dimères ainsi que le 2,6-dihydroxy-p-benzoquinone, le β -sitostérol, le 3-Oglucose- β -sitostérol et la catéchine ont été isolés de l'extrait des écorces de tige de *Khaya senegalensis* (Kayser *et al.*, 2001). Deux nouveaux triterpénoïdes (aglinone et agline E), le 3-épiocotillol, l'agline A, l'acide eichlérianique ; les triterpénoïdes, l'argentine A, l'argentine B, le dammar-24- α -ol,

le 3-épi-cabraleahydroxy lactone, le 25-hydroperoxydammar-23-èn-3 β ,20-diol, l'acide eichlériianique et le dammar-24-èn-3 α ,20-diol ont été isolés de l'extrait méthanolique des écorces de tige d'*Aglaia argentea* (Kindi *et al.*, 2017). Par ailleurs, trois nouveaux triterpénoïdes de type limonoïde tels que : toonasine A, toonasine B et toonasine C ont été identifiés des écorces de *Toona sinensis* (Qian *et al.*, 2016). Notons qu'un diterpénoïde du nom de Gossweilone a été aussi isolé de cette espèce (Xu *et al.*, 2011).

I.1.3.4.2. Activités biologiques des Meliaceae

Les travaux antérieurs sur les Meliaceae ont établi un large éventail d'activités biologiques. Les Meliaceae sont employées comme insecticides, bactéricides, antiviraux, antiparasitaires et antibactériennes (Chong *et al.*, 2008 ; Ogni *et al.*, 2014 ; Soha *et al.*, 2019). Les limonoïdes appartenant à la famille des Meliaceae auraient une activité antimicrobienne (Joosten & Veen, 2011) et antifongique (Govindachari *et al.*, 2000 ; Abdelgaleil & El-Aswad, 2005). En outre, Mane. (2012) et Ishaq *et al.* (2014) ont montré que l'extrait éthanolique des écorces de la plante *Khaya senegalensis* a une activité antioxydante assurant une bonne protection gastrique. En plus, l'extrait aqueux des feuilles de *Khaya senegalensis* est un potentiel antioxydant et antibactérien contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (Konaté *et al.*, 2011) et présente également un effet médical dans la réduction de la glycémie (Kalman *et al.*, 2013). Par ailleurs, les extraits dichlorométhanique et méthanolique des écorces de tige d'*Entandrophragma angolense*, sur la souche résistante à la chloroquine W2 de *Plasmodium falciparum* ont montré une activité inhibitrice, avec des CI₅₀ de 2 et 5,4 μ g/ml respectivement (Bickii *et al.*, 2006).

I.1.3.5. Présentation du genre *Turraea*

Le genre *Turraea* comprend environ 60 à 70 espèces d'arbustes qu'on retrouve en Afrique (Jensen *et al.*, 2017), à Madagascar et aux Comores. On trouve une seule espèce (*Turraea pubescens* Enfe.) en Asie et en Australie (Mabberley *et al.*, 1995 ; Chase & Reveal, 2016). Le genre *Turraea* est riche en limonoïdes (Tan & Luo, 2011). *Turraea* est reconnaissable dans la famille des Meliaceae par ses feuilles simples spiralées, ses fleurs à étamines totalement soudées, un réceptacle pollinique et son fruit à capsule déhiscence possédant une graine portant un arille (Randrianarivony *et al.*, 2017).

I.1.3.6. Quelques utilisations traditionnelles des *Turraea*

Il existe environ 11 espèces du genre d'origine qui poussent en Afrique, dont certaines ont été utilisées traditionnellement pour traiter diverses maladies telles que la toux, la diarrhée et les douleurs d'estomac (Kokwaro, 2009 ; Kamatenesi *et al.*, 2011). Certaines espèces du genre *Turraea* sont employées comme remèdes traditionnels. En effet, selon Mulholland & Taylor, (1988), la décoction d'écorces de racine de *Turraea nilotica* est utilisée pour traiter des troubles gastriques. *Turraea floribunda* est utilisée comme émétique et purgatif selon Ndung'u *et al.* (2004). Quant à *Turraea robusta*, elle entre dans le traitement du paludisme, la diarrhée et les malaises gastro-intestinaux (Rajab *et al.*, 1988). Les feuilles de cette même plante sont souvent consommées comme antidote à l'empoisonnement (Gathirwa *et al.*, 2008 ; Kokwaro, 2009). La plante *Turraea vogelii* soigne également des douleurs du ventre et des vers intestinaux (Rasamison *et al.*, 2014).

I.1.3.7. Travaux antérieurs sur le genre *Turraea*

I.1.3.7.1. Composition chimique des *Turraea*

Des limonoïdes et triterpénoïdes ont été isolés du genre *Turraea*. En effet, Mulholland & Taylor (1988) ont isolé plusieurs composés dont l'azadirone, le 12 α -acétoxy-7-déacétylazadirone, le mzikonone, le 11 α ,3 α -diacétyl-7 α -tigloylvilasinine et le hispidol A des feuilles, des racines et des écorces de tige de *Turraea nilotica*. Les protolimonoides tels que le niloticine, le piscidinol A, l'hispidol B, le toonapubesine F, le nilotine, le β -sitostérol, l'oxo- β -sitostérol, le stigmastérol, l'oxo-stigmastérol, le niloticine acétate et le piscidinol A diacétate ont été également isolés des racines et des écorces de tige de *Turraea nilotica* (Bentley *et al.*, 1995). On retrouve chez ces plantes, les composés glycosides tels que l'acétate sitostérol-3-O-D-glucopyranoside et l'acétate de stigmastérol-3-O-D-glucopyranoside (Zhao *et al.*, 1989 ; Jares *et al.*, 1990 ; Kojima *et al.*, 1990). Les structures de ces composés sont représentées dans les figures 4 et 5.

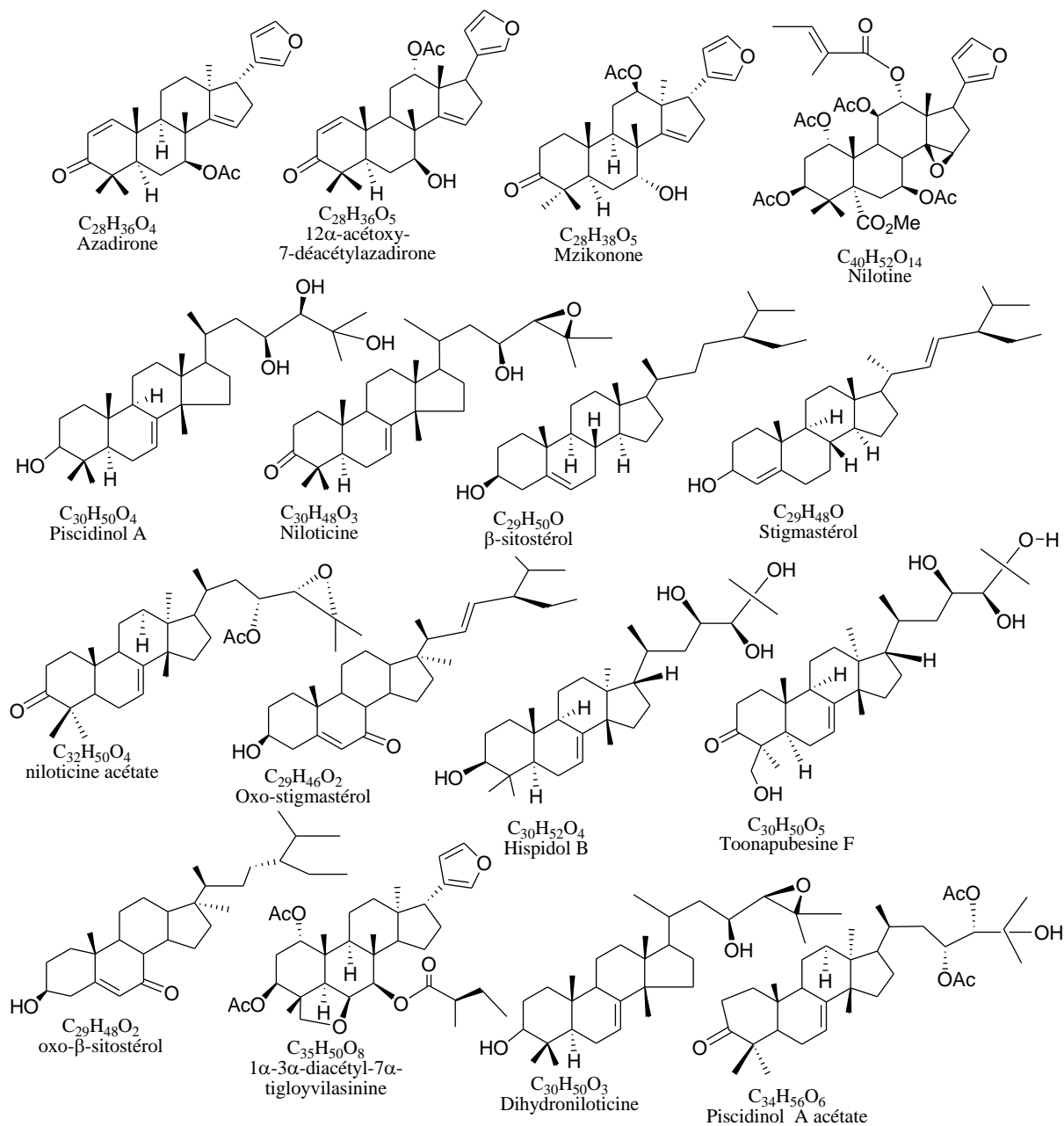


Figure 4 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des feuilles, des racines et des écorces de tige de *Turraea nilotica* (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley *et al.*, 1995)

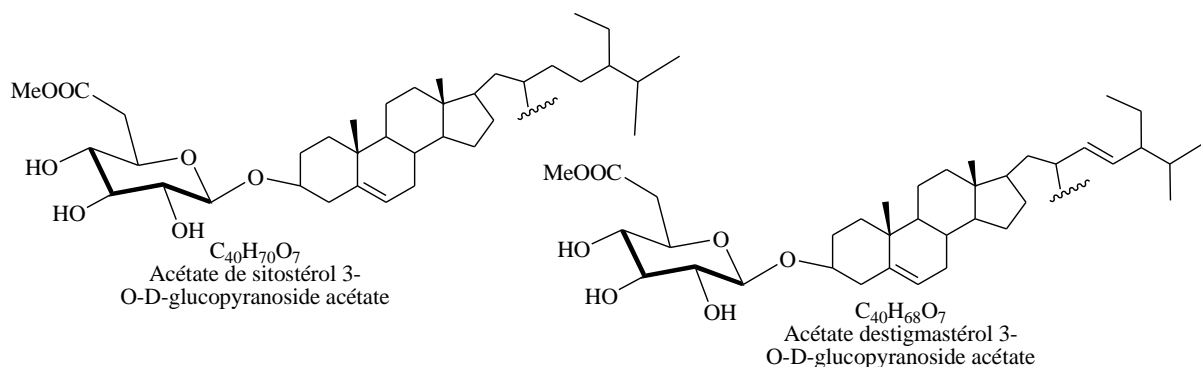


Figure 5 : Composés glycosylés isolés des feuilles, des racines et des écorces de tige *Turraea nilotica* (Zhao *et al.*, 1989 ; Jares *et al.*, 1990 ; Kojima *et al.*, 1990)

Les travaux réalisés sur les feuilles, les écorces de racine et de tige de *Turraea holstii* ont abouti à des limonoïdes et des triterpénoïdes nommés : $1\alpha,3\alpha$ -diacétylvilasine, 11-épi-toonaciline, hostinine B, 12α -acétoxynéotrichilénone, 12α -ométhylnimbolinine et oxo- β -sistostérol (Champagne *et al.*, 1992 ; Tan & Luo, 2011). Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 6.

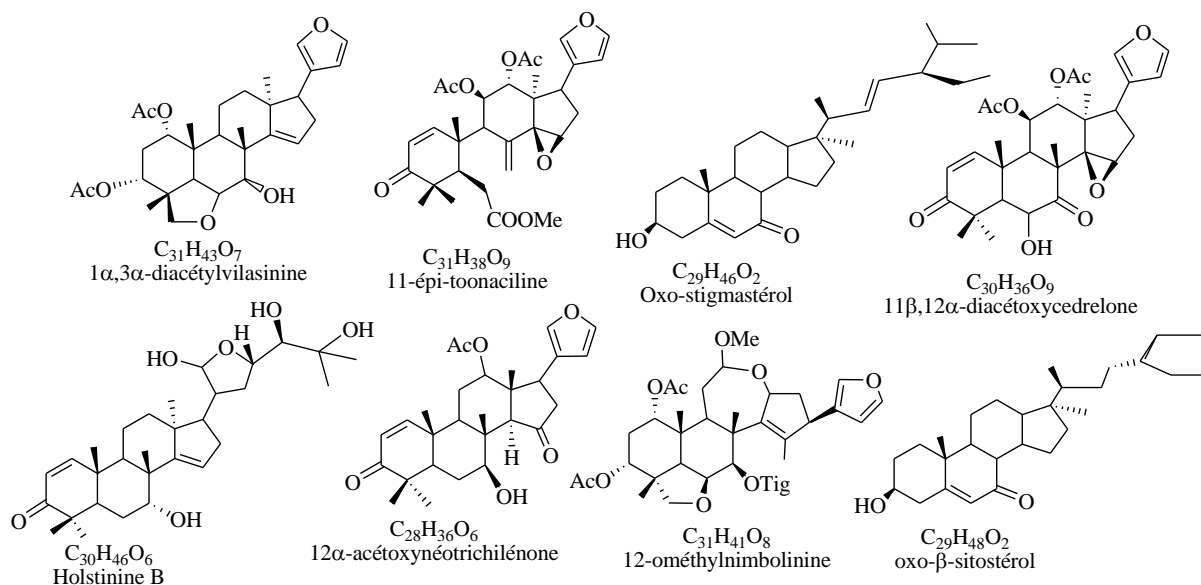


Figure 6 : Composés isolés des feuilles, des racines et des écorces de tige de *Turraea holstii* (Champagne *et al.*, 1992 ; Tan & Luo, 2011)

Les études phytochimiques des extraits méthanoliques des écorces de racine de *Turraea robusta* ont aussi conduit à l'isolement de cinq (5) limonoïdes : mzikonone, mzikonol, azadirone, 1,2-dihydroazadirone et nimbolinine B, puis des triterpénoïdes tels que turranolide

et butyrospermol (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992). Les structures de ses composés sont représentées dans la figure 7.

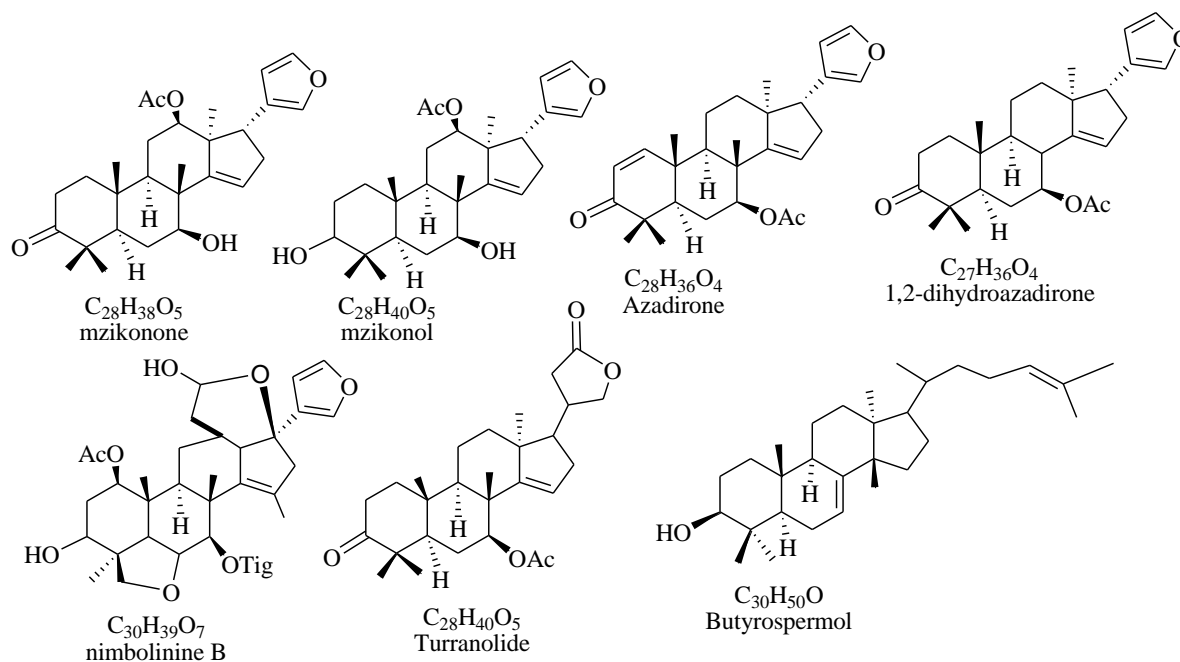


Figure 7 : Triterpénoïdes et limonoïdes isolés des écorces de racine de *Turraea robusta* (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992)

A partir des graines et des racines de *Turraea parvifolia*, ont été isolés les triterpénoïdes : turraparvine A, turraparvine B, turraparvine C, 12 α -acétoxyazadirone, 11-épi-hydroxytoonacilide, 11-épi-23-hydroxytoonacilide et des limonoïdes qui sont : mzikonone ; 1 α -acétyl-3 α -propionylvilasinine ; 1 α ,3 α -diacétyl-7 α -tigloyvilasinine et 12 α -acétoxy-1,2-dihydroazadirone (Cheplogoi & Mulholland, 2003a ; Cheplogoi & Mulholland, 2003b). Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 8.

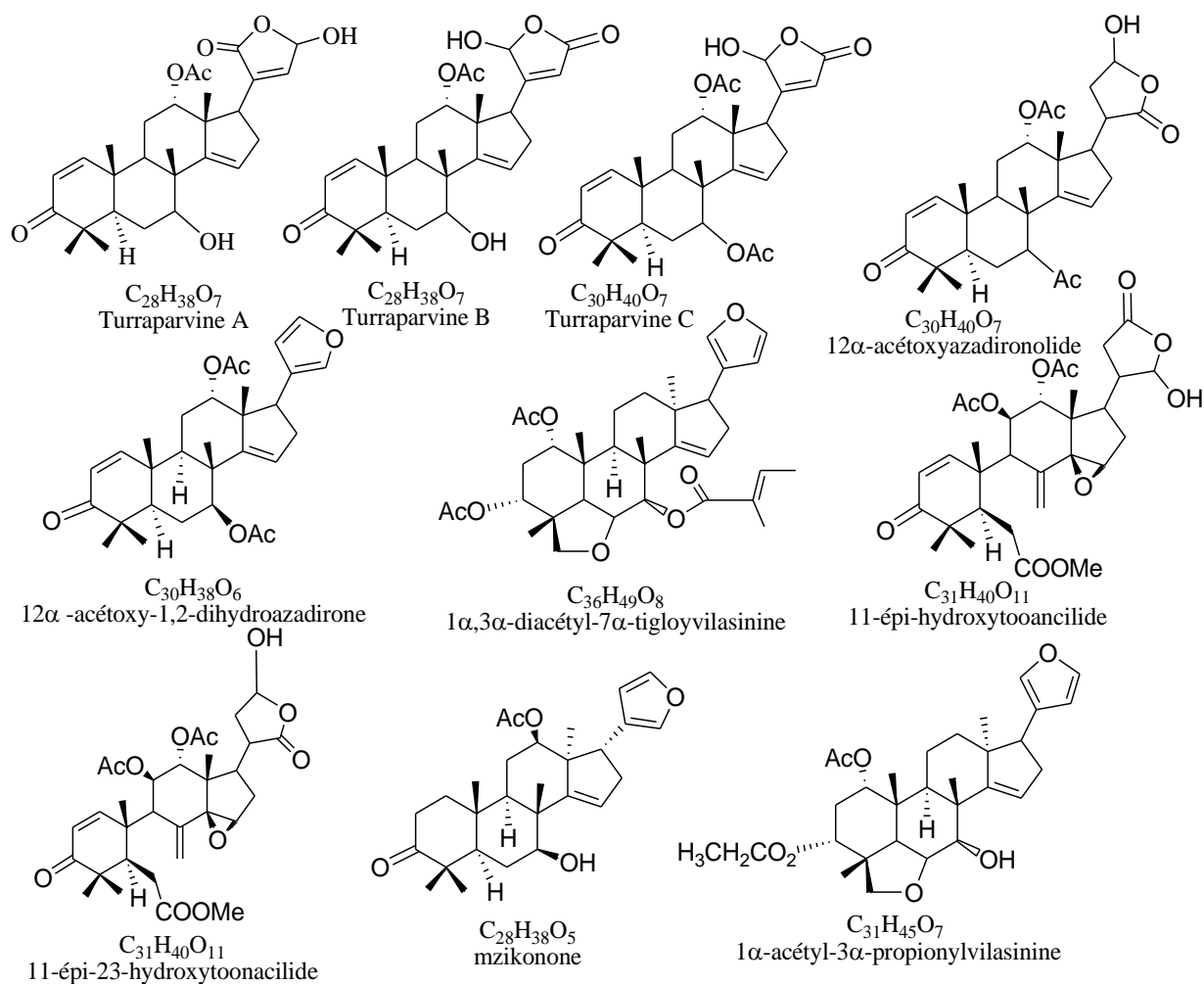


Figure 8 : Triterpénoïdes et limonoïdes isolés des graines et des racines de *Turraea parvifolia* (Cheplogoi & Mulholland, 2003a ; Cheplogoi & Mulholland, 2003b)

Ces molécules turraflorine A, turraflorine B, turraflorine C, turraflorine G, turraflorine H et turraflorine I ont été isolées des graines de *Turraea floribunda* (McFarland *et al.*, 2004). A partir des écorces de racine de *Turraea floribunda*, ont été identifiés les triterpénoïdes::turraflorine D, turraflorine F, 1 α ,7 α ,11 β -triacétoxy-4 α -carbométhoxy-12 α -(2-méthylpropanoyloxy)-14 β ,15 β -époxyhavanensine, 1 α ,11 β -diacétoxy-4 α -carbométhoxy-7 α -hydroxy-12 α -(2-méthylpropanoyloxy) -15-oxohavanensine, 28- nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α - (2-méthylbutanoyloxy)-14,15- désoxyhavanensin-1,7-diacétate, 28-nor-4 α -carbométhoxy-11 β -hydroxy12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-14,15-désoxyhavanensine-1 acétate, 18-nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α (2-méthylbutanoyloxy)-14,15désoxyhavanensine-1-acétate, 11 β -acétoxy-3,7-diacétyl-4 α -carbométhoxy-12-trisobutyryloxy-28-nor-1-tigloyl-

havanensine (Torto *et al.*, 1995 ; Mulholland *et al.*, 1998; McFarland *et al.*, 2004; Ndung'u *et al.*, 2004). Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 9.

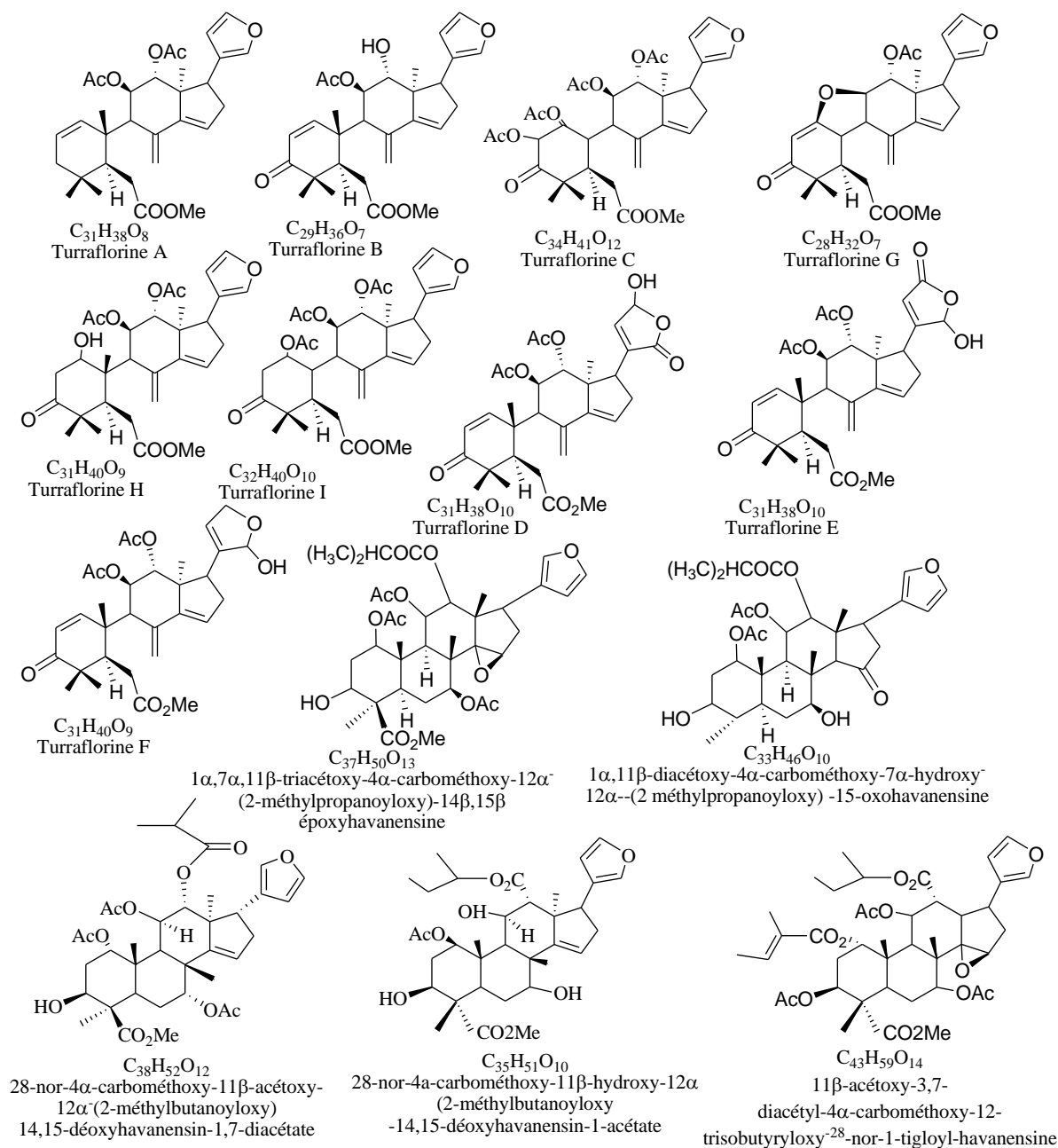


Figure 9 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des graines de *Turraea floribunda* (Torto *et al.*, 1995 ; Mulholland *et al.*, 1998 ; Mulholland *et al.*, 1999 ; McFarland *et al.*, 2004)

D'autres limonoïdes avec des variations structurales ont été isolés et identifiés de l'extrait méthanolique des rameaux et des feuilles de *Turraea pubescens*. Il s'agit entre autres du mzikonone, turraflorine A, 11-épi-tonaciline, 12 α -acétoxy-7-déacétylazadirone, turrapubine

A-I, nimonol, dihydroniloticine, piscidinol A, turrapubine H, 7-déacétylbruceajavanine B, dihydrosapeline E acétate, hispidol B, mesendanine T, mesendanine U, turrapubesols A-C, bourjotinolone B, grandifoliolone, hispidone et 3-épisapeline A. A ceux-là, on peut ajouter les triterpénoïdes isolés tels que 11-épi-23-hydroxytoonacilide, 2 β ,3 β ,5 β -trihydroxyprégn-20-èn-6-one, 3 β -hydroxy-5 α -prégn-7,20-dièn-6-one, 3 β -acétoxy-5 α -prégn-7,20-dièn-6-one, turrapubesine C, D-G, acide turrapubesique A, Cyperusol C, turranine A-E (Wang *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2011 ; Yuan *et al.*, 2013). Les structures de ces composés sont représentées dans les figures 10 et 11.

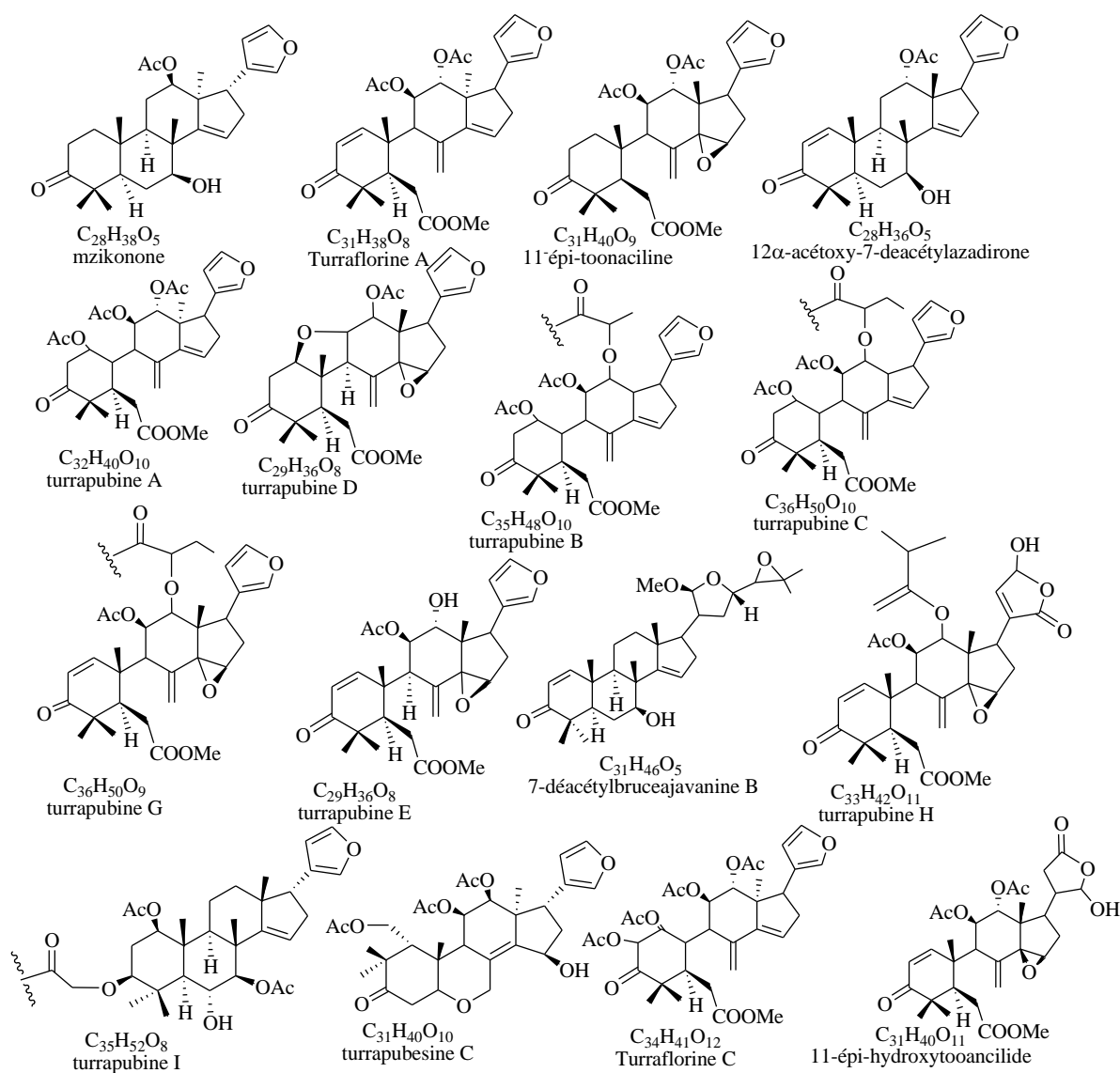


Figure 10 : Protolimonoides et Triterpénoïdes isolés des feuilles de *Turraea pubescens* (Wang *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008 ; Yuan *et al.*, 2013).

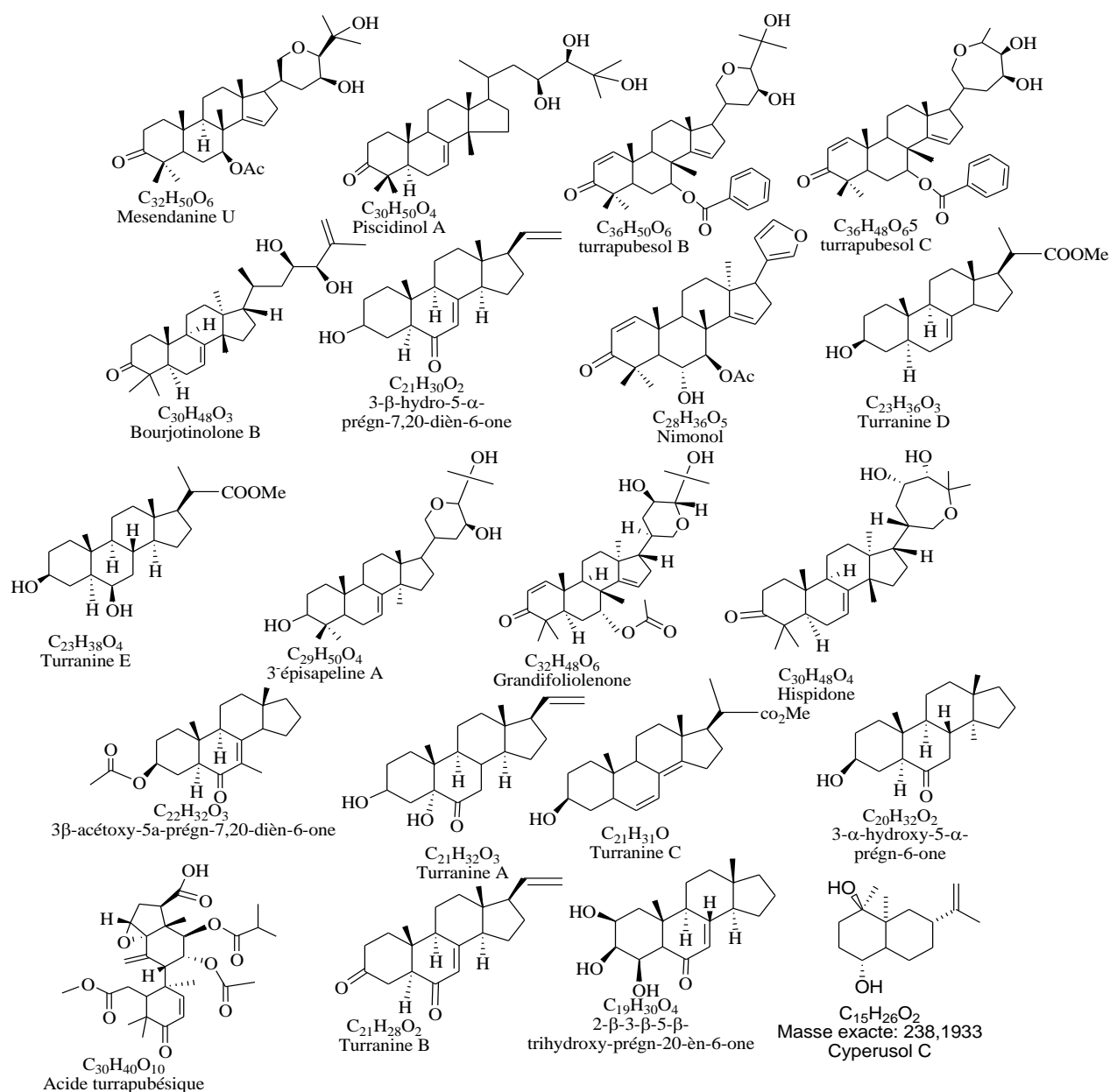


Figure 11 : Protolimonoides et Triterpénoïdes isolés des feuilles de *Turraea pubescens* (Wang *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2011 ; Yuan *et al.*, 2013)

Selon l'espèce, les limonoïdes peuvent être dominant soit dans les feuilles, les graines, les racines ou les écorces de tronc. *Turraea holstii* fait partie des espèces où les racines et les écorces de tronc sont très riches en limonoïdes. En effet, plusieurs molécules de cette famille ont été isolées de ces organes : 1α,3α-diacétylvilasine, 11-épi-tonaciline, 11β,12α-diacétoxycedrelone, 12-Ométhylnimboline, 12α-acétoxynéotrichilénone, 12α-acétoxy-7-acétyl-1,2-dihydroneotrichilénone, 12α-acétoxy-1,2-dihydroneotrichilénone, 11β-acétoxy-7-acétoxy-12α-hydroxy-1,2-dihydroneotrichilénone et puis des triterpénoïdes tels que

holstinone A , holstinone B et holstinone C (Mulholland *et al.*, 1998 ; Mulholland *et al.*,1999).

Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 12.

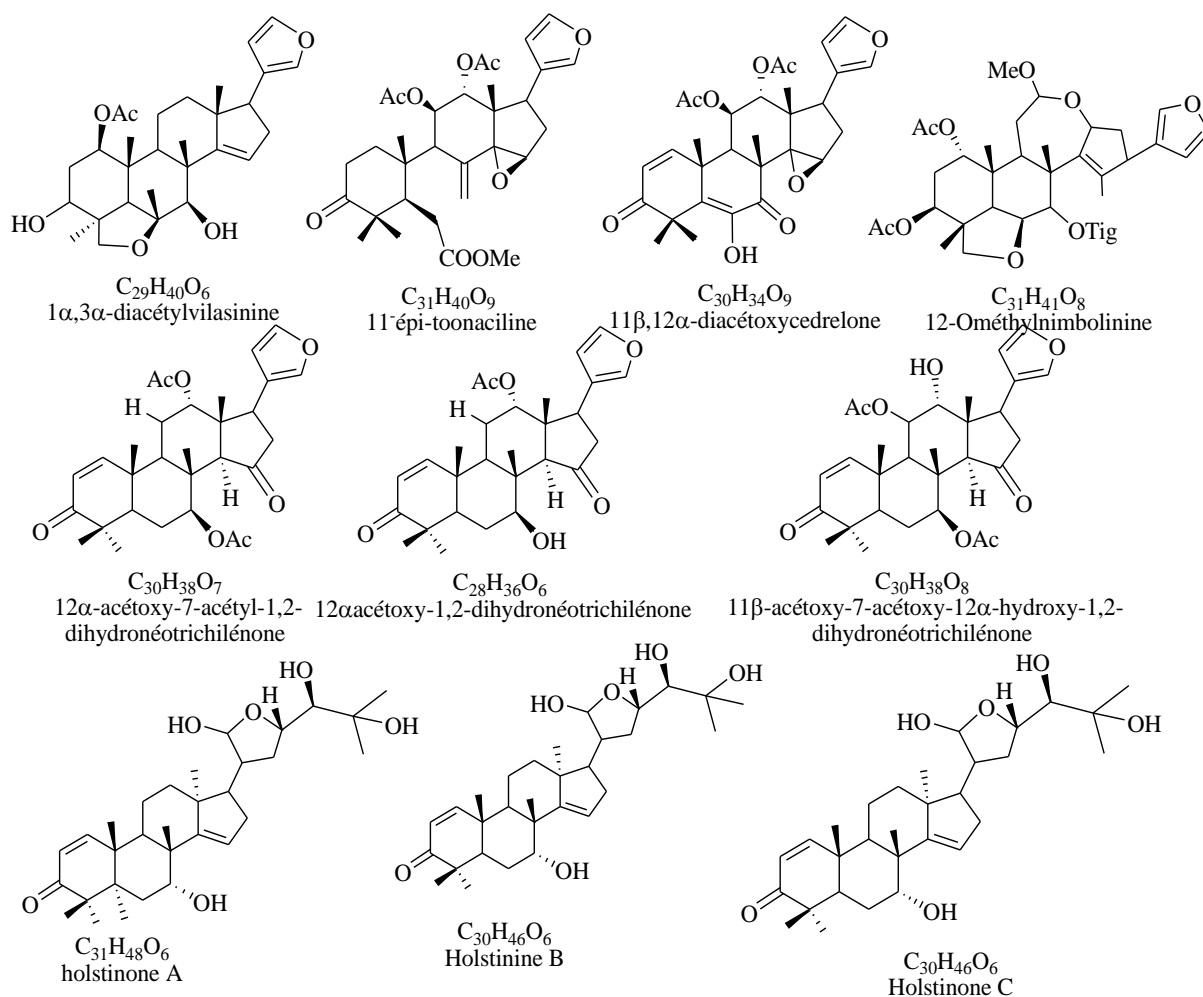


Figure 12 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des écorces de racine et de tige de *Turraea holstii* (Mulholland *et al.*, 1998 ; Mulholland *et al.*,1999)

Concernant *Turraea obtusifolia*, ce sont plutôt les graines qui sont riches en limonoïdes. De ces graines, Fraser *et al.* (1995) et Sarker *et al.* (1997) ont isolés prieurianine, rohitukine rubrine E et villostérol. Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 13.

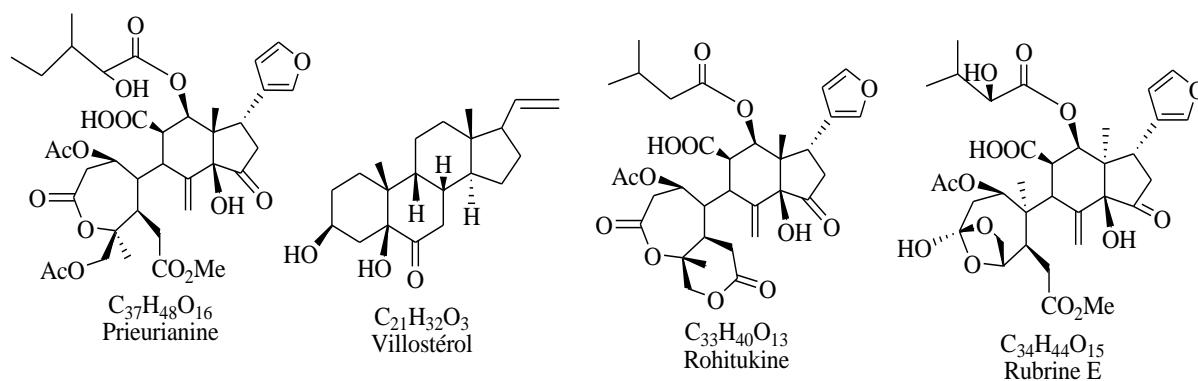


Figure 13 : Protolimonoides et Triterpénoïdes isolés des graines de *Turraea obtusifolia* (Fraser *et al.*, 1995 ; Sarker *et al.*, 1997 ; Mulholland *et al.*, 1998 ; Mulholland *et al.*, 1999)

Au niveau de *Turraea wakefieldii*, ce sont plutôt les écorces de racine qui ont permis d'isoler des limonoïdes et des triterpénoïdes : $11\beta,12\alpha$ -diacétoxy-époxyneotectleanine ; $11\beta,12\alpha$ -diacétoxyneotectleanine ; $7\alpha,12\alpha$ -diacétoxy- 11β -hydroxyneotectleanine ; $7\alpha,12\alpha$ -diacétoxy-epoxyhydroxyneotectleanine ; $11\beta,12\alpha$ -diacétoxy- $14\beta,15\beta$ -époxyneotectleanine, 1α -acétoxy- 3α -propanoyloxyvilasinine et $11\beta,12\alpha$ -diacétoxy-1-déoxo- $14\beta,15\beta$ -époxy- 3β -hydroxy-2-oxo-neotectleanine (Ndung'u *et al.*, 2003 ; Ndung'u *et al.*, 2004). C'est le même constat avec *Turraea mombassana* où on a isolé plusieurs limonoïdes tels que le 12α -acétoxy-7-décétylazadirone, le mombasol et le mombasone (Adul *et al.*, 1993 ; Owino *et al.*, 2008). Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 14.

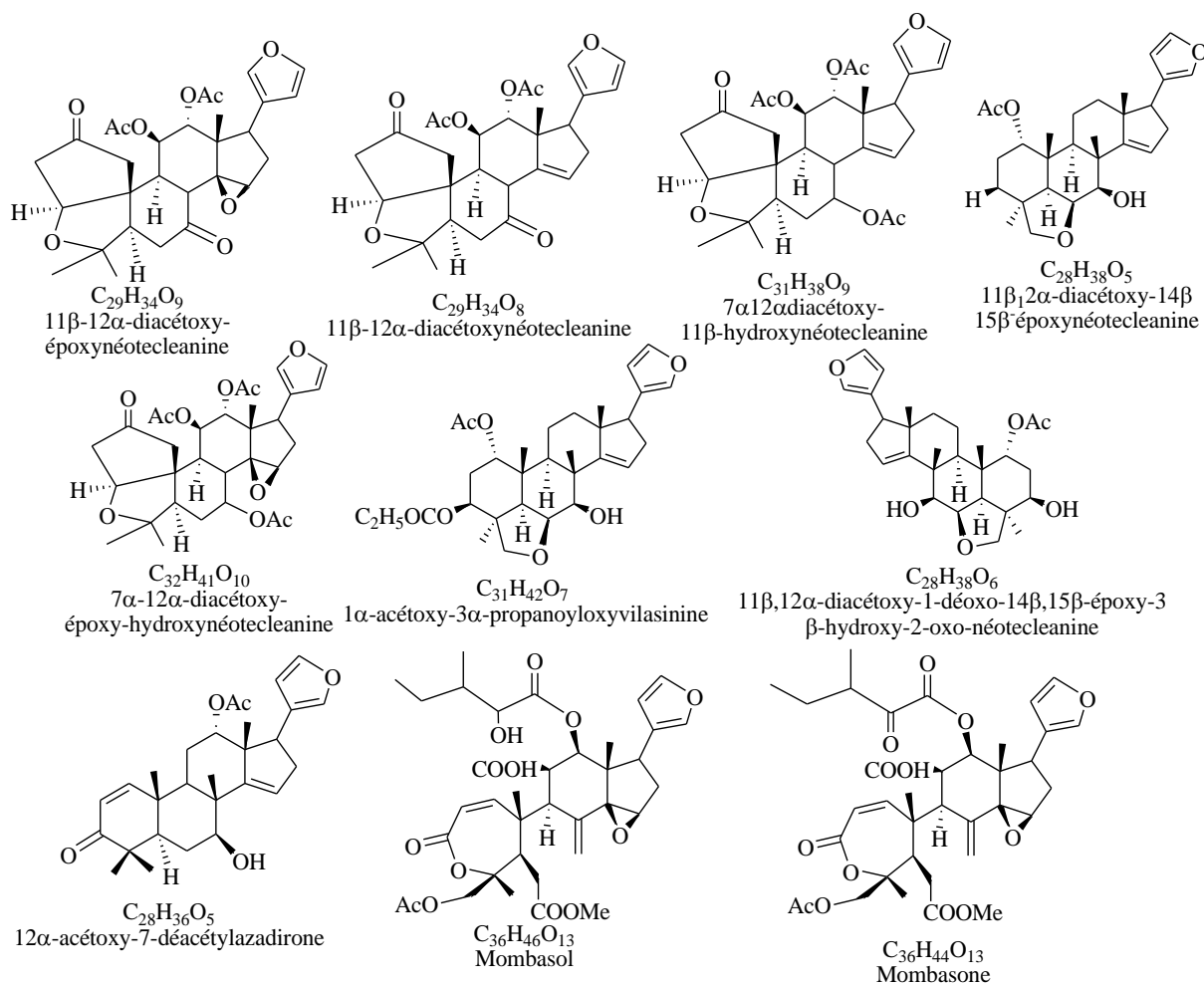


Figure 14 : Limonoïdes et triterpénoïdes isolés des écorces de racine de *Turraea wakefieldii* et de *Turraea mombassana* (Ndung'u *et al.*, 2004 ; Owino *et al.*, 2008)

D'autres stéroïdes qui ne sont pas du type limonoïdes, ont aussi été isolés de nombreuses espèces du genre *Turraea*. C'est le cas de l'acide turraoïque et de la turraénine, tous deux de structures nouvelles, isolées de *Turraea vogelii* (Rasamison *et al.*, 2014). Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 15.

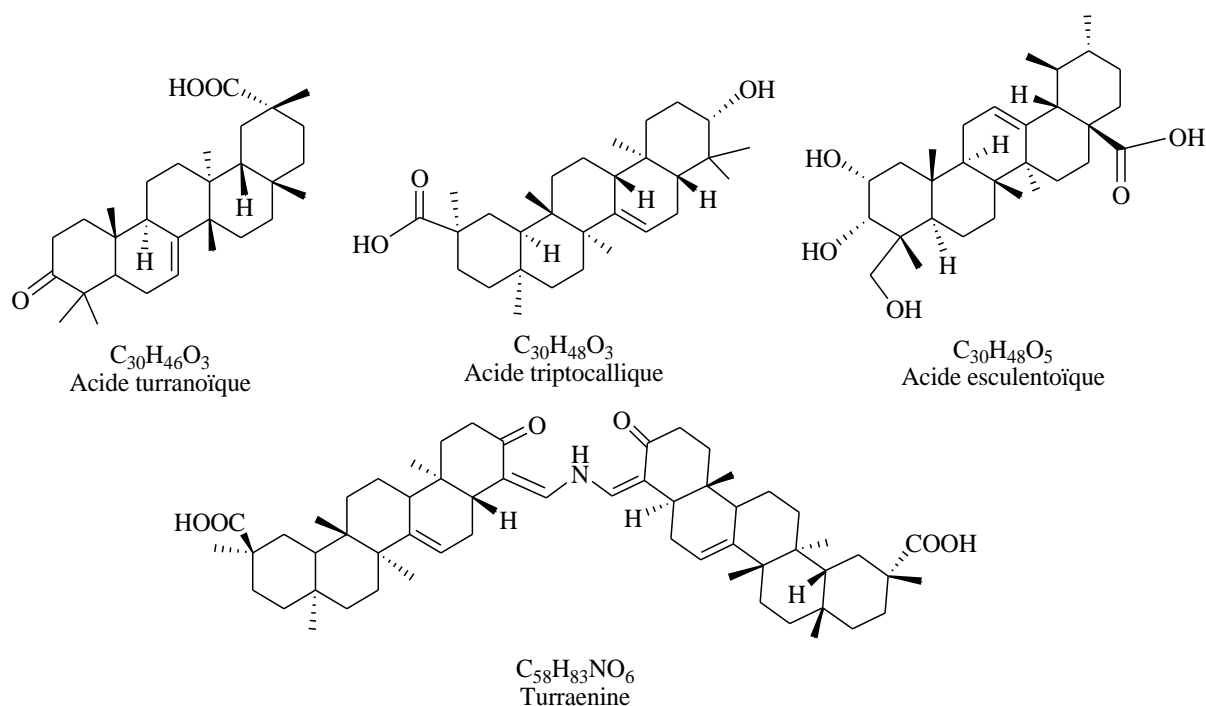


Figure 15 : Triterpenoïdes isolés des feuilles de *Turraea vogelii* (Rasamison *et al.*, 2014)

Les limonoïdes tels que : mzikonone, 12α -acétoxy-7-désacétylazadirone et 1α , 12α -diacétoxy-7-désacétyl-1,2-dihydro-3 α -hydroxyazadirone ont été isolés des écorces de racine de *Turraea cornucopia* (Owino *et al.*, 2008). Les structures de ces composés sont représentées dans la figure 16.

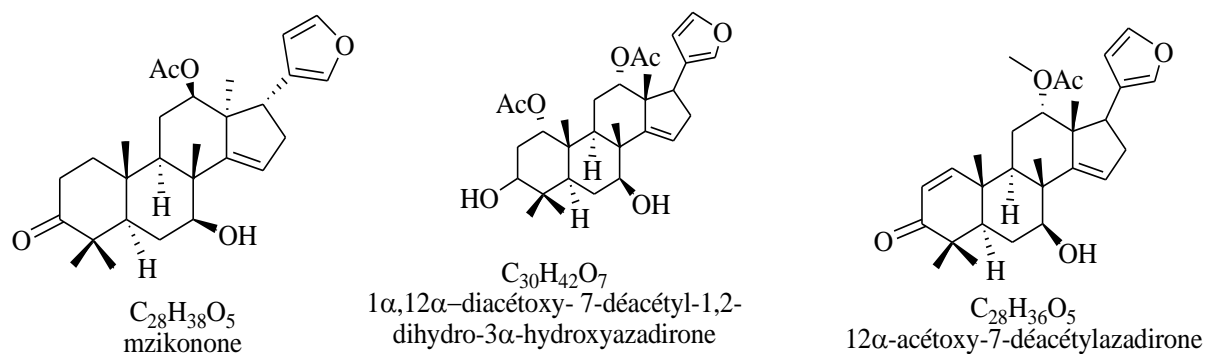


Figure 16 : Limonoïdes isolés des écorces de racine de *Turraea cornucopia* (Owino *et al.*, 2008)

I.1.3.7.2. Activités biologiques des *Turraea*

L'extrait méthanolique des écorces de racine de *Turraea robusta* a des activités antiplasmodiales avec une toxicité (DL_{50}) orale supérieure à 5000 mg / kg de poids corporel (Irungu *et al.*, 2007 ; Gathirwa *et al.*, 2008).

Les extraits méthanoliques de *Turraea nilotica* et de *Turraea robusta* (Gürke) ont été testés sur les souches de *Plasmodium falciparum* sensibles et résistantes à la chloroquine (Irungu *et al.*, 2007). L'extrait au chloroforme des feuilles de *Turraea vogelii* Hook f. a montré une activité cytotoxique sur les cellules de leucémie myéloïde chronique K-562 (CI₅₀=14,27 µg/mL). Tandis que les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et de méthanol de la tige de la plante ont inhibé la croissance de ces mêmes cellules K-562 avec CI₅₀ de 19,50 ; 24,10 et 85,40 µg / mL respectivement (Irungu *et al.*, 2015). Un extrait brut éthanolique des feuilles d'une espèce de *Turraea* de Madagascar a été sélectionné pour enquête car il a démontré une activité antiplasmodiale *in vitro* à 3,9 µg / mL contre la souche résistante à la chloroquine FC-M29 de *Plasmodium falciparum* lors d'un dépistage préliminaire. Des extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol de feuilles de *Turraea vogelii* ont montré des activités cytotoxiques sur le carcinome leucémique (K-562) avec CI₅₀ de 85,00 µg / mL et 85,22 µg / mL de CMI (Hamid *et al.*, 2015).

I.1.3.8. Présentation de l'espèce *Turraea heterophylla* (Smith)

Turraea heterophylla (Figure 17) est une espèce qui pousse dans les forêts tropicales et les savanes. En Côte d'Ivoire, on la retrouve dans les forêts de l'ouest, plus précisément dans la région de Daloa. Cette espèce est également retrouvée dans la région de savane (Bouaké et Korhogo). L'espèce est connue en Côte d'Ivoire sous diverses appellations selon les langues régionales : Kplélé (Baoulé), Nonéme bouki (Bété), N'zan flélèm (Senoufo), Yôho n'drou (Guéré), Loman so (Gagou).



Figure 17 : Photographie de *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae), Source : Kouadio (2022)

I.1.3.8.1. Description botanique

Classification APG III (Arbonnier, 2009)

Règne :	Plantae
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Santalales
Famille :	Meliaceae
Genre :	<i>Turraea</i>
Espèce :	<i>heterophylla</i>

Turraea heterophylla appartient à la famille des Meliaceae. Elle comprend environ 53 genres et 600 espèces d'arbres et d'arbustes, originaires des régions tropicales (ATIBT, 2016). La plupart des membres de la famille ont de grandes feuilles composées, avec des folioles disposées en forme de plume et des grappes de fleurs ramifiées. *Turraea heterophylla* est un arbuste bas glabre en forêt et en savane pouvant atteindre 1,2 m. Les nervures latérales courbées, atteignent la marge de la feuille. Les fleurs très nombreuses, petites, blanchâtres sont des panicules groupées aux extrémités des rameaux sans épines. Les étamines sont trois à quatre fois plus nombreuses que les pétales. Les fruits arrondis, deviennent rouges lorsqu'ils sont matures. Le fruit est charnu et coloré avec une capsule coriace (Bouquet & Debray, 1974).

I.1.3.8.2. Utilisations traditionnelles de *Turraea heterophylla*

Turraea heterophylla, est très utilisée traditionnellement en thérapie depuis de nombreuses années. Cette plante est utilisée pour soigner diverses maladies. En effet, en Côte d'Ivoire, la décoction de la pulpe racinaire de cette plante est prise en lavement pour lutter contre la trypanosomiase (Bouquet & Debray, 1974) et comme aphrodisiaque (Boua *et al.*, 2013). Selon Cek *et al.* (2007), cet aphrodisiaque améliore le comportement sexuel en stimulant la production de la testostérone, ce qui rehausse la libido chez l'homme. En outre, l'extrait des écorces de racine est pris comme tonifiant contre les troubles gastriques. Le jus de la pulpe de l'écorce est utilisé comme gouttes nasales pour les yeux et la pulpe des feuilles est utilisée comme une lotion pour la peau. Le jus des feuilles est aussi pris comme gouttes nasales pour les yeux (N'guessan *et al.*, 2009a). En médecine traditionnelle, certains organes de la plante telles que les feuilles, les écorces, les racines sont utilisées dans le traitement d'affections courantes comme la fièvre typhoïde, les diarrhées, le paludisme, la bronchite et l'hypofertilité (N'guessan *et al.*, 2009b). De même, une décoction de pointes de feuilles est utilisée comme boisson ou pour les bains de fièvre par les Anyis (Côte d'Ivoire) (N'guessan *et al.*, 2009b). Les travaux menés par Tra Bi (1997) et Opa (2003) ont montré que *Turraea heterophylla* est utilisée sous forme de cure-dents par les guérisseurs pour soigner l'infection sexuelle (I.S). En Afrique, le décocté des racines est utilisé en application sur la peau pour la fièvre (Bouquet & Debray, 1974). En plus, les feuilles sont considérées comme une valeur médicinale considérable et aussi utilisées pour les goûts amers mis dans les rhums pour traiter l'impuissance sexuel (Irvine, 1961).

Par ailleurs, des travaux menés par Singh *et al.* (2012), ont attesté son effet aphrodisiaque en association avec la tige, les écorces de racine et les graines.

I.1.3.8.3. Travaux antérieurs sur *Turraea heterophylla*

I.1.3.8.3.1. Etudes phytochimiques antérieurs sur *Turraea heterophylla*

Dans la littérature, les travaux réalisés sur *Turraea heterophylla* par Boua *et al.* (2013) en Côte d'Ivoire et Akrofi (2011) au Ghana font mention de la composition chimique. En effet, par des tests de caractérisations des CCM avec des révélateurs appropriés sur l'extrait méthanolique de *T. heterophylla*, Boua *et al.* (2013) ont identifié les stérols, les terpènes, les alcaloïdes, les coumarines, les sucres réducteurs, les polyphénols, les saponosides stéroïdes et les protéines. Quant aux travaux d'Akrofi (2011) sur les extraits méthanolique et dichlorométhanique des écorces de racine, ils indiquent que l'espèce renferme des tanins, des saponines, des terpènes, des stéroïdes et environ huit limonoïdes différents. En plus, plusieurs molécules y ont été isolées et identifiées dont les limonoïdes nommés le rohituka-7, l'obacunone et un diterpénoïde nommé margocinine (Figure 18)

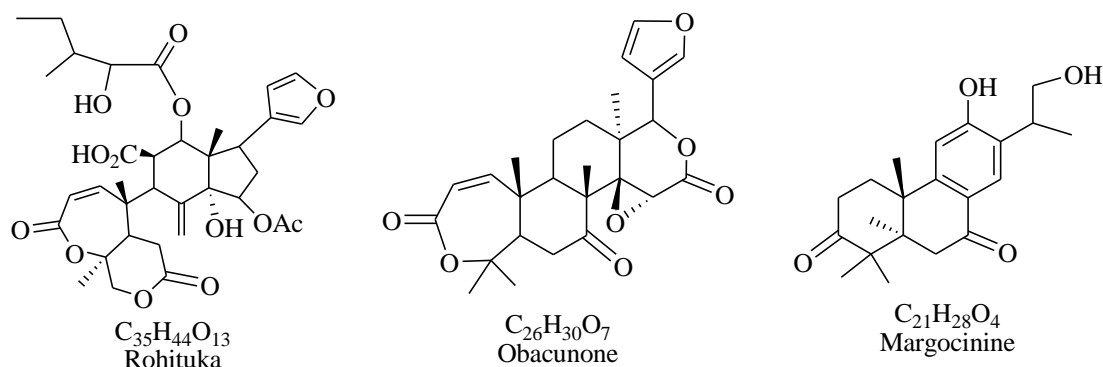


Figure 18 : Structures de quelques composés isolés des écorces de racine de *Turraea heterophylla* (Akrofi, 2011)

I.1.3.8.3.2. Activités biologiques de *Turraea heterophylla*

L'incorporation des extraits végétaux de *T. heterophylla* dans l'alimentation du tilapia *O. niloticus* améliore nettement les performances de croissance des alevins comparée à l'aliment commercial simple couramment utilisé en pisciculture (Kophy *et al.*, 2018). Des extraits méthanolique et dichlorométhanique des écorces de racine de *T. heterophylla* ont montré une activité antimicrobienne contre des bactéries Gram positifs et négatifs, notamment, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* en enregistrant respectivement une zone d'inhibition (18 mm ; 10 mm et 12 mm) à la concentration de 5

mg/mL (Akrofi, 2011). Des tests biologiques indiquent que *T. heterophylla* a non seulement des propriétés érectiles mais également manifeste des effets secondaires négligeables sur la pression artérielle (Boua *et al.*, 2013).

I.2. METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES

I.2.1. Définition

Les métabolites secondaires sont des composés phytochimiques non directement impliqués dans les processus vitaux de bases (croissance, la division cellulaire, la respiration, la photosynthèse, reproduction). En effet, les métabolites secondaires (phytophénols) sont synthétisés dans les espèces végétales en partie en réponse aux pressions écologiques et physiologiques telles que les attaques d'agents pathogènes et d'insectes, les rayons UV et les blessures (Lincoln & Eduardo, 2006). Contrairement aux métabolites secondaires, les métabolites primaires sont de type de métabolites qui sont directement impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ces composés ont généralement une fonction physiologique dans l'organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque.

I.2.2. Quelques composés phénoliques des plantes

Les composés phénoliques sont des molécules aromatiques constituées d'un groupement benzène (C₆) et au moins d'un hydroxyle (-OH) qui facilitent les substitutions électrophiles. Il existe environ 4500 composés. Ces composés sont typiques des plantes vasculaires et ont colonisé l'environnement aérien. Les composés phénoliques comme la lignine font partir des fibres alimentaires qui ont un rôle bénéfique dans le transit intestinal et stimulent la flore bactérienne (Michael, 2015). La lignine est accumulée dans les structures de conduction de la plante, ce qui lui confère sa rigidité et une croissance indéfinie. Les polyphénols ont aussi des propriétés biologiques très marquées ; antioxydantes, anticancéreuses, anti-inflammatoires, antibactériennes et vasodilatatrices (Kéita, 2002). Ils sont fortement répandus dans le règne végétal. On les rencontre dans les racines, les écorces, les feuilles et les fruits (Pincemail *et al.*, 2002 ; Fleuriet *et al.*, 2005). On peut nommer quelques composés phénoliques tels que : les acides phénoliques, les tanins, les quinones, les flavonoïdes et les coumarines.

I.2.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés non flavoniques et ils sont présents dans les plantes sous forme combinée. Ils dérivent de l'acide benzoïque et existent sous forme d'ester ou de glucoside. Les plus fréquents sont les acides hydroxy benzoïques et les hydroxy cinnamiques (Muanda *et al.*, 2010) (Figure 19).

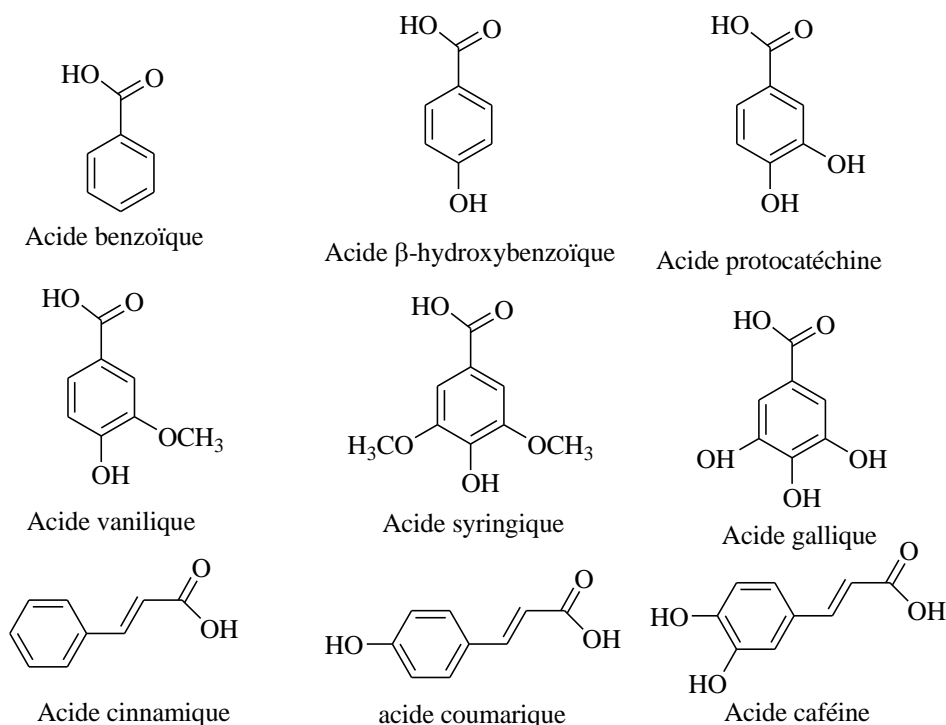


Figure 19 : Structures des acides hydroxy benzoïques et hydroxy cinnamiques

I.2.2.2. Tanins

On distingue deux types de tanins : les tanins hydrolysables (gallotanins et ellagitanins) et les tanins condensés (procyanidines).

- Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique ou d'acide ellargique et de glucose. Ils sont présents dans l'écorce, les feuilles et stockés dans des vacuoles. Certains mammifères comme les moutons et les antilopes sont sensibles aux tanins (Okuda & Ito, 2011). En effet, ils ont un pouvoir d'astringence, ils agglomèrent les glycoprotéines de la salive qui lubrifient la langue grâce à leurs nombreux groupements hydroxyles qui provoquent le dessèchement de la bouche.

- Les tanins condensés ont des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti inflammatoires (Okamura *et al.*, 1993). Leur aptitude à piéger les radicaux libres pourrait

réduire le risque de maladies cardio-vasculaires et de cancers. La figure 20 donne les structures de quelques tanins.

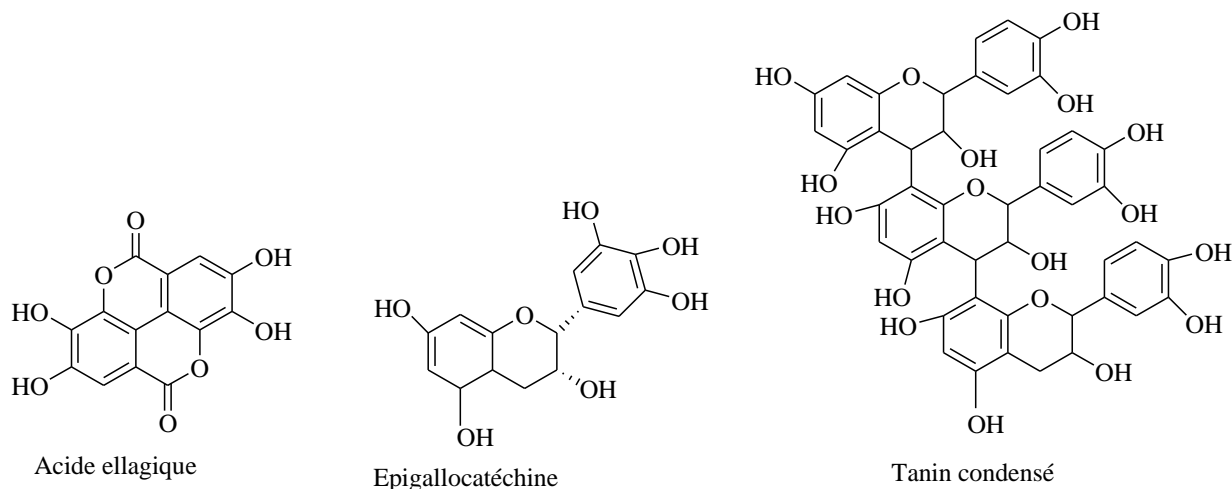


Figure 20 : Structures de quelques tanins

I.2.2.3. Quinones et dérivés anthracéniques

Les quinones sont des substances oxygénées issues de l'oxydation des dérivés aromatiques et caractérisées par le motif 1,4-dicéto-cyclohexa-3,5-diéniq. Les quinones naturelles sont des benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones (Figure 21). Les benzoquinones sont des composés anti-appétants, anti-microbiens, insecticides et nématocides et sont souvent les principes actifs des Myrsinaceae qui présentent ce type d'activités. L'embéline (benzoquinone) possède des propriétés anthelminthiques (Ogweno *et al.*, 2002), et contraceptives (Krishnaswamy & Purushothaman, 1980; Seth *et al.*, 1982). Cette molécule a, outre ses propriétés contraceptives, des propriétés analgésique, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anti-tumorale et anti-bactérienne (Chitra *et al.*, 2003). Les dérivés anthracéniques sont des hétérosides ayant en commun un noyau anthracénique de base (Figure 21) (Paris & Haisbielle, 1981). Les dérivés anthracéniques libres appartiennent au groupe des quinones et ont une action purgative et laxative sur le gros intestin en provoquant non seulement les contractions des parois intestinales mais en stimulant également les évacuations fécales environ 10h après leur ingurgitation. Ils rendent les selles plus fluides, facilitant ainsi le transit intestinal (Bruneton, 1999).

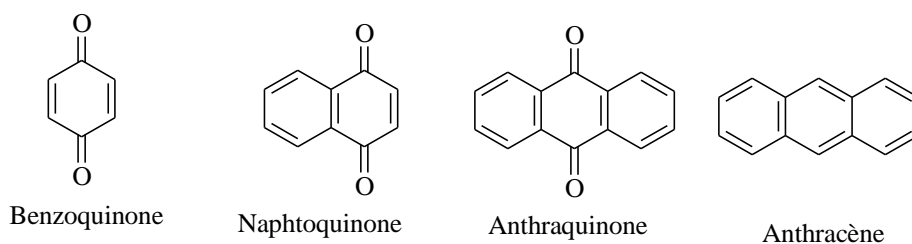


Figure 21 : Structures de quelques quinones et dérivés anthracéniques

I.2.2.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments des végétaux, qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bors *et al.*, 1998). Le groupe de composés est défini par une structure en C₁₅, caractérisés par un enchaînement de deux noyaux aromatiques A et B liés par une unité de trois carbones C₃ : Ar(A)- C₃- Ar(B) (Figure 22).

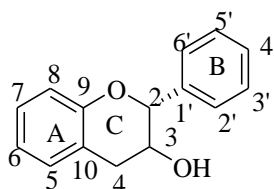


Figure 22 : Structure de la Flavan-3-ol

Les différentes classes sont déterminées par le degré d'oxydation de l'unité de liaison, tandis que les composés de la même classe sont déterminés par le pont d'hydroxylation ou d'autres substitutions du noyau A ou B. On distingue les flavonoïdes au sens strict du terme (Flavones, Flavonols, Flavanones, Flavanols, Flavanes, Flavan-3-ol, Chalcones, Aurones) et les isoflavonoïdes (isoflavones, isoflavanes, isoflavonols, 3-arylcoumarines) (Harbone, 1998). Les flavonoïdes sont hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4' et 7' et sont souvent glycosylés. On attribue aux flavonoïdes des propriétés variées : antioxydantes, antiallergiques, anti-spasmodiques, antibactériennes, hépato-protectrices, cancéro-protectrices et oestrogéniques (Cowan, 1999 ; Didry *et al.*, 1982 ; Li & Jiang, 2007). Les flavonoïdes ont également d'autres fonctions. Ils ont un effet attracteur sur les pollinisateurs et protègent également les plantes des rayons ultraviolet.

I.2.2.5. Coumarines

Les coumarines sont le point de départ de famille de composés qui se forment par une ou des substitutions sur le cycle aromatique. Le squelette de base des coumarines est

constitué de deux cycles accolés de types C₆-C₃. Ce sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer en première approximation comme étant des lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques. Elles constituent une classe importante de composés naturels. Leur structure se trouve dans environ 150 espèces, appartenant à 30 familles de plantes différentes. Elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché (Deiana *et al.*, 2003 ; Booth *et al.*, 2004).

Les coumarines possèdent des propriétés biologiques très diverses (antifongique, antimicrobienne, anti-tumorale, anti-agrégation plaquettaire, inhibitrice de plusieurs enzymes, anti-virale, anti-inflammatoire, anti-coagulante, diurétique et analgésique), lesquelles varient selon la substitution sur le cycle benzopyrane (Reddy *et al.*, 2005). Les coumarines sont utilisées dans la composition de nombreux parfums et pour aromatiser des alcools par exemple le Zubrowka. Les structures chimiques de quelques coumarines sont représentées dans la figure (Figure 23).

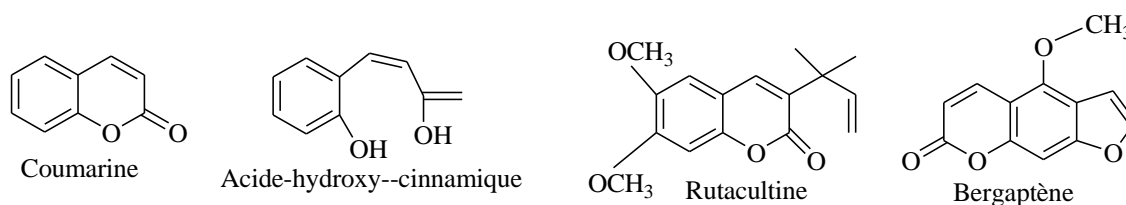


Figure 23 : Structures de quelques coumarines

I.2.3. Quelques composés terpéniques des plantes

Les terpènes sont des molécules à 5 atomes de carbone, connu sous le nom d'isoprène, et dont le précurseur est l'isopentényldiphosphate (IPP). Ce sont 20 lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA, ils sont donc des molécules hydrophobes. Il existe 20 000 molécules connues avec comme motif commun cette base isoprène. Les composés terpéniques sont stockés dans les vacuoles au niveau des écorces, des épines, des racines ou encore des feuilles (Kéita, 2002 ; Christianson, 2008) ; on en retrouve également dans le latex. Les terpènes sont pour la plupart des anti-herbivores. Ils ont des effets différents selon la plante, et peuvent provoquer des convulsions, des allergies de la peau. Ils ont un goût amer et peuvent également inhiber les micro symbioses de l'appareil digestif (Bruneton, 1999). En effet, les terpénoïdes et les stéroïdes, dérivés des terpènes sont issus des mêmes précurseurs, et formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées. Les terpénoïdes et les stéroïdes constituent la plus large classe de composés secondaires. Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques des végétaux puisque le squalène, le cholestérol ou encore des sesquiterpènes, des diterpènes, des triterpènes et tétraterpènes se

rencontrent chez les animaux. Ces hormones proches de la testostérone sont présentes chez l'homme, chez les animaux ou les végétaux. Les stéroïdes comprennent le cholestérol, les hormones sexuelles, les glucocorticoïdes et l'aldostérone. Ils stimulent la moelle osseuse. Pendant des décennies, les stéroïdes ont été le pilier de la thérapie des anémies hypoplasiques comme celles dues à certaines leucémies ou à l'insuffisante rénale (Basaria *et al.*, 2001).

Ces stéroïdes ont été largement remplacés dans ce cadre par des hormones protidiques synthétiques qui stimulent la croissance sélective des précurseurs des cellules sanguines. Ces hormones sont utilisées pour traiter le retard de croissance des enfants (Ranke. & Bierich, 1986).

En pratique, les hormones stéroïdiques de synthèse sont utilisés pour plusieurs fins :

- stimulation de l'appétit : préservation et augmentation de la masse musculaire ; des stéroïdes ont été donnés à des personnes souffrant de dénutrition chronique dans des situations telles que le cancer et le sida (Grunfeld *et al.*, 2006).

- induction de la puberté masculine : les androgènes sont donnés à des adolescents de sexe masculin ayant un retard très important de puberté. La testostérone est maintenant presque le seul androgène utilisé à cette fin et on a montré qu'elle permettait d'augmenter la taille et le poids sans apport de matières grasses excessives chez les garçons ayant un retard pubertaire (Arslanian. & Suprasongsin, 1997).

- substitution hormonale : pour les hommes avec de faibles niveaux de testostérone et amélioration de la libido chez les personnes âgées de sexe masculin (Nieschlag *et al.*, 1999 ; Shah *et al.*, 2007 ; Yassin & Saad, 2007).

- adaptation du morphotype : au souhait du patient pour permettre à des individus ressentant une dysphorie du genre, et qui souhaitent une apparence plus masculine (modification de la voix, croissance du volume des os et de la masse musculaire, pilosité masculine, augmentation des niveaux de globules rouges dans le sang et augmentation du volume du clitoris) (Moore *et al.*, 2003).

Quant aux phytostérols, ils ont une structure semblable à celle due au cholestérol. Contrairement au cholestérol qui se retrouve uniquement dans les produits d'origine animale, les phytostérols se retrouvent, pour leur part, en quantité variable dans tous les aliments d'origine végétale. Selon Shaghaghi *et al.* (2013) et Abumweis *et al.* (2014), la consommation de phytostérols serait bénéfique pour la santé du cœur en ce sens qu'ils réduisent la concentration de cholestérol total dans le sang sans diminuer le HDL (le bon cholestérol).

Les terpènes contenus dans le latex sont utiles à la plante pour lutter contre les prédateurs. Les terpènes sont également utiles au développement de la plante :

- les brassinostéroïdes étant une classe de polyhydroxystéroïdes, sont reconnue comme la sixième classe d'hormones végétales. Ces hormones stimulent la croissance des feuilles, puis protègent les plantes subissant un stress froid ou la sécheresse (Bajguz, 2007).

- les gibbérellines (diterpènes) sont des hormones végétales de croissance impliquées dans beaucoup de réponses de la plante, elles provoquent aussi un allongement de la tige et favorisent la floraison (Grennan, 2006).

- les caroténoïdes, quant à eux, sont impliqués dans la photosynthèse et donnent l'aspect coloré des végétaux (carotte, tomate), mais sont aussi précurseurs d'hormones végétales (Phan-Thi & Waché, 2014).

Comme des flavonoïdes, les terpènes figurent parmi les composants utilisés par les consommateurs. Pourtant, celles-ci représentent 10 à 30 % des substances absorbées par l'organisme à chaque repas. Les terpènes sont des constituants majoritaires des huiles extraites des végétaux. Elles permettent à la plante de se défendre contre les espèces nuisibles, d'assurer certaines réactions essentielles à son développement et d'attirer les insectes pollinisateurs (Allard *et al.*, 2017). Les huiles essentielles ont une fonction de défense contre les herbivores et les insectes (Margareta, 2017). Les constituants des huiles essentielles, terpènes ou terpénoïdes, ont la particularité de dégager de fortes odeurs. Ils sont utilisés comme antiseptiques et dans certains domaines comme la cosmétique. Les terpènes peuvent également être classés selon leur nombre d'unités (Figure 24).

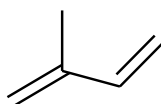


Figure 24 : Structure chimique de l'isoprène

On peut citer par exemples :

- les hémiterpènes composées d'une unité isoprène (C_5) : C_5H_8
- les monoterpènes composés de deux unités isoprène (C_{10}) : $2 (C_5H_8)$

Les monoterpènes sont des composés de 2 unités isoprène atomes de carbones, volatils et biologiquement actifs. Certains sont de structures linéaires et d'autres cycliques (monocycles et bicycles) (Figure 25).

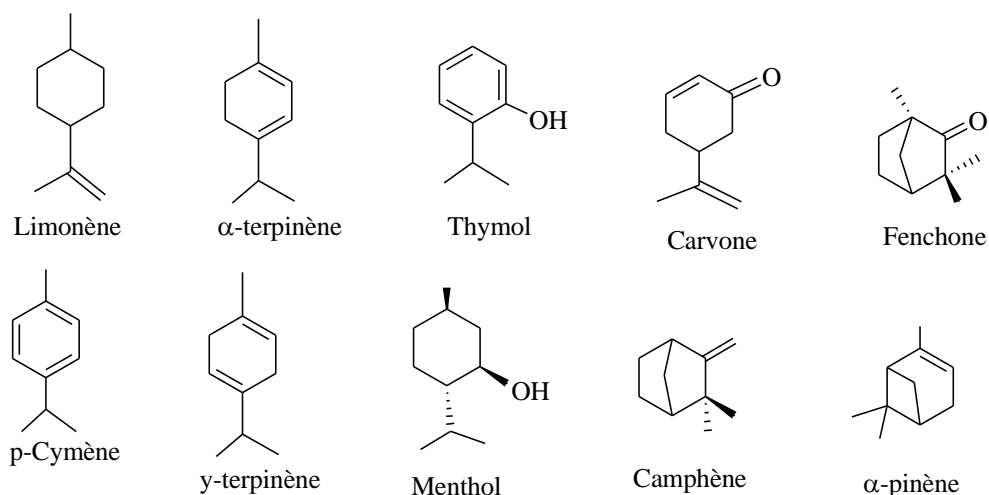


Figure 25 : Structures de quelques monoterpènes

- les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) sont des composés à 3 unités d'isoprène

On distingue les sesquiterpènes linéaires et les sesquiterpènes cycliques (monocycliques et polycycliques) (Figure 26).

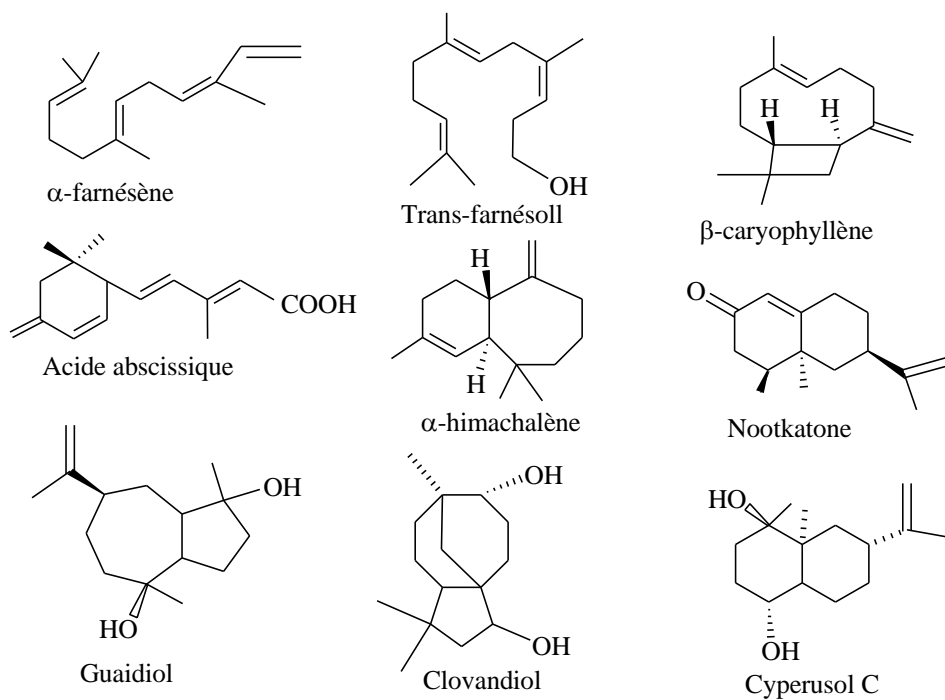


Figure 26 : Structures de quelques sesquiterpènes

- les diterpènes ($C_{20}H_{32}$) sont des composés de quatre unités isoprènes. Ces diterpènes sont des composés à 20 atomes de carbones et peuvent être aliphatiques ou cycliques (Figure 27).

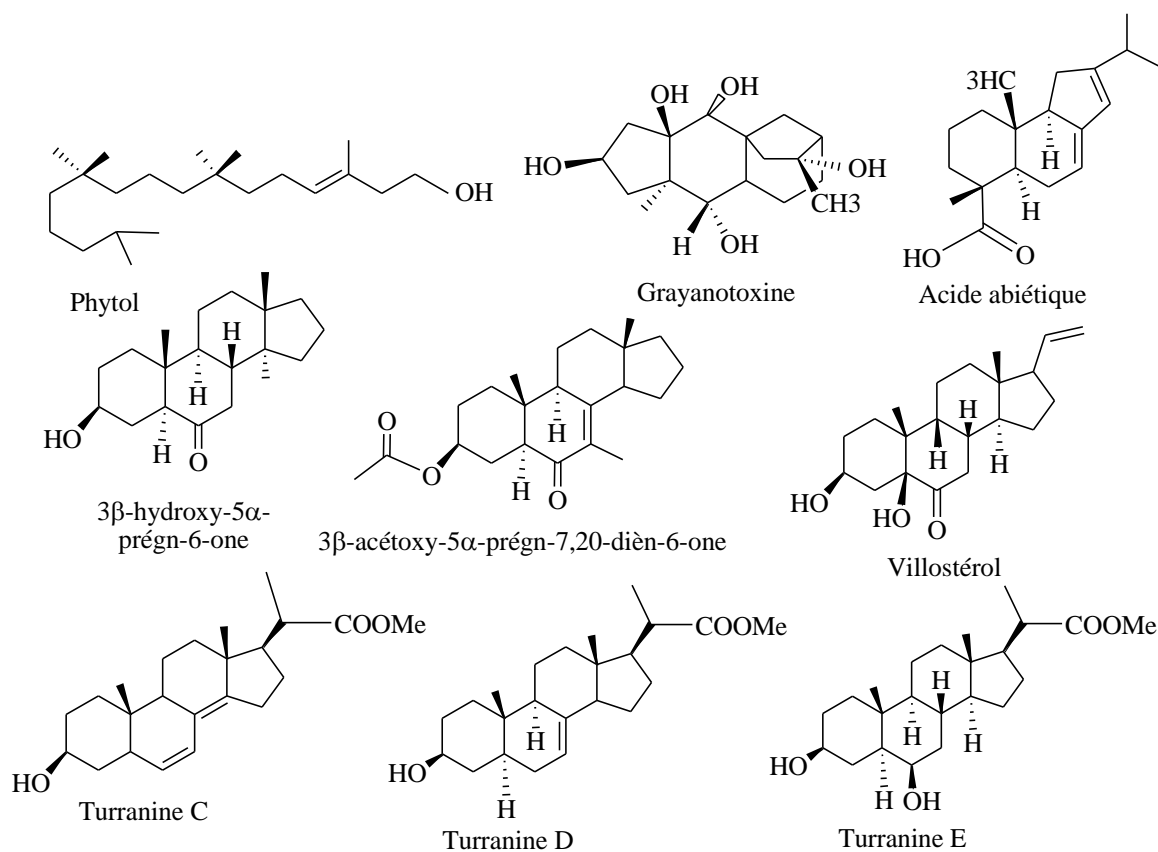


Figure 27 : Structures de quelques diterpènes

- les sesterpènes ($C_{25}H_{40}$) sont des composés à 5 unités d'isoprène, construits à partir de 5 unités d'isoprène (C_5) (Figure 28). Ils sont isolés des plantes, des champignons, des insectes.

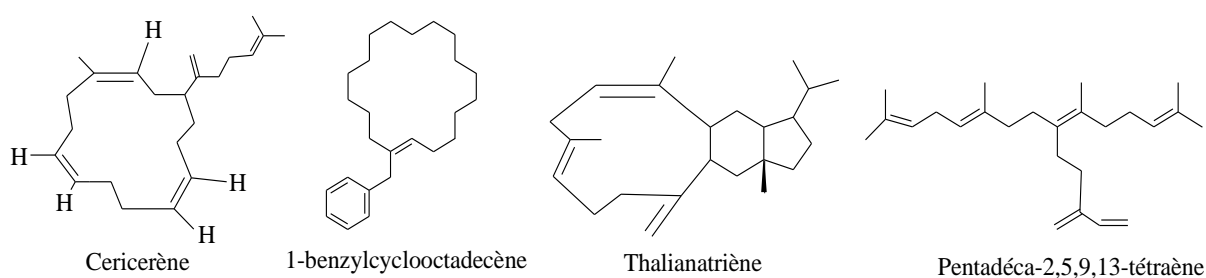


Figure 28 : Structures de quelques sesterpènes

- les triterpènes ($C_{30}H_{48}$) sont des substances d'origine organique à 30 atomes de carbone (Figure 29). Ils sont très répandus dans la nature. On les trouve notamment dans les résines, à l'état libre (phytostérols), sous forme estérifiée ou hétérosidique (saponosides).

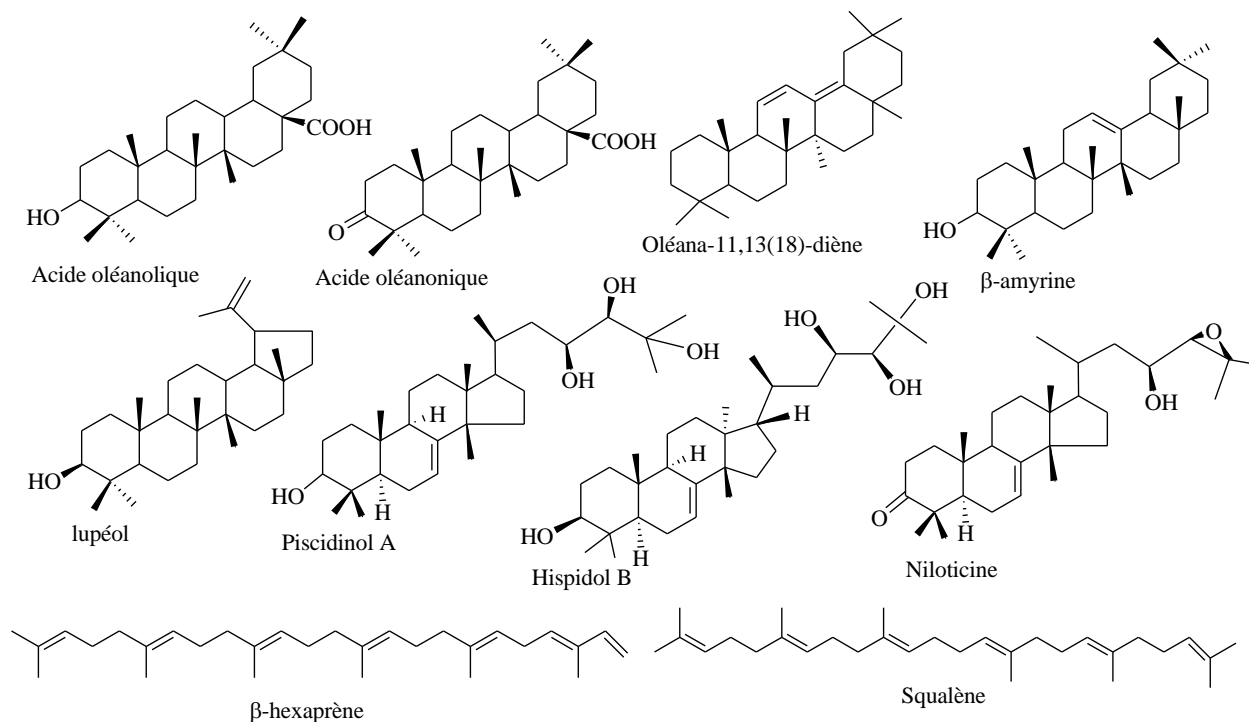


Figure 29 : Structures de quelques triterpènes

- les tétraterpènes ($C_{40}H_{64}$) sont composés de huit unités isoprène

On retrouve dans cette famille, les caroténoïdes dont un pigment photosynthétique majeur est le β -carotène (Carotte) mais également des pigments aux propriétés antioxydantes comme le lycopène (Tomate) (Figure 30). Ces pigments sont des antioxydants liposolubles que l'on retrouve dans les légumes comme la carotte, le brocoli, la tomate et la citrouille (Kéita, 2002 ; Pincemail *et al.*, 2002).

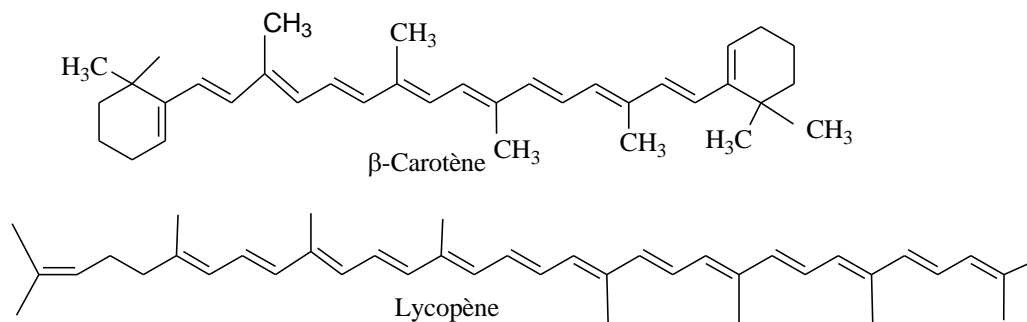


Figure 30 : Structures du β -carotène et du Lycopène

I.2.4. Quelques limonoïdes des plantes

Les limonoïdes sont une classe de triterpénoïdes, hautement oxygénés, ayant un squelette formé de perhydrocyclopentanophénanthrène ou sterane. Les principaux limonoïdes que renferment les agrumes sont la limonine et la nomiline (Manners *et al.*, 2003). Au cours des dernières années, des études pharmacologiques ont indiqué leurs effets bénéfiques : antioxydantes, anticancéreuses, antipaludiques, antimicrobiennes, cardioprotectrices, aphrodisiaques, insecticides, immuno- stimulantes (Krief *et al.*, 2004 ; Yu *et al.*, 2009). Poulouse *et al.* (2005) ont montré que certains limonoïdes des agrumes ont des propriétés anti-cancéreuses *in vitro* sur des modèles animaux. Ils diminueraient la prolifération de cellules cancéreuses du sein, de l'estomac, du poumon, de la bouche et du côlon (Miller & Porter, 2004). De plus, ils inhibent la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et ils induisent les enzymes de phase II (Tian & Miller, 2001 ; Perez *et al.*, 2010). Par exemple, l'obacunone a montré son efficacité dans la diminution de l'incidence des tumeurs du côlon et de la bouche. Les limonoïdes en synergie avec les flavonoïdes réduiraient l'hypercholestérolémie (Kurowska & Banh, 2000). Les Trichirubines A et B extraits de *Trichilia rubescens* possèdent une activité antipaludique significative contre *Plasmodium falciparum* (Krief *et al.*, 2004). Par ailleurs, des études épidémiologiques ont démontré qu'un apport régulier en limonoïdes et flavonoïdes provenant d'agrumes est associé à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires. Ces métabolites contribueraient à améliorer la vasodilatation coronarienne, à diminuer l'agrégation des plaquettes sanguines et à prévenir l'oxydation du mauvais cholestérol (LDL) (Yu *et al.*, 2020). Les limonoïdes, par les propriétés antioxydantes peuvent ralentir la prolifération des lignées de cellules cancéreuses et diminuer la croissance des métastases (Chow *et al.*, 2011). Par leur aptitude à diminuer le cholestérol sanguin, les limonoïdes contribuent à réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires. Ces propriétés pourraient servir à l'élaboration de thérapies anti tumorales (Yu *et al.*, 2020). Il a été démontré que les limonoïdes obtenus à partir d'agrumes exercent des effets inhibiteurs sur la prolifération du carcinome colorectal, hépatocellulaire, gastrique, pancréatique, mammaire ou prostatique, l'oophorome, le mélanome, le neuroblastome et le carcinome épidermoïde de la poche des joues (Kim *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2014 ; Gualdani *et al.*, 2016). La figure 31 représente la structure de quelques limonoïdes.

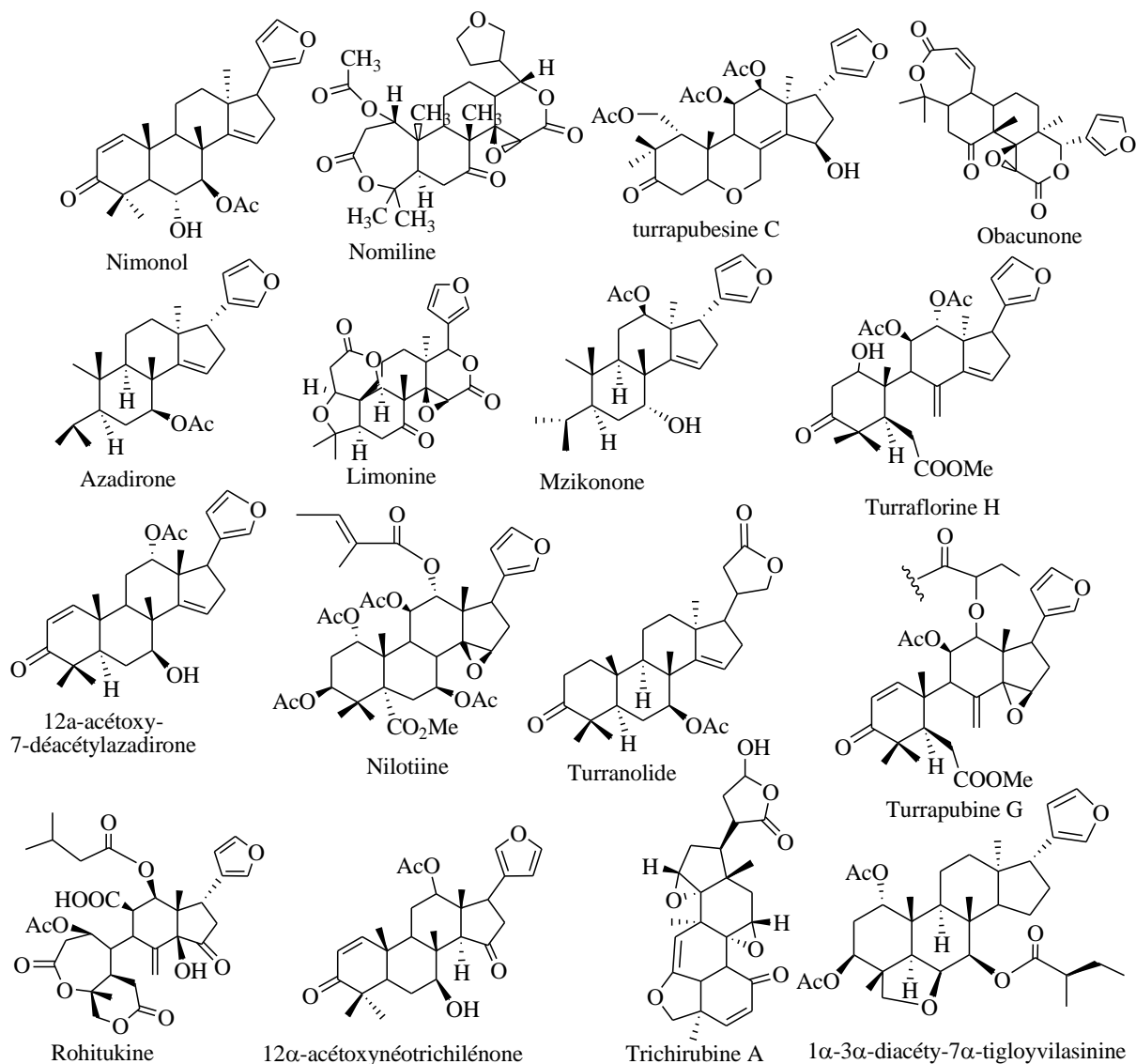


Figure 31 : Structures de quelques limonoïdes (Manners *et al.*, 2003 ; Krief *et al.*, 2004)

I.3. QUELQUES TECHNIQUES DE DETERMINATION STRUCTURALE

I.3.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Son principe est basé sur la séparation et la détermination de la masse d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision (Menet, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012). Le spectromètre de masse ionise l'échantillon en un faisceau d'ions (phase vapeur.). Les ions obtenus sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (valeurs m/e ou m/z). Les ions ainsi produits émettent des signaux qui sont enregistrés sous la forme de raies en fonction de leur abondance relative (Yadav *et al.*, 2016).

Le graphique représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z est appelé spectre de masse. Dans le cas de méthodes d'ionisation dites « douces », l'ion moléculaire ou pseudo moléculaire formé peut être consécutif à l'addition d'un ion (H^+ par exemple) ou à la soustraction d'un électron à la molécule. Dans le cas de méthodes d'ionisation moins douces ou dans une chambre de collision, les ions pseudo-moléculaires ou moléculaires se fragmentent pour donner des ions fils en suivant des règles de fragmentation connues et caractéristiques des structures des molécules à analyser (Menet, 2011). La spectrométrie de masse est utile pour la caractérisation des composés organiques de deux façons. Elle permet de :

- donner les masses moléculaires exactes, donc les formules brutes des molécules ;
- montrer la présence de certaines unités structurales et leurs points d'attachement dans la molécule, donc une idée de la structure de la molécule (Yadav *et al.*, 2016).

Depuis plusieurs années, la spectrométrie de masse est couplée aux méthodes séparatives telles les chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide. Dans ces cas, le spectromètre de masse fonctionne alors comme un détecteur classique. On peut citer trois modes différents d'ionisation :

- impact électronique (E I) : ancienne technique d'ionisation qui consiste à obtenir, sous vide, l'interaction d'une molécule M et d'un électron accéléré à quelques dizaines de volts (généralement 70 eV)
- ionisation chimique (C I) : une réaction ion-molécule entre une molécule M et un ion réactant NH_4^+ ; il en résultera soit un transfert de proton et l'on obtiendra $(M + H)^+$, soit la réaction d'adduit et l'on obtiendra $(M + NH_4)^+$
- ionisation par Electrospray (E S I) : technique qui permet de désolvater et d'ioniser les molécules d'échantillons dissoutes dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique ou magnétique. Elle a lieu dans une source à la pression atmosphérique.

Par ailleurs, la spectroscopie de masse apporte des renseignements non seulement au sujet de l'ion moléculaire mais également, en raison de sa fragmentation à propos des entités structurales qui composent la molécule.

La réactivité des ions moléculaires obtenus dépend de leur énergie interne. Le faisceau d'électron a une énergie bien supérieure au potentiel d'ionisation de la molécule. En conséquence, la molécule bombardée perd non seulement un électron mais elle absorbe également une certaine énergie transférée au moment de la collision. Cette énergie supplémentaire place l'ion M^+ dans un vibrationnel excité qui être instable et il dissipe son énergie en se fragmentant.

I.3.2. Spectroscopie ultraviolet-visible

Les techniques de spectroscopie UV visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique des composés. C'est une méthode qualitative et quantitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée qui permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins (Skoog *et al.*, 2007).

I.3.3. Spectrométrie HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Le couplage HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS récemment développé est devenu un outil puissant pour la caractérisation de systèmes complexes de composés chimiques (Han *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2019). C'est un système qui combine plusieurs méthodes d'analyses :

la méthode HPLC qui consiste à la séparation, l'identification et la quantification de la composition d'un mélange à haute pression.

la méthode Q-TOF-MS/MS qui donne la masse à haute résolution et permet de confirmer la composition élémentaire des ions parents et des ions fils (Quirantes *et al.*, 2013).

Les détecteurs de masse à temps de vol sont d'une grande résolution et d'une bonne sensibilité (puisque tous les ions générés sont conservés pour la détection, contrairement aux filtres quadripolaires qui n'en conservent qu'un à chaque instant). Les systèmes hybrides comportant un premier filtre de masse quadripolaire permettent l'identification de molécules par sélection (éventuellement automatique) d'ions parents intenses, fragmentation et identification des formules atomiques les plus probables pour les fragments générés, en fonction de leur masse exacte (Michael, 2003 ; Jongmin *et al.*, 2017).

I.3.4. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) est une méthode de choix pour l'analyse du métabolisme. En effet, elle permet de séparer les composés et souvent leurs isomères, de limiter la suppression d'ionisation et le bruit de fond. Contrairement à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), elle présente l'avantage d'être applicable à l'analyse de composés non volatils. Par ailleurs, la (LC/MS) autorise la plupart du temps, peu ou pas d'étape de traitement de l'échantillon. Enfin, contrairement aux études de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS),

les sources et les analyseurs utilisés en LC/MS permettent d'obtenir la masse moléculaire d'un métabolite et de réaliser ensuite des expériences complémentaires (MS/MS) afin de l'identifier (Giles *et al.*, 2010 ; Ovcacikova *et al.*, 2016).

I.4. BACTERIES ETUDIEES

Cette partie porte essentiellement sur les microorganismes (germes) impliqués dans cette étude. Il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Ces germes sont généralement impliqués dans les infections couramment rencontrées à l'hôpital (Darie, 2003 ; Guessennd *et al.*, 2013).

I.4.1. *Staphylococcus aureus*

Bactérie à gram positif, *Staphylococcus aureus* est la plus rencontrée en pathologie humaine parmi toutes les bactéries. En effet, elle se développe sur tous les milieux usuels dont quelques souches donnent un pigment jaune-orangé. Plusieurs substances de la paroi de *S. aureus* jouent un rôle important dans les réactions immunologiques (Meyer *et al.*, 1994). Il s'agit du peptidoglycane ou antigène O, des acides, des polysaccharides de surface et de la protéine A qui est un produit antigénique. Les infections à *aureus* sont fréquentes dans le monde et se présentent sous des aspects cliniques très variés parmi lesquelles nous avons :

- les staphylococcies cutanées, sous-cutanées et muqueuses (nassale, buccales et pharynx)
Cette bacterie provoque les furunculoses, les syndromes des enfants ébouillantés, des sinusites, des panaris, des abcès (Prescott *et al.*, 2003).
- les staphylococcies à localisation viscérale comme l'ostéomyélite, l'endocardite et les staphylococcies pleuropulmonaires et urogénitales. Signalons que les staphylococcies pleuropulmonaires apparaissent après une grippe (Vandendriessche *et al.*, 2011).

I.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif., entouré d'une pseudo-capsule appelée slime jouant un rôle important dans la pathogénicité de la bactérie. Elle est beaucoup responsable d'infections nosocomiales. Elle se développe sur tous les milieux usuels en aérobie entre 30°C et 37°C. Elle produit une odeur caractéristique de seringa due à la production d'ortho-amino-acétophénone. Les malades particulièrement sensibles sont les enfants, les personnes âgées, les sujets atteints d'infections graves chroniques, diabètes et cancers. Cependant, les infections généralement observées sont des infections pulmonaires, uro-génitales, ostéro-articulaires, oculaires, cutanées et méningées (Jarvis *et al.*, 1992 ; Aaron *et al.*, 2010).

I.4.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie à gram négatif qui se trouve principalement dans le tube digestif. Il peut être pathogène pour l'appareil urinaire. Il existe quatre types d'*Escherichia coli* responsables de la diarrhée chez l'homme :

- *Escherichia coli* entéro-pathogène (EPEC) responsable de la diarrhée infantile grave ou toxicose.
- *Escherichia coli* entéro-toxinogène (ETEC) qui provoque les diarrhées liquides.
- *Escherichia coli* entéro-invasives (EIEC) isolée des syndromes dysentériques chez l'adulte et chez l'enfant.
- *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC) responsable des épidémies de diarrhée aqueuses hémorragiques et du syndrome hémolytique-urémique (Johnson, 1991 ; Olivier *et al.*, 2010).

I.5. TOXICOLOGIE

La détermination de la toxicité d'un produit comporte plusieurs étapes qui sont la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë et la toxicité chronique (Bijaoui, 2012).

I.5.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est la méthode qui permet de déterminer la dose létale 50 % (DL₅₀). Elle est caractérisée par l'administration d'une dose unique, et se déroule en 24 heures. La dose létale 50% (DL₅₀) se définit comme la dose entraînant la mort de 50 % des animaux mis en expérimentation après administration unique (Alwashli *et al.*, 2012).

I.5.2. Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë est une épreuve de toxicité par une administration répétée. Elle a pour but de mettre en évidence les altérations fonctionnelles consécutives aux administrations répétées de la substance active ou l'association des substances actives. La durée de l'étude expérimentale est de deux semaines (Hodgson & Cunny, 2010).

I.5.3. Toxicité chronique

Elle étudie les effets toxiques après une période de 90 jours. Cette étude peut s'étendre sur une période de 18 à 24 mois pour les non rongeurs. Elle permet de déceler les effets toxiques demandant un long temps de latence avant d'agir. Ce sont des phénomènes par effet cumulatif (Stephen, 2016).

I.6. GENERALITES SUR QUELQUES TESTS ANTIOXYDANTS

I.6.1. Définition

Un antioxydant est une molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques, en neutralisant les radicaux libres à leur contact. Les antioxydants luttent contre le stress oxydatif responsable du vieillissement cellulaire. Ils auraient donc un effet anti-âge (Kodio *et al.*, 2017). Les antioxydants sont également des molécules chargées de lutter contre la prolifération des radicaux libres dans l'organisme. De plus, les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Certains agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres, en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, réagissent rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. En plus, ils absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulier pour la transformer en chaleur (Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011).

I.6.2. Quelques techniques de mesure de l'activité antioxydante

Il existe différentes méthodes de mesure compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et de la nature diversifiée des antioxydants. Nous avons entre autres, le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes et la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

I.6.2.1. Technique DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un test facile et très reproductible pour tester la capacité antioxydante sur des antioxydants uniques dans des solutions aqueuses, des aliments, des boissons, des extraits de plantes. Le test DPPH mesure l'activité antioxydante des composés capables de transférer des atomes d'hydrogène. Le composé (DPPH) est un cation radical coloré et stable de couleur pourpre qui montre un maximum d'absorbance à 517 nm. Les composés antioxydants, qui sont capables de transférer un électron provoquent une décoloration de la solution. Cette réaction est rapide et proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon (Pernin, 2019).

I.6.2.2. Technique ABTS

Le sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) est un composé chimique utilisé notamment en biochimie dans l'étude de la cinétique de certaines enzymes. Le radical $ABTS^{\bullet+}$ (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron (e^-) à un atome d'azote. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H^\bullet), l'atome d'azote concerné piège un H^\bullet , conduisant à l' $ABTS^{\bullet+}$, ce qui entraîne la décoloration de la solution. De plus, l'ABTS est utilisé couramment par l'industrie agroalimentaire et les scientifiques dans le domaine agricole pour évaluer la capacité antioxydante des aliments (Dejian *et al.*, 2005). Pour ce faire, on le convertit en radical cationique par addition de persulfate de sodium $Na_2S_2O_8$. Ce cation est de couleur bleue (Roberta *et al.*, 1999). Le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ réagit avec la plupart des antioxydants, notamment les phénols, les thiols et la vitamine C (Richard & Jace, 2009). Au cours de ces réactions, il perd sa couleur bleue et retrouve son état neutre, incolore. Ces réactions peuvent être suivies par spectrophométrie. Cette mesure est souvent appelée capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC), qui permet de comparer la réactivité des antioxydants par rapport au Trolox, équivalent gramme de la vitamine E (Lawrence *et al.*, 1985).

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

Dans ce deuxième chapitre, nous exposons le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de notre travail.

II.1. MATERIEL

II.1.1. Matériel végétal

Turraea heterophylla (Smith) a été récoltée à Gadouan au centre ouest de la Côte d'Ivoires selon les coordonnées GPS (6°38'64. O''N 6°09'19.3''W). Puis, l'identification a été faite au CNF (Centre National de Floristique) de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan) par le botaniste Assi Jean, à partir du spécimen conservé sous le numéro 31235.

II.1.2. Matériel technique et solvants utilisés pour l'étude chimique

II.1.2.1. Appareillage

L'appareillage utilisé pour les manipulations chimiques est constitué :

- d'une balance électrique de marque Sartorius AG : BL 600 ; Max 600g ($P \pm 0,1$) pour les différentes pesées ;
- d'un bain marie pour la concentration des extraits ;
- d'un bain de sable pour évaporer les extraits dans les capsules en porcelaine ;
- d'un spectrophotomètre HACH : DR 2400 pour la mesure des absorbances ;
- d'une spatule pour le prélèvement de l'échantillon ;
- d'une hotte de protection contre les produits dangereux ;
- d'un agitateur magnétique pour la macération ;
- d'un évaporateur rotatif de type BUCHI-461 pour concentrer les extraits ;
- d'un spectromètre de masse pour identifier les composés ;
- d'un séchoir pour les feuilles récoltées ;
- d'un système de Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC Agilent 1260 Infinity) couplée à un Q-TOF-MS Agilent 6530. La figure 32 donne un aperçu du système HPLC-ESI-Q-TOF, série TOF/ 6530 utilisé.



Figure 32 : Photographie du système HPLC-ESI-Q-TOF, série TOF/ 6530

II.1.2.2. Verrerie

La verrerie ayant servi à l'étude chimique est constituée :

- de tubes à essais permettant le triphytochimique ;
- d'erlenmeyers pour la réalisation des mélanges ;
- d'éprouvettes graduées ;
- de fioles jaugées ;
- de micropipettes ;
- d'une baguette de trituration pour l'homogénéisation des solutions ;
- d'une ampoule à décanter pour les contre-extractions.

II.1.2.3. Autres matériels techniques

Les autres matériels techniques utilisés comprennent :

- des papiers wattman N° 2 pour des filtrations ;
- des pinces de crocodiles pour chauffer les plaques en aluminium ;
- une plaque chromatographique en silice ;
- une calotte chauffante pour faire des distillations et chauffer des solvants.

II.1.2.4. Solvants organiques

Le méthanol, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane provenant de la Chimtec, Boulevard du Gabon, Abidjan sont les solvants ayant servi à l'extraction et au fractionnement.

II.1.3. Matériel pour l'étude biologique

II.1.3.1. Matériel animal pour l'étude de la toxicité

Les animaux utilisés proviennent de l'animalerie du Département de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) d'Abidjan. Ce sont des rates blanches de souche Wistar, âgées de 8 à 9 semaines, dont le poids est compris entre 108 et 112 g (Figure 33). Les rates ont été choisies à cause de leur sensibilité. Ces rates sont maintenues dans les conditions avec des granulés provenant de la société Ivograin faits à base de céréales et d'un complexe minéralo vitaminiques (55 % de glucides, 18 % de protéines brutes, 2,5 % de matière grasse brute, 3,9 % de cellulose brute, 4,9 % de cendres brutes et 1,7 % de vitamines).

L'acclimatation a duré quinze (15) jours avant l'expérimentation.

Au cours du traitement, les animaux sont privés de nourriture, mais pas d'eau. Chaque animal est identifié par un numéro et une marque différente. La voie d'administration est la voie orale (par gavage) à l'aide d'une sonde gastrique.



Figure 33 : Photographie des rates blanches de souche Wistar, Source : Kouadio (2022)

II.1.3.2. Matériel pour l'étude de l'activité antibactérienne

Pour l'étude de l'activité antibactérienne, le matériel est essentiellement constitué d'extraits de la plante et de souches bactériennes. 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 de Côte d'Ivoire (IPCI), le Laboratoire National de Santé Publique de Côte d'Ivoire (LNSP) 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* sensible et *Staphylococcus aureus* CIP 483), et Bacilles à Gram négatif (*Escherichia coli* CIP 54127AF, *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). La souche de *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalière, est sensible à la pénicilline. Chaque germe a été conservé à la température du laboratoire (25°C) dans de la gélose profonde pour la conservation des souches bactériennes. Au delà de ceux-ci, nous avons utilisé d'autres matériels techniques tels que :

- un incubateur bactériologique (JOUAN type : EB 170 EL SANS, Afghanistan) ;
- une autoclave (Trade Raypa, modèle AE-75BRY, Espagne) ;
- un solvant diméthylsulfoxyde (DMSO) ;
- des milieux de culture (gélose Mueller-Hinton, gélose nutritive) ;
- des antibiotiques de référence (Gentamycine, Tétracycline) ;
- des petits matériels (microplaques, micropipettes, boîtes de Petri).

II. 2. METHODES D'ETUDE CHIMIQUE

II.2.1. Récolte, séchage et broyage des feuilles de *Turraea heterophylla*

Les feuilles de *T. heterophylla* (Smith) ont été collectées en avril 2016 pendant la saison pluvieuse à Gadouan selon les coordonnées GPS (6°38'64. 0''N 6°09'19.3''W) dans le département de Daloa (Côte d'Ivoire). Ensuite, elles ont été séchées à l'abri de la lumière du soleil au laboratoire de Constitution et Réaction de la Matière, de l'Université Félix Houphouët-Boigny à température ambiante à 25°C pendant deux semaines (Figure 34A). La matière sèche obtenue a été pulvérisée à l'aide d'un broyeur électrique (RETSCHSK,100) pour faciliter l'extraction des principes actifs. La poudre obtenue après broyage des feuilles séchées (Figure 34B) a été conservée à l'abri de la lumière dans un bocal étanche et placé dans un dessiccateur pour la suite des travaux.

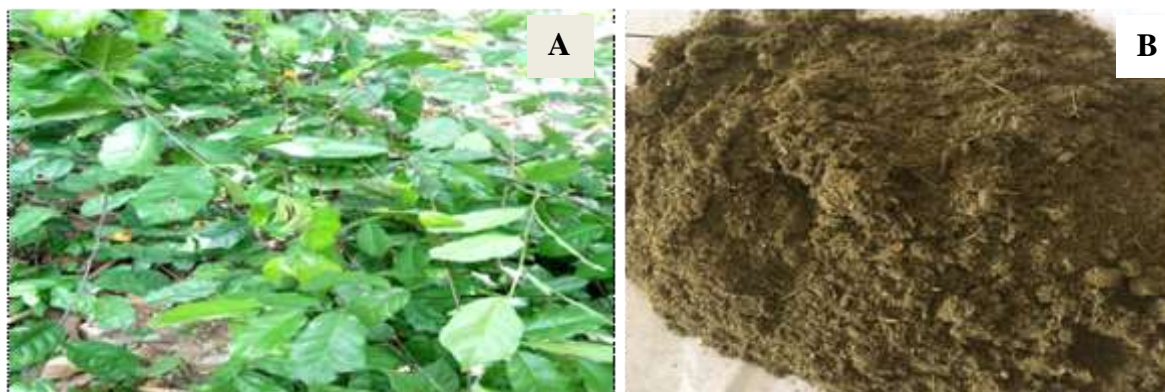


Figure 34 : Photographie des feuilles (A) et du broyât des feuilles (B) de *Turraea heterophylla*

II.2.2. Préparation de l'extrait méthanolique des feuilles de *Turraea heterophylla*

Pour préparer l'extrait méthanolique des feuilles de *Turraea heterophylla*, 200 g de poudre végétale ont été extraits par macération dans 300 mL de méthanol pendant 24h. Après filtration sur papier Wattman n°2, le filtrat est récupéré et le Marc est extrait dans les mêmes conditions opératoires jusqu'à épuisement. 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, pour obtenir l'extrait brut méthanolique. Cet extrait a été conservé dans un bocal étanche, dans un dessiccateur en verre, pour la suite des travaux. Le schéma d'extraction est représenté par la figure 35.

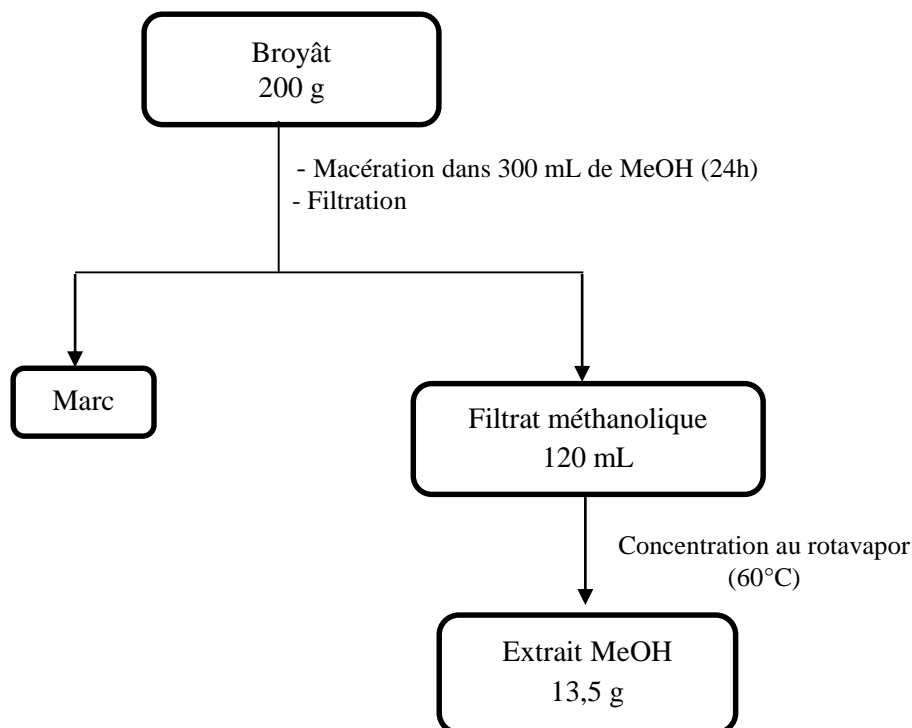


Figure 35 : Schéma d'extraction solide-liquide

II.2. 3. Fractionnement de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

L'extrait brut méthanolique a été fractionné successivement à partir de solvants de polarités croissantes (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et eau) suivant la méthode rapportée par Attioua *et al.* (2012). Une partie de l'extrait brut méthanolique ($E_{\text{MeOH}} = 7,2$ g) a été dissoute dans l'eau distillée puis filtrée pour obtenir 100 mL de solution aqueuse. Dans une ampoule à décanter, les 100 mL ont été épuisés successivement avec l'hexane (3x 100 mL), le dichlorométhane (4x 100 mL) et l'acétate d'éthyle (5x 100 mL). La phase aqueuse résiduelle est séchée à l'étuve à 60°C, puis extraite avec le mélange méthanol/eau (5x 80 mL). L'extrait obtenu est considéré comme étant une fraction aqueuse résiduelle. La matière végétale a été totalement épuisée. Les différentes phases organiques obtenues sont séchées avec du sulfate de sodium anhydre, puis filtrées sur papier Wattman n°2 avant d'éliminer les solvants sous pression réduite. Ce traitement a abouti à quatre extraits : hexane (F_{HEX}), dichlorométhane (F_{DCM}), acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueux résiduel (F_{Aq}). Les différentes étapes de cette extraction sont résumées par la figure 36.

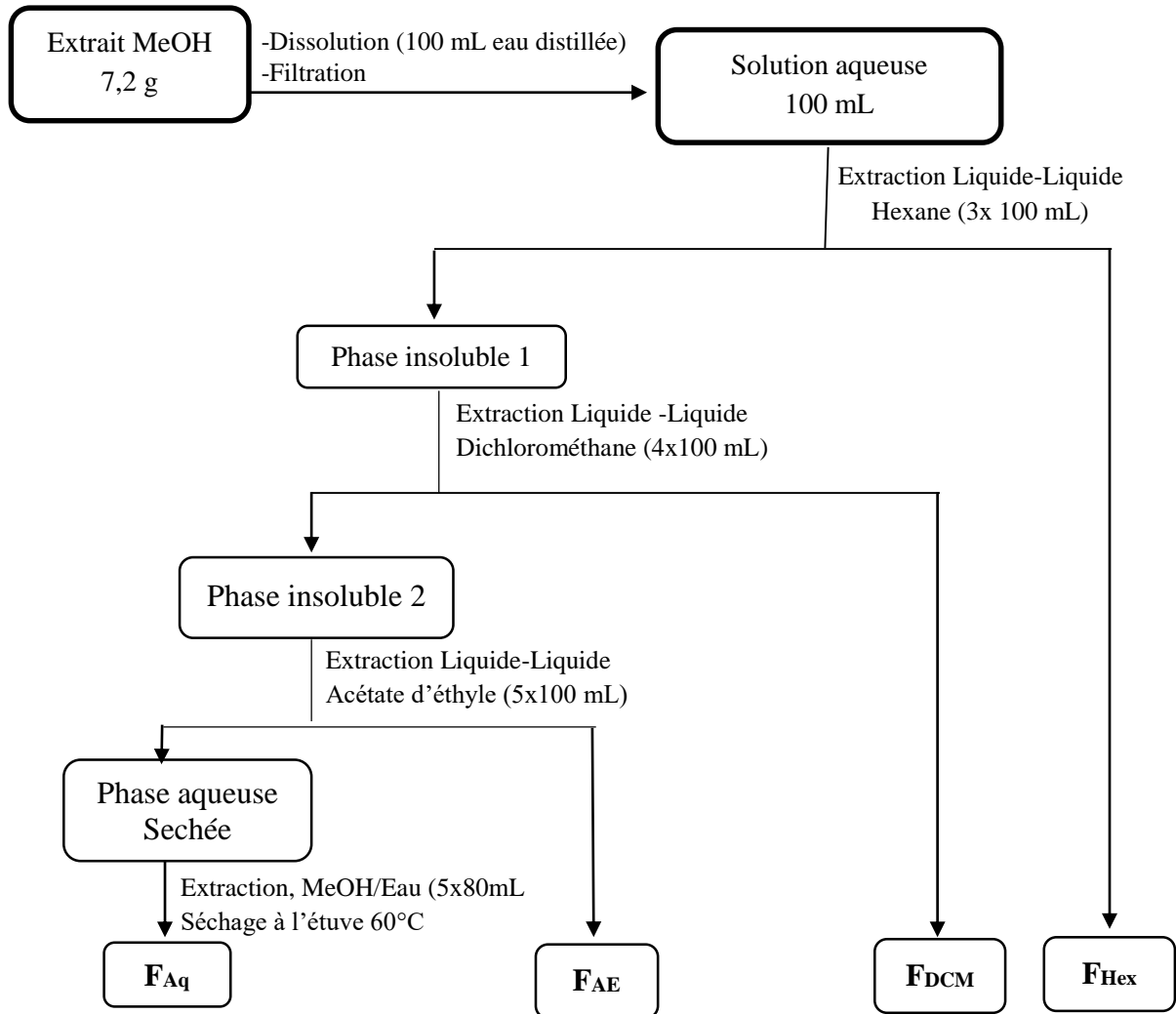


Figure 36 : Schéma d'extraction liquide-liquide

II.2.4. Criblage phytochimique de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et ses fractions

II.2.4.1. Etude qualitative de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et ses fractions

L'analyse qualitative est basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisées sur les extraits et fractions de la plante étudiée.

II.2.4.1.1. Test des polyphénols par réaction au chlorure ferrique

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner (1983). 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.

II.2.4.1.2. Test des stérols et des polyterpènes par la réaction de Lieberman et Burchard

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner (1983). 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.

II.2.4.1.3. Test des flavonoïdes par réaction à la cyanidine

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner (1983). 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.

II.2.4.1.4. Test des tanins

✓ Test des tanins catéchiques par le réactif de Stiasny

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Wagner (1983). 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.

✓ Recherche de tanins galliques

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.

II.2.4.1.5. Test des alcaloïdes

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Harbone (1998). 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.

II.2.4.1. 6. Test des quinones

Le réactif Borntraegen (ammoniaque à moitié dilué) permet la détection de quinones libres. Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Harbone (1998). 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'hydrolysate 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 quinone.

II.2.4.1.7. Test des saponines

Le test a été réalisé suivant la méthode décrite par Harbone (1998). 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.

II.2.4.1.8. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de la phase stationnaire et de la phase mobile. Pour analyser les extraits végétaux : MeOH, Hex, DCM, AE, Aq au moyen de la CCM, des chromatoplaques (gel de silice 60 F254, support aluminium (Merck)), une cuve de développement, un séchoir électrique, des pipettes Pasteur, des capillaires, une pince, une lampe ultra-violet (UV) et des solvants organiques (solvants de migration) ont été utilisés. Les solutions sont déposées à l'aide de capillaires sous forme de points distants de 1cm les uns des autres et de 0,8 cm des deux bords des plaques chromatographiques. Les plaques sont introduites dans la cuve de développement contenant la phase mobile (développant) constituée par un mélange de plusieurs solvants organiques. La migration du développant par capillarité, provoque la séparation des composés. Le développement ascendant est arrêté lorsque le front du solvant est atteint. Les développants utilisés à cet effet sont respectivement les gradients de solvants CH_2Cl_2 /Acétate d'éthyle (7/3 ; v/v) et Hex/ CH_2Cl_2 (2/8 ; v/v).

Les plaques sont ensuite séchées et les tâches colorées détectées par observation directe sous une lampe UV à longueur d'onde (254 nm et à 366 nm) (Vernin, 1970). Ainsi les chromatogrammes révélés sous la lumière UV 366 nm et 254 nm (Figure 39) présentent des empreintes moléculaires diversement colorées (bleue, violette, marron, orange, verte, rouge, noire) correspondant à plusieurs groupes de métabolites secondaires : bleue, verte plus ou moins foncée (polyphénols) (Wagner,1983) ; bleue, verte, violette (stérois et polyterpènes) (Ladigina *et al.*, 1983) ; jaune, verte, bleue (flavonoïdes) (Ladigina *et al.*, 1983 ; Békro *et al.*,2007) ; orange (alcaloïdes) (Harbone, 1998). Pour préciser leur nature, les réactifs spécifiques / révélateurs aux polyphénols (FeCl₃, NH₃), aux flavonoïdes (réactifs de Neu, vanilline, AlCl₃), aux stérois et polyterpènes (Liebermann-Bürchard ; H₂SO₄ à 10%) et les alcaloïdes (réactif de Dragendorff) ont été utilisés.

II.2.4.2. Etude quantitative de l'extrait méthanolique de *Turraea heterphylla* et fractions

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV 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 sont calculées à partir de la formule.

$$\mathcal{E} = \frac{CVD}{m}$$

\mathcal{E} : Teneur ou concentration (mg. EAG/g ou mg. EQ/g d'extrait sec).

C : concentration de l'échantillon

V : volume de la solution préparée (mL)

D : facteur de dilution

m : masse de l'extrait (g)

II.2.4.2.1. Détermination des teneurs en polyphénols totaux

La méthode décrite par Kouamé *et al.* (2021) 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 méthanolique. Le mélange est maintenu 2 minutes dans l'obscurité à température ambiante, puis 2 mL de solution de carbonate de sodium (75 g /L) sont ajoutés. Le mélange est ensuite placé pendant 15 minutes au bain-marie à 50°C, puis refroidi rapidement. L'absorbance est mesurée à longueur d'onde 760 nm, avec de l'eau distillée comme blanc. Les essais ont été réalisés trois fois pour chaque échantillon et la concentration en polyphénols est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg.EAG/g extrait sec).

Ainsi, les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et ses fractions ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage $Y = 0,9829 X + 0,0005$ avec $R^2 = 0,9936$ tracée en utilisant l'acide gallique comme standard.

II.2.4.2.2. Détermination des teneurs en flavonoïdes totaux

La méthode décrite par Kouamé *et al.* (2021) a été utilisée pour le dosage des flavonoïdes totaux. Dans une fiole de 25 mL, 0,75 mL de nitrite de sodium (NaNO_2) 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 (AlCl_3) 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 de l'absorbance a été faite à longueur d'onde 510 nm. Les essais ont été réalisés trois fois pour chaque échantillon et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait sec (mg. EQ/g d'extrait sec). Les teneurs en flavonoïdes de l'extrait méthanolique et ses fractions ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage $Y = 1,0071X - 0,0014$ avec $R^2 = 0,9985$ tracée en utilisant la quercétine comme standard.

II.2.5. Identification des constituants chimiques de l'extrait méthanoliques de *Turraea heterophylla*

II.2.5.1. Analyse de l'extrait méthanolique de de *Turraea heterophylla* par spectroscopie ultraviolette

En analyse structurale, les valeurs des longueurs d'ondes (λ_{max}) permettent d'identifier les groupements d'atomes responsables de l'absorption au niveau des molécules appelées groupement chromophores : ce sont des groupes d'atomes liés dans une molécule et qui sont responsables des pics d'absorption importants dans l'ultraviolet ou le visible.

Le chromophore sera saturé ou insaturé selon la structure de la molécule ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{N}=\text{N}$, CH_4).

II.2.5.2. Analyse de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* par HPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Les échantillons ont été dissouts dans du méthanol, puis injectés dans la colonne du système HPLC. Les analyses ont été réalisées en mode positif. Une colonne analytique Sunfire® C18 (150×2,1 mm ; 3,5 μm , Waters) a été utilisée avec un débit de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un gradient linéaire à deux voies : Voie A (95-0% de H_2O + 0,1% d'acide formique), Voie B (5-100%) de B (ACN)

pendant 30 minutes pour une meilleure séparation. Les conditions ESI ont été définies avec température capillaire à 320 °C, tension de source à 3,5 kV et un débit de gaz de 10 L/min.

Dans le mode ion positif, la purine C₅H₄N₄ (ion à m/z 121,050873 g/mol) et la phosphazène C₁₈H₁₈F₂₄N₃O₆P₃ (ion à m/z 922,009798 g/mol) ont été utilisées comme masses de verrouillage internes. Les scans complets ont été acquis à une résolution de 11000 à m/z 922.

Le volume d'injection des échantillons a été fixé à 5 µL. Le gradient utilisé pour l'élution est donné dans le tableau I.

Tableau I : Programme d'élution des échantillons sur le système HPLC-Q-TOF

Temps (minutes)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	100	0
5	100	0
15	95	5
25	5	95
30	0	100
32	0	100
42	0	100
52	100	0

NB : Solvant A : H₂O + acide formique 0,1% et Solvant B : ACN

Une étude de déréplication a été menée sur l'extrait méthanolique brut afin d'identifier les pics correspondant aux molécules décrites dans la littérature. Pour cela, un traitement automatisé des données brutes de HPLC-ESI-MS a été réalisé par le logiciel MassHunter (Jongmin *et al.*, 2017). Celui-ci fait ressortir une liste de données qui se traduit graphiquement en pics correspondant chacun à un composé présent dans l'extrait. En cliquant sur un pic donné, le logiciel génère un ensemble de formules qui correspondent chacune aux ions moléculaires [M+H]⁺. La formule donnant le meilleur score par le logiciel est celle qui correspond à la formule brute de la molécule retenue.

Avec cette formule retenue, on effectue des recherches dans les bases de données DNP[®] (Dictionary of Natural Products), Scifinder et Reaxys[®], pour avoir suffisamment de l'information pour déterminer la structure exacte d'un composé connu dans la littérature (McFarland *et al.*, 2004)

II.3. METHODE BIOLOGIQUE

II.3.1. Etudes biologiques de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et ses fractions

II.3.1.1. Evaluation de la toxicité aiguë et effet sur le poids de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé le protocole OCDE 423 (OCDE, 2002). Chaque lot est constitué de trois rates. Pour la dose initiale, on choisit une parmi les quatre suivants : 5, 50, 300 et 2000 mg/kg de poids corporel. La dose choisie est celle pour laquelle on peut s'attendre à observer la mortalité parmi quelques unes des rates traitées. Le choix du sexe de l'animal (femelle) est exigé par ladite ligne directrice, du fait de la forte sensibilité des rates. Les rates de chaque lot d'essai ont été gavées chacune avec un temps d'observation (chaque 30 min). Lorsque le lot traité ne présentait aucun animal mort et aucun signe de toxicité (agressivité, mobilité, vigilance, état des selles, vomissement, mortalité etc.), le lot suivant était traité à son tour. Au terme de l'expérience, les lots ont été traités et les rates sont observées le premier jour, et régulièrement chaque jour pendant 15 jours.

II.3.1.1.1. Préparation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

Les différentes concentrations de l'extrait méthanolique sont préparés et les quantités injectées sont déterminées également selon le tableau II.

Tableau II : Différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* correspondants aux doses administrées aux rates.

Lots	1	2	3	4	5
Dose injecté (mg/kg de PC*)	0	5	50	300	2000
Quantité d'extrait injecté par rate (mg/kg de PC*)	0	0,5	5,5	33	220
Concentration (mg/mL)	0	1,1	11	66	440

*PC : poids corporel

✓ Exemple de calcul : lot 3

Pour avoir une dose de 50 mg/kg chez les rates de poids moyen 110 g, il faut

$50 \times 110 / 1000 = 5,5$ mg (quantité d'extrait)

✓ Exemple de calcul : lot 4

Pour avoir une dose de 300 mg/kg chez les rates de poids moyen 110 g, il faut

$300 \times 110 / 1000 = 33$ mg (quantité d'extrait)

La concentration d'extrait à injecter pour un volume de 0,5 mL est calculée selon la formule ci-après : $C = m/v$ où m la masse d'extrait et v le volume à injecter

✓ Exemple de calcul : lot 3 et lot 4

Pour avoir 5,5 mg dans un volume de 0,5 mL il faut : $5,5/0,5 = 11 \text{ mg/mL}$

Pour avoir 33 mg dans un volume de 0,5 mL il faut : $33 / 0,5 = 66 \text{ mg/mL}$

II.3.1.1.2. Administration des doses aux rates

Après avoir soumis les rates à un jeun de 24 heures, elles sont gavées à l'aide d'une sonde rigide. La technique repose sur un principe simple. Il faudrait bien tenir la rate pour qu'elle ne bouge pas lors de l'administration. Une fois qu'on introduit la sonde dans la gorge de l'animal, la substance est injectée doucement (Figure 37).

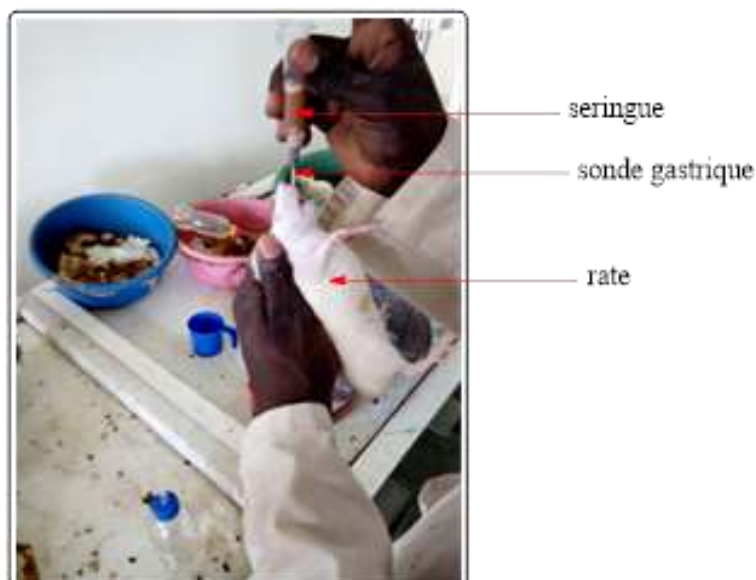


Figure 37 : Photographie du gavage des rates avec l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

Pour les expériences, les rates sont réparties en 5 lots de 3 rates qui seront soumises au traitement suivant :

- Lot I (témoin) : eau distillée
- Lot II (traité) : 5 mg/kg de poids corporel d'extrait méthanolique
- Lot III (traité) : 50 mg/kg de poids corporel d'extrait méthanolique
- Lot IV (traité) : 300 mg/kg de poids corporel d'extrait méthanolique
- Lot V (traité) : 2000 mg/kg de poids corporel d'extrait méthanolique

Après le traitement, les rates sont observées individuellement chaque heure pendant le premier jour et chaque jour sur une durée de deux semaines (14 jours). Les paramètres physiologiques (mobilité, toilettage, taux de mortalité) sont déterminés.

II.3.1.1.3. Détermination du poids corporel des rates

Le poids des animaux pendant les 15 jours d'expérience est mesuré tous les 3 jours.

II.3.1.2. Etude *in vitro* des activités antibactériennes de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion par puits en milieu gélosé pour déterminer la sensibilité de l'extrait méthanolique des feuilles de *Turraea heterophylla*.

II.3.1.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Les souches bactériennes préalablement conservées dans des tubes Eppendorf ont été prélevées par simple raclage puis repiquées par quadrant (épuisement de la semence) sur une boîte de gélose Mueller-Hinton. La culture a été incubée à 37 °C durant 18 heures, afin d'obtenir des jeunes colonies isolées. Pour chaque inoculum, une colonie bien isolée de la culture bactérienne jeune de 18 heures a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur, puis écrasée sur la paroi d'un tube contenant 10 mL d'eau distillée stérile. Par la suite, à l'aide d'une micropipette, 1000 µL pour les *Staphylococcus aureus*, 100 µL pour les entérobactéries et 10 µL *Pseudomonas aeruginosa* ont été prélevés et dilués dans 10 mL d'eau distillée stérile. Cette suspension bactérienne a été ajustée à 0,5 MacFarland afin d'obtenir une suspension bactérienne estimée à 10⁶ UFC/mL constituant ainsi l'inoculum bactérien de départ pour chacune des souches bactériennes (Koné *et al.*, 2004).

II.3.1.2.2. Détermination des diamètres d'inhibition

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé dans des cupules (puits) a été utilisé pour réaliser le test (Koné *et al.*, 2004). Une solution de concentration 3000 mg/mL de l'extrait a été préparée. Des boîtes de Pétri de 90 mm contenant de la gélose Mueller-Hinton ont étéensemencées par écouvillonnage avec l'inoculum préparé.

Ensuite, des cupules de 6 mm ont été creusées en enfonçant le gros bout d'une pipette Pasteur dans la gélose et remplies avec 50 µL de la solution d'extrait préparé, une distance minimale de 15 mm du bord de la boîte de Pétri et 30 mm entre les puits a été réalisée pour éviter que les zones d'inhibition ne se chevauchent. L'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 24 heures.

Après ce délai, le diamètre d'inhibition autour de chaque cupule a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. En fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante. Selon Etuaful *et al.* (2005), 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 9 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

Nous avons utilisé la tétracycline et la gentamycine. Ces deux antibiotiques en solution injectable de (25 µg/mL) chacun, ont servi de contrôles positifs. 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 (Aubry *et al.*, 2006). La figure 38 montre le schéma simplifié de la méthode de diffusion.

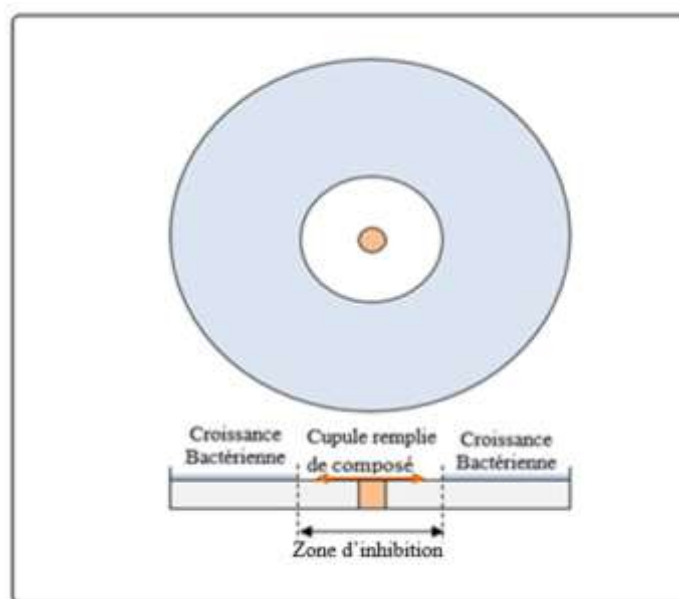


Figure 38 : Schéma simplifié adapté de la méthode de diffusion sur puits en milieu solide

II.3.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

L'activité antiradicalaire a été évaluée par les tests de réduction du DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et de l'ABTS (acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

II.3.1.3.1. Mesure de l'activité antiradicalaire par le test DPPH

La détermination de l'activité antiradicalaire des extraits a été effectuée par le test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) selon la méthode de Dieng *et al.* (2017) avec quelques modifications. Une solution méthanolique de DPPH a été préparée en dissolvant 5 mg de ce produit dans un mélange méthanol/eau (70/30) (v/v). Ensuite, à un volume de 50 µl d'extrait à une concentration donnée sont ajoutés 950 µl de la solution DPPH. Les extraits ainsi que la référence (acide ascorbique) sont testés à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 ; 5 mg/mL); puis les absorbances ont été mesurées à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé.

Une droite d'étalonnage a été réalisée avec les concentrations de l'acide ascorbique : Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante

$$(\%) \text{Inhibition du DPPH} = \frac{(A_0 - A_{\text{extrait}}) \times 100}{A_0}$$

A_0 : absorbance DPPH diluée,

Abs extrait : absorbance DPPH dilué + échantillon

La concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) qui est la concentration d'extrait ou de l'acide ascorbique responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH est déterminée graphiquement.

II.3.1.3.2. Mesure de l'activité antiradicalaire par le test ABTS

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation ABTS⁺ (acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Le test a été réalisé selon la technique utilisée par Dieng *et al.* (2017). Le radical-cation ABTS⁺ a été produit par réaction de 8 mM ABTS (87,7 mg dans 20 mL d'eau distillée) et 3 mM de persulfate de potassium (0,0162 g dans 20 mL eau distillée) dans un ratio 1 : 1 (v/v). Le mélange a été ensuite incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 4 heures. Ce mélange a été diluée progressivement avec du méthanol (MeOH) jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. Ainsi, une prise d'essai de 3,9 mL de cette solution diluée d'ABTS⁺ a été ajoutée à 100 µL d'extrait ou de la référence (acide ascorbique) à différentes concentrations (3,5 ; 5 ; 6,25 ; 10 ; 11,25 ; 13,75 ; 15 mg/ml). Après agitation, le mélange a été incubé pendant 6 minutes à l'obscurité (T=30 ± 2°C). L'absorbance résiduelle du radical ABTS⁺ a été ensuite mesurée à 734 nm au spectrophotomètre UV-visible et devrait être comprise entre 20%-80% de l'absorbance du blanc. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé et les résultats ont été exprimés (mg/mL). Une droite d'étalonnage a été réalisée avec les concentrations de Trolox.

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS est calculé selon l'équation suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition du ABTS} = \frac{(A_0 - A_{\text{extrait}}) \times 100}{A_0}$$

A_0 : absorbance ABTS diluée,

Abs extrait : absorbance ABTS dilué + échantillon

Analyses des résultats expérimentaux.

Toutes les mesures expérimentales ont été réalisées en triple. Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type : moyen (SE) \pm d'écart-type.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce troisième chapitre, nous présentons les résultats de notre travail assortis d'une discussion.

III.1. ETUDE CHIMIQUE

III.1.1. Rendements d'extraction de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et de ses fractions

L'extraction réalisée sur la poudre des feuilles de *T. heterophylla* a donné les résultats consignés dans le tableau III.

Tableau III : Rendement de l'extrait méthanolique des feuilles de *Turraea heterophylla*

Organe	P ₁	P _{ext}	Rendement	Aspect physique
Feuilles	200g	13,5g	5,40 %	pâteuse

P₁ : Poudre végétale ; P_{ext} : extrait végétal

L'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* a donné un rendement de 5,40 %. Ce rendement indique que les feuilles de *T. heterophylla* contiennent des métabolites secondaires extractibles par le méthanol. Le partitionnement de l'extrait E_{MeOH} (7,2 g) par l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'eau ont abouti respectivement aux rendements des fractions (Tableau IV).

Tableau IV : Rendements et aspects physiques des fractions issues de l'extrait méthanolique des feuilles de *Turraea heterophylla*

Echantillons	Aspects physiques	Masses (g)	Rendements (%)
Fraction Hex	pâteuse	0,95 ± 0,32	13,2 ± 0,04
Fraction DCM	pâteuse	1,38 ± 0,35	19,2 ± 0,04
Fraction AE	pâteuse	1,92 ± 0,38	26,7 ± 0,05
Fraction Aq.	pâteuse	2,52 ± 0,50	35,0 ± 0,07

Hex : hexane ; DCM : dichlorométhane ; AE : acétate d'éthyle ; Aq : aqueux

On note que les rendements les plus importants sont obtenus avec la fraction aqueuse résiduelle (F_{Aq} : 35 ± 0,07%), suivie de la fraction acétate d'éthyle (F_{AE} : 26,7 ± 0,05%). Ces deux fractions renferment environ 62 ± 0,12%, en masse, des métabolites contenus dans l'extrait brut méthanolique. Le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'eau étant des solvants hydrophiles, ceux-ci ont donc la même affinité à extraire les composés hydrosolubles (Silverstein *et al.*, 2005).

La différence des rendements pourrait être liée à la durée de l'extraction ou à la granulométrie des broyâts, deux facteurs qui ont influencé le rendement d'extraction selon nos résultats (Koné, 2017).

III.1.2. Etude qualitative et quantitative de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et de ses fractions

III.1.2.1. Etude qualitative

III.1.2.1.1. Tri-phytochimique

La mise en évidence des grandes familles chimiques a été réalisée par les tests en tube, conformément à la méthode décrite par Attioua *et al.* (2012), avec une légère modification. L'analyse qualitative est basée sur l'intensité de coloration ou de précipitation grâce aux tests de caractérisations chimiques. Ainsi, le criblage phytochimique réalisé sur l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* (E_{MeOH}) et ses fractions 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 (Tableau V).

Tableau V : Tri-phytochimique de l'extrait brut méthanolique des feuilles de *Turraea heterophylla* et de ses fractions

Métabolites secondaires	Tests chimiques	Extrait	Fractions			
		E_{MeOH}	F_{HEX}	F_{DCM}	F_{AE}	F_{Aq}
Alcaloïdes	Dragendorff-Bouchardât	+	-	-	+	+
Polyphénols	Chlorure ferrique	+	+	+	+	+
Flavonoïdes	Copeaux de magnésium	+	+	+	+	+
Tanins galliques	Réactif Stiasny	-	-	-	-	-
Tanins catéchiques	Chlorure ferrique ($FeCl_3$)	-	-	-	-	-
Stérols et polyterpènes	Liebermann-Bürchard	+	+	+	-	-
Quinones	Ammoniac dilué	-	-	-	-	-
Saponines	Mousse	+	-	-	+	+

+ : Présence ; - : Absent ; E_{MeOH} : extrait méthanolique ; F_{Hex} : fraction hexanique ; F_{DCM} : fraction dichlorométhane ; F_{AE} : fraction acétate d'éthyle ; F_{Aq} : fraction aqueuse résiduelle

Les résultats indiquent que sur les huit (8) familles recherchées, seuls les tanins et les quinones sont absents (Tableau V). Ces résultats sont similaires à ceux précédemment obtenus à partir des écorces de tige de la même plante (Akrofi, 2011 ; Boua *et al.*, 2013). Cependant, l'absence de tanins dans l'extrait méthanolique et les fractions des feuilles est contraire aux résultats des travaux de Bouquet & Debray (1974). Cette contradiction pourrait s'expliquer par une différence d'approche méthodologique des tests.

En effet, l'étude des écorces de racine de la même plante par ces auteurs ont révélé 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. Elle peut aussi se justifier par plusieurs facteurs : agropédologiques, climatiques et géographique (Lee *et al.*, 2003).

Le tri-phytochimique montre que la composition chimique des feuilles de *T. heterophylla* est similaire à celle des autres espèces du genre *Turraea* (Tan & Luo, 2011 ; Boua *et al.*, 2013). Le tableau V montre aussi que toutes les familles chimiques caractérisées dans l'extrait brut méthanolique (E_{MeOH}) se retrouvent réparties 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 (génines) et glycoside dans les feuilles de *T. heterophylla* (Muyonga *et al.*, 2014). Concernant les stérols et les polyterpènes, ils se retrouvent, après fractionnement, dans les solvants apolaires : hexane et dichlorométhane. Cette observation est normale, puisque ces composés sont généralement très solubles dans les solvants lipophiles tels que les hydrocarbures. Quant aux saponines, ils sont dans les fractions polaires (acétate d'éthyle et eau). La richesse en différents groupes chimiques de l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* pourrait justifier l'utilisation de sa décoction dans de nombreux traitements traditionnels (N'guessan *et al.*, 2009b).

III.1.2.1.2. Profil chromatographique

Les résultats de l'identification des familles de composés par la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et ses fractions à l'hexane (F_{Hex}), au dichlorométhane (F_{DCM}), à l'acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueuse résiduelle (F_{AQ}) sont consignés dans le tableau VI.

Tableau VI : Familles de composés identifiés par CCM de l'extrait méthanolique et de ses fractions

Extrait/fractions	Rapport frontal (R_f)	Coloration	Révélateur	Composés identifiés
E_{MeOH}	0,33 ; 0,58 ; 0,78 ; 0,98	Bleue, violette	H_2SO_4 à 10%	Stérols et terpènes
	0,72 ; 0,78	Bleue noiâtre	$FeCl_3$	Polyphénols
	0,33 ; 0,58 ; 0,92	Bleue, rose ,violacée	$AlCl_3$, Vaniline	Flavonoïdes
F_{AE}	0,33 ; 0,58 ; 0,92	Bleue noiâtre	$FeCl_3$	Polyphénols
	0,33 ; 0,63 ; 0,98	Bleue, rose -violette	$AlCl_3$, Vaniline	Flavonoïdes
F_{DCM}	0,35	Bleue	H_2SO_4 à 10%	Stérols et terpènes
	0,49	Bleue noiâtre	$FeCl_3$	Polyphénols
	0,39 ; 0,60	Bleue, rose violacée	$AlCl_3$, Vaniline	Flavonoïdes
F_{Hex}	0,37	Bleue	H_2SO_4 à 10%	Stérols et terpènes
	0,69 ; 0,88	Bleue noiâtre	$FeCl_3$	Polyphénols
	0,75	Bleue; rose violacée	$AlCl_3$, Vaniline	Flavonoïdes
F_{Aq}	0,28	Bleue noiâtre	$FeCl_3$	Polyphénols
	0,18	rose violacée	$AlCl_3$, vaniline	Flavonoïdes

E_{MeOH} : extrait méthanolique ; F_{Hex} : fraction hexanique ; F_{DCM} : fraction dichlorométhane ; F_{AE} : fraction acétate d'éthyle ; F_{Aq} : fraction aqueuse résiduelle

Les CCM de E_{MeOH} , F_{DCM} et F_{Hex} révélés avec l'acide sulfurique à 10% et puis visualisés sous UV à 366 nm et 254 nm (figure 39), confirment la présence des stérols et terpénoïdes par de diverses couleurs. Les spots observés à ce niveau sont tous des teintes bleues aux rapports frontaux ($R_f = 0,33 ; 0,35 ; 0,37 ; 0,58 ; 0,78 ; 0,98$). Pour l'identification des différents spots, nous sommes référés aux travaux de N'gaman (2009).

Les chromatogrammes de E_{MeOH} , F_{AE} , F_{Aq} , F_{DCM} et F_{Hex} obtenus, après traitement avec le réactif de $FeCl_3$, ont montré des tâches colorées en bleue noirâtre (Figure 39), confirmant ainsi la présence des polyphénols dans les feuilles de la plante. Les rapports frontaux mis en évidence sont ($R_f = 0,28 ; 0,33 ; 0,49 ; 0,58 ; 0,69 ; 0,72 ; 0,78 ; 0,88 ; 0,92$) (Ladiguina *et al.*, 1983 ; Michelle, 2007). Les spots visualisés sous UV à 366 nm et 254 nm et après révélation avec le réactif $AlCl_3$, HCl dans les chromatogrammes (E_{MeOH} , F_{AE} , F_{Aq} , F_{DCM} et F_{Hex} et nous a permis d'identifier des flavonoïdes aux couleurs bleue, rose violacée avec les rapports frontaux ($R_f = 0,18 ; 0,33 ; 0,39 ; 0,58 ; 0,60 ; 0,63 ; 0,75 ; 0,92 ; 0,98$). Les rapports frontaux ($R_f = 0,18 ; 0,28 ; 0,33$ et 0,35) aux petites valeurs, justifieraient la polarité des solvants tels que le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'eau (Mamyrbekova-Bekro *et al.*, 2010).

Il faut noter que les fluorescences ont été observées dans l'extrait méthanolique et certaines fractions sous UV à 366 nm (Figure 39). Toutefois, elles pourraient caractériser la présence des coumarines et aussi d'autres groupes de composés.

La présence des composés phénoliques, des stérols et terpénoïdes dans les tests en tube est en accord avec ceux réalisés en CCM. Ce qui confirme la richesse des feuilles de *T. heterophylla* en composés phénoliques, stérols et terpénoïdes. L'absence des saponines et des alcaloïdes à cette expérience pourrait s'expliquer par une approche méthodologique. Il est à noter que les composés phénoliques ainsi que les stérols et terpénoïdes détectés sont majoritairement polaires grâce au groupement hydroxyles qu'ils possèdent (Azwanida 2015).

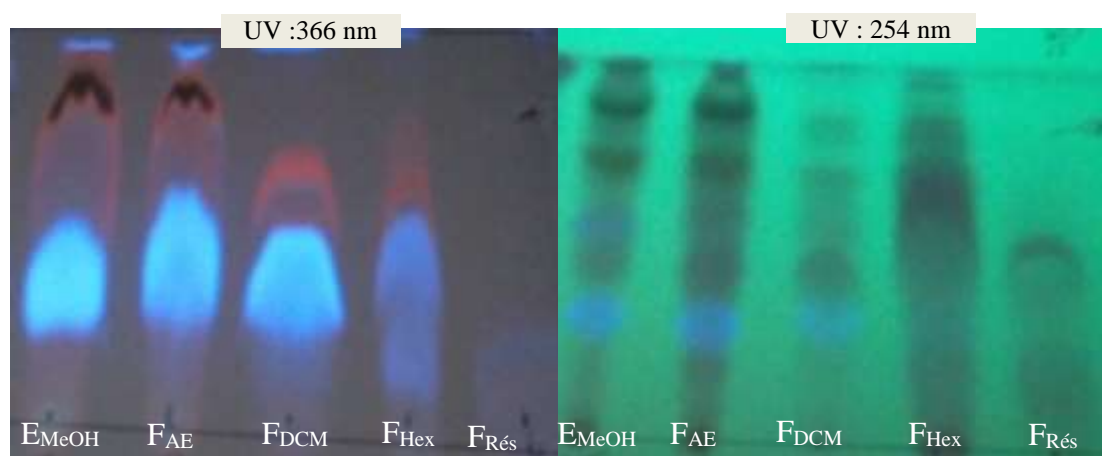


Figure 39 : Profil chromatographique des empreintes moléculaires

E_{MeOH} : extrait méthanolique ; **F_{Hex}** : fraction hexanique ; **F_{DCM}** : fraction dichlorométhane ; **F_{AE}** : fraction acétate d'éthyle ; **F_{Aq}** : fraction aqueuse résiduelle

III.1.2.2. Etude quantitative de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et de ses fractions

III.1.2.2.1. Teneurs en polyphénols totaux

La droite d'étalonnage (Figure 40) d'équation $y = 0,9829x + 0,0005$ avec un coefficient de régression $R^2 = 0,9936$ a été obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

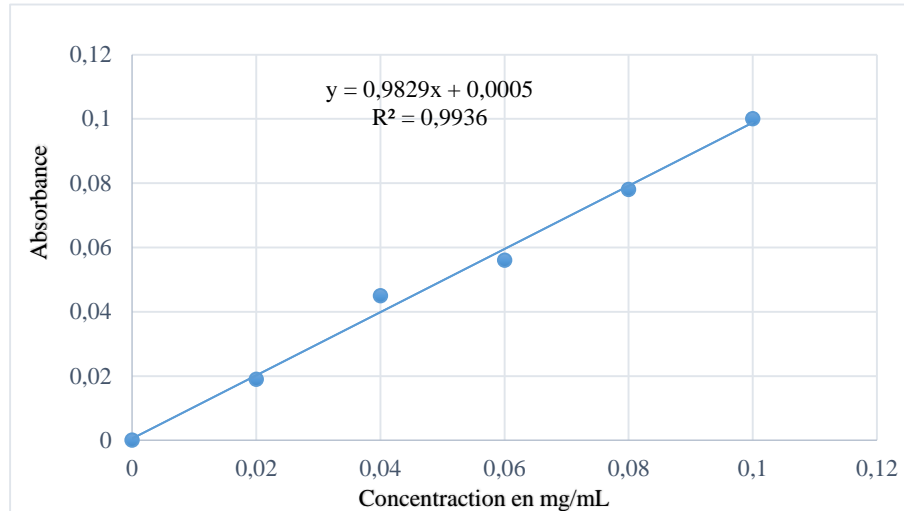


Figure 40 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique

Les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* (E_{MeOH}) et de ses fractions (F_{Hex} , F_{DCM} , F_{AE} et F_{Aq}) ont été traduites sous forme d'histogramme (Figure) 41.

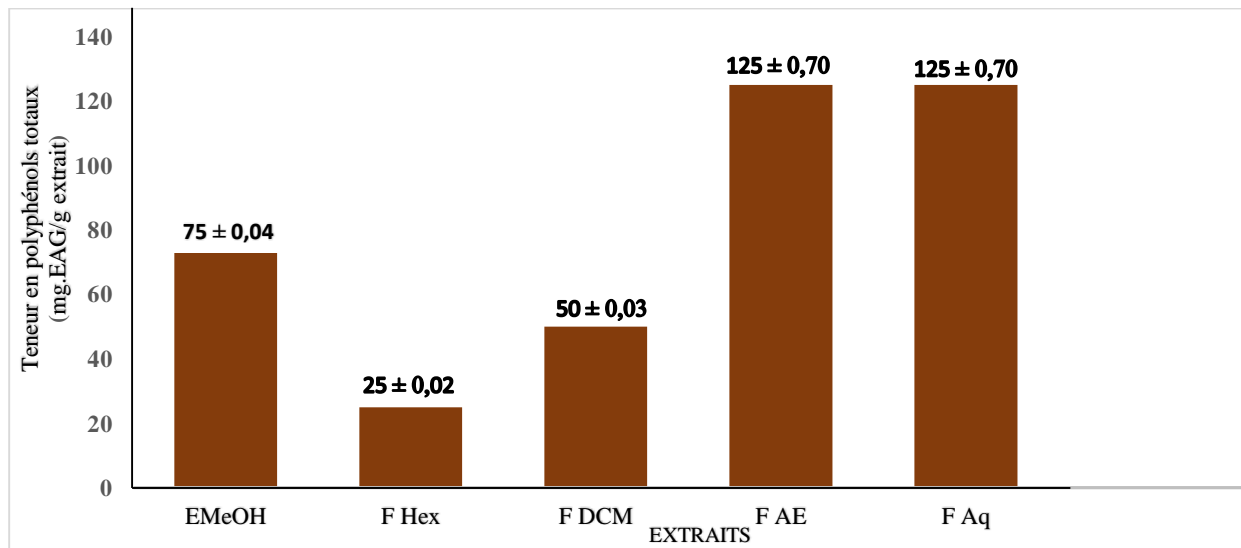


Figure 41 : Histogrammes des teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et de ses fractions

E_{MeOH} : extrait méthanolique ; F_{Hex} : fraction hexanique ; F_{DCM} : fraction dichlorométhane ; F_{AE} : fraction acétate d'éthyle ; F_{Aq} : fraction aqueuse résiduelle

On note que l'extrait méthanolique (E_{MeOH}) et ses fractions à l'acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueuse résiduelle (F_{Aq}) ont des teneurs en polyphénols totaux respectivement de 75 ± 0,04 mg.EAG/g d'extrait sec ; 125 ± 0,70 mg EAG/g d'extrait sec et 125 ± 0,70 mg EAG/g d'extrait sec.

Ils sont deux à trois fois plus riches en polyphénols que les fractions hexanique (F_{HEX}) et au dichlorométhane (F_{DCM}) qui ont respectivement des valeurs de $25 \pm 0,02$ et $50 \pm 0,03$ mg EAG/g d'extrait sec. La variabilité des teneurs en polyphénols est probablement due à la composition phénolique des extraits, aux conditions biotiques telles que l'espèce, l'état physiologique et aux conditions abiotiques (saison, climat et température) (Mounira, 2015). Cette différence confirme aussi que les polyphénols présents dans l'extrait brut méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* sont majoritairement glycosylés. Ils sont donc plus solubles dans le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'eau (Markham, 1982 ; Azwanida 2015). Les aglycones qui sont faiblement solubles dans les solvants hydrophiles, ont été très peu extraits par le méthanol. Cette proportion des polyphénols dans les feuilles de *T. heterophylla* pourrait neutraliser les radicaux libres et contribuer ainsi à prévenir diverses pathogènes dégénératives.

III.1.2.2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux

Pour déterminer les teneurs en flavonoïdes, la droite d'étalonnage (Figure 42) d'équation $y=0,9829x+0,0005$ avec un coefficient de régression $R^2 = 0,9985$ a été obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

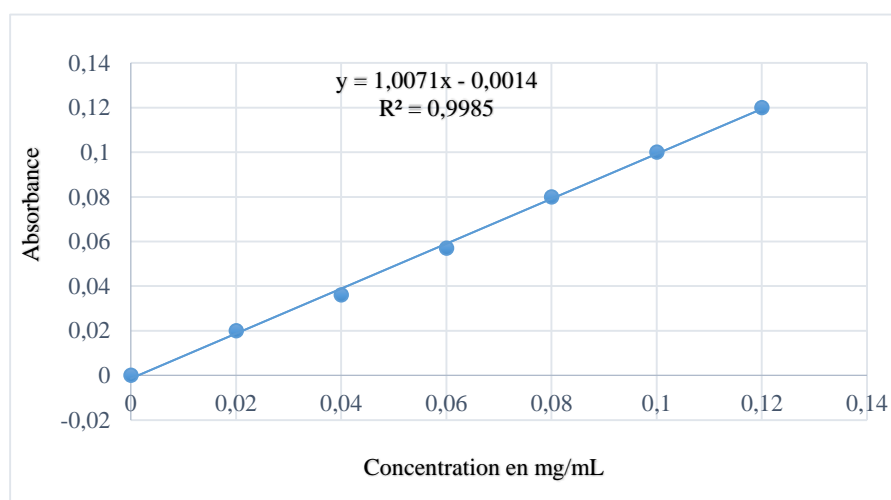


Figure 42 : Droite d'étalonnage de la quercétine

Les teneurs en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* (E_{MeOH}) et de ses fractions (F_{Hex} , F_{DCM} , F_{AE} et F_{Aq}) ont été traduites sous forme d'histogramme (Figure 43).

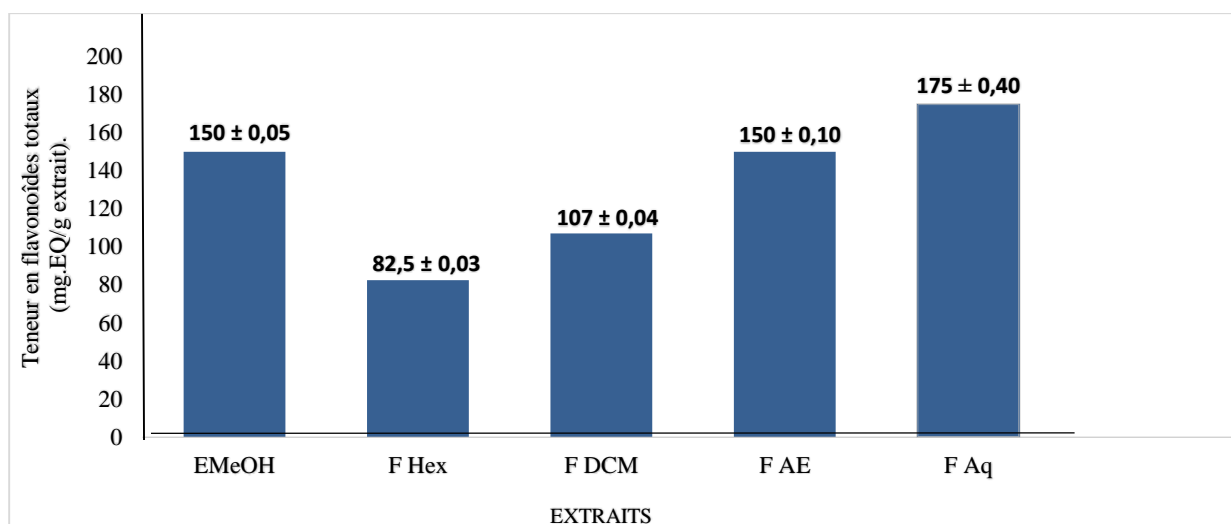


Figure 43 : Histogrammes des teneurs en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique et de ses fractions

E_{MeOH} : extrait méthanolique ; F_{Hex} : fraction hexanique ; F_{DCM} : fraction dichlorométhane ; F_{AE} : fraction acétate d'éthyle ; F_{Aq} : fraction aqueuse résiduelle

La figure 43 représente les teneurs en flavonoïdes de l'extrait méthanolique et ses fractions respectivement avec les valeurs $E_{MeOH} = 150 \pm 0,05$ mg EQ/g d'extrait sec ; $F_{Hex} = 82,5 \pm 0,03$ mg EQ/g d'extrait sec ; $F_{DCM} = 107 \pm 0,04$ mg. EQ/g d'extrait sec ; $F_{AE} = 150 \pm 0,10$ mg EQ/g d'extrait sec et $F_{Aq} = 175 \pm 0,40$ mg EQ/g d'extrait sec). Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec le criblage phytochimique qui montre que les flavonoïdes se retrouvent dans tous les extraits, apolaires comme polaires (Tableau V). Les teneurs en flavonoïdes augmentent lorsqu'on passe des fractions les moins polaires (F_{Hex}) aux plus polaires (F_{Aq}) (Figure 43). Par conséquent, les flavonoïdes contenus dans l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* seraient majoritairement glycosylés (Markham, 1982). Ainsi, les flavonoïdes non glycosylés (génines) se retrouvent dans les fractions hexane (F_{HEX}) et dichlorométhane (F_{DCM}) (Muyonga *et al.*, 2014). Quant aux flavonoïdes glycosylés, c'est plutôt dans les fractions acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueuse résiduelle (F_{Aq}) qu'ils se trouvent. 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'acétate d'éthyle et l'eau (Markham, 1982 ; Azwanida, 2015).

Les informations contenues dans la revue bibliographique révèlent que les polyphénols, les polyterpènes et les stérols sont des métabolites secondaires dont l'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel sont importants en raison de leur diversité structurale.

De ce fait, il est opportun d'identifier les structures de certains métabolites secondaires issus de ces grandes familles dans les feuilles de *T. heterophylla*.

III.1.3. Identification des constituants chimiques de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

Dans le but d'identifier les molécules de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla*, un traitement automatisé des données brutes par HPLC-ESI-QTOF-MS/MS a été fait à l'aide du logiciel Agilent MassHunter Workstation Software. Celui-ci fait ressortir les chromatogrammes, les spectres ESI-MS et MS/MS et génère une liste de formules brutes de données correspondant aux composés présents dans l'extrait brut. Puis, la structure correspondant à la formule la plus proche de la masse est retenue. Cette identification des composés s'est également faite grâce à la spectroscopie ultraviolet-visible (UV) et au couplage chromatographie liquide à haute performance (HPLC) / spectrométrie de masse tandem (MS/MS / QTOF).

III.1.3.1. Analyse par spectrométrie ultraviolet-visible

L'étude réalisée par spectrométrie UV aux longueurs d'ondes 254 nm et 280 nm a permis d'obtenir les chromatogrammes des figures 44 et 45.

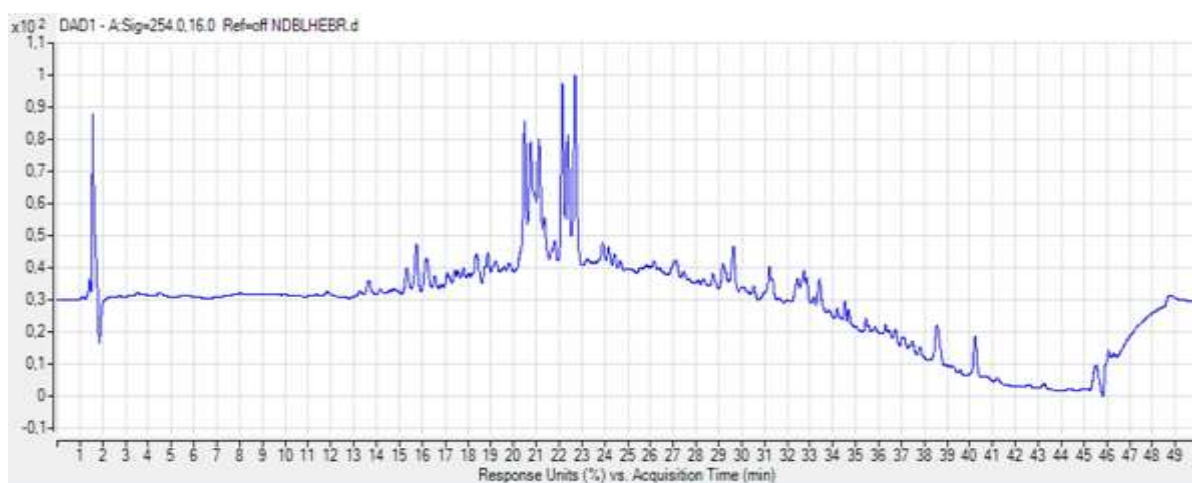


Figure 44 : Chromatogramme UV 254 nm de l'extrait MeOH des feuilles de *Turraea heterophylla*

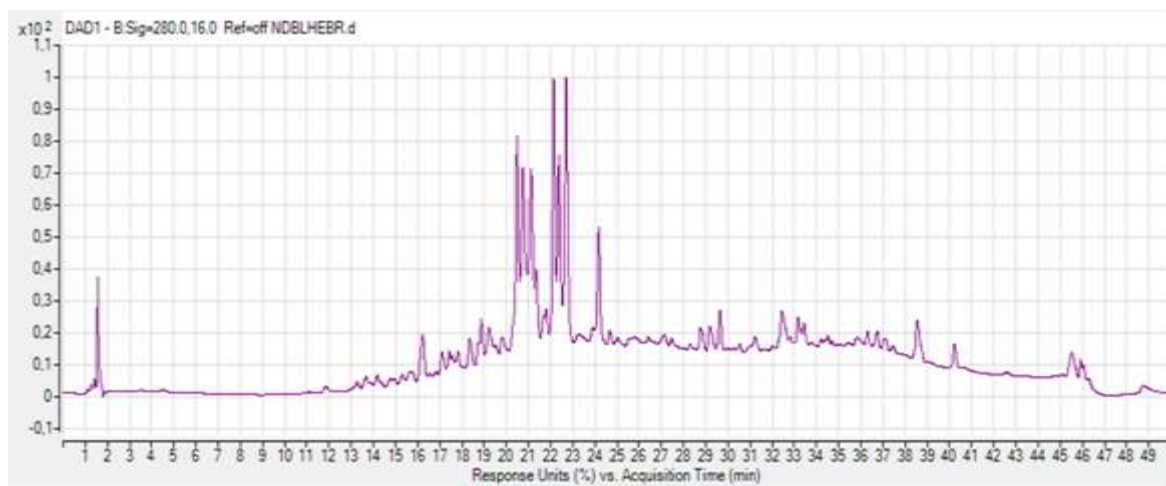


Figure 45 : Chromatogramme UV 280 nm de l'extrait MeOH des feuilles de *Turraea heterophylla*

On notera que les chromatogrammes obtenus aux longueurs d'onde 254 nm et 280 nm ont les profils similaires à quelques pics près. Les molécules observées à ces longueurs d'ondes (254 et 280 nm) sont celles possédant au moins une double liaison (C=C ou C=O) dans leur chaîne carbonée. Ces chromatogrammes UV permettent donc de caractériser des fonctions chimiques. Afin d'identifier les composés révélés à ces longueurs d'onde, il a été réalisé une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse à tandem (HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS).

III.1.3.2. Analyse par HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

L'analyse en couplage LC-MS/MS de l'extrait méthanolique brut des feuilles de *T. heterophylla* a conduit au spectre de masse LC-ESI-MS (Figure 46).

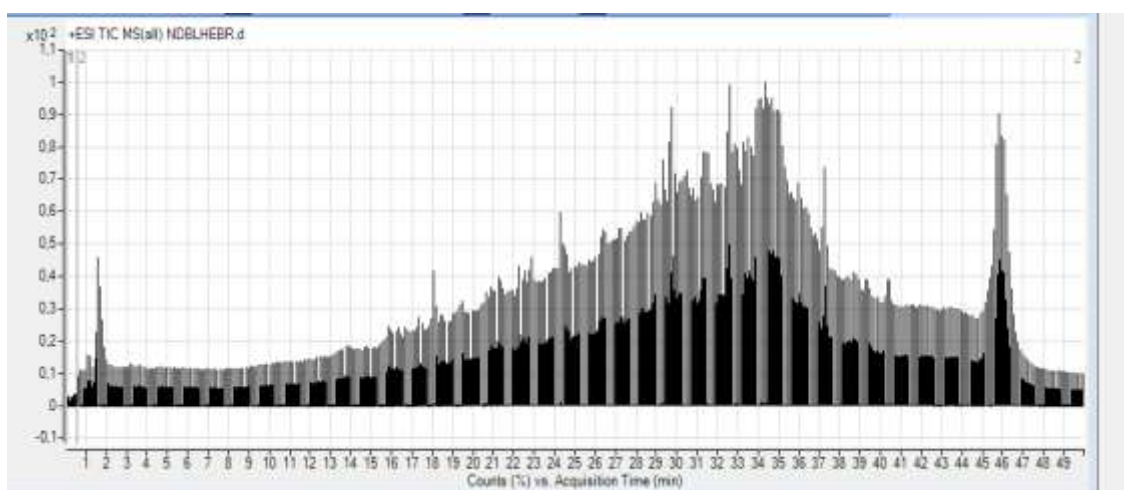


Figure 46 : Spectre en LC-ESI-MS de l'extrait méthanolique de feuilles de *Turraea heterophylla*

Le traitement du spectre de masse LC-ESI-MS par le logiciel Agilent MassHunter a donné le chromatogramme HPLC-ESI-Q-TOF-MS (Figure 47), qui révèle quarante cinq (45) pics correspondants aux composés majoritaires détectés.

En effet, le traitement de chaque pic de ce chromatogramme HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS par le logiciel MassHunter, et en confrontant les résultats aux données de la littérature, nous a permis d'identifier les structures de douze (12) composés.

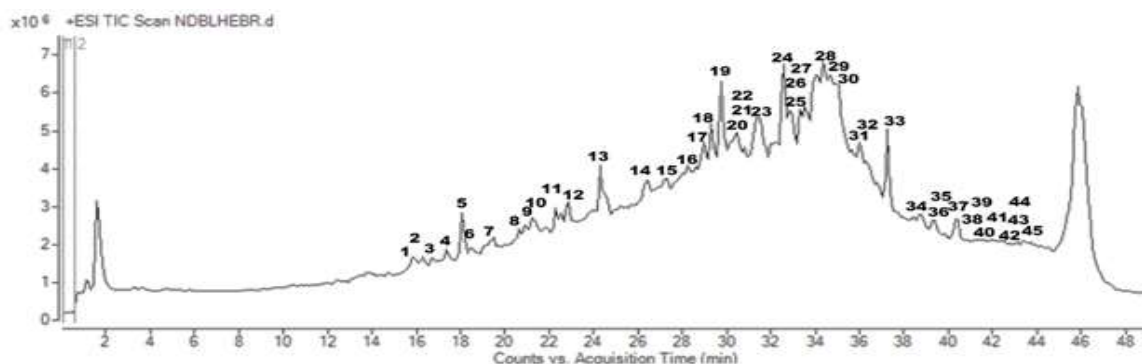


Figure 47 : Chromatogramme HPLC-ESI-Q-TOF-MS de l'extrait méthanolique des feuilles de *Turraea heterophylla*

III.1.3.3. Identification des limonoïdes

Les résultats des pics **7**, **24** et **25** (Figure 47) correspondent à des dérivés limonoïdes. Leurs structures ont été déterminées grâce aux données spectrales et conformément aux bases de données Reaxys® et Dictionary of Natural Products® (DNP) et de la littérature.

III.1.3.3.1. Identification du composé **7**

Sur le chromatogramme de la figure 47, le pic **7** qui apparaît au temps de rétention ($T_R = 19,125$ min) a été intégré pour donner le spectre ESI-MS (Figure 48).

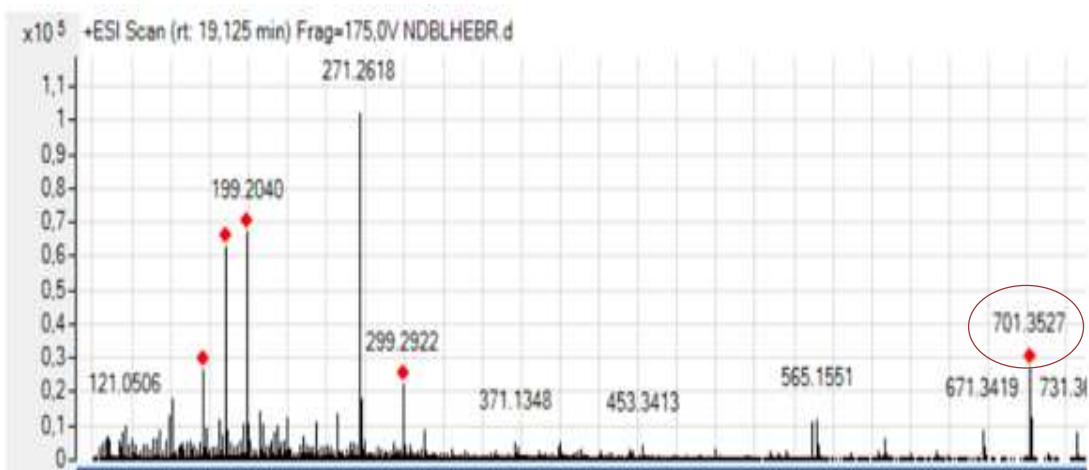


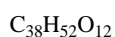
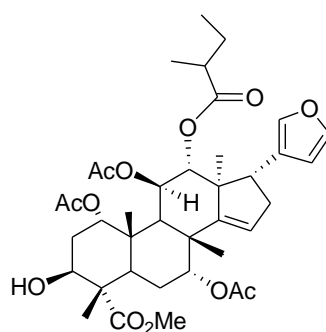
Figure 48 : Spectre en ESI-MS du composé **7**

Sur ce spectre, on observe le pic de l'ion moléculaire à $m/z = 701,3527$ $[M+H]^+$. Plusieurs formules brutes ont été proposées par le Logiciel MassHunter Workstation Software (Tableau VII). Parmi celles-ci, la formule $C_{38}H_{52}O_{12}$ a été retenue comme la meilleure au score (94,22) conformément aux données de la littérature. La masse molaire correspondant à cette formule est 700,3449 g/mol.

Tableau VII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 701,3527

Formula	Species	m/z	Diff (p)	Sc
C38 H52 O12	(M+H) ⁺	701.3527	-0,65	94,22
C39 H48 N4 O8	(M+H) ⁺	701.3527	1,15	93,39
C37 H46 N7 O7	(M+H) ⁺	701.3527	-0,88	92,65
C38 H42 N11 O3	(M+H) ⁺	701.3527	0,93	91,6
C36 H40 N14 O2	(M+H) ⁺	701.3527	-1,11	90,27
C45 H50 N4 O4 S	(M+H) ⁺	701.3527	-0,86	89,03
C41 H50 N9 O	(M+H) ⁺	701.3527	3,17	88,84
C36 H50 N3 O11	(M+H) ⁺	701.3527	-2,67	88,54
C40 H44 N8 O4	(M+H) ⁺	701.3527	2,95	87,52
C46 H46 N5 S	(M+H) ⁺	701.3527	0,95	87,16
C51 H44 N2 O	(M+H) ⁺	701.3527	-1,36	86,63
C35 H44 N10 O6	(M+H) ⁺	701.3527	-2,91	86,45
C31 H42 N17 O S	(M+H) ⁺	701.3527	1,06	85,54
C32 H48 N10 O6 S	(M+H) ⁺	701.3527	1,31	84,88
C43 H48 N4 O3 S	(M+H) ⁺	701.3527	-2,89	84,49
C29 H40 N20 S	(M+H) ⁺	701.3527	-1,01	84,03
C30 H46 N13 O5 S	(M+H) ⁺	701.3527	-0,74	83,95
C33 H54 N3 O11 S	(M+H) ⁺	701.3527	1,57	83,7
C34 H38 N17 O	(M+H) ⁺	701.3527	-3,15	83,53
C31 H52 N6 O10 S	(M+H) ⁺	701.3527	-0,48	83,39

Pour identifier la structure exacte correspondant à cette formule brute, les recherches ont été menées dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider, PubChem et de la littérature. Le seul composé correspondant est 28-nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-14,15-déoxyhavanensin-1,7-diacétate (7) (Figure 49).



Masse exacte : 700,3459

28-nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-
14,15-déoxyhavanensin-1,7-diacétate

Figure 49 : Structure du 28-nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-14,15-déoxyhavanensin-1,7-diacétate

Cette structure est conforme aux fragmentations MS/MS observées sur le spectre de fragmentation ESI-MS/MS (Figure 50).

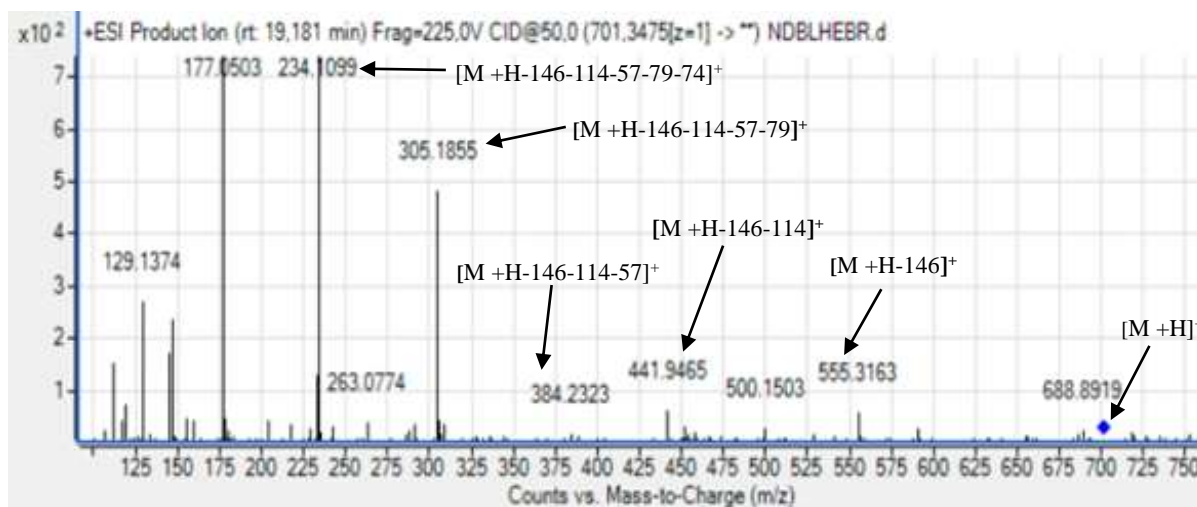


Figure 50 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **7**

Les fragments observés nous permettent de proposer une voie de fragmentation du composé **7** (Figure 51). En effet, le fragment observé à m/z : 555,3163 $[M+H-146]^+$ correspond à la perte de l'acide tiglique ($C_5H_8O_2$: m/z 100), suivie d'un réarrangement entraînant la perte d'un énoïl (C_2H_5O : m/z 46). Le fragment à m/z : 555,3163 $[M+H-146]^+$ perd deux groupements méthanoate de méthyle ($2C_2H_4O_2$: m/z 2×60), suivi d'un réarrangement conduisant à l'addition de six hydrogènes (+6H) pour donner le fragment à m/z : 441,2272 $[M+H-146-114]^+$. La perte des groupements : éthylène (C_2H_4 : m/z 28), méthyle (CH_3 : m/z 15) et l'eau (H_2O : m/z 18), suivie de réarrangement avec l'addition deux atomes d'hydrogène (+2H m/z : 2) aboutit au fragment à m/z : 384,2301 $[M+H-146-114-61]^+$. De même, le fragment à m/z 305,1855 $[M+H-146-114-61-79]^+$ correspondant à la perte d'un méthanoate de méthyle ($C_2H_4O_2$ m/z : 60) et du méthyle (CH_3 m/z :15), suivie d'un réarrangement. La perte d'un autre groupe de méthanoate de méthyle ($C_2H_4O_2$: m/z 60) et d'un méthyle (CH_3 m/z :15), suivie de réarrangement avec l'addition de trois atomes d'hydrogène (+3H m/z :3) ; conduit au fragment à m/z : 234,1409 $[M+H-146-114-61-79-74]^+$.

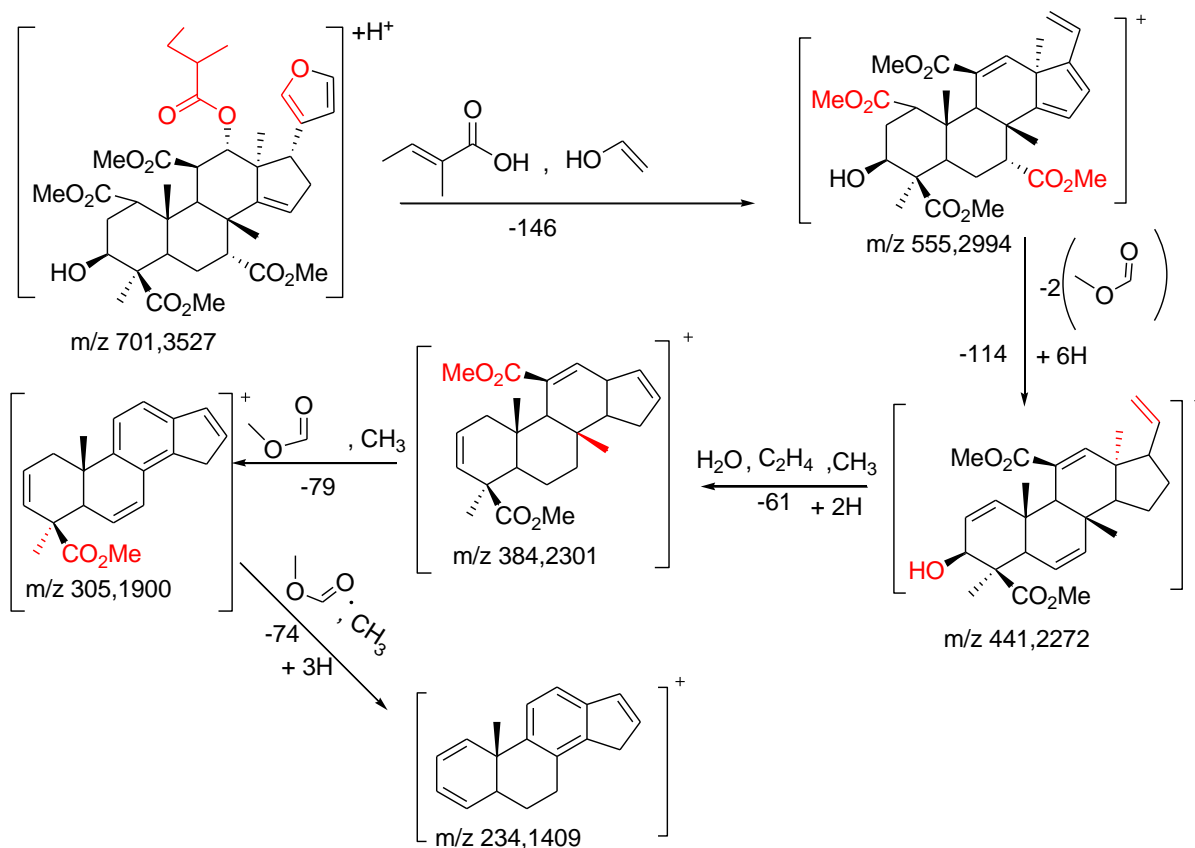


Figure 51 : Schéma de fragmentation du 28- nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-14,15-déoxyhavanensin-1,7-diacétate (**7**)

Cette fragmentation est caractéristique des limonoïdes ; surtout celle à m/z 555 [M+H-acide tiglique]⁺ (Akrofi, 2011). Ce composé naturel connu est un limonoïde et abondant dans les espèces du genre *Turraea*. En effet, il a été déjà isolé de *Turraea floribunda* (Torto *et al.*, 1995 ; McFarland *et al.*, 2004), de *Turraea holstii* (Mulholland *et al.*, 1998 ; Mulholland *et al.*, 1999) et de *Turraea wakefieldii* (Ndung'u *et al.*, 2004). Ce limonoïde identifié pourrait traiter l'infection urinaire (Torto *et al.*, 1995 ; McFarland *et al.*, 2004).

III.1.3.3.2. Identification du composé 24

Le composé correspondant au pic 24 ($T_R = 32,593$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 425,2723$ (Figure 52).



Figure 52 : Spectre ESI-MS du composé 24

Le Logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes (Tableau VIII). Parmi celles-ci, la formule $C_{27}H_{36}O_4$ a été retenue au score (72,78) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 424,2645 g/mol.

Tableau VIII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 425,2688

Formula	Species	m/z	Diff (p)	Sc
C28 H32 N4	(M+H)+	425.2688	0,98	74,95
C27 H36 O4	(M+H)+	425.2688	-2,01	72,78
C30 H34 N O	(M+H)+	425.2688	4,26	67,33
C25 H34 N3 O3	(M+H)+	425.2688	-5,31	63,04
C20 H36 N6 O2 S	(M+H)+	425.2688	-0,77	61,83
C13 H28 N16 O	(M+H)+	425.2688	1,31	60,69
C22 H38 N3 O3 S	(M+H)+	425.2688	2,56	60,17
C14 H34 N9 O6	(M+H)+	425.2688	1,74	58,1
C12 H32 N12 O5	(M+H)+	425.2688	-1,68	56,24
C15 H30 N13 O2	(M+H)+	425.2688	4,71	54,62
C18 H34 N9 O S	(M+H)+	425.2688	-4,11	54,05
C19 H40 N2 O6 S	(M+H)+	425.2688	-3,72	53,91
C13 H36 N12 S2	(M+H)+	425.2688	0,3	53,36
C16 H36 N6 O7	(M+H)+	425.2688	5,13	51,09
C24 H40 O4 S	(M+H)+	425.2688	5,88	50,6
C23 H32 N6 O2	(M+H)+	425.2688	-8,62	49,4
C15 H38 N9 O S2	(M+H)+	425.2688	3,69	48,43
C17 H38 N5 O5 S	(M+H)+	425.2688	-7,08	40,58
C16 H32 N12 S	(M+H)+	425.2688	-7,48	40,45
C17 H40 N6 O2 S2	(M+H)+	425.2688	7,06	37,14
C21 H30 N9 O	(M+H)+	425.2688	-11,95	37,01

La détermination de la structure exacte correspondant à cette formule brute est recherchée dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider et PubChem. Ainsi, le composé correspondant est la 1,2- dihydroazadirone (**24**) (Figure 53).

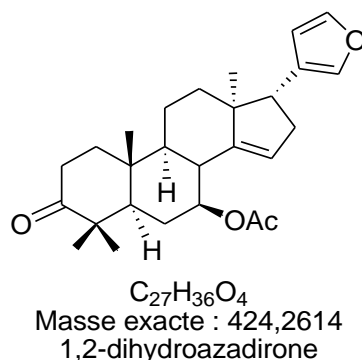


Figure 53 : Structure de la 1,2- dihydroazadirone (**24**)

Pour confirmer cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 55) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 54).

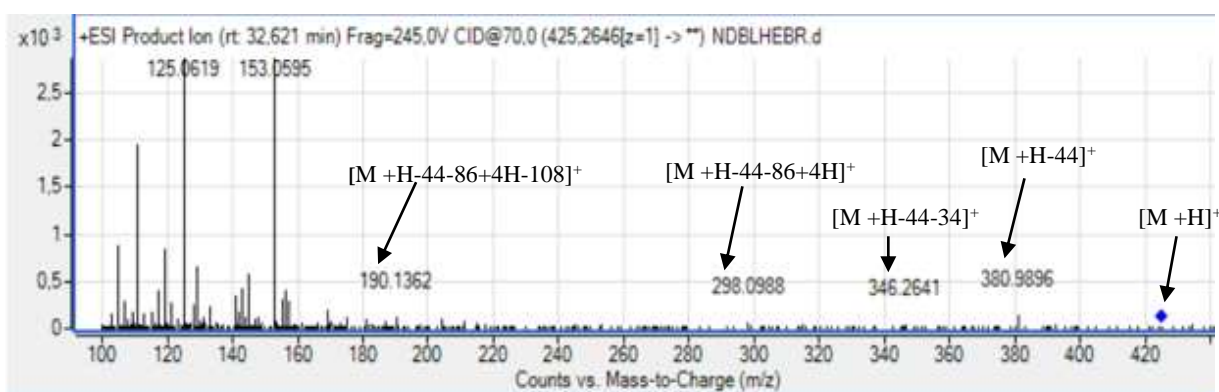


Figure 54 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **24**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 425,2728 ($[M+H]^+$) perd le groupement éthanal (C_2H_4O : m/z : 44) pour donner le fragment observé à m/z : 380,2351 $[M+H-44]^+$. La perte d'une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18), d'un groupement méthyle (CH_3 : m/z : 15), suivie d'un réarrangement conduit au fragment à m/z : 346,1933 $[M+H-44-34]^+$. A partir du fragment à m/z : 380,2351 $[M+H-44]^+$, la perte du noyau furane (C_4H_4O : m/z : 68), d'une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18) accompagnée d'un réarrangement avec l'addition de quatre atomes d'hydrogène (+4H) aboutit au fragment à m/z : 298,2297 $[M+H-44-86+4H]^+$.

Ce dernier fragment subit un réarrangement avec la perte de (C_8H_{12} : m/z : 108) pour donner le fragment à m/z : 190,1358 $[M+H-44-86+4H-108]^+$.

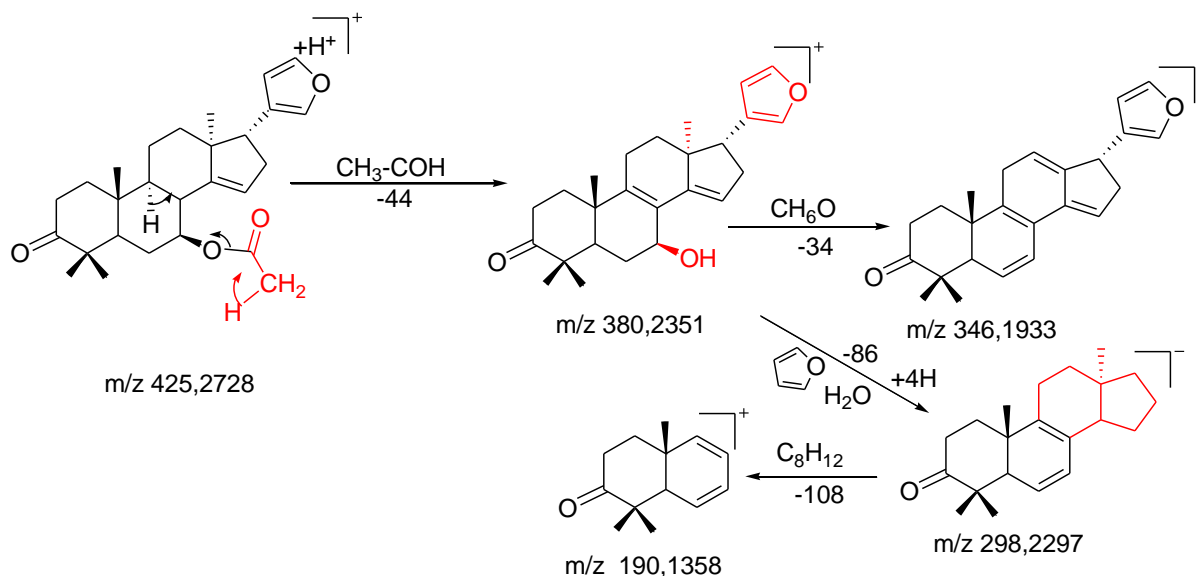


Figure 55 : Schéma de fragmentation de la 1,2-dihydroazadirone (24)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure de la 1,2-dihydroazadirone qui est aussi un dérivé limonoïde connu, car déjà isolé des écorces de racine de *Turraea robusta* (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992). Ce limonoïde connu pourrait traiter les maux d'estomac, la diarrhée et des troubles gastriques (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992).

III.1.3.3.3. Identification du composé 25

Le composé correspondant au pic 25 ($T_R = 32,944$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 457,2954$ (Figure 56).

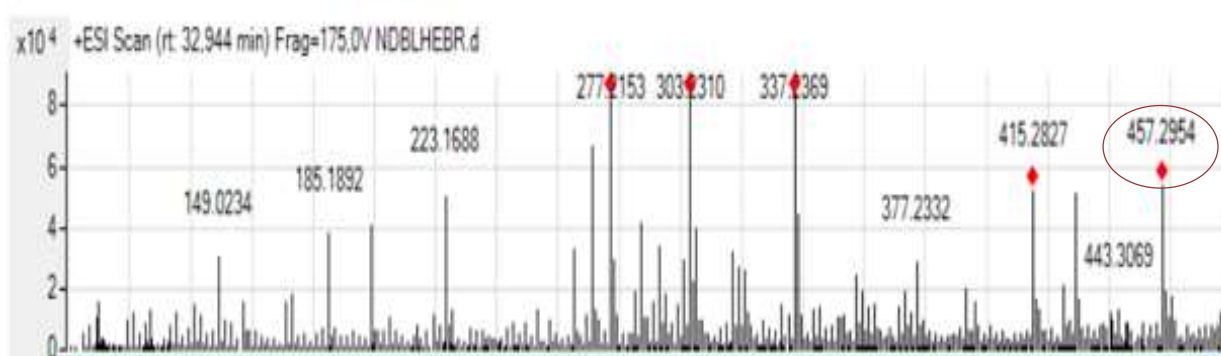


Figure 56 : Spectre ESI-MS du composé 25

Le Logiciel MasHunter a proposé plusieurs formules brutes correspondant à cette valeur de $[M+H]^+$ (Tableau IX). Parmi celles-ci, la formule $C_{28}H_{40}O_5$ a été retenue au score (73,75) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 456,2876 g/mol.

Tableau IX : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 457,2954

Formula	Species	m/z	Diff (p)	Sc
C29 H44 S2	(M+H)+	457.2954	-2,14	80,85
C29 H36 N4 O	(M+H)+	457.2954	0,62	74,7
C28 H40 O5	(M+H)+	457.2954	-2,11	73,75
C23 H42 N3 O4 S	(M+H)+	457.2954	0,58	73,2
C26 H48 S3	(M+H)+	457.2954	4,82	72,84
C27 H34 N7	(M+H)+	457.2954	-2,54	70,27
C31 H38 N O2	(M+H)+	457.2954	3,77	69,99
C16 H42 N9 O2 S2	(M+H)+	457.2954	0,88	69,61
C25 H44 O5 S	(M+H)+	457.2954	3,79	68,78
C24 H38 N7 S	(M+H)+	457.2954	3,31	68,73
C21 H40 N6 O3 S	(M+H)+	457.2954	-2,64	68,23
C15 H38 N9 O7	(M+H)+	457.2954	0,93	65,8
C18 H44 N6 O3 S2	(M+H)+	457.2954	4,11	64,97
C14 H40 N12 O S2	(M+H)+	457.2954	-2,37	64,87
C26 H39 Cl N5	(M+H)+	457.2954	-0,6	64,34
C14 H32 N16 O2	(M+H)+	457.2954	0,25	62,98
C26 H38 N3 O4	(M+H)+	457.2954	-5,26	62,68
C28 H41 Cl N2 O	(M+H)+	457.2954	2,5	61,96
C13 H36 N12 O6	(M+H)+	457.2954	-2,37	61,38
C17 H40 N6 O8	(M+H)+	457.2954	4,18	60,59
C16 H34 N13 O3	(M+H)+	457.2954	3,58	59,7
C25 H43 Cl N O4	(M+H)+	457.2954	-3,36	58,94

Deux spectres ESI-MS/MS ont été générés par le Logiciel MassHunter Workstation Software ; cela suppose que le pic **25** présente deux isomères qui seront représentés par **25A** et **25B** (Figure 57). Les recherches effectuées dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider, PubChem et de la littérature ont permis de proposer deux structures possibles pour le composé **25** (**25A**, **25B**).

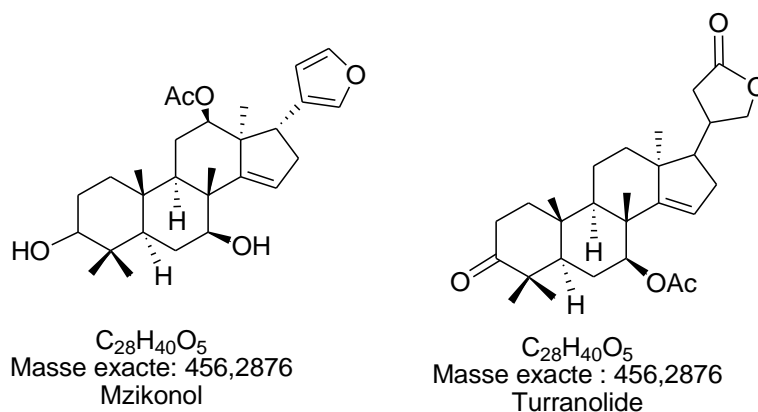


Figure 57 : Structure des isomères du composé **25** (**25A** et **25B**)

Pour différencier ces isomères, l'analyse des spectres de fragmentation ESI-MS/MS (Figures 58 et 60) a été déterminante. L'interprétation des fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 58) a permis de proposer une voie de fragmentation (Figure 59) pouvant aboutir à la structure du composé **25A**.

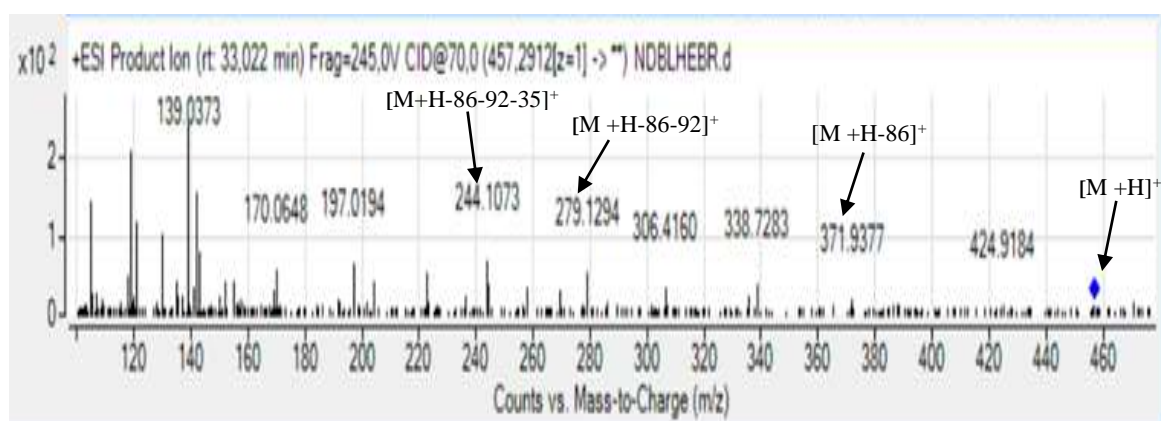


Figure 58 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **25A**

L'ion moléculaire à m/z 457,2954 $[M+H]^+$ perd un noyau de furane (C_4H_4O : m/z : 68) et une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18) pour donner le fragment observé à m/z : 371,2581 $[M+H-86]^+$. Ce même fragment perd le méthanoate de méthyle ($C_2H_4O_2$: m/z : 60), un méthyle et une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18) pour aboutir au fragment observé à m/z : 279,2107 $[M+H-86-92]^+$. Ce dernier fragment perd deux groupements méthyle ($2CH_3$: m/z : 2×15) et cinq atomes d'hydrogène ($-5H$) pour donner le fragment à m/z : 244,1252 $[M+H-86-92-35]^+$.

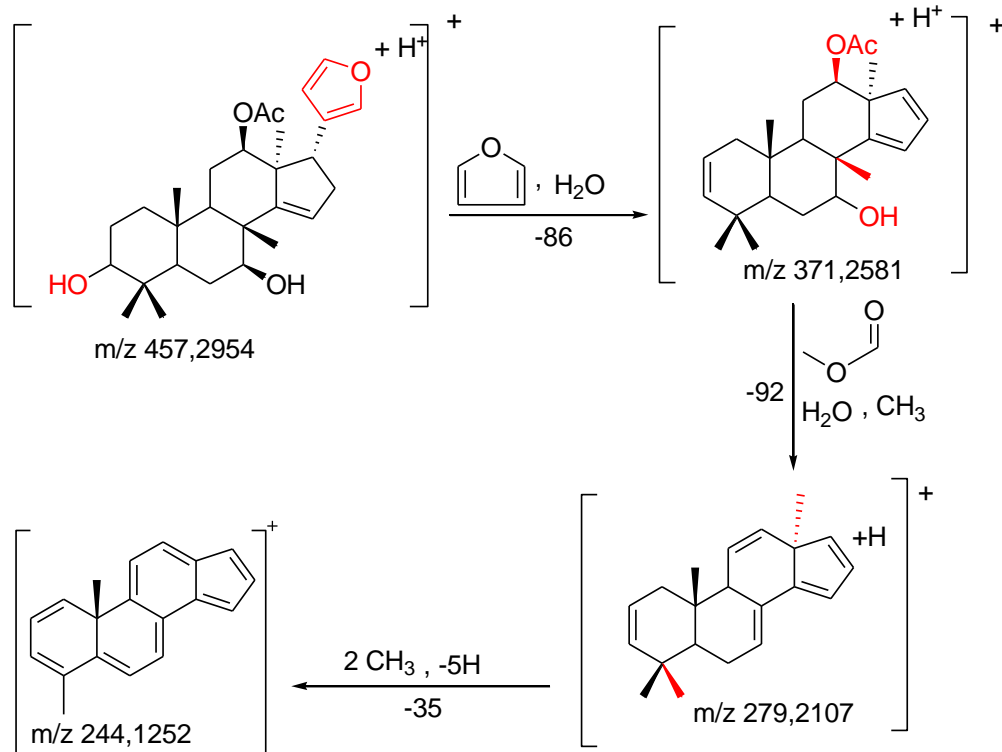


Figure 59 : Schéma de fragmentation du Mzikonol (25A)

Ce schéma de fragmentation nous a permis de conclure qu'il s'agit du Mzikonol (25A) (Figure 57). Ce composé est un limonoïde connu, déjà isolé de *Turraea robusta* (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992). Ce limonoïde connu pourrait traiter les maux d'estomac, la diarrhée et des troubles gastriques (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992).

L'interprétation des fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 60) a permis de proposer une voie de fragmentation (Figure 61) pouvant aboutir à la structure du composé 25B.

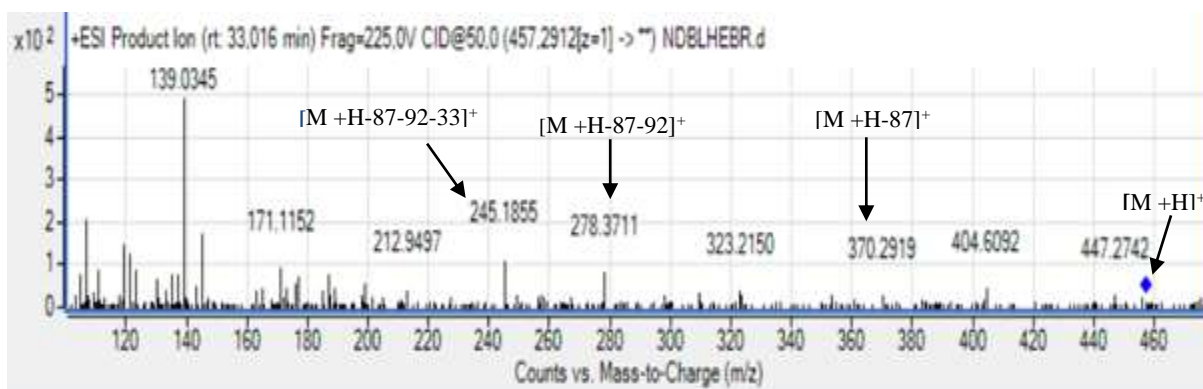


Figure 60 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé 25B

Sur le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 457,2954 $[M+H]^+$ perd une lactone ($C_4H_6O_2$: m/z : 86), suivi d'un réarrangement avec l'élimination d'un atome d'hydrogène pour donner le fragment observé à m/z : 370,2508 $[M+H-86]^+$. Ce fragment perd à son tour le méthanoate de méthyle ($C_2H_4O_2$: m/z : 60) et deux groupements méthyle ($2CH_3$: m/z : 2×15) pour aboutir au fragment observé à m/z : 278,1671 $[M+H-87-92]^+$. Enfin, ce dernier fragment perd un méthyle (CH_3 : m/z : 15) et une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18), suivie d'un réarrangement pour conduire au fragment à m/z : 245,1409 $[M+H-87-92-33]^+$.

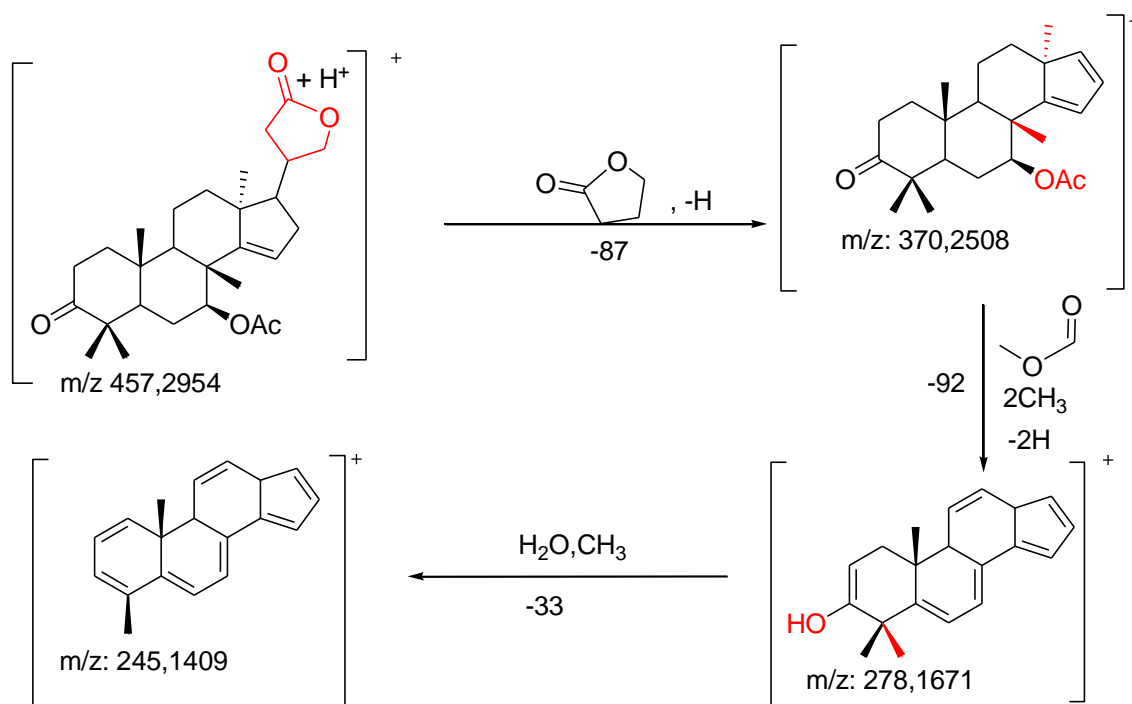


Figure 61 : Schéma de fragmentation de la Turranolide (**25B**)

Ce schéma de fragmentation nous a permis de conclure qu'il s'agit de la Turranolide(**25B**) (Figure 57). Cette molécule est un limonoïde connu, car déjà isolé de *Turraea robusta* (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992). Ce limonoïde pourrait traiter les maux d'estomac, la diarrhée et des troubles gastriques (Rajab *et al.*, 1988 ; Bentley *et al.*, 1992).

III.1.3.3.4. Identification des stéroïdes

Les résultats des pics (**8**, **20**, **23**, **30**, **35**, **38** et **39**) (Figure 47) révèlent des stéroïdes. Leurs structures ont été déterminées grâce aux données spectrales et conformément aux bases de données Reaxys® et Dictionary of Natural Products® (DNP).

III.1.3.3.4.1. Identification du composé 8

Le composé correspondant au pic 8 ($T_R = 18,071$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 415,2052$ (Figure 62).



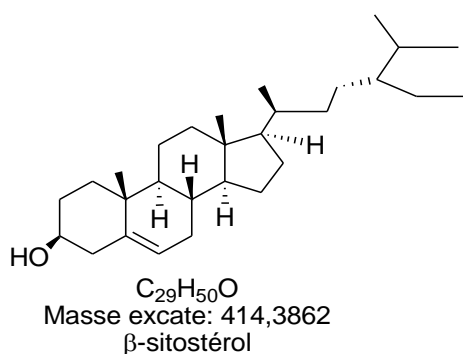
Figure 62 : Spectre ESI-MS du composé 8

Le Logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes (Tableau X). Parmi celles-ci, la formule $C_{31}H_{26}O$ a été retenue au score (83,31) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 414,3862 g/mol.

Tableau X : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 415,2062

Formula	Species	m/z	Diff (ppm)	Score
C16 H32 N O11	(M+H)+	415.2062	-3,67	84,15
C18 H32 N5 O2	(M+H)+	415.2062	0,6	83,88
C31 H26 O	(M+H)+	415.2062	-1,49	83,31
C15 H26 N8 O6	(M+H)+	415.2062	-4,13	82,8
C20 H26 N6 O4	(M+H)+	415.2062	5,81	81,57
C14 H20 N15 O	(M+H)+	415.2062	-4,6	80,76
C11 H24 N15 O	(M+H)+	415.2062	2,77	79,78
C17 H36 N O6 S	(M+H)+	415.2062	-2,44	79,54
C16 H30 N8 O S	(M+H)+	415.2062	-2,85	79,14
C20 H34 N2 O3	(M+H)+	415.2062	4,03	78,52
C12 H30 N8 O6	(M+H)+	415.2062	3,27	78,1
C28 H30 O S	(M+H)+	415.2062	6,06	76,91
C29 H24 N3	(M+H)+	415.2062	-4,86	76,33
C21 H28 N5 O2	(M+H)+	415.2062	-7,25	76,22
C13 H26 N12 O	(M+H)+	415.2062	6,29	71,96
C14 H32 N5 O7	(M+H)+	415.2062	6,77	69,71
C18 H40 N O S4	(M+H)+	415.2062	-0,58	69,01
C22 H28 N3 O5	(M+H)+	415.2062	9,24	69
C14 H30 N4 O1	(M+H)+	415.2062	-7,14	68,7
C11 H32 N11 S3	(M+H)+	415.2062	1,59	67,9
C21 H22 N10	(M+H)+	415.2062	8,87	67,67
C15 H34 N4 O5	(M+H)+	415.2062	-5,89	67,1
C13 H24 N11 O	(M+H)+	415.2062	-7,63	66,93

Pour déterminer la structure exacte correspondant à cette formule brute, les recherches ont été menées dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider et PubChem. Le composé correspondant est le β -sitostérol (Figure 63).

**Figure 63** : Structure du β -sitostérol (8)

Pour confirmer cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 65) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 64).

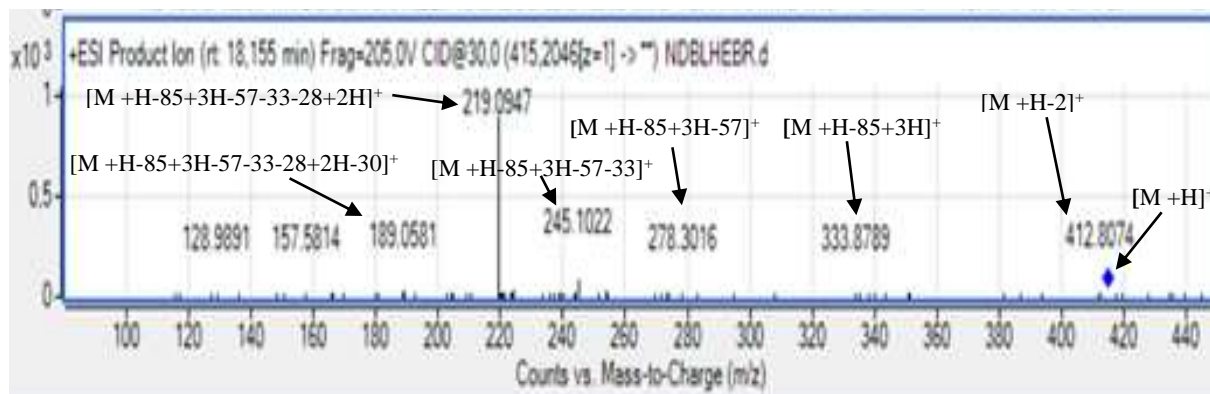


Figure 64 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **8**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 415,2062 $[M+H]^+$ perd deux atomes d'hydrogène (-2H) pour donner le fragment observé à m/z : 412,3705 $[M+H-2]^+$. A partir du fragment à m/z : 415,2062 ($[M+H]^+$), l'élimination du groupement alkyl (C_6H_{13} : m/z : 85) accompagnée de réarrangement avec l'addition de trois atomes d'hydrogène (+3H) aboutit au fragment à m/z : 333,8589 $[M+H-85+3H]$. La perte du groupement butyle (C_4H_9 : m/z : 57) conduit au fragment à m/z : 278,3015 $[M+H-85+2H-57]^+$. Cet ion fragment à m/z : 278,3015 $[M+H-85+2H-57]^+$, subit à son tour l'élimination d'un groupement méthyle (CH_3 : m/z : 15) et d'une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18), pour donner le fragment à m/z : 345,2348 $[M+H-85+2H-57-33]^+$. La perte d'une unité (C_2H_4 : m/z : 28), suivie de réarrangement avec l'addition de deux atomes d'hydrogène (+2H) conduit au fragment à m/z : 219,2191 $[M+H-85+2H-57-33-28]^+$. Ce dernier fragment subit la perte de deux groupements méthyle (CH_3 : m/z : 2×15) traduisant le fragment à m/z : 189,0581 $[M+H-85+2H-57-33-28-30]^+$.

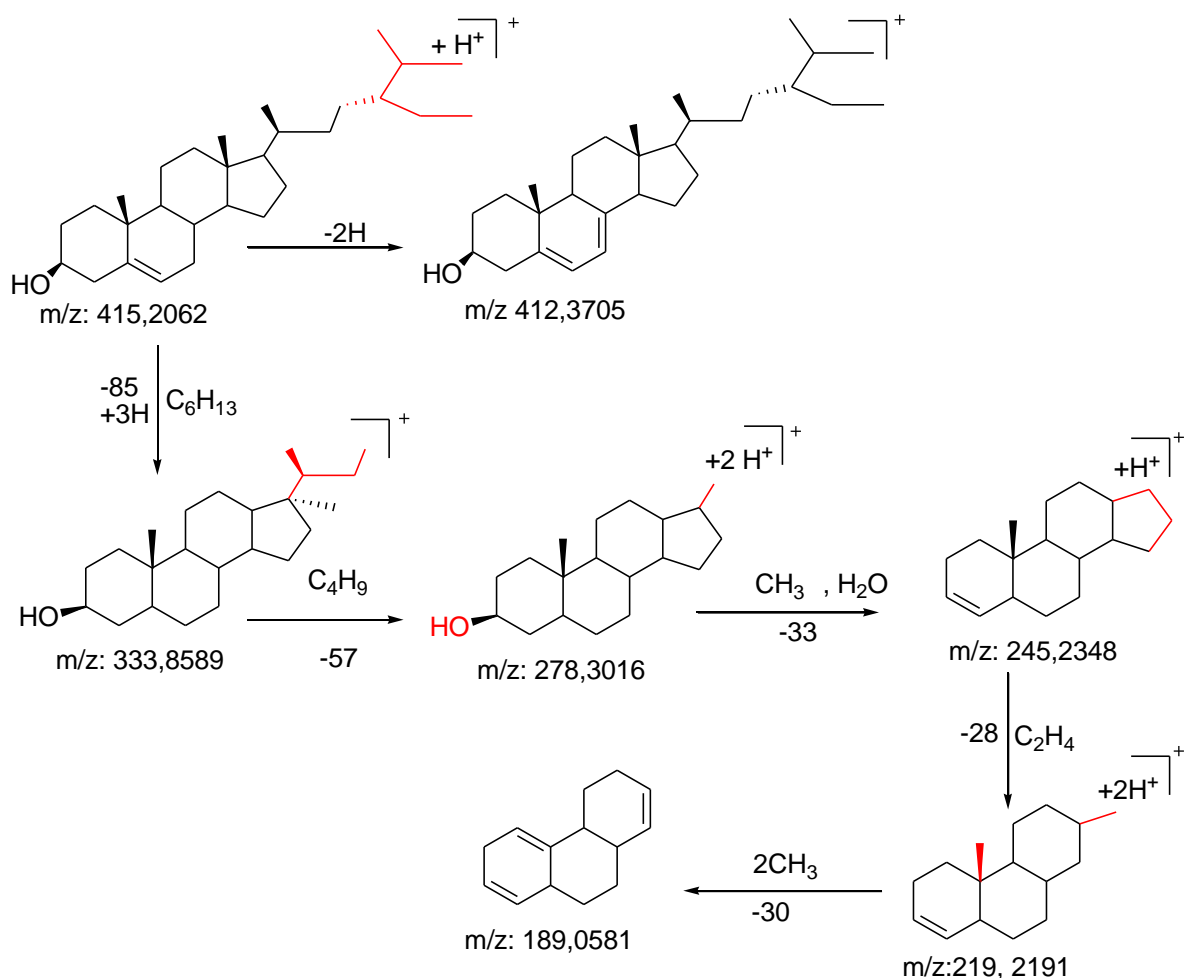


Figure 65 : Schéma de fragmentation du β -sitostérol (8)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure du β -sitostérol qui est un dérivé stéroïdique connu, car déjà isolé de *Turraea nilotica* (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley *et al.*, 1995), de *Turraea floribunda* (Torto *et al.*, 1995 ; McFarland *et al.*, 2004) et de *Turraea holstii* (Mulholland *et al.*, 1998). En effet, β -sitostérol serait efficace dans le traitement du cancer et de la prostate (Berges *et al.* 2000 ; Jourdain *et al.*, 2006). Ce stéroïde fait diminuer la concentration de "mauvais" cholestérol (LDL) sans faire baisser le taux de "bon" cholestérol (HDL) (Lecerf, 2006). Le stress oxydatif induit par la glucose oxydase et la peroxydation lipidique, pourrait être évité par incorporation de β -sitostérol dans la membrane cellulaire (Shi *et al.*, 2013). L'administration de β -sitostérol favorise la sensibilité à l'insuline (Radika *et al.*, 2013) et réduit les taux de glucose et d'oxyde nitrique sur des rats diabétiques ; le β -sitostérol est donc un excellent antidiabétique. Le β -sitostérol a aussi montré un effet protecteur sur le tissu pancréatique avec l'amélioration de l'antioxydant pancréatique (Gupta *et al.*, 2011).

Par ailleurs, Ovesna *et al.* (2004) ont montré expérimentalement l'inhibition du développement du cancer du côlon et du sein par le β -sitostérol. En outre, β -sitostérol a été aussi isolé des racines et des écorces de tige de *Trichilia rubescens*. L'activité anti-plasmodiales évaluée contre les stades érythrocytaires de la souche 3D7 *Plasmodium falciparum*, a présenté une activité *in vitro* anti-plasmodiale significative avec une valeur de CI_{50} de 1,13 M (Gabay *et al.*, 2010).

III.1.3.3.4.2. Identification du composé 20

Le composé correspondant au pic 20 ($T_R=30,836$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 333,2417$ (Figure 66).

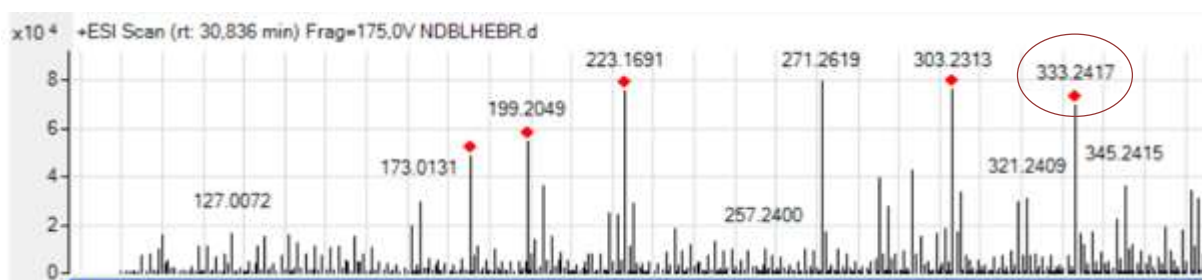


Figure 66 : Spectre ESI-MS du composé 20

Le Logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes (Tableau XI). Parmi celles-ci, la formule $C_{31}H_{26}O$ a été retenue au score (59,75) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 332,2351 g/mol.

Tableau XI : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 333,2417

Formula	Species	m/z	Diff (ppm)	Score
C17 H36 N2 S2	(M+H)+	333.2417	-3,26	79,39
C17 H28 N6 O	(M+H)+	333.2417	0,81	66,16
C12 H30 N9 S	(M+H)+	333.2417	3,85	65,31
C16 H32 N2 O5	(M+H)+	333.2417	-2,93	64,06
C14 H31 Cl N7	(M+H)+	333.2417	-0,68	63,99
C15 H26 N9	(M+H)+	333.2417	-3,68	60,71
C16 H33 Cl N4	(M+H)+	333.2417	3,62	60,45
C19 H30 N3 O2	(M+H)+	333.2417	-2,03	60,16
C21 H32 O3	(M+H)+	333.2417	2,19	59,75
C14 H32 N6 O S	(M+H)+	333.2417	8,35	53,34
C18 H35 Cl N O	(M+H)+	333.2417	7,89	47,51
C16 H34 N3 O2	(M+H)+	333.2417	12,82	40,75
C24 H30 N	(M+H)+	333.2417	10,2	35,56

L'identification de la structure exacte, correspondant à cette formule brute est recherchée dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider et PubChem. Ainsi, le composé correspondant est Villostérol (**20**) (Figure 67).

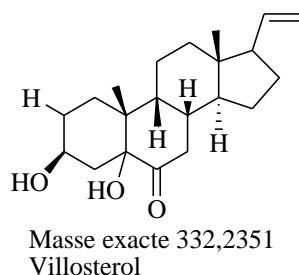


Figure 67 : Structure de villostérol (**20**)

Pour confirmer cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 69) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 68).

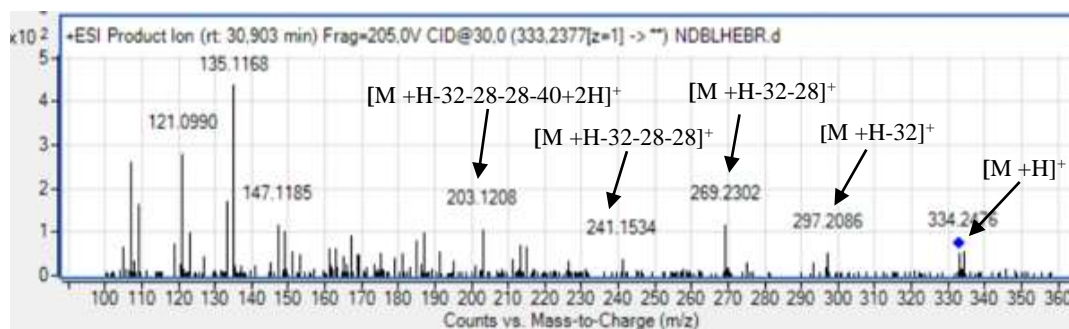


Figure 68 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **20**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 333,2417 $[M+H]^+$ perd deux molécules d'eau (H_2O : m/z : 2x18) pour aboutir au fragment observé à m/z : 297,2140 $[M+H-32]^+$. Ce fragment subit la perte d'un groupement carbonyle ($C=O$: m/z : 28) qui conduit au fragment à m/z : 269,2191 $[M+H-32-28]^+$. Ainsi, ce fragment obtenu perd à son tour la molécule d'éthylène (C_2H_4 : m/z : 28) pour donner le fragment observé à m/z : 241,1951 $[M+H-32-28-28]^+$. Enfin, ce dernier fragment perd une unité (C_3H_4 : m/z : 40), accompagné de réarrangement avec l'addition de deux atomes d'hydrogène (+2H) pour aboutir au fragment à m/z : 203,1722 $[M+H-32-28-28-40+2H]^+$. De plus, les ions fragments les plus courants $[M+H-18]^+$ et $[M+H-28]^+$, correspondant à la molécule d'eau (H_2O : m/z : 18) et au groupement carbonyle ($C=O$: m/z : 28) sont caractéristiques des stéroïdes et aussi bien connus d'autres terpénoïdes (Yuan *et al.*, 2013).

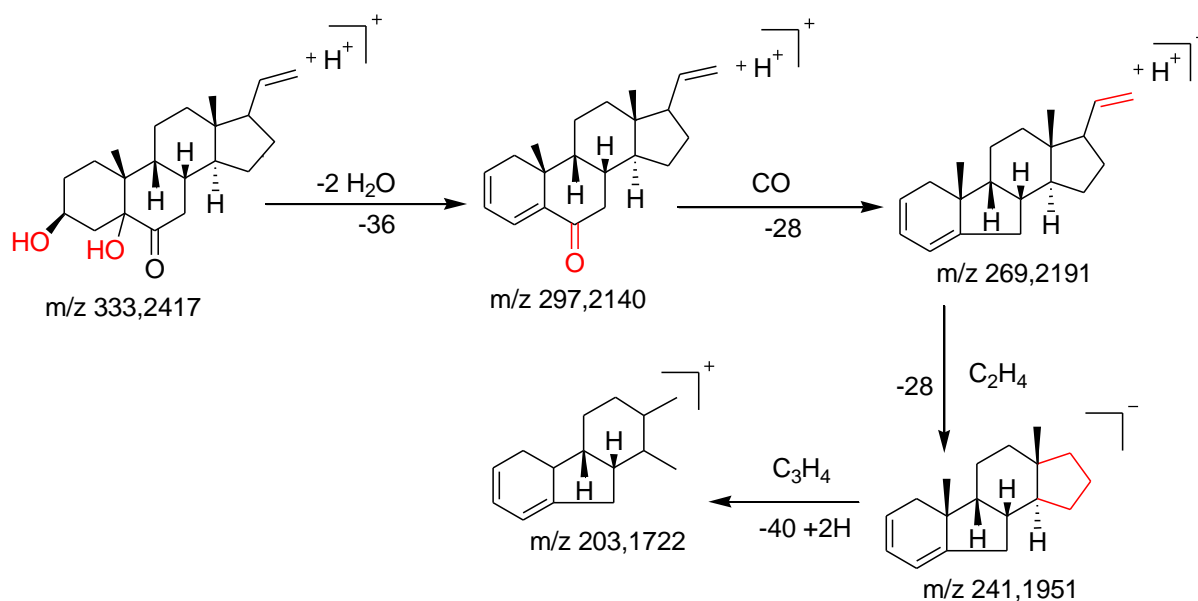


Figure 69 : Schéma de fragmentation du villostérol (**20**)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure du Villostérol qui est un dérivé stéroïdique connu. En effet, il a été déjà isolé de *Turraea Villosa* (Chiplunka *et al.*, 1993), de *Turraea obtusifolia* (Mulholland *et al.*, 1999 ; Sarker *et al.*, 1997) et de *Turraea pubescens* (Yuan *et al.*, 2013). Ce stéroïde serait efficace pour traiter le cancer et la diarrhée (Chiplunkar *et al.*, 1993). Le composé villostérol a présenté une activité inhibitrice contre la production d'oxyde nitrique (NO) induite par les lipopolysaccharides (LPS) dans les cellules RAW264,7 avec une valeur CI_{50} de 11,5 μ M (Yuan *et al.*, 2013).

III.1.3.3.4.3. Identification du composé 23

Le composé correspondant au pic **23** ($T_R = 32,241$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 345,2428$ (Figure 70).

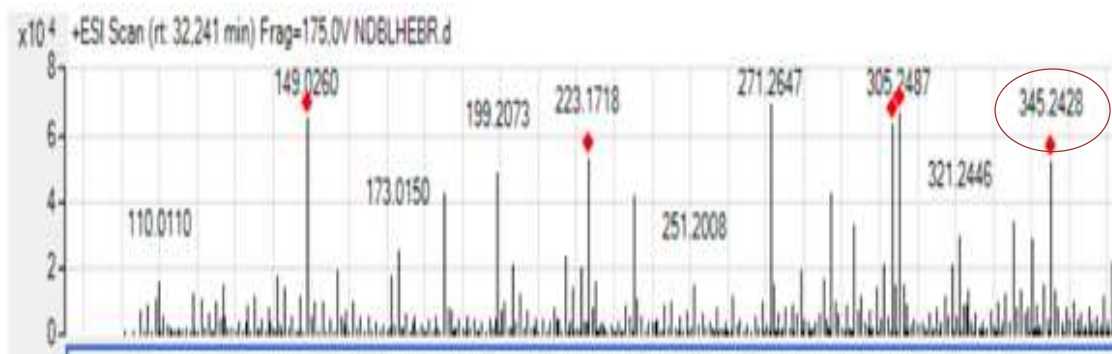


Figure 70 : Spectre ESI-MS du composé **23**

Le Logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes (Tableau XII). Parmi celles-ci, la formule $C_{22}H_{32}O_3$ a été retenue au score (80,32) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 344,2350 g/mol.

Tableau XII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 345,2428

Formule	Species	m/z	Diff (p)	Sc
$C_{22}H_{32}O_3$	(M+H)⁺	345.2424	0,06	80,32
$C_{20}H_{30}N_3O_2$	(M+H) ⁺	345.2424	-4,04	73,66
$C_{15}H_{32}N_6OS$	(M+H) ⁺	345.2424	1,5	66,13
$C_{25}H_{30}N$	(M+H) ⁺	345.2424	7,78	66,08
$C_{13}H_{30}N_9S$	(M+H) ⁺	345.2424	-2,68	62,53
$C_{18}H_{28}N_6O$	(M+H) ⁺	345.2424	-8,15	58,57
$C_{17}H_{34}N_3O_2S$	(M+H) ⁺	345.2424	5,64	58
$C_9H_{30}N_9O_5$	(M+H) ⁺	345.2424	4,45	54,66
$C_{10}H_{26}N_{13}O$	(M+H) ⁺	345.2424	8,09	44,96
$C_{19}H_{36}O_3S$	(M+H) ⁺	345.2424	9,77	44,51

Pour identifier la structure exacte correspondant à cette formule brute, les recherches ont été menées dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider et PubChem. Le composé correspondant est 3β -acétoxy- 5α -prégn-7,20-dién-6-one (**23**) (Figure 71).

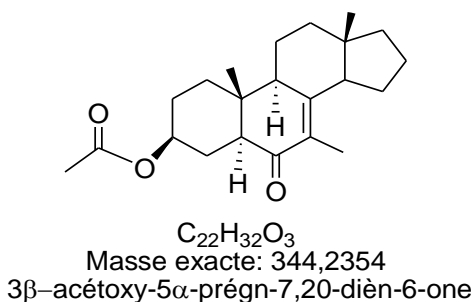


Figure 71 : Structure de la 3β-acétoxy-5α-prégn-7,20-dièn-6-one (**23**)

Pour la confirmation de cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 73) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 72).

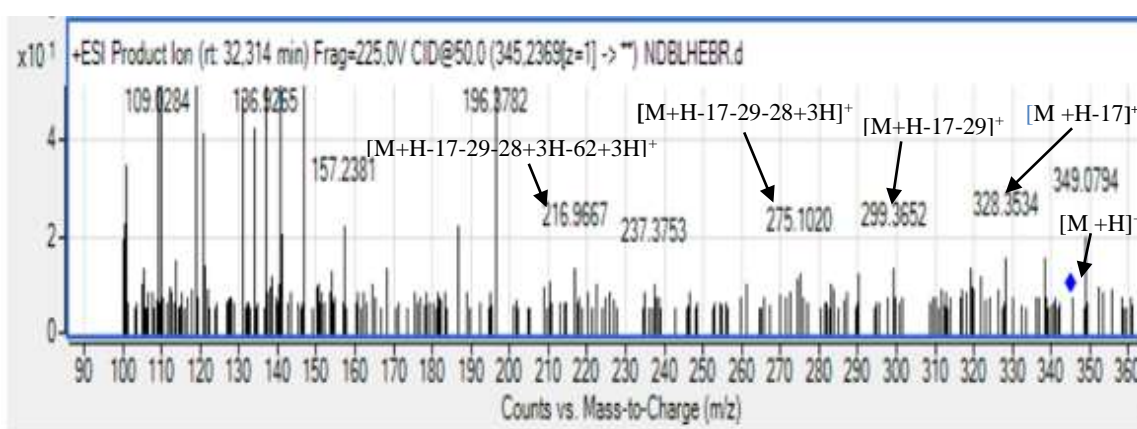


Figure 72 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **23**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 345,2428 $[M+H]^+$ perd le groupement méthyle (CH_3 : m/z : 15), suivie d'élimination de deux atomes d'hydrogène (-2H) pour traduire le fragment observé à m/z : 328,2038 $[M+H-17]^+$. Ce fragment d'abord subit une tautomérie en énol pour sa stabilité et perd une unité (CHO : m/z : 29) qui conduit au fragment à m/z : 299,2006 $[M+H-17-29]^+$. La perte du groupement carbonyle ($C=O$: m/z : 28), suivie de réarrangement avec l'addition de trois atomes d'hydrogène (+3H) aboutit au fragment à m/z : 275,2369 $[M+H-17-29-28+3H]^+$. Ce dernier ion fragment perd deux groupements méthyle (CH_3 : m/z : 2x15), une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18) et une unité (CH_2 : m/z : 14), accompagnée de réarrangement avec l'addition de trois atomes d'hydrogène (+3H) pour donner le fragment à m/z : 216,1878 $[M+H-17-29-28+3H-62+3H]^+$.

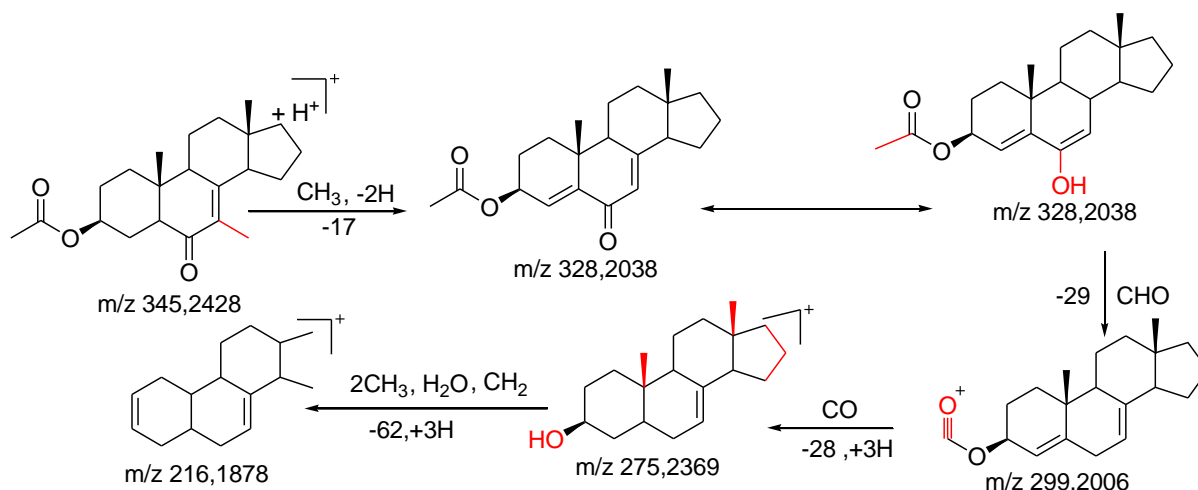


Figure 73 : Schéma de fragmentation de la 3β-acétoxy-5α-prégn-7,20-dién-6-one (**23**)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure du 3β-acétoxy-5α-prégn-7,20-dién-6-one qui est un dérivé stéroïdique connu, car précédemment isolé de *Turraea villosa* (Chiplunka *et al.*, 1993) et de *Turraea pubescens* (Wang *et al.*, 2008 ; Yuan *et al.*, 2013). Ce stéroïde pourrait traiter le cancer et la diarrhée (Chiplunka *et al.*, 1993).

III.1.3.3.4.4. Identification du composé **30**

Le composé correspondant au pic **30** ($T_R = 35,520$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 413,3399$ (Figure 74).

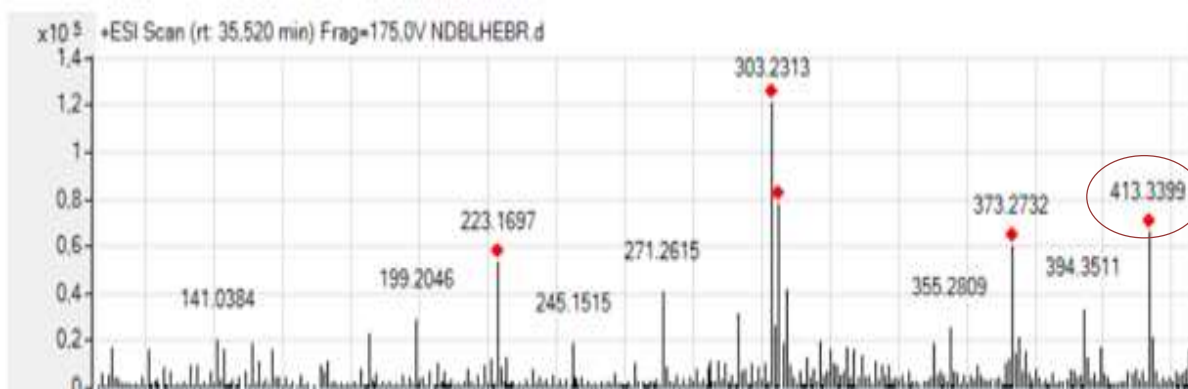


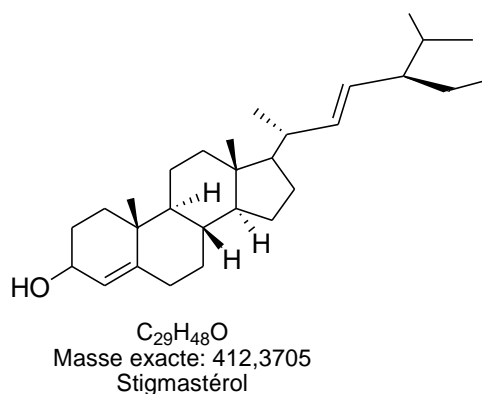
Figure 74 : Spectre ESI-MS du composé **30**

Le logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes correspondant à cette valeur de $[M+H]^+$ (Tableau XIII). Parmi celles-ci, la formule $C_{29}H_{48}O$ a été retenue au score (96,46) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 412,2705 g/mol.

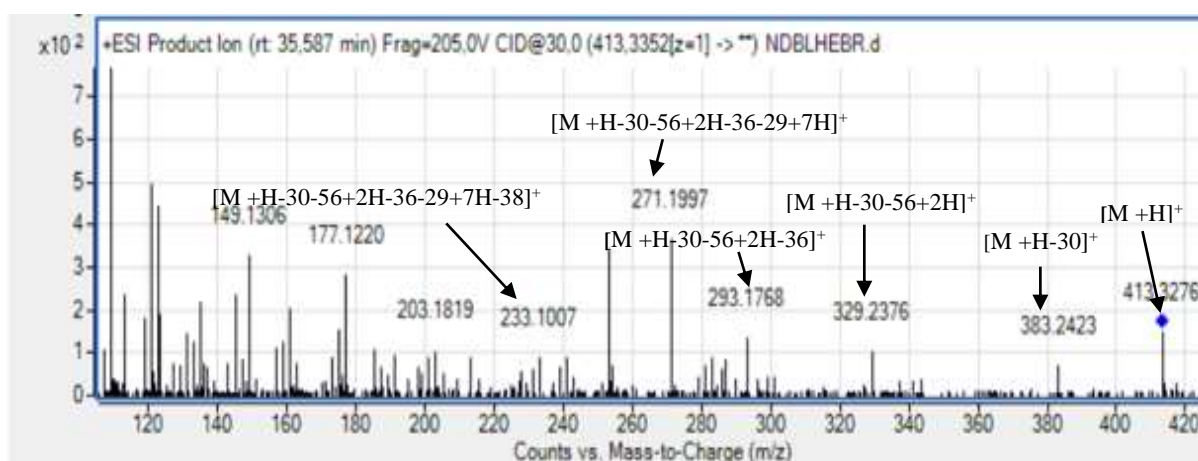
Tableau XIII : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 413,3399

Formula	Species	m/z	Diff (p)	Sc
C27 H46 N3	(M+H) ⁺	413.3769	-0,91	99,09
C29 H48 O	(M+H) ⁺	413.3769	2,51	96,46
C24 H48 N2 O3	(M+H) ⁺	413.3769	-7,39	78,61
C24 H50 N3 S	(M+H) ⁺	413.3769	6,65	76,93
C26 H52 O S	(M+H) ⁺	413.3769	10,1	64,45

La détermination de la structure exacte correspondant à cette formule brute est recherchée dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider et PubChem. Ainsi, le composé correspondant est Stigmastérol (**30**) (Figure 75).

**Figure 75** : Structure de Stigmastérol (**30**)

Pour confirmer cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 77) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 76).

**Figure 76** : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **30**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 413,3276 $[M+H]^+$ perd deux groupements méthyle (CH_3 : m/z : 2×15) pour donner le fragment observé à m/z : 383,3308 $[M+H-30]^+$. La perte du butène (C_4H_8 : m/z : 56), suivie de réarrangement avec l'addition de deux atomes d'hydrogène (+2H) pour aboutir au fragment à m/z : 329,2839 $[M+H-30-56+2H]^+$. Ce fragment perd deux groupements méthyle ($2CH_3$: m/z : 2×15), accompagnée d'élimination de six atomes d'hydrogène (-6H) qui conduit au fragment à m/z : 293,1900 $[M+H-30-56+2H-36]^+$. A partir de ce fragment, la perte d'une unité (C_2H_5 : m/z : 29), suivie de réarrangement avec l'addition de sept atomes d'hydrogène (+7H) aboutit au fragment à m/z : 271,2056 $[M+H-30-56+2H-36-29+7H]^+$. Ce dernier fragment subit à son tour la perte du groupement méthyle (CH_3 : m/z : 15) et une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18), suivie de réarrangement avec élimination de cinq atomes d'hydrogène (-5H) pour avoir le fragment à m/z : 233,1900 $[M+H-30-56+2H-36-29+7H-38]^+$.

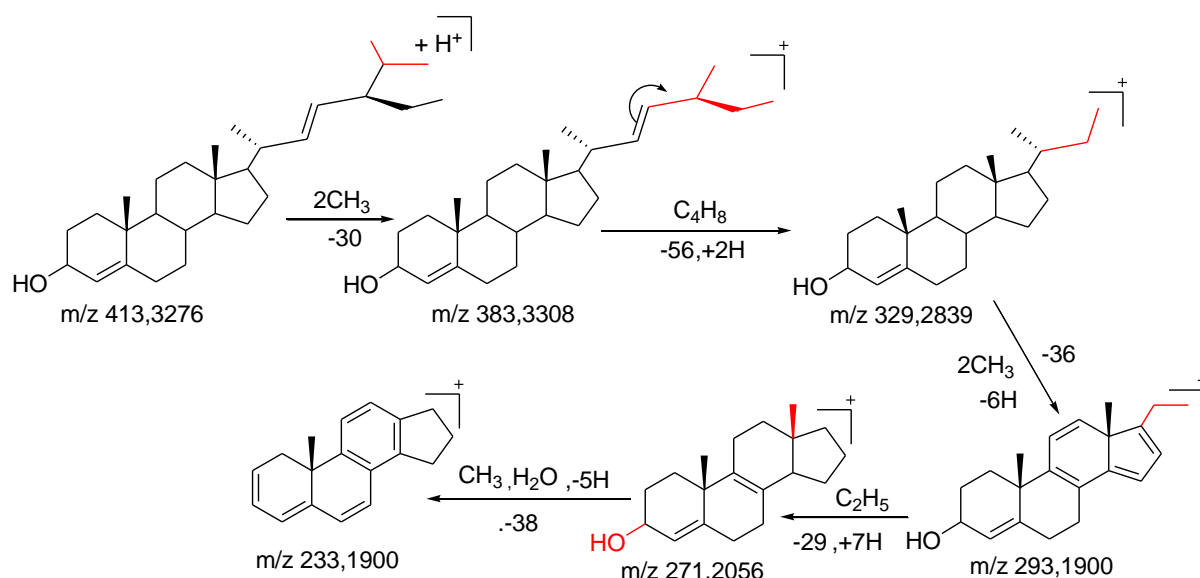


Figure 77 : Schéma de fragmentation du Stigmastérol (30)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure du Stigmastérol qui est un dérivé stéroïdique connu, déjà isolé de *Turraea nilotica* (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley, 1995), de *Turraea holstii* (Mulholland *et al.*, 1998) et de *Turraea floribunda* (Torto *et al.*, 1995 ; McFarland *et al.*, 2004). En effet, Stigmastérol a été concentré sur l'activité hypocholestérolémiante et a été apprécié comme facteur anti-raideur dans le traitement des maladies rhumatismales. Ce stéroïde a un effet anti-inflammatoire potentiel (Gabay *et al.*, 2010). En outre, stigmastérol a été aussi isolé des racines et des écorces de tige de *Trichilia rubescens*.

L'activité anti-plasmodiale évaluée contre les stades érythrocytaires de la souche 3D7 *Plasmodium falciparum*, a présenté une activité *in vitro* anti-plasmodiale significative avec une valeur de CI_{50} de 0,79 M (Gabay *et al.*, 2010).

III.1.3.3.4.5. Identification du composé 38

Le composé correspondant au pic **38** ($T_R = 40,322$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 429,3720$ (Figure 78).

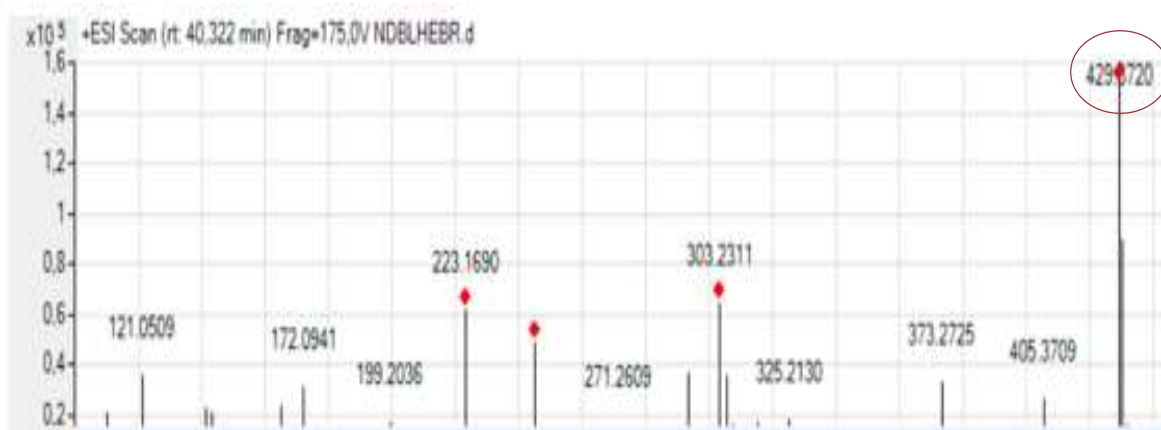


Figure 78 : Spectre ESI-MS du composé **38**

Le Logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes correspondant à cette valeur de $[M+H]$ (Tableau XIV). Parmi celles-ci, la formule $C_{29}H_{48}O_2$ a été retenue au score (95,25) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 428,3654 g/mol.

Tableau XIV : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 429,3720

Formule	Species	m/z	Diff (ppm)	Score
C27 H46 N3 O	(M+H)+	429.3720	-1,05	97,52
C29 H48 O2	(M+H)+	429.3720	2,24	95,25
C22 H48 N6 S	(M+H)+	429.3720	2,9	90,74
C25 H44 N6	(M+H)+	429.3720	-4,35	90,27
C24 H50 N3 O S	(M+H)+	429.3720	6,23	80,63
C24 H48 N2 O4	(M+H)+	429.3720	-7,28	77,99
C26 H52 O2 S	(M+H)+	429.3720	9,54	68,06
C17 H42 N13	(M+H)+	429.3720	8,78	66,32

Pour identifier la structure exacte correspondant à cette formule brute, les recherches ont été menées dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider, PubChem et de la littérature. Le composé correspondant est l'Oxo- β -sitostérol (**38**) (Figure 79).

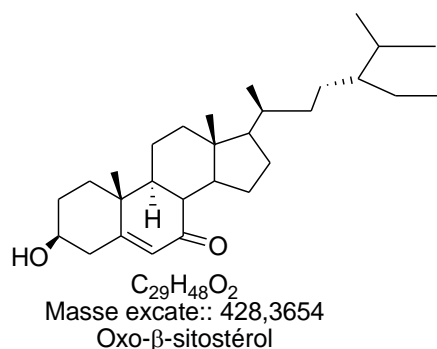


Figure 79 : Structure de l'Oxo- β -sitostérol (**38**)

Pour la confirmation de cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 81) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 80).

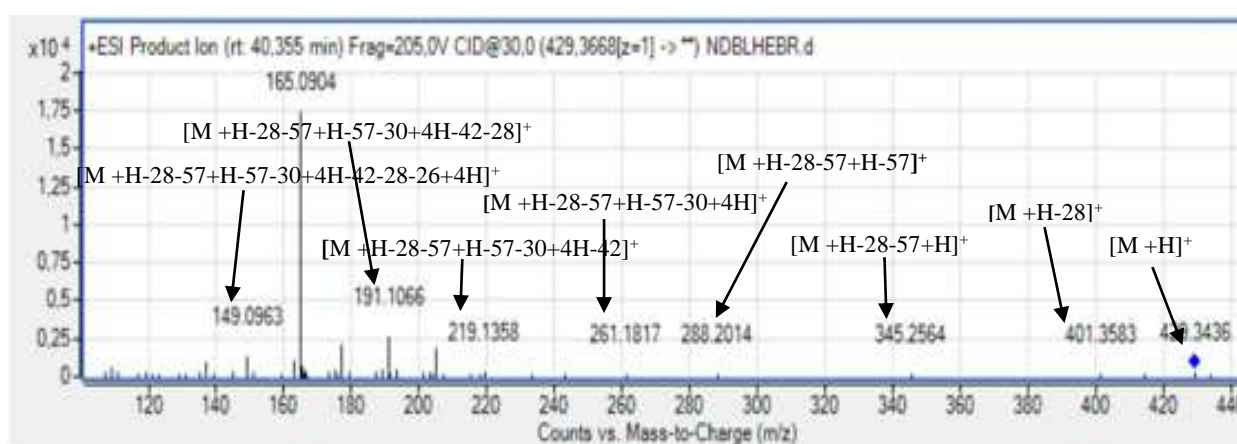


Figure 80 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **38**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 429,3720 $[M+H]^+$ perd une molécule de l'éthylène (C_2H_4 : m/z : 28), accompagnée de réarrangement pour aboutir au fragment à m/z : 401,3414 $[M+H-28]^+$. Ce fragment perd à son tour un groupement butyle (C_4H_9 : m/z : 57) suivie de réarrangement avec l'addition d'un hydrogène (+H) qui conduit au fragment à m/z : 345,2794 $[M+H-28-57+H]^+$. La perte d'une unité (C_3H_5O : m/z : 57) aboutit au fragment à m/z : 288,2448 $[M+H-28-57+H-57]^+$. Ce fragment obtenu, subit l'élimination de deux groupements méthyle ($2CH_3$: m/z : 2×15) accompagnée de réarrangement avec l'addition de quatre atomes d'hydrogène (+4H) pour aboutir au fragment à m/z : 261,2213 $[M+H-28-57+H-57-30+4H]^+$. L'élimination d'une unité (C_3H_6 : m/z : 42) conduit au fragment à m/z : 219,1743 $[M+H-28-57+H-57-30+4H-42]^+$. La perte du méthylène (C_2H_4 : m/z : 28) aboutit au fragment à m/z : 191,1430 $[M+H-28-57+H-57-30+4H-42-28]^+$.

Ce dernier fragment perd une molécule d'eau (H_2O : m/z : 18) et une molécule d'éthylène (C_2H_4 : m/z : 28) suivie de réarrangement avec l'addition de quatre hydrogène (+4H) pour donner au fragment à m/z : 149,1325 [$\text{M}+\text{H}-28-57+\text{H}-57-30+4\text{H}-42-28-26+4\text{H}$]⁺.

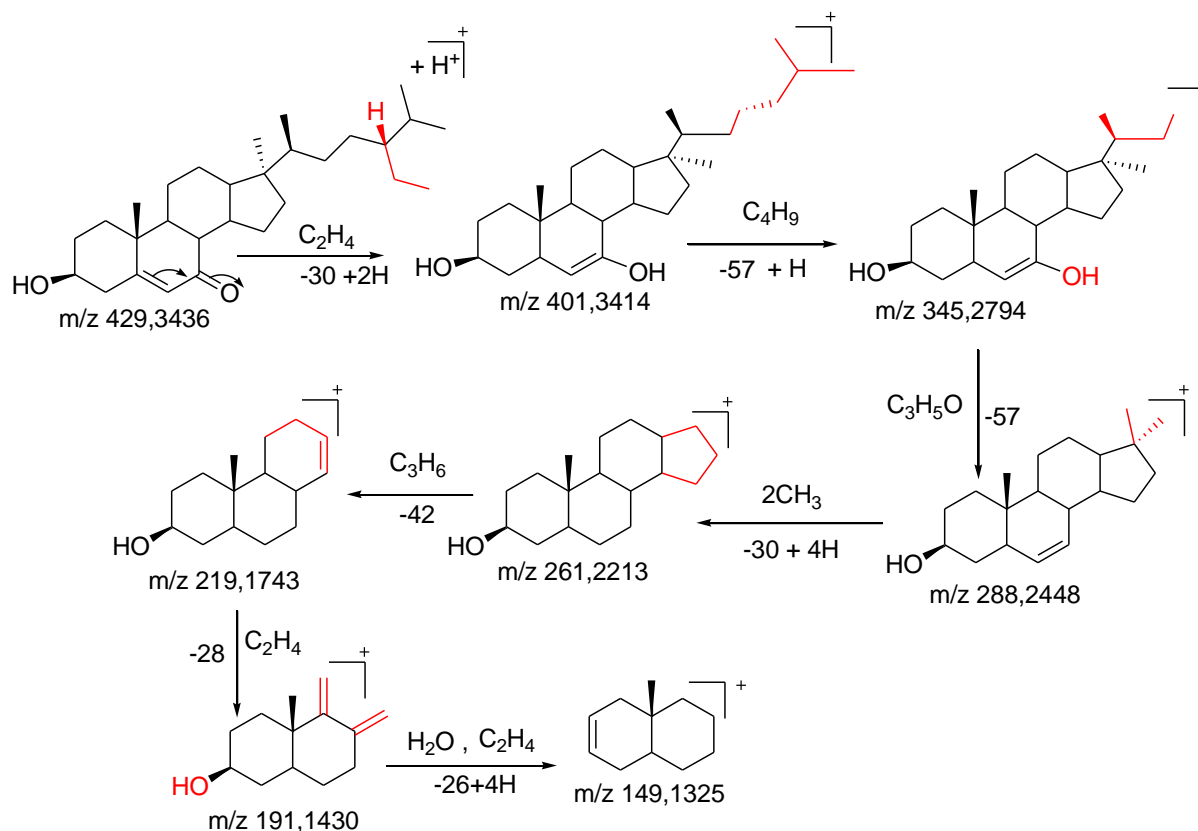


Figure 81 : Schéma de fragmentation de l' Oxo- β -sitostérol (**38**)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure de l'Oxo- β -sitostérol qui est un dérivé stéroïdique connu, car précédemment isolé de *Turraea nilotica* (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley *et al.*, 1995).

III.1.3.3.4.6. Identification du composé 39

Le composé correspondant au pic **39** ($T_R = 40,556$ min) donne l'ion moléculaire [$\text{M}+\text{H}$]⁺ à $m/z = 305,2454$ (Figure 82).

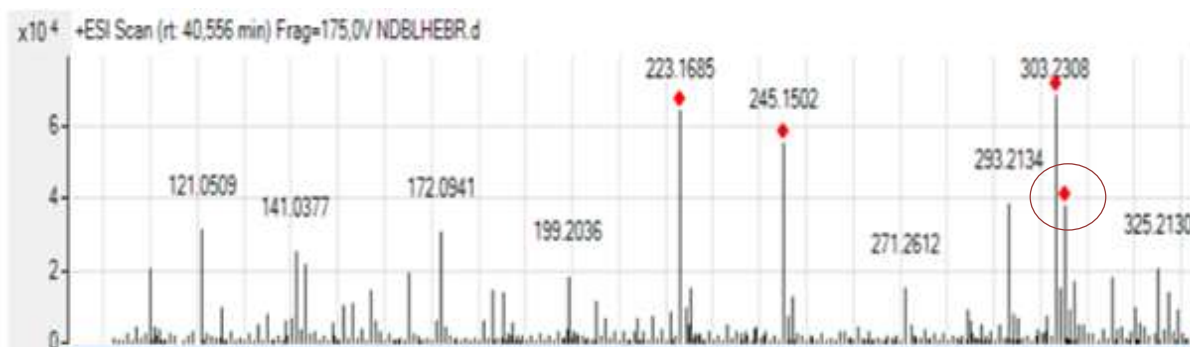


Figure 82 : Spectre ESI-SM du composé **39**

Le Logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes correspondant à cette valeur de $[M+H]^+$ (Tableau XV). Parmi celles-ci, la formule $C_{20}H_{32}O_2$ a été retenue au score (71,89) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 304,2402 g/mol.

Tableau XV : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 305,2454

Formula	Species	m/z	Diff (ppm)	Score
C18 H30 N3 O	(M+H) ⁺	305.2454	2,11	82,07
C16 H28 N6	(M+H) ⁺	305.2454	-2,54	79,63
C20 H32 O2	(M+H)⁺	305.2454	6,73	71,89
C15 H32 N2 O4	(M+H) ⁺	305.2454	-6,65	64,89
C13 H32 N6 S	(M+H) ⁺	305.2454	8,37	51,64
C13 H30 N5 O3	(M+H) ⁺	305.2454	-11,34	46,78

La détermination de la structure exacte correspondant à cette formule brute est recherchée dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider, PubChem et de la littérature. Le composé correspondant est la 3 β -hydroxy-5 α -prégn-6-one (**39**) (Figure 83).

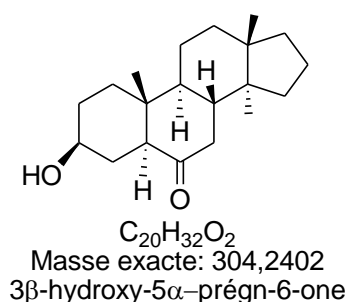


Figure 83 : Structure de la 3 β -hydroxy-5 α -prégn-6-one (**39**)

Pour confirmer cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 85) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 84).

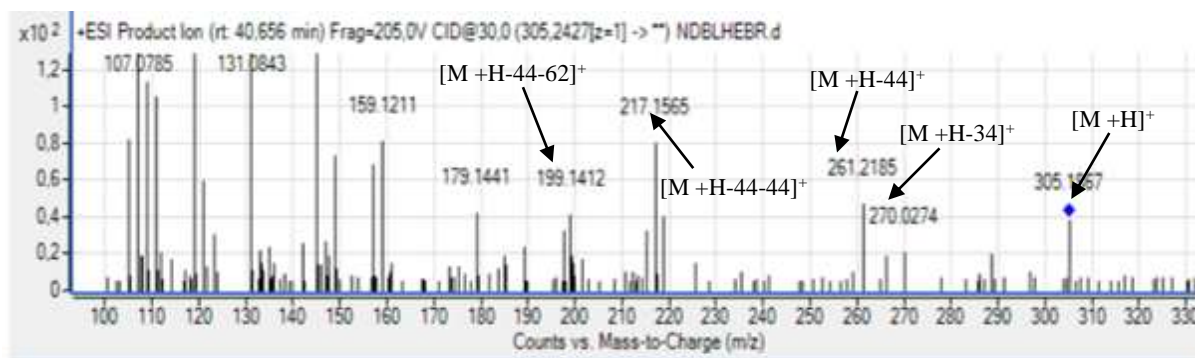


Figure 84 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **39**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à $m/z : 305,1867 [M+H]^+$ perd une molécule d'eau ($H_2O : m/z : 18$) et une molécule de méthane ($CH_4 : m/z : 16$) pour aboutir au fragment à $m/z : 270,1620 [M+H-34]^+$. Ce même fragment à $m/z : 305,1867 [M+H]^+$ subit à nouveau la perte de la molécule de propane ($C_3H_8 : m/z : 44$) qui conduit au fragment à $m/z : 261,1849 [M+H-44]^+$. Ce fragment perd dans un premier temps une unité ($C_2H_4O : m/z : 44$) pour aboutir au fragment à $m/z : 217,1587 [M+H-44-44]^+$ et dans le deuxième temps la perte d'une molécule d'eau ($H_2O : m/z : 18$) suivi d'une molécule de propane ($C_3H_8 : m/z : 44$) conduit au fragment à $m/z : 217,1587 [M+H-44-62]^+$ avec réarrangement.

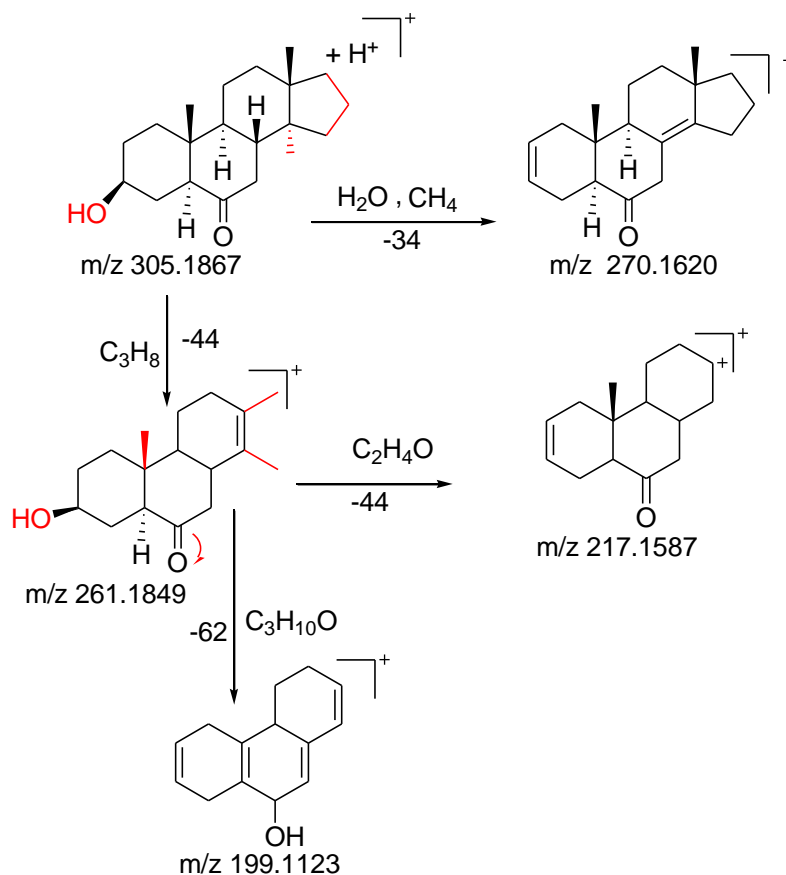


Figure 85 : Schéma de fragmentation de la 3β-hydroxy-5α-prégn-6-one (39)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure de la 3β-hydroxy-5α-prégn-6-one qui est un dérivé stéroïdique connu, car déjà isolé de *Turraea Villosa* (Chiplunka *et al.*, 1993) et de *Turraea pubescens* (Wang *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008 ; Yuan *et al.*, 2013). Ce stéroïde pourrait être utiliser pour traiter le cancer et la diarrhée (Chiplunka *et al.*, 1993).

III.1.3.3.5. Identification des sesquiterpènes

Le composé correspondant au pic **21** ($T_R = 31,305$ min) donne l'ion moléculaire $[M+H]^+$ à $m/z = 239,2002$ (Figure 86).

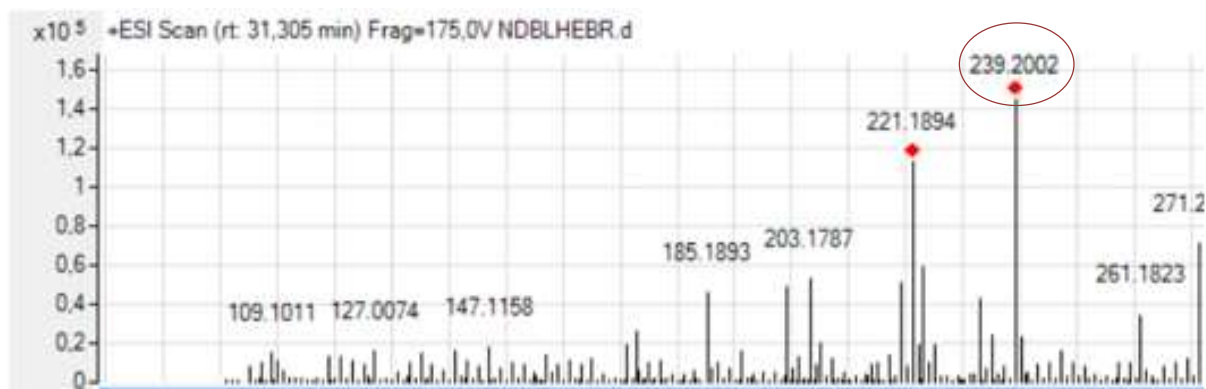


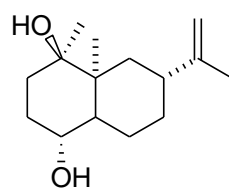
Figure 86 : Spectre ESI-MS du composé **21**

Le Logiciel MassHunter a proposé plusieurs formules brutes correspondant à cette valeur de $[M+H]^+$ (Tableau XVI). Parmi celles-ci, la formule $C_{15}H_{26}O_2$ a été retenue au score (85,80) conformément aux données de la littérature ; ce qui donne comme masse molaire 238,1904 g/mol.

Tableau XVI : Formules brutes proposées pour l'ion moléculaire à m/z : 239,2002

Formula	Species	m/z	Diff (p)	Sc
$C_{13}H_{24}N_3O$	(M+H) ⁺	239.2002	-2,16	87,49
$C_{15}H_{26}O_2$	(M+H) ⁺	239.2002	3,8	85,8
$C_{11}H_{22}N_6$	(M+H) ⁺	239.2002	-8,19	72,87

La détermination de la structure exacte correspondant à cette formule brute, est recherchée dans les bases de données Reaxys®, Dictionary of Natural Products® (DNP), ChemSpider, PubChem et de la littérature. Le composé correspondant est le cyperusol C (**21**) (Figure 87).



$C_{15}H_{26}O_2$
Masse exacte: 238,1933
Cyperusol C

Figure 87 : Structure du Cyperusol C (**21**)

Pour confirmer cette structure, nous avons proposé une voie de fragmentation (Figure 89) conformément aux fragments du spectre ESI-MS/MS (Figure 88).

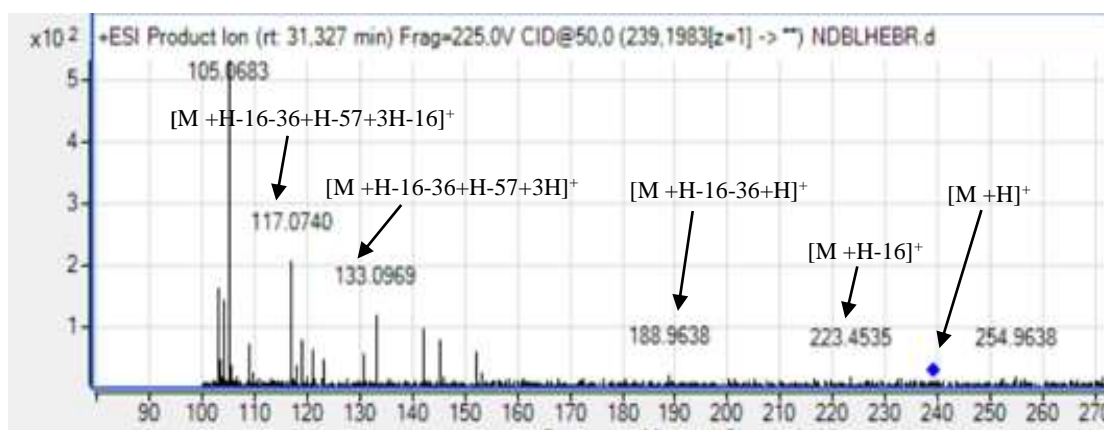


Figure 88 : Spectre de fragmentations ESI-MS/MS du composé **21**

Selon le schéma de fragmentation, l'ion moléculaire à m/z : 239,2002 $[M+H]^+$ perd le groupe méthyl (CH_3 : m/z :15), suivie d'un réarrangement avec l'élimination d'un atome d'hydrogène(-H) pour donner le fragment à m/z : 223,1693 $[M+H-16]^+$. Ce fragment perd à son tour deux molécules d'eau ($2H_2O$: m/z : 2×18) suivie de réarrangement avec l'addition d'un hydrogène (+H) qui conduit au fragment à m/z : 188,1565 $[M+H-16-36+H]^+$. La perte d'une molécule de méthylène (C_2H_4 : m/z :28) ;de deux groupements méthyle ($2CH_3$), accompagnée de réarrangement avec l'addition de trois atomes d'hydrogène (+3H) aboutit au fragment à m/z : 133,1565 $[M+H-16-36+H-57+3H]^+$.

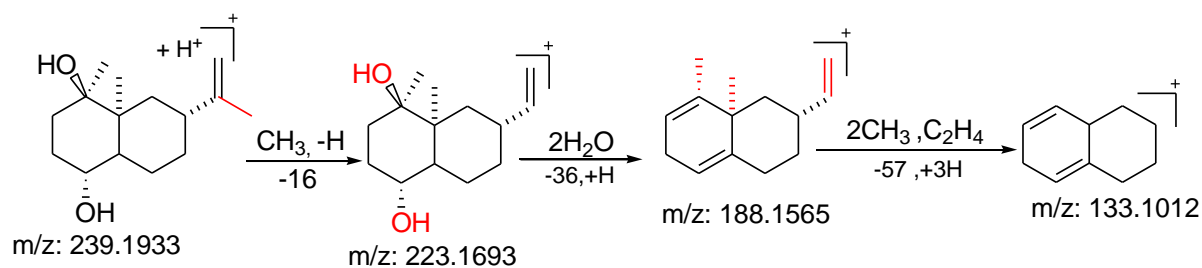


Figure 89 : Schéma de fragmentation de Cyperusol C (**21**)

Cette voie de fragmentation est conforme à la structure du Cyperusol C qui est un dérivé stéroïdique connu, car déjà isolé de *Turraea pubescens* (Wang *et al.*, 2008 ; Yuan *et al.*, 2013).

Conclusion partielle

Le criblage phytochimique réalisé grâce aux tests de caractérisation chimique a révélé la présence de polyterpènes et stérols, d'alcaloïdes, de saponines, de polyphénols et de flavonoïdes. Concernant les dosages, les résultats ont montré que l'extrait méthanolique et les fractions acétate d'éthyle et aqueuse résiduelle de *T. heterophylla* ont des teneurs plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes. Aussi, cette étude montre que les feuilles de cette espèce synthétisent à la fois des polyphénols glycosylés et leurs génines (aglycones). Quant à l'analyse chimique de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla*, par la méthode HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, elle a permis d'identifier les structures de douze (12) composés dont quatre (4) limonoïdes, sept (7) stéroïdes et un sesquiterpénoïde. En ce qui concerne les composés identifiés, ils pourraient justifier l'utilisation traditionnelle de *T. heterophylla* comme aphrodisiaque ; car les limonoïdes et les stéroïdes sont connus pour leurs effets bénéfiques sur le fonctionnement du cœur.

Nous allons évaluer les activités pharmacologiques de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et de ses fractions.

III.2. ETUDE BIOLOGIQUE

III. 2.1. Toxicité aiguë et effet de poids corporel de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

III. 2.1.1. Toxicité et signes cliniques observées chez les rates après administration de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

La toxicité de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* a été déterminée en administrant une dose unique de cet extrait, puis en observant les effets sur le comportement et la vie de l'animal traité. Après administration par voie orale de l'extrait aux rates à différentes doses, quelques signes cliniques ont été constatés (peau et fourrure, yeux, muqueuses, diarrhées, salivation, léthargies, rythmes cardiaque, agressivité, somnolence, alimentation, mobilité, mortalité) dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Signes cliniques observés chez les rates

Observations	Lot Témoin		Lot Expérimental	
	6 heures	12 heures	6 heures	12 heures
Peau et fourrure	Normal	Normal	Normal	Normal
Yeux	Normal	Normal	Normal	Normal
Muqueuses	Normal	Normal	Normal	Normal
Diarrhées	Absence	Absence	Absence	Absence
Salivation	Absence	Absence	Absence	Absence
Léthargies	Absence	Absence	Absence	Absence
Rythmes cardiaque	Normal	Normal	Normal	Normal
Agressivité	Absence	Absence	Absence	Absence
Somnolence	Non	Non	Non	Non
Alimentation	Oui	Oui	Oui	Oui
Mobilité	Oui	Oui	Oui	Oui
Mortalité	Non	Non	Non	Non

Selon les données du tableau, l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* administré à différentes doses aux rates, n'a entraîné aucun décès sur 24h d'observation.

Pour être certain que les effets de cet extrait ne sont effectivement pas nocifs pour ces rates, la période d'observation a été prolongée à 15 jours

III. 2.1.2. Evolution du poids corporel des rates après administration de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

Le suivi des poids corporels des animaux sur une période de 15 jours est resumé dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Suivi des poids corporels des animaux sur une période de 15 jours

Météo hebdomadaire	Lots	1 ^{er} jour	3 ^e jour	6 ^e jour	9 ^e jour	12 ^e jour	15 ^e jour
Poids M (T)		110±2,3	111±2,7	113±2,7	115±3	117 ±3	119±3
	Δ		+1	+2	+2	+2	+2
Poids M (5 mg)		110±2,7	112±2,7	115±3,6	118±2,7	121±2,7	124±2,7
	Δ		+2	+3	+3	+3	+3
Poids (50 mg)		110±3	112±2,7	115±2,7	119±3,3	122±2,7	126±2,7
	Δ		+2	+3	+3	+3	+4
Poids M (300 mg)		112±2,7	115±4	118±3	122±3	125±3	127±2,7
	Δ		+3	+3	+3	+3	+2
Poids M (2000 mg)		112± 3	114±2,7	117±2,7	121±3	125±2,3	129±3
	Δ		+2	+4	+4	+4	+4

NB : T : Témoin ; M : Moyen

Selon les résultats obtenus, nous remarquons une variabilité entre les poids corporels des rates en fonction du temps et celui du témoin. On constate une légère augmentation de 2 unités tous les trois jours pour les témoins. Puis, de 3 unités en moyenne pour les rates gavées de 5 mg / kg de poids corporel. Elle varie également entre 3 à 4 unités pour les rates gavées de 50 à 2000 mg / kg de poids corporel. Dans l'ensemble, nous constatons une variation du poids moyen des rates traitées durant 15 jours. Ce qui montre de manière générale, une légère augmentation du poids corporel jusqu'à la fin de l'expérience. De ces deux expériences, l'étude de la toxicité de l'extrait méthanolique de *T. heterophylla* aux différentes doses aux rates n'a pas provoqué de signes cliniques durant 24 heures. De même, aucun signe de toxicité du point de vue comportemental n'a été observé pendant les 15 jours d'expérience. Ce qui justifierait l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle (Bouquet & Debray ; 1974, Boua *et al.*, 2013 ; Tra Bi, 1997 ; Opa ,2003).

Après l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait méthanolique de la plante, nous ferons une étude préliminaire afin de vérifier la sensibilité des souches bactériennes testées vis-vis de cet extrait.

III. 2. 2. Activités antibactériennes de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla*

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* a été évaluée contre les bactéries gram-positives et gram-négatives. Les diamètres des zones d'inhibition sont consignés dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Diamètres d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* sur les bactéries testées

		Bactéries				
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> CIP 103467	<i>S. aureus</i> Sensible	<i>S. aureus</i> CIP 483	<i>E. coli</i> CIP 54127AF
Extrait méthanolique des feuilles <i>T. heterophylla</i>		9,0 ± 0,00	9,50 ± 0,00	9,50 ± 0,29	9,50 ± 0,00	9,0 ± 0,00
Contrôles positifs	Tétracycline	27,0 ± 0,00	27,00 ± 0,58	23,00 ± 0,00	26,00 ± 0,58	23,00 ± 0,58
	Gentamycine	26,00 ± 0,87	28,00 ± 0,00	25,00 ± 0,00	27,00 ± 0,58	26,00 ± 0,00

P : *Pseudomonas* ; *S* : *Staphylococcus* ; *E.* : *Escherichia* ; **CIP** : Collection de l'Institut Pasteur ; **ATCC** : American Type Culture Collection

D'après le tableau XIX, les diamètres d'inhibition (9-9,5 mm) de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* sur des bactéries testées sont inférieures à ceux des molécules de références qui ont varié de 23,00 ± 0,58 mm à 27,00 ± 0,58 mm pour la tétracycline et de 25,00 ± 0,00 mm à 28,00 ± 0,00 mm pour la gentamycine. Néanmoins, toutes les souches bactériennes testées étaient sensibles à l'extrait selon Ponce *et al.* (2003).

De façon générale, cette inhibition de l'extrait pourrait s'expliquer par l'induction d'une synergie d'activité entre les composés extractibles et la concentration testée (3000 mg/mL). Ceci corrobore avec les résultats obtenus par Akrofi (2011). En effet, il a révélé que, à la dose de 5 mg/mL (plus grande concentration), les bactéries testées (Gram positifs et négatifs) ont présenté une quasi résistance face à l'extrait méthanolique de *T. heterophylla*. Selon Oussou *et al.* (2008), la méthode de diffusion en milieu gélosé est un pré-test ou un test d'efficacité qui permet de détecter l'existence d'une activité antibactérienne d'une substance.

III. 2.3. Activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Turraea heterophylla* et de ses fractions

III. 2.3.1. Activité antiradicalaire par le test de DPPH

Les valeurs des absorbances mesurées à 517 nm sont consignées dans le tableau XX.

Tableau XX : Valeurs des absorbances du test DPPH de l'extrait méthanolique, des fractions et de l'acide ascorbique

Concentration (mg/mL)	0,5	1	1,5	2	2,5	3,5	4	4,5	5
% Inhibition DPPH (aqueuse résiduelle)	30,50	30,69	34,29	31,50	36,35	41,31	48,17	50,82	56,67
% Inhibition DPPH (Acétate d'éthyle)	31,86	32,10	32,90	36,30	40,05	46,77	54,78	55,31	55,72
% Inhibition DPPH (méthanolique)	20,62	20,67	28,14	30,57	30,21	49,15	50,74	62,10	62,57
% Inhibition DPPH (hexanique)	21,58	23,61	32,77	30,05	35,75	36,72	36,59	37,39	55,78
% Inhibition DPPH (dichlorométhane)	20,12	21,70	22,75	33,25	32,16	33,75	33,58	46,33	50,59
% Inhibition (Acide ascorbique)	39,00	46,10	54,15	60,50	68,70	82,62	86,15	96,31	97,55

Le tableau XX montre que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait brut méthanolique, ses fractions ainsi que la substance de référence, qui est l'acide ascorbique. Mais pour la concentration 4 mg/mL, les pourcentages d'inhibition du radical DPPH au niveau des fractions à l'hexane et au dichlorométhane ont regressé. Ce recul pourrait s'expliquer par une approche méthodologique. Pour mieux comprendre le pouvoir antioxydant des extraits étudiés, les valeurs des CI_{50} (mg /mL) ont été déterminées. Ce sont des concentrations d'extraits qui inhibent 50% des radicaux libres représentés par la solution de DPPH *in-vitro*. Elles sont déterminées graphiquement à l'aide des droites de pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des fractions testées (Figure 90).

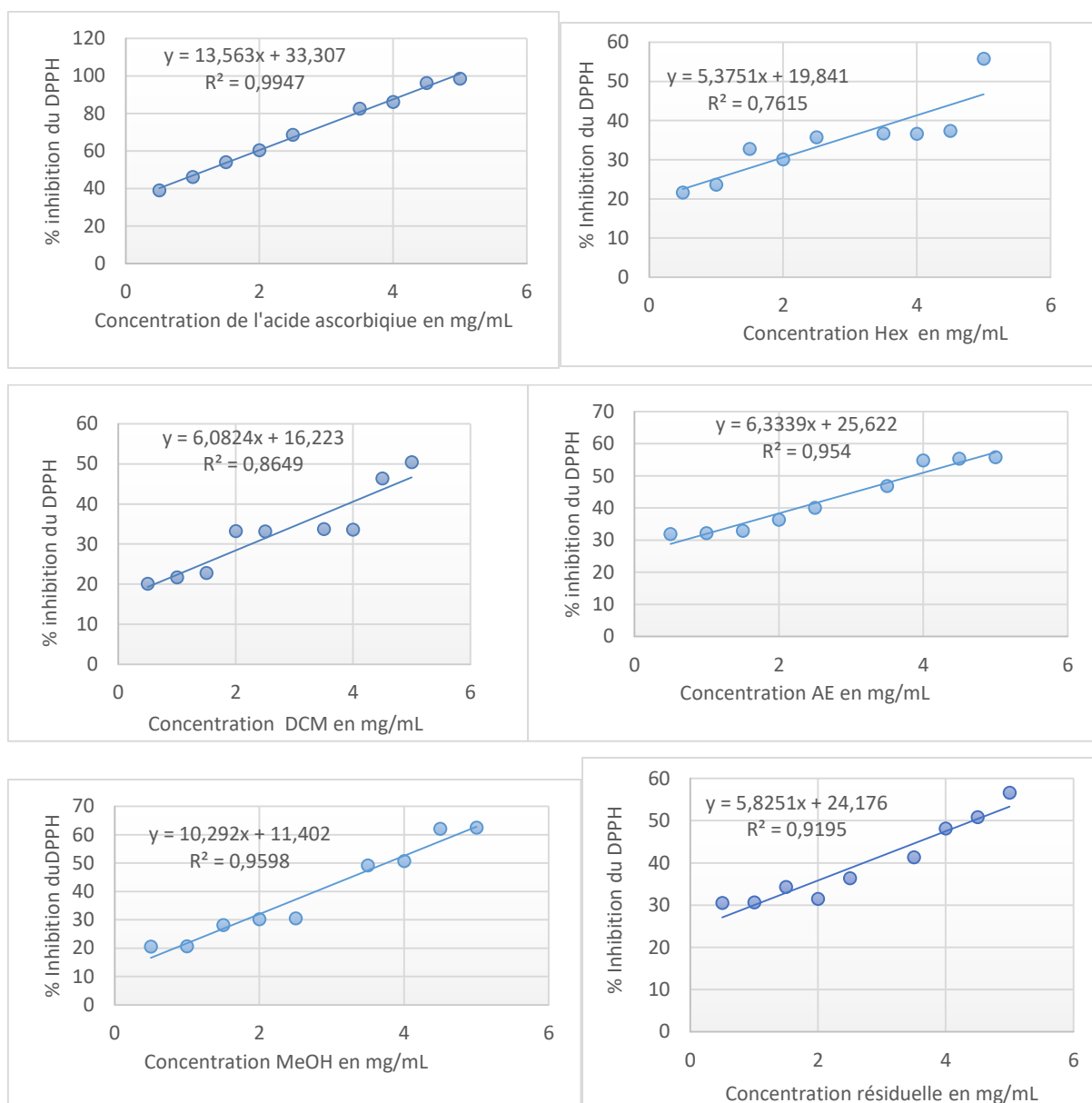


Figure 90 : Droites d'étalonnage des pourcentages d'inhibition du DPPH par l'extrait méthanolique, des fractions et l'acide ascorbique

E_{MeOH} : extrait méthanolique ; **F_{Hex}** : fraction hexanique ; **F_{DCM}** : fraction dichlorométhanique ; **F_{AE}** : fraction acétate d'éthyle ; **F_{Aq}** : fraction aqueuse résiduelle

On remarque que les allures de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de *T. heterophylla*, ses fractions ainsi que l'acide ascorbique ont presque une droite de type $y=ax+b$ avec des coefficients de corrélation variant de $R^2 = 0,5613$ à $R^2 = 0,9947$. En effet, les graphes de l'extrait méthanolique de *T. heterophylla* et ses fractions à l'acétate d'éthyle (**F_{AE}**) et aqueuse résiduelle (**F_{Aq}**) ont de bon coefficient de corrélation respectifs avec **E_{MeOH}** ($R^2 = 0,9598$), **F_{AE}** ($R^2 = 0,9540$) et **F_{Aq}** ($R^2 = 0,9195$) comparativement à celui de l'acide ascorbique ($R^2 = 0,9947$).

En plus, la lecture de ces graphes nous permet aussi d'estimer la concentration à partir de laquelle 50% des radicaux libres DPPH ont été réduits. Ces résultats constituent un bon support de fiabilité de l'effet antiradicalaire des extraits des feuilles de *T. heterophylla*. Les valeurs des concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) en mg/mL de l'extrait méthanolique, des fractions et de l'acide ascorbique sont représentées sous forme de diagramme (Figure 91).

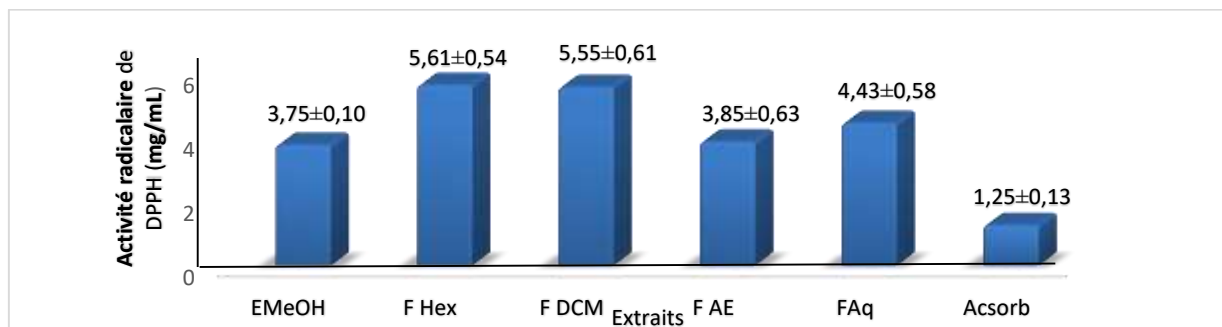


Figure 91 : Diagramme des différentes valeurs de CI₅₀ du test DPPH

E_{MeOH} : extrait méthanolique ; **F_{Hex}** : fraction hexanique ; **F_{DCM}** : fraction dichlorométhane ; **F_{AE}** : fraction acétate d'éthyle ; **F_{Aq}** : fraction aqueuse résiduelle ; **Acsorb** : Acide ascorbique

D'après les figures (90 et 91), on constate que l'extrait méthanolique de *T. heterophylla* et ses fractions possédant une activité antiradicalaire dose dépendante. Les CI₅₀ ont été déterminées. Comme l'indique la figure 91, l'acide ascorbique (Antioxydant de référence) a montré une bonne activité sur la réduction du DPPH à partir de la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) égale à 1,25 ± 0,13 mg/mL, suivie de l'extrait méthanolique et ses fractions dans l'ordre suivant : E_{MeOH} (CI₅₀ = 3,75 ± 0,10 mg/mL), F_{AE} (CI₅₀ = 3,85 ± 0,63 mg/mL), F_{Aq} (CI₅₀ = 4,43 ± 0,58 mg/mL), F_{DCM} (CI₅₀ = 5,55 ± 0,61 mg/mL) et F_{Hex} (CI₅₀ = 5,61 ± 0,54 mg/mL). Malgré le fait que l'activité antioxydante des fractions (hexane et dichlorométhane) testées soit faible à celle du témoin, l'activité au niveau de ces solvants n'est pas à négliger. Toutefois, il faut indiquer que la différence d'activité entre l'extrait méthanolique et ses fractions serait liée à la concentration en principes actifs. Ceci permet de confirmer que la fraction aqueuse bien qu'elle contienne plus de composés phénoliques que la fraction acétate d'éthyle, demeure moins concentrée en molécules activité antioxydante. En outre, le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait des feuilles de *T. heterophylla* observé serait liée à la présence des polyphénols et flavonoïdes totaux qui sont détectés majoritairement dans les extraits polaires (méthanol, acétate d'éthyle et eau). Plusieurs études ont montré que l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH est très influencée par le solvant d'extraction ;

ce qui peut être expliqué par la variation de la quantité et la qualité de l'activité antioxydante en fonction de la nature du solvant utilisé (Floegel *et al.*, 2011). Ce résultat est en accord avec les travaux d'Akrofi (2011) et Boua *et al.* (2013) réalisés sur la même plante qui montrent qu'une bonne activité antioxydante serait due à la présence des composés phénoliques. Ces composés phénoliques pourraient neutraliser les radicaux libres et contribuer ainsi à prévenir diverses maladies dégénératives. La concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) de l'extrait méthanolique (E_{MEOH}) étant modérée par rapport à la CI₅₀ de référence (acide ascorbique), les molécules identifiées de cet extrait pourraient avoir un pouvoir antioxydant. Les molécules comme le villostérol, le β -sitostérol, le stigmastérol, la 3 β -hydroxy-5 α -prégn-6-one, la 1,2-dihydroazadirone et la 3 β -acétoxy-5 α -prégn-7,20-dién-6-one justifieraient leur utilisation contre les maladies telles que le diabète, le cancer, la maladie d'alzheimer, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires et les troubles gastriques (Bentley *et al.*, 1992 ; Chiplunka *et al.*, 1993, Gupta *et al.*, 2011 ; Shi *et al.*, 2013).

Afin de valider les résultats de l'activité antioxydante de l'extrait et des fractions de *Turraea heterophylla* obtenus précédemment par le radical DPPH, nous avons utilisé un deuxième radical qui s'appuie sur la capacité de piégeage du proton par le radical cationique ABTS^{•+}.

III. 2.3.2. Activité antiradicalaire par le test de ABTS

Les valeurs des absorbances mesurées à 734 nm sont consignées dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Valeurs des différentes absorbances du test de l'ABTS de l'extrait méthanolique , des fractions et du Trolox

Concentration (mg/mL)	3,75	5	6,25	10	11,25	11,5	13,75	15
% Inhibition ABTS (Extrait aqueux)	20,81	31,50	34,07	36,05	35,15	45,12	47,57	55,87
% Inhibition ABTS (Acétate d'éthyle)	21,58	27,30	25,50	37,80	40,15	45,15	46,67	57,09
% Inhibition ABTS (Méthanolique)	21,31	21,58	21,66	35,03	33,24	45,13	55,10	67,75
% Inhibition ABTS (Hexanique)	31,61	32,92	34,90	34,03	28,58	24,53	56,81	58,87
% Inhibition ABTS (Dichorométhane)	21,05	25,50	29,15	23,74	36,54	29,58	50,50	65,05
% Inhibition (Trolox)	19,29	27,69	33,46	51,05	55,43	60,25	68,62	74,41

Le tableau XXI montre que le pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait brut méthanolique, ses fractions ainsi que la substance de référence, qui est l'acide ascorbique . Mais pour la concentration 10 mg/mL, le pourcentage d'inhibition du radical ABTS au niveau de la fraction hexanique a regressé et puis à la concentration 11,5 mg /mL , le pourcentage d'inhibition de la fraction au dichlorométhane a diminué également . Cette diminution du pourcentage d'inhibition pourrait être due à une approche méthodologique. Ainsi pour mieux comprendre le pouvoir antioxydant des extraits étudiés, les valeurs des CI_{50} (mg /mL) ont été déterminées. Ce sont des concentrations d'extraits qui inhibent 50% des radicaux libres ABTS. Elles sont déterminées graphiquement à l'aide de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des fractions testées (Figure 92).

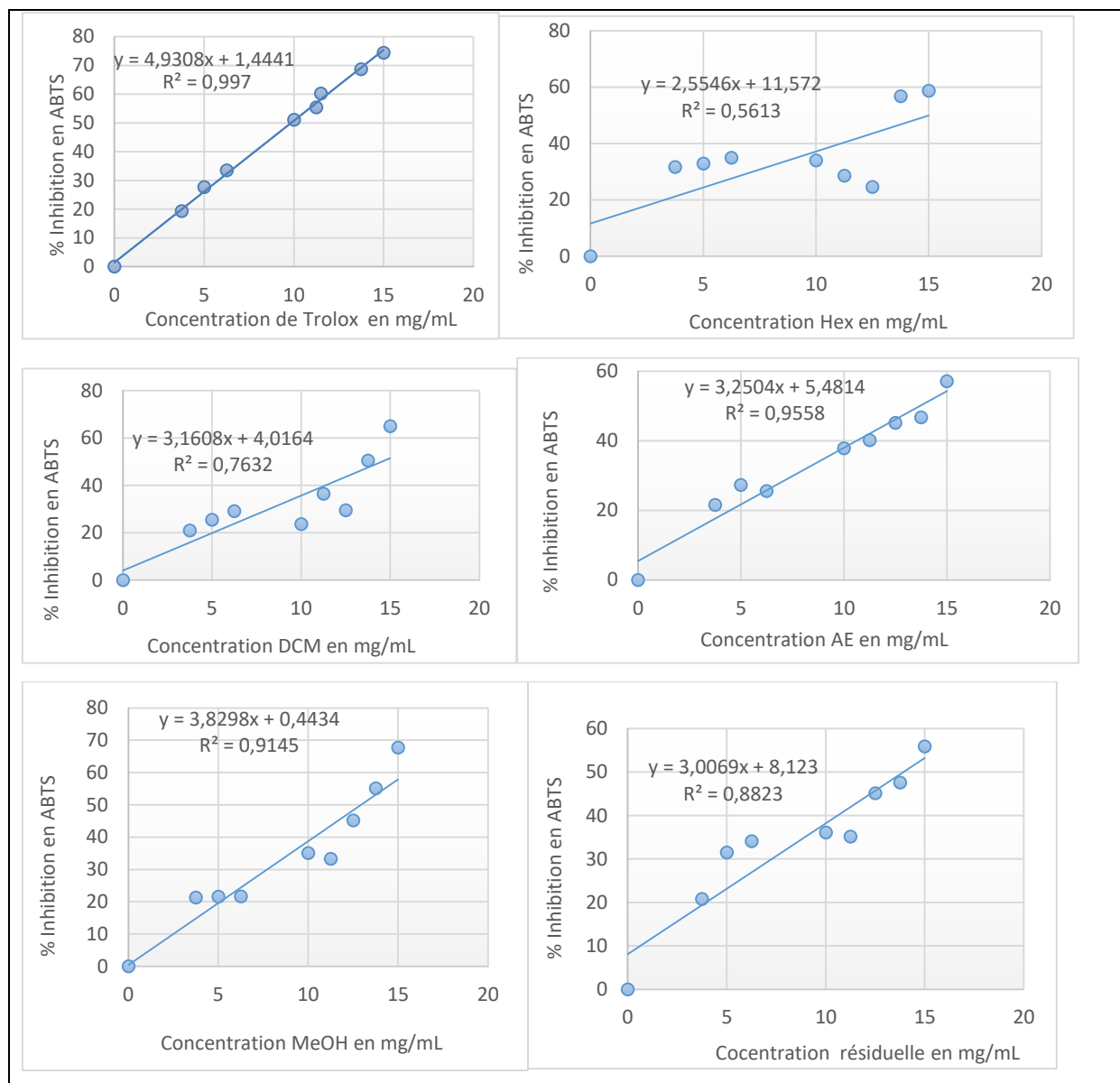


Figure 92 : Droites d'étalonnage des pourcentages d'inhibition de l'ABTS par l'extrait méthanolique, des fractions et de Trolox

E_{MeOH} : extrait méthanolique ; F_{Hex} : fraction hexanique ; F_{DCM} : fraction dichlorométhane ; F_{AE} : fraction acétate d'éthyle ; F_{Aq} : fraction aqueuse résiduelle

On observe que les profils de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de *T. heterophylla*, ses fractions ainsi que l'acide ascorbique ont presque une droite de type $y=ax+b$ avec des coefficients de corrélation variant de $R^2 = 0,5613$ à $R^2 = 0,9970$. En effet, les graphes de l'extrait méthanolique de *T. heterophylla* et ses fractions à l'acétate d'éthyle (F_{AE}) et aqueuse résiduelle (F_{Aq}) ont de bons coefficients de corrélation respectifs avec E_{MeOH} ($R^2 = 0,9145$), F_{AE} ($R^2 = 0,9558$) et F_{Aq} ($R^2 = 0,8823$) comparativement à celui de Trolox ($R^2 = 0,9970$).

En plus, la lecture de ces graphes nous permet aussi d'estimer la concentration à partir de laquelle 50% des radicaux libres ABTS ont été réduits. Ces résultats constituent un bon support de fiabilité de l'effet antiradicalaire des extraits des feuilles de *T. heterophylla*. Les valeurs des concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) en mg/mL de l'extrait méthanolique, des fractions et de l'acide ascorbique sont représentées sous forme de diagramme (Figure 93).

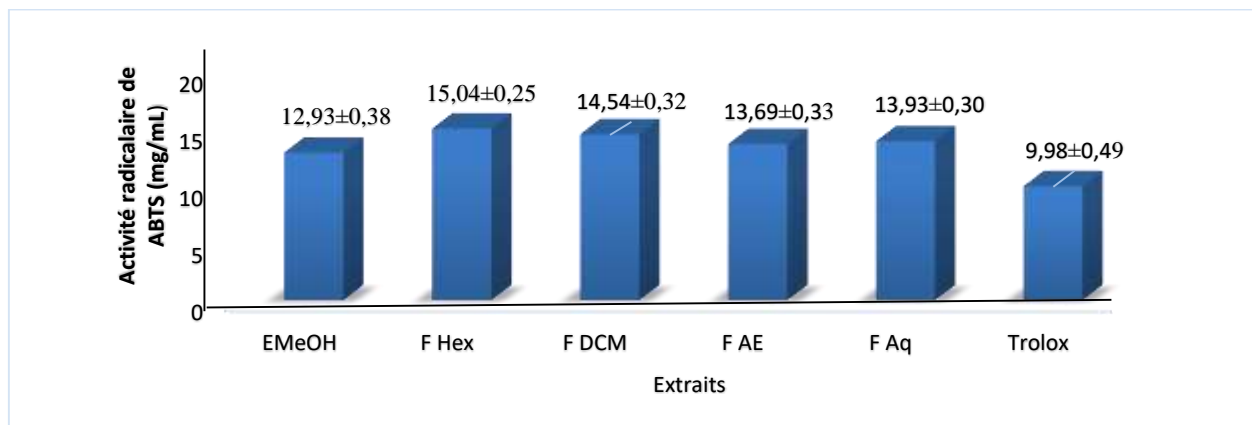


Figure 93 : Diagramme des différentes valeurs de CI₅₀ du test de l'ABTS

EMeOH : extrait méthanolique ; **F_{Hex}** : fraction hexanique ; **F_{DCM}** : fraction dichlorométhane ; **F_{AE}** : fraction acétate d'éthyle ; **F_{Aq}** : fraction aqueuse résiduelle

Les résultats du deuxième test basé sur la capacité de piégeage du proton par le radical cationique ABTS^{o+} viennent corroborer ceux déjà obtenus sur l'aptitude antioxydante de l'extrait méthanolique et ses fractions avec le test de la DPPH.

En effet, les concentrations inhibitrices à 50% (CI₅₀) de l'extrait méthanolique et ses fractions obtenues des feuilles de *T. heterophylla* par rapport à Trolox (CI₅₀ = 9,98 ± 0,49 mg/mL) sont dans l'ordre suivant : EMeOH (CI₅₀ = 12,93 ± 0,38 mg/mL), F_{AE} (CI₅₀ = 13,69 ± 0,33 mg/mL), F_{Aq} (CI₅₀ = 13,93 ± 0,30 mg/mL), F_{DCM} (CI₅₀ = 14,54 ± 0,32 mg/mL) et F_{Hex} (CI₅₀ = 15,04 ± 0,25 mg/mL). Ces valeurs confirment bien que l'extrait des feuilles de *T. heterophylla* est doté d'un effet antioxydant modéré. En outre, le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait des feuilles de *T. heterophylla* observé serait liée à la présence des polyphénols et flavonoïdes totaux qui sont détectés majoritairement dans les extraits polaires (méthanol, acétate d'éthyle et eau). Plusieurs études ont montré que l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS est très influencée par le solvant d'extraction, ce qui pourrait s'expliquer par la variation de la quantité et la qualité de l'activité antioxydante en fonction de la nature du solvant utilisé (Floegel *et al.*, 2011).

Dans l'ensemble, l'extrait méthanolique et ses fractions à l'acétate d'éthyle et aqueuse résiduelle ont été plus actifs sur le radical libre DPPH et ABTS que des fractions au dichlorométhane et hexane. Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique et les fractions acétate d'éthyle et aqueuse étant polaires concentrent plus de constituants chimiques et possèdent la capacité de donner de l'hydrogène à un radical libre. A notre connaissance, dans la littérature aucun auteur n'a encore évalué l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* par le radical DPPH et ABTS, mais en comparaison à d'autres espèces, nos résultats sont similaires à ceux de Koné *et al.* (2015) qui ont montré que les extraits éthanoliques et aqueux des feuilles de *Uvaria chamae* présentaient de bons potentiel d'inhibition du radical DPPH avec une concentration inhibitrice à 50% ($CI_{50} = 4,02$ mg/mL) en comparaison avec la vitamine C ($CI_{50} = 3,52$ mg/mL). Le pouvoir antioxydant modéré des extraits des feuilles justifierait certainement l'usage de *T. heterophylla* dans diverses affections (N'guessan, 2009b ; Akrofi, 2011 ; Boua *et al.*, 2013).

Conclusion partielle

Au vu de nos résultats, *Turraea heterophylla* a montré une atoxicité par voie orale et une faible activité antibactérienne. L'évaluation du potentiel antiradicalaire a montré une activité antioxydante modéréé comparativement aux molécules de référence.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail avait pour objectif de réaliser l'étude phytochimique et biologique des feuilles de *Turraea heterophylla*. L'étude des feuilles de *Turraea heterophylla* a concerné le tri-phytochimique, la quantification spectrophotométrique des polyphénols et flavonoïdes totaux, l'identification des limonoïdes, des stéroïdes et des sesquiterpénoïdes et les tests biologiques.

Le tri-phytochimique réalisé grâce aux tests de caractérisation chimique a révélé la présence d'alcaloïdes, de saponines, de polyphénols, de flavonoïdes, de polyterpènes et stérols. En ce qui concerne la quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux, les résultats indiquent que l'extrait méthanolique et ses fractions acétate d'éthyle et aqueuse résiduelle ont concentré plus de polyphénols et flavonoïdes totaux. Aussi, cette étude révèle que les feuilles de cette espèce synthétisent à la fois les polyphénols glycosylés et leurs génines (aglycones).

L'étude phytochimique menée en combinant les méthodes d'extractions (macération et fractionnement), la spectroscopie ultraviolet-visible (UV) et la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse tandem (HPLC-ESI-QTOF-MS/MS); a permis d'identifier les phytoconstitués de la famille des polyterpénoïdes et des stérols à savoir : le 28-nor-4 α -carbométhoxy-11 β -acétoxy-12 α -(2-méthylbutanoyloxy)-14,15-déoxyhavanensin-1,7-diacétate ; le cyperusol C ; la 3 β -acétoxy-5 α -prégn-7,20-dièn-6-one ; la 1,2-dihydroazadirone ; la turranolide ; le mzikonol ; le β -sitostérol ; le stigmastérol ; l'Oxo- β -sitostérol ; l'Oxo-stigmastérol ; la 3 β -hydroxy-5 α -prégn-6-one et le villostérol.

Il est à noter que les douze (12) phytoconstitués identifiés ont déjà été isolés de plusieurs espèces du genre *Turraea*, mais identifiés pour la première fois dans les feuilles de *Turraea heterophylla* de Côte d'Ivoire. Cependant, cette technique d'analyse hautement sensible et permettant des déterminations structurales sans isolement des constitués, est un atout pour détecter la présence de métabolites secondaires dans des extraits végétaux.

L'évaluation du potentiel pharmacologique de l'extrait méthanolique des feuilles a montré une atoxicité par voie orale et une faible activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (CIP 103467) et *Escherichia coli* (CIP 54127AF), enregistrant des valeurs de diamètre d'inhibition (9-9,5 mm). En plus, l'évaluation du potentiel antiradicalaire a montré une activité antioxydante modérée vis-à-vis du radical DPPH et ABTS. Cette activité antioxydante de l'extrait des feuilles de *T. heterophylla*, serait due à la présence de la teneur élevée des polyphénols et des flavonoïdes totaux d'après notre étude.

En somme, ces résultats justifieraient en partie l'utilisation traditionnelle de *T. heterophylla* dans diverses affections en Côte d'Ivoire.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus étant encourageants, les perspectives du développement de notre recherche font état de notre ambition à continuer les différents travaux selon les deux axes définis comme suit :

- **Au plan phytochimique**
- ✓ Isoler et caractériser les molécules de types stéroïdes et limonoïdes contenus dans l'extrait des feuilles de *Turraea heterophylla*
- ✓ Etendre cette étude à d'autres organes de la plante tels que les racines, la tige et les fleurs
- **Au plan biologique**
- ✓ Poursuivre l'activité antibactérienne
- ✓ Etendre l'étude à d'autres pathologies

REFERENCES

- Aaron S. D., Vandemheen K.L., Ramotar K., Giesbrecht L.T., Tullis E. & Freitag A. (2010). Infection with transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in adults with cystic fibrosis. *Journal of the American Medical Association*, 304 : 2145-2153.
- Abdelgaleil S. A. M. & El-Aswad A. F. (2005). Antifeedant and growth inhibitory effects of tetranortriterpenoids isolated from three Meliaceae species on the cotton leaf worm, *spodoptera littoralis* (Boisd) . *Journal of Applied Sciences Research*, 1 : 234-241.
- Abumweis S. S., Christopher P. F. M., Jiri F. & Jones P.J.H. (2014). Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy. *Canadian Cardiovascular Society*, 30 : 1225-1232.
- Adjanohoun E. J. & Aké A. L. (1985). Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali, 5^{ème} Edition. Agence Comptable Centrale du Trésor, Paris (France), 257 p.
- Adul G.O., Bentley M. D., Benson B.W., Huang F.Y., Gelbaum L. & Hassanali A. (1993). Two new picrosarin-class limonoids from *Turraea mombasana*. *Journal of Natural Products*, 56 : 1414-1417.
- Aké A. L. (1988). Plantes médicinales de quelques légumineuses utilisées dans la médecine traditionnelle africaine en Côte d'Ivoire. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 25 : 309-313.
- Aké A. L. (2011). Abrégé de médecine et pharmacopée africaines. Quelques plantes employées traditionnellement dans la couverture des soins de santé primaire. NEICEDA, Abidjan (Côte d'Ivoire), 157 p.
- Akrofi R. (2011). 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.
- Allard P. M., Genta J. G. & Wolfender J. L. (2017). Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. *Current Opinion in Chemical Biology, Omics* 36 : 40-49.
- Alwashli A., Al Sobarry M. & Cherrah Y. (2012). Toxicité aiguë et activité analgésique de l'extrait méthanolique de *Rumex nervosus* Vahl. *Phytothérapie*, 10 : 293-297.
- Andrey C. (2017). Larousse des plantes médicinales : Identification, préparations, soins. 500 plantes décrites. Edition Larousse, Québec (Canada), 336 p.
- Andrew C. (2021) . Encyclopédie des plantes médicinales : 550 plantes médicinales et leurs usages thérapeutiques, Nouvelle Édition, Québec (Canada), 335 p.

- Arbonnier M. (2009). Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest, Éditions Quae, 574 p.
- Arslanian S. & Suprasongsin C. (1997). Testosterone treatment in adolescents with delayed puberty : changes in body composition, protein, fat, and glucose metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(10) : 3213-3220.
- Attioua K. B., Ramiarantsoa H., Boti J. B., Vincent A. A., Félix Z. T. & Léon A. D. (2012). Isolation and identification of alkaloids from croton lobatus. *Institute of Pharmaceutical Education And Research*, 13(2) : 1-4.
- ATIBT. (2016). Nomenclature générale des bois tropicaux. Association technique internationale des bois tropicaux, Paris (France), 152 p.
- Aubry J. (2006). Infection à *Mycobacterium ulcerans* : aspects épidémiologique, cliniques et thérapeutiques. Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris (France), 43 p.
- Azwanida N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Amorative Plants*, 2 : 87-91.
- Bajguz A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant physiology/biology*, 45(2) : 95-107.
- Basaria S., Wahlstrom J. & Dobs A. (2001). Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(11) : 5108-5117.
- Bekro Y. A., Mamyrbékova-Békro J. A., Boua B. B., Tra Bi.H. F. & Ehile E. E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et *Zarucchi* (caesalpiniaaceae). *Sciences & Nature*, 4(2) : 217-225.
- Bentley M. D., Adul G. O., Alford A. R., Huang F.Y., Gelbaum L. & Hassanali A. (1995). An insect antifeedant limonoid from *Turraea nilotica*. *Journal of Natural Products*, 58 : 748-750.
- Bentley M. D., Gaul F., Rajab M. S. & Hassanali A. (1992). Tetranortriterpenes from *Turraea robusta*. *Journal of Natural Products*, 55 : 84-87.
- Berges R. R., Kassen A. & Senge T. (2000). Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with β -sitosterol an 18-month follow-up. *BJU International*, 85(7) : 842-846.
- Betti J. L. (2011). Vulnérabilité des plantes utilisées comme antipaludique dans l'arrondissement de Minton au sud de la réserve de la biosphère du Dja (Cameroun). *Systématique et phytogéographie des plantes pour la compréhension de la biodiversité africaine*, 71(2) : 661- 678.

- Bickii J., Tchouya G. R., Tchouankeu J. C. & Tsamo E. (2006). The antiplasmodial agents of the stem bark of *Entandrophragma angolense* (Meliaceae). *Journal African of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13 ; 4(2) : 135-139.
- Bijaoui A. (2012). Recherche documentaire en toxicologie : accéder à l'information pertinente. *Pratiques et métiers TM 22. Références en santé au travail*, 130 : 71-86.
- Bors W., Hetter W., Michel C., Evans C. A. & Packer L. (1998). The chemistry of flavonoids. *Flavonoids in health and disease*, 1 : 111-136.
- Booth N. L., Dejan N., Richard B. & Geller S.E. (2004). Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 76 : 511-516.
- Boua B. B., Mamyrbékova B., Akhanovna J., Kouame B. A. & Bekro Y. A. (2013). Criblage phytochimique et potentiel érectile de *Turraea heterophylla* de Côte d'Ivoire. *Journal of Applied BioSciences*, 68 : 5394-5403.
- Bouquet A. & Debray M. (1974). Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. Travaux et documents de Contribution, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer. N°32, Paris (France), 231 p.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. Edition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris (France) : 418-419.
- Cek S., Turan F. & Atik E. (2007). The effects of gokshura, *Tribulus terrestris* on sex differentiation of guppy, *Poecilia reticulata*. *Pak. Journal of Biological Sciences*, 10(5) : 718-725.
- Chaabi M. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenocla* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissuslio carpus* Guill. & Perr. (Combrétaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Département de Chimie, Université MENTOURI de Constantine, Algérie, 179 p.
- Champagne D. E., Koul O., Isman M. B., Scudder G. G. & Neil T. G. H. (1992). Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31 : 377-394.
- Chase M. W. & Reveal J. L. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Journal Botanical of the Linnean Society*, 161 : 105-121.
- Chase M. W. & Reveal J. L. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Journal Botanical of the Linnean Society*, 181(1) : 1-20.

- Cheplogoi P. K. & Mulholland D. A. (2003a). Limonoids from *Turraea parvifolia* (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 : 799-803.
- Cheplogoi P. K. & Mulholland D. A. (2003b). Tetranortriterpenoid derivatives from *Turraea parvifolia* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 62 : 1173-1178.
- Chevallier L. & Crouzet-Segarra C. (2004). Abrégés : Médicaments à base de plantes, 2ème édition, Paris (France), 354 p.
- Chiplunkar Y. G., Nagasampagi B.A., Tavale S. S. & Puranik V.G. (1993). Villostero, 3 β ,5 β -dihydroxy-20-pregnen-6-one, steroid from *Turraea villosa*. *Phytochemistry*, 33 : 901-903.
- Chitra M., Devi C. S. & Sukumar E. (2003). Antibacterial activity of embelin. *Fitoterapia*, 74 (4) : 401-403.
- Chong K. H., Zuraini Z., Sasidharan S., Devi P.V. K., Latha L.Y. & Ramanathan S. (2008). Antimicrobial activity of *Elaeis guineensis* leaf. *Pharmacie online*, 3 : 379-386.
- Chow E., Finkelstein J. A., Sahgal A. & Coleman R. E. (2011). Metastatic cancer to the bone. DeVita VT Jr, Lawrence TS, & Rosenberg SA. *Cancer : Principles & Practice of Oncology*. 9th ed. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 150 :2192-2204.
- Christianson D. W. (2008). "Unearthing the roots of the terpenome." *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2) : 141-150.
- Cowan M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Nature Reviews Molecular Biology*, 12(4) : 564-582.
- Dabemat H., Denis F., Avril J. L. & Monteil H. (2000). Bactériologie clinique 3ème édition, Ellipses, 602 p.
- Darie H. (2003). Infection par *Mycobacterium ulcerans* : aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96 : 368-371.
- Deiana M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F. & Bonsignore L. (2003). *Journal of American Oil Chemists-Society*, 80 : 65-70.
- Dieng.S.I. M., Fall.A. D., Diatta B.K., Sarr.A., Sene M., Mbaye A., Diatta. W. & Bassene.E. (2017). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-éthanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(2) : 768-776.
- Dejian H., Boxin O. & Ronald L. P. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6) : 1841-1856.

- Didry N., Pinkas M. & Torck M. (1982). Composition chimique et activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *Grindelia*. *Phytotherapy Research*, 16 : 7-15.
- Ermel K. E., Pahlich E. & Schmutterer H. (1986). Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations in Kenya, and its dependence on temperature, relative humidity and light. *Proceeding of the 3rd International Congress*, pp 171-184.
- Etuaful S., Carbonnelle B. & Grosset J. (2005). Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8) : 3182-3186.
- Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. Mémoire des activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. *Annales pharmaceutiques françaises*, 64 : 390-396.
- Fankam A. G., Koaita J. R. & Kuete V. (2014). Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. *Complementary and alternative therapies*, 14 : 241-244.
- Fleuriet A., Jay Allemand C. & Macheix J. J. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes, 192 p.
- Floegel A., Kim D., Chung S. & Chun O. (2011). Comparaison of ABTS/ DPPH ASSAYS to measure antioxydant capacity in popular-rich US foods. *Journal food Composition and Analysis*, 24 : 1043-1048.
- Fraser L.A., Mulholland D. A. & Nair J. J. (1995a). Limonoids from the seed of *Turraea floribunda*. *Phytochemistry*, 35 : 455-458.
- Fraser L.A., Mulholland D.A. & Taylor D.A.H. (1995b). Chemotaxonomic significance of the limonoid nymania-1 in *Turraea obtusifolia*. *South African Journal of Experimental Botany*, 61 : 218-282.
- Gabay O., Sanchez C., Salvat C., Chevy C., Breton M., Nourrissat G., Wolf C. & Berenbaum F. (2010). Stigmastérol : un phytostérol aux propriétés anti-arthrosiques potentielles, 18(1) : 106 -116.
- Gathirwa J. W., Rukunga G. M., Njagi E. N. M., Omar S. A., Mwitari P. G., Guantai A. N. & Ndiege I.O. (2008). The *in vitro* anti-plasmodial and *in vivo* antimalarial efficacy of combinations of some medicinal plants used traditionally for treatment of malaria by the Meru community in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 115 : 223-231.
- George K. M, Chatterjee D., Gunawardana G., Welty D., Hayman J. & Lee R. (1999). Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Sciences*, 283(5403) : 854-857.

- Giles K., Wildgoose J. L., Langridge D. J. & Campuzano I. (2010). A method for direct measurement of ion mobilities using a travelling wave ion guide. *Journal International of Mass Spectrometry*, 298 (1-3) : 10-16.
- Gnaoré Y.T. D., Koffi B. A., Yaya S., Faustin A. K., Landry C. A. K. & Marc V. (2020). Norcucurbitacins from the leaves of *Mareya micrantha* (Benth.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Fitoterapia*, 143 : 104538.
- Govindachari T. R., Suresh G., Gopalakrishnan G., Masilamani S. & Banumathi B. (2000). Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia*, 71 : 317-320.
- Grennan A. K. (2006). Gibberellin metabolism enzymes in rice. *Plant Physiology*, 141(2) : 524-526.
- Grinfeld C., Kotler D., Dobs A., Glesby M. & Bhasin S. (2006). Oxandrolone in the treatment of HIV-associated weight loss in men : a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 41(3) : 304-314.
- Gualdani R., Cavalluzzi M. M., Lentini G. & Habtemariam S. (2016). The chemistry and pharmacology of *Citrus limonoids*. *Journal of Molecular Biology*, 21(11), 1530.
- Guessend N. K., Ouattara M. B., Ouattara N. D., Nevry R. K., Gbonon V., Tiekoura K. B., Dosso M. & Ger B. M. R. (2013). Etude des bactéries multirésistantes des effluents hospitaliers d'un centre hospitalier et universitaire (CHU) de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *Journal of Applied Biosciences*, 69 : 5456-5464.
- Gupta R., Sharma A. K., Dobhal M., Sharma M. & Gupta R. S. (2011). Antidiabetic and antioxidant potential of β -sitostérol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *Journal Diabetes*, 3(1) : 29-37.
- Hamid A. A., Aiyelaagbe O., Oguntoye S. O., Negi A. S. & Zubar M. F. (2015). *Science Editor for Centrepoint and Greater Scientists*, 21(1) : 1-12.
- Han L., Boakye Y. M., Liu E., Zhang Y., Li W., Song X., Fu F. & Gao X. (2012). Structural characterisation and identification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* YC by HPLC/ESI-QTOF-MS/MS. *Phytochemical analysis*, 23 : 668-676.
- Harbone J. B. (1998). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants*. Analys, 3rd Edition, NewYork (Etats-Unis), 1380 p.
- Harmon A. D., Weiss U. & Silverton J. V. (1979). The structure of rohitukine, the main alkaloid of *Amoora rohituka* (Syn. *Aphanamixis polystachya*) (Meliaceae). *Tetrahedron Letters*, 20 : 721-724.

- Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Faculté des Sciences et des Sciences Appliquées, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou (Algérie), 83 p.
- Hodgson E. & Cunny H. (2010). Toxicity Testing: a textbook of modern. *Toxicology*, 4 : 409-456.
- Irungu B.N., Adipo N., Orwa J. A. & Kimani F. (2015). Antiplasmodial and cytotoxic activities of the constituents of *Turraea robusta* and *Turraea nilotica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 5(174) : 419-425.
- Irungu B. N., Rukunga G. M., Mungai G. M. & Muthaura C. N. (2007). *In vitro* antiplasmodial and cytotoxicity activities of 14 medicinal plants from Kenya. *Journal of Experimental Botany*, 73 : 204-207.
- Irvine F. R. (1961). Woody plants of Ghana, with special reference to their uses. London, *Oxford University Press*, 868 p.
- Ishaq F. N., Zezi A. U. & Olurische T. O. (2014). *Khaya senegalensis* inhibits piroxicam mediated gastro-toxicity in wistar rats. *Avicen. Phytomedicine*, 4(6) : 377-384.
- Iwu M. M. (1993). Handbook of African medicinal plants, CRS Press, Florida, United states, 435 p.
- Jamila H. S. (2018). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat, Laboratoire de Biocatalyse et des Bioprocédés, Lorraine (France) , 250 p.
- Jares E. A., Tettamanzin M. C. & Pomili A. B. (1990). Sitosterol 3-O- β -glucuronopyranoside from *Senecio bonariensis*. *Phytochemistry*, 29 : 340-341.
- Jarvis W. R. & Martone W. J. (1992). Predominant pathogens in hospital infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29 : 19-24.
- Jensen C. R., Duev D. A. & Riddle R. (2017). The African plant databas. Conservatory and botanical garden of the city of Geneva and South African. *National Biodiversity Institute*, 72 p.
- Johson J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 : 80-128.
- Jongmin A., Hee-Sung C., Young-Won C. & Jinwoong K. (2017). Isolement guidé par la dérégulation de nouveaux diglycosides substitués par un phénylpropanoïde à partir de la salsa Cistanche et de leurs activités inhibitrices sur la production de NO dans les macrophages. *Journal of Molecular Biology*, 22(7) : 1131-1138.

- Joosten L. & Veen J. A. (2011). Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. *Phytochemistry Reviews*, 10 : 127-136.
- Jourdain C., Tenca G., Deguercy A., Troplin P. & Poelman D. (2006). *In-vitro* effects of polyphenols from cocoa and β -sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 15(4) : 353-361.
- Kalman D. S., Schwartz H. I., Feldman S. & Krieger D. R. (2013). Efficacy and safety of *Elaeis guineensis* and *Ficus deltoidea* leaf extracts in adults with pre-diabetes. *Journal of Natural Products*, 12(1) : 12-36.
- Kamatenesi M. M., Oryem O. H. & Acipa A. (2011). Medicinal plants of Otwal and Ngai Sub counties in Oyam district, northern Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7 : 1-7.
- Kayser E. B., Morgan P. G., Hoppel C. L. & Sedensky M. M. (2001). Mitochondrial expression and function of GAS-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 276 : 20551-20558.
- Kayser O., Kiderlen A. F. & Croft S. L. (2003). Natural products as antiparasitic drugs. *Journal Parasitology Research*, 90 : S55- S62.
- Keita R. M. (2002). Etude de l'activité antifongique et antibactérienne de 14 plantes utilisées dans le traitement des I.S.T. Thèse de pharmacie, Bamako (Mali), 130 p.
- Kim J., Jayaprakasha G.K. & Patil B. S. (2013). Limonoids and their anti-proliferative and anti-aromatase properties in human breast cancer cells. *Journal Food & Function*, 4(2) : 258-265.
- Kim J., Jayaprakasha G. K. & Patil B. S. (2014). Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity *in vitro* by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 105 : 36-44.
- Kindi F., Desi H., Nurlelasari R. M., Ace T. H., Khalijah A.W., Unang S. & Yoshihito S. (2017). New cytotoxic protolimonoids from the stem bark of *Aglaia argentea* (Meliaceae) *Phytochemistry Letters*, 21 : 211-215.
- Kodjo S. E., Kafui K., Oudjaniyobi S., Pakoupati B., Amegnona A. & Messanvi G. (2017). Etude comparative des activités antioxydantes d'extraits éthanoliques de feuilles, d'écorces et de racines de *Cassia sieberiana*. *International Journal of Biological Chemical Sciences*, 11(6) : 2924-2935.
- Kophy T., Moussa C., Mamadou K., Mamadou O., Allassane O. & Gourene G. (2018). Effets de deux plantes aphrodisiatiques africaines *Garcinia kola* et *Turraea heterophylla* sur les performances zootechniques et le taux d'inversion sexuelle chez *Oreochromis niloticus*. *Agronomie Africaine*, 30 (2) : 135-146.

- Kojima H., Sato N., Hatano A. & Ogura H. (1990). Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, 29 : 2351-2355.
- Kokwaro J. (2009). Medicinal Plants of East Africa, 3rd Edition, Nairobi: University of Nairobi (Kenya), Press, 478 p.
- Konan D. J., Attioua K.B., Kablan A.C.L., Kabran A.F., Koffi A.P. & Aka S. A.G. (2019). New cassane diterpenoids from the root bark of *Erythrophleum suaveolens*. *Phytochemistry Letters*, 31 : 166-169.
- Konaté K., Kiendrébéogo M., Ouattara M. B., Souza A., Lamien M. A., Nongasida Y., Barro N., Millogo R. J. & Nacoulma O.G. (2011). Antibacterial potential of aqueous acetone extracts from five medicinal plants used traditionally to treat infectious diseases in Burkina Faso. *Journal Current Research of Biological Sciences*, 3(5) : 435-442.
- Koné W. M., Kamanzi A. K., Terreaux C., Hostettmann K., Traore D. & Dosso M. (2004). Traditional medicine in North Côte d'Ivoire : Screening of 50 médicinales plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93 : 43-49.
- Koné M, Toure A, Ouattara K. & Coulibaly A. (2015). Phytochemical Composition, Antioxydant and Antibacterial Activities of Root of *Uvaria chamae* P. Beauv. (Annonacea) Used in Treatment of Dysentery in North of Côte d'Ivoire. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(6) : 1047- 1053.
- Koné K., Soro Y. & Siaka S. (2017). Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydroalcoolique des métabolites secondaires d'*Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44 : 15-22.
- Kouadio N. J. (2013). Evaluation de l'activité antibactérienne de quatre (4) plantes médicinales sur la croissance *in vitro* de bactéries multirésistantes. Mémoire de Master, Laboratoire de Botanique et Phytothérapie, UFR des Sciences de la Nature, Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan, Côte d'Ivoire), 53 p.
- Kouadio A. P., Attioua K. B., Kabran A. F., Kassi A. B., Yao A. R., Yoboue K. H., Kasse N. M. & Amoikon K.E. (2020). Comparative physico-chemical study of fermented and unfermented cocoa beans from Côte d'Ivoire. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 16(1) : 355-362.
- Kouamé K.T., Siaka S., Kassi A. B. & Soro Y. (2021). Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigma thonningii* (Caesalpiniaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1): 97-105.

- Kouitchou M. L. B., Tchouangueu T. F. & Talla E. (2017). Antimicrobial, antioxidant and protective effect of methanol extract of *Trichilia emetica* (Meliaceae), stem and root bark against free radical-induced oxidative haemolysis. *European Journal of Medicinal Plants*, 19(1) : 1-14.
- Krief S., Martin M. T., Grellier P., Kasenene J. & Sévenet T. (2004). Novel antimalarial compounds isolated *in situ* survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy research*, 48(8) : 3196-3199.
- Krishnaswamy M. & Purushothaman K. K. (1980). Antifertility properties of *Embelia ribes*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 18 (6): 638-639.
- Kurowska E.M. & Banh C. (2000.). Regulation of apo B production in HepG2 cells by citrus limonoids. In : Berhow MA, Hasegawa S, Manners GD, editors. Citrus limonoids functional chemicals in agriculture and foods. *Journal of the American Chemical Society*, 175-184.
- Ladigina E.Y., Safronitch L. N., Otriachenkova V. E., Balandina I. A. & Grinkevitch N.I. (1983). Analyse chimique des plantes médicinales (traduit Russe). Edition Moskva, Vischaya Chkola, Russie, 347 p.
- Lawrence R., Coates B., Steven J. L. & Joseph M. M. (1985). « Autoxidation in micelles. Synergism of vitamin C with lipid-soluble vitamin E and water-soluble Trolox », *Canadian Journal of Chemistry*, 63(2) : 366-374.
- Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. & Lee C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food Chemistry*, 51 : 7292-7295.
- Lecerf J. M. (2006). *Cahiers de nutrition et de diététique*, 41(5) : 199-305.
- Li J. & Jiang Y. (2007). Litchi Flavonoids : Isolation, identification and biological activity. *Molecules*, 12 : 745-758.
- Lincoln T. & Eduardo Z. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology*, Fourth Edition, Sinauer Associates, 700 p.
- Mabberley D.J., Pannell C.M. & Sing A.M. (1995). Meliaceae. *Flora Malesiana*, Series.1, 12 : 1-407.
- Mabberley D. J., Pannell C. M., Edmonds J. M. & Sing, A. M. (2007). Meliaceae. In: *E. Soepadmo*, Tree Flora of Sabah and Sarawak, 6 : 17-218.
- Mabberley D. J. (2011). Meliaceae. In: K. Kubitzki (eds), The Families and Genera of vascular plants, 10, Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 185-211.

- Mahajan V., Sharma N., Kumar S., Bhardwaj V., Ali A., Khajuria R. K., Bedi Y. S., Vishwakarma R. A. & Gandhi S. G. (2015). Production of rohitukine *in* leaves and seeds of *Dysoxylum binectariferum*: an alternate renewable resource. *Pharmaceutical Biology*, 53(3) : 446-450.
- Mamyrbekova-Bekro J. A., Dogbo D., Gogbeu S. J & Bekro Y.A. (2010). On the Qualitative Phytochemical Composition of Crude Hydromethanolic extracts of the Leaves of 6 Varieties of *Manihot Esculenta* Crantz of Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 45(2) ; 200-211.
- Mane S. (2012). Etude comparée des propriétés antioxydantes des extraits d'écorces de tronc, des feuilles et des fruits (coques et graines) de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss (Meliaceae). Thèse de Doctorat, UFR Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou, Burkina-Faso, 120 p.
- Manners G. D., Jacob R. A., Breksa A. P., Hasegawa S. & Schoch T. K. (2003). Bioavailability of *Citrus Limonoids* in Hu. mans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 : 4156-4161.
- Margareta S. (2017). The chemistry of plants and insects. plants, bugs, and molecules, *Royal Society of Chemistry*, 1-63.
- Markham K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London, 113p.
- Mbaye D. D., Seck M., Sy G. Y., Faye J. M., Sarr A., Faye B. & Faye B. (2013). Activité antiinflammatoire de la graine de *Ccarapa procera* (Meliaceae). *Revue Cames, Sciences des Structures et de la Matière*, 1 : 17-28.
- McFarland K., Mulholland D. A. & Fraser L. A. (2004). Limonoids from *Turraea Floribunda* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 65 : 2031-2037.
- Menet M. C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*, 437 :41-53.
- Meyer A., Deiana J. & Leclerc H. (1994). Cours de microbiologie générale, nouveau programme, Biosciences et techniques. Éditions Doin, Paris (France) : 5-7.
- Meyer A., Deiana J. & Bernard A. (2004). Cours de microbiologie générale avec cours et exercices corrigés. 2^{ème} Edition. Doin, Paris (France), 430 p.
- Michael H. (2003). Modern spectroscopy, Other Wiley Editorial Offices, 4th éditon, 1-482.
- Michaël. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary. *Metabolites Medicines*, 2(3) : 251-286.
- Michelle N. C. (2007). Supramolecular photochemistry *in* zeolites : From catalysts to sunscreens. *Pure and Applied Chemistry*, 79(1) :1-20.

- Miller E. G. & Porter J. L. (2004), Further studies on the anticancer activity of *citrus limonoids*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15) : 4908-4912.
- Mohana K. P., Soujanya K. N., Ravikanth G., Vasudeva R., Ganeshiah K. N. & Shaanker R.U. (2014). Rohitukine, a chromone alkaloid and a precursor of flavopiridol, is produced by endophytic fungi isolated from *Dysoxylum binectariferum* Hook.f and *Amoora rohituka* (Roxb). *Phytomed*, 21 : 541-546.
- Moore A., Wisniewski A. & Dobs M. (2003). Endocrine treatment of transsexual people : a review of treatment regimens, outcomes, and adverse effects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8) : 3467-3473.
- Mounira A. & Mahdia H. (2015). Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf). Mémoire de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar D'el-Oued, (Algerie), 106 p.
- Mpondo M. E., Ngene J.P., Mpounze S. L., Etame L. G., Ngo B. P.C., Yinyang J. & Dibong S.D. (2017). Connaissances et usages traditionnels des plantes médicinales du département du Haut Nyong. *Journal of Applied Biosciences*, 113 : 11229-11245.
- Mulholland D. A. & Taylor D.A. (1988). Protolimonoids from *Turraea nilotica*. *Phytochemistry*, 27: 1220-1221.
- Mulholland D. A., Monkhe T.V., Coombes P. H. & Rajab M. S. (1998). Limonoids from *Turraea holstii* and *Turraea floribunda*. *Phytochemistry*, 49 : 2585-2590.
- Mulholland D. A., Monkhe T.V., Taylor D. A. & Rajab M.S. (1999). Triterpenoids from *Turraea holstii*. *Phytochemistry*, 52 : 123-126.
- Mulholland D.A., Parel B. & Coombes P.H. (2000). The chemistry of Meliaceae and Ptaeroxylaceae of southern and eastern Africa and Madagascar. *Current Organic Chemistry*, 4(10) : 1011-1054.
- Muanda F., Dicko A. & Soulimani R. (2010). Assessment of polyphenolic compounds, *in vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of *Securidaca longepedunculata* root barks. *Comptes Rendues. Biologies*, 333 : 663-669.
- Muyonga J. H., Andabati B. & Ssepuuya G. (2014). Effect of heat processing on selected grain amaranth physicochemical properties. *Food Science & Nutrition*, 2(1) : 9-16.
- Murata T., Miyase T., Muregi F. W., Naoshima I. Y., Umehara K., Warashina T. & Ishih A. (2008). Antiplasmodial triterpenoids from *Ekebergia capensis*. *Journal of Natural Products*, 71 : 167-174.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D. & Aké A. L. (2009a). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes. *Journal of Natural & Science*, 6 : 1-15.

- N'Guessan K., Tra Bi F. H. & Koné M. W. (2009b). Etude ethnopharmacologique de plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle chez les Abbey et Krobou d'Agboville (Côte d'Ivoire). *Journal of Ethnopharmacology*, 44 : 42-50.
- Nacoulma O. (1996). Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso : cas du Plateau central. Thèse de Doctorat, Laboratoire de Biologie et Ecologie Végétale, Université de Ouagadougou, Burkina-Faso, 605 p.
- Nakatani M., Abdelgaleil S. A. M., Saad M. M. G., Huang R. C., Doe M. & Iwagawa T. (2004). Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. *Phytochemistry*, 65 : 2833-2841.
- Ndung 'u M.W., Kaoneka B., Hassanali A., Lwande W., Hooper A. M., Tayman F. & Torto B. (2004). New mosquito larvicidal tetranortriterpenoids from *Turraea wakefieldii* and *Turraea floribunda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 : 5027-5031.
- Ndung'u M., Hassanali A., Hooper A. M., Chhabra S., Miller T. A., Paul R. L. & Torto B. (2003). Ring A-seco mosquito larvicidal limonoids from *Turraea wakefieldii*. *Phytochemistry*, 64 : 817-823.
- Nieschlag E., Büchter D. & Von Eckardstein S. (1999). Repeated intramuscular injections of testosterone undecanoate for substitution therapy in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (Oxford)*, 51(6) : 757-763.
- N'gaman K.C.C., Békro Y.A., Mamyrbékova-Békro J.A., Bénié A & Goozé Bi S. (2009). Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbenaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest : Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Scientific Research* 36 (2): 161-171.
- Noudèkè N. D., Dotché I., Ahounou G. S., Karim I.Y. A. & Farougou S. (2017). Inventory of medicinal plants used in the treatment of diseases that limit milk production of cow in Benin. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 4(1) : 1-14.
- Novais M. H. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93 : 183-195.
- OCDE. (2002). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits Chimiques : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë, N° 423, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (section 4 : effets sur la santé), 14 p.
- Ogni C. A., Kpodekon M. T., Dassou H. G., Boko C. K., Koutinhoun B. G., Dougnon J. T., Youssa A. K., Yedomonhan H. & Akoegninou A. (2014). Inventaire ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement des pathologies parasitaires dans les élevages extensifs et semi-intensifs du Bénin. *Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(3) : 1089-1102.

- Ogweno M. J., Yenesew A., Juma B. F., Derese S., Ayoo J. A., Aluoch A.O. & Guchu S. (2002).. Bioactive compounds from some Kenyan ethnomedicinal plants: Myrsinaceae, Polygonaceae and Psiadia punctulata. *Phytochemistry Reviews* 1 (3) : 311-323.
- Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. & Takahara Y (1993). Antioxidant activity of tannins and flavonoïds in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33 : 557-561.
- Okuda T. & Ito H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16 : 2191-2217.
- Olayinka A. O., Onoruvwe O. & Lot T. Y. (1992). Cardiovascular effects of the methanolic extracts of the stem bark of *Khaya senegalensis*. *Phytotherapy Research*, 6(5) : 282-284.
- Olivier T., David S., Bertrand P. & Erick D. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3) : 207-217.
- OMS. (2005). Stratégie de l’OMS pour la medecine traditionnelle, Genève (Suisse), 78 p.
- Opa A. (2003). Stratégies thérapeutiques actuelles dans la prise en charge médicale de l’impuissance sexuelle à propos de 104 patients reçus au Service d’urologie du CHU de Cocody de 1998 à 2001. Thèse de Doctorat, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Cocody (Abidjan, Côte d’Ivoire), 85 p.
- Ouayogode A. (2021). Etude ethnobotanique, chimique et activités pharmacologiques de plantes et recettes antimalariques de Côte d’Ivoire. Thèse de Doctorat, Université Paris-Saclay (France),45p.
- Oussou K. R., Yolou S., Boti J. B., Guessennnd K. N., Kanko C., Ahibo C. & Casanova J. (2008). Etude chimique et activité antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *Journal European of Scientific Research*, 24 : 94-103.
- Ovcacikova M., Lída M., Cífkova E. & Holcapek M. (2016). Lipidomic Analysis. *Journal of Chromatography A*, 1450 : 76-85.
- Ovesna Z., Vachalkova A. & Horvathova K. (2004). Taraxasterol and β -sitosterol : new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma*, 51 : 407-414.
- Owino J. H. O., Ndung’u M. & Hassanali A. (2008). Two new Azadiron limonoids from *Turraea cornucopia*. *Journal of the Chemical Society*, 5 : 43-49.
- Paris M. & Haisbielle H. (1981). Abrégé de Matière médicale pharmacognosie, tomes 1, Masson M Edition. Paris, 339 p.

- Perez J. L., Jayaprakasha G. K., Valdivia V., Munoz D., Dandekar D. V., Ahmad H. & Patil B. S. (2009). Limonin methoxylation influences the induction of glutathione S-transferase and quinone reductase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 :5279-5286.
- Pernin A. (2019). Action antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des milieux modèles et des émulsions riches en lipides insaturés. Thèse de Doctorat, Faculté d'Agriculture, d'Alimentation, de Biologie, d'Environnement et de Santé. Université Paris-Sacla (France), 65p.
- Phan-Thi H. & Waché Y. (2014). Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment. UV-vis spectra as a marker. *Food Chemistry*, 156 : 58-63.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. & Defraigne J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 233-239.
- Ponce A. G., Fritz R., Del V. C. E. & Roura S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm Wiss Technology*, 36 : 679-684.
- Poulose S. M., Harris E. D. & Patil B. S. (2005). *Citrus limonoids* induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *Journal of Nutrition*, 135(4) : 870-877.
- Pousset J. L. (2006). Place des médicaments traditionnels en Afrique. *Institute of Tropical Medicine*, 66 : 606-609.
- Prescott L., Harley J. & Klein D. (2003). Microbiologie. 2^{ème} Edition Bruxelles : De Boeck Université de Bruxelles (Belgiques), 1137 p.
- Qian M., Xing R. P., Shuang Y. L., Luo S.W., Xia W., Jin R. D., Rui C., Lin Z., Xiao N. L. & Ming H. Q. (2016). Lactam triterpenoids from the bark of *Toona sinensis*. *Natural Products and Bioprospecting*, 6 : 239-245.
- Quirantes P. R., Lozano S. J., Herrero M., Ibanez E., Segura C. A. & Fernández G. A. (2013). HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterizing phenolic compounds in olive leaf extracts. *Phytochemical analysis*, 24 : 213-223.
- Radika M. K., Viswanathan P. & Anuradha C.V. (2013). Nitric oxide mediates the insulin sensitizing effects of β -sitosterol in high fat diet-fed rats. *Nitric Oxide*, 32(1) : 43-53.
- Rajab M. S., Bentley M. D., Hassanali A. & Chapya A. (1988). A new limonoid from *Turraea robusta*. *Phytochemistry*, 27 : 2353-2355.
- Randrianarivony T. N., Randriatsivory M. F., Andriamihajarivo T. H. & Callmander M.W. (2017). A new species of *Turraea* (Meliaceae) from Southwestern Madagascar. *Candollea*, 72 : 283-288.

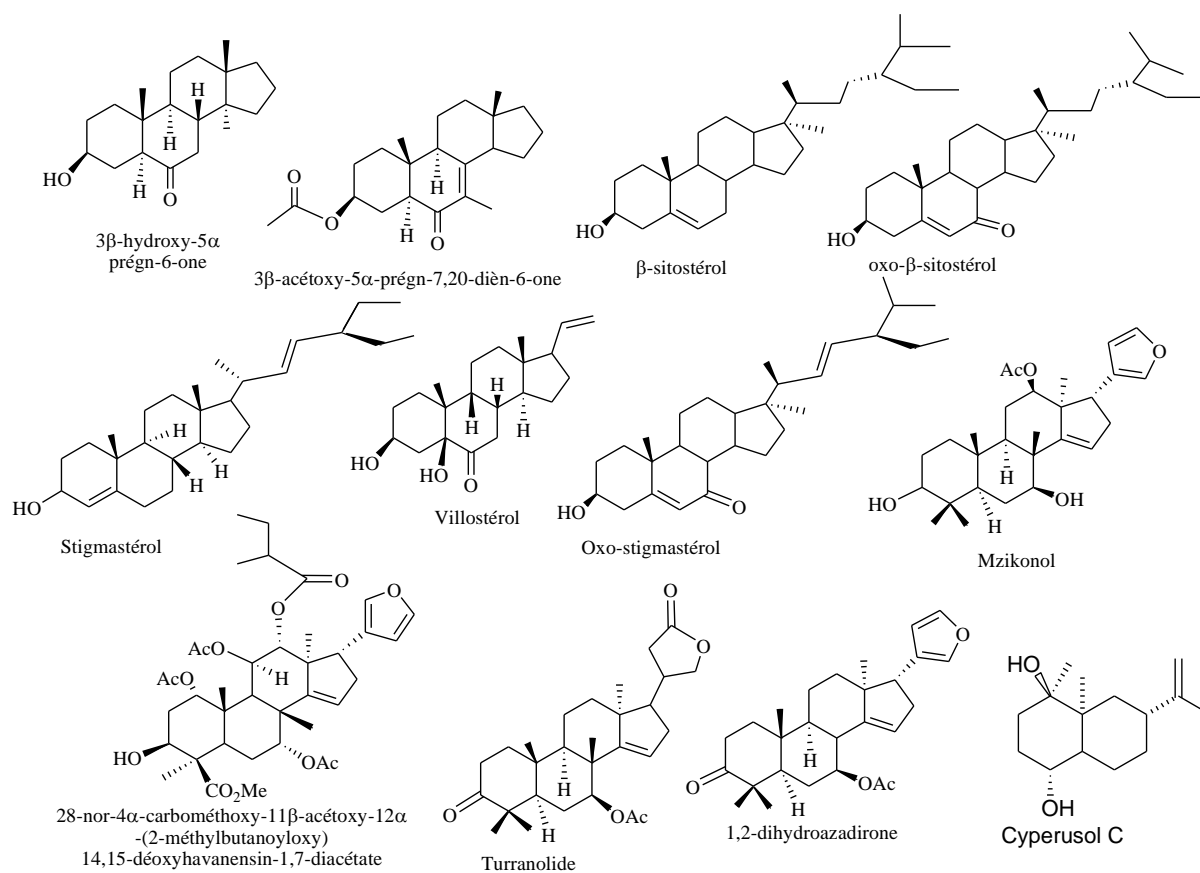
- Ranke M. & Bierich J. (1986). Treatment of growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 15(3) : 495-510.
- Rasamison V. E., Rakotondraibe L. H., Sleboznick C., Brodie P. J., Ratsimbason M., Dyke T.K., Shen Y., Randrianjanaka L. M. & Kingston D. G. (2014). Nitrogen-containing dimeric nor-multiflorane triterpene from a *Turraea* sp. *Organic Letters*, 16(10) : 2626-2629.
- Reddy N. S., Gumireddy K. & Mallireddigari M. R. (2005). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13 : 3141-3147.
- Rhattas M., Allal D. & Lahcen Z. (2016). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, 97 : 9187-9211.
- Richard B.W. & Jace D. E. (2009). Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4-25) : 1156-1161.
- Rivière C., Nicolas J. P., Caradec M. L., Désiré O. & Schmitt A. (2005). *Bulletin de la Société Française d'Ethnopharmacologie et de la Société Européenne d'Ethnopharmacologie*, 36 : 36-50.
- Roberta R., Nicoletta P., Anna P., Ananth P., Min Y. & Catherine R. E. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(9-10) : 1231-1237.
- Roger C. (1992). Impact des pesticides chimiques et biologiques sur la survie et l'efficacité de prédation de *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coleoptera : Coccinellidae). Mémoire de maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal (Canada), 76 p.
- Sanogo R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Thèse de Pharmacie 2. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Université Bamako, Mali, 53 p.
- Sarker S. D., Savchenko T., Whiting P., Sik V. & Dinan L. (1997). Two limonoids from *Turraea obtusifolia* (Meliaceae), prierianin and rohitukin, antagonise 20-hydroxyecdysone action in a *Drosophila* cell line. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35 : 211-217.
- Seth S. D., Johri N. & Sundaram K. R. (1982). Antispermatic effect of embelin from *Embelia ribes*. *Indian Journal of Pharmacology* 14 (2) : 207-211.
- Sewram V., Raynor M.W., Mulholland D. A. & Raidoo D. M. (2000). The uterotonic activity of compounds isolated from the supercritical fluid extract of *Ekebergia capensis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 : 133-145.

- Shaghghi M. A., Abumweis S. S. & Jones P. J. H. (2013). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterol/stanols provided in capsule and tablet formats : results of a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(11) : 1494-1503.
- Shah K., Montoya C. & Persons R. (2007). Do testosterone injections increase libido for elderly hypogonadal patients. *Journal of Family Practice*, 56(4) : 301-305.
- Shi C., Wu F., Zhu X. & Xu J. (2013). Incorporation of β -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3 β signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(3) : 2538-2544.
- Silverstein R. M., Webster F. X. & Kiemle D. (2005). Spectrometric identification of organic compounds, seventh Edition, John Wiley and Sons, 512 p.
- Singh R., Singh S., Jeyabalan G. & Ali A. (2012). An overview on traditional medicinal plants as aphrodisiac. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(4) : 47-56.
- Skoog D. A., Donald M. W., James H. F. & Stanley R. C. (2007). Principles of instrumental analysis, 6th ed., Belmont, CA : Thomson Brooks/Cole, 169-173.
- Soha S. A. S., Dougnon T. J., Ougnon T. J., Ohouko F. H. O., Kpodekon M.T. T. & Youssao A.K. (2019). Activités biologiques et utilisations de *Elaeis guineensis* (Jacq) et de *Khaya senegalensis* (Desr) en médecine traditionnelle humaine et vétérinaire. *Journal International of Biological and Chemical Sciences*, 13(1) : 525-542.
- Stephen P. (2016). Essentials of toxic chemical risk. Science and Society. CRC Press: 49-79.
- Tan Q. G. & Luo X. D. (2011). Meliaceae limonoids. *Chemical Reviews*, 111 : 7437-7522.
- Taylor A. R. & Taylor D. A. (1984). Limonoids from *Ekebergia pterophylla*. *Phytochemistry*, 23 : 2676-2677.
- Tian Q. & Miller E. G. (2001). Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutrition and Cancer*, 40(2) : 180-184.
- Torto B., Bentley M. D., Cole J. W., Hassanali A., Huang F.Y., Gelbaum L. & Vanderveer D. G. (1995). Limonoids from *Turraea floribunda*. *Phytochemistry*, 40 : 239-243.
- Tra Bi F.H. (1997). Utilisation des plantes par l'homme dans les forêts classées du Haut-Sassandra et de Scio en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat, 3ème cycle, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire), 215 p.
- Vandendriessche S., Kadlec K., Schwarz S. & Denis O. (2011). Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene erm(T) in Belgian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 : 2455- 2459.

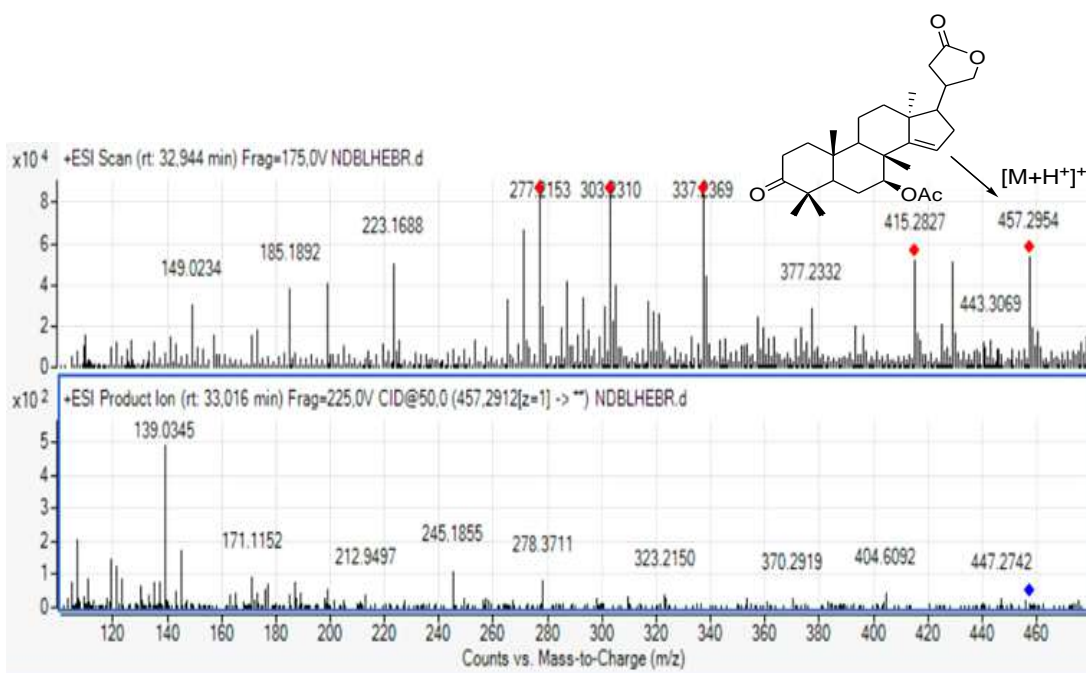
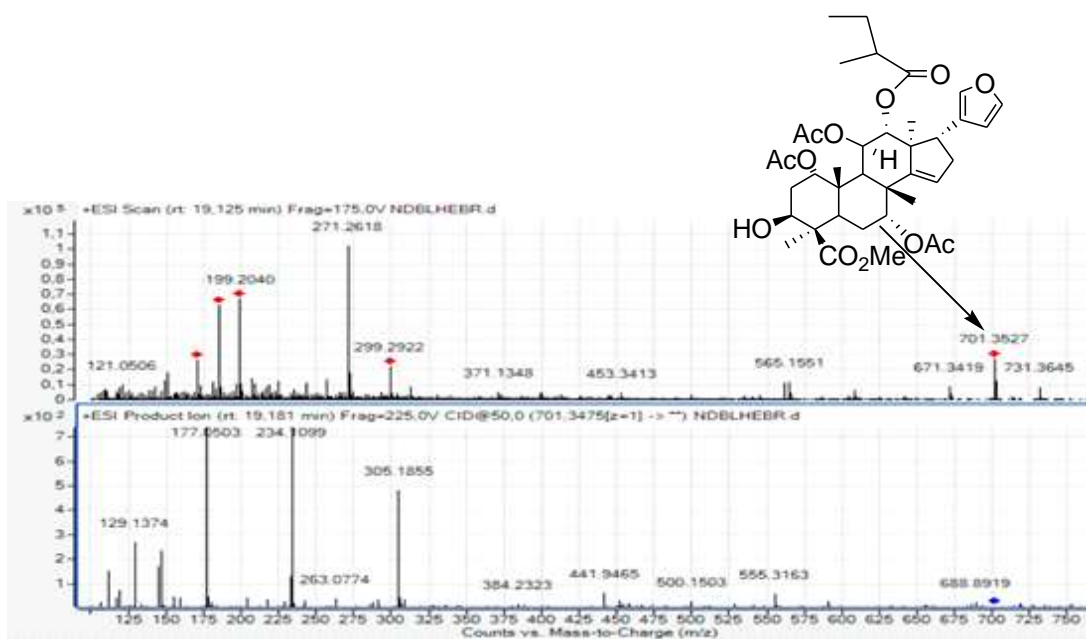
- Wagner H. (1983). *Drogen analyse, Dünschicht chromatographische Analyse von Arzneidrogen*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York (Etats-Unis), 522 p.
- Wang X. N., Fan C. Q. & Yue J. M. (2006). New pregnane steroids from *Turraea pubescens*. *Journal International Research of Steroids*, 71 : 720 -724.
- Wang X. N., Yin S., Fan C. Q., Lin L. P., Ding J. & Yue J. M. (2007). Eight new limonoids from *Turraea pubescens*. *Tetrahedron*, 63 : 8234-8241.
- Wang X. N., Fan C. Q., Yin S., Lin L. P., Ding J. & Yue J. M. (2008). Cytotoxic terpenoids from *Turraea pubescens*. *Journal of Helvetica Chimica Acta*, 91 : 510-519.
- Wang J. R., Liu H. L., Kurtán T., Mándi A., Antus S., Li J. & Guo Y. W. (2011). Protolimonoids and norlimonoids from the stem bark of *Toona ciliata* and *Turraea pubescens*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9 : 7685-7696.
- Weber N., Birnbaum P., Forget P. M., Gueye M. & Kenfack D. (2009). L'huile de carapa (carapa spp., Meliaceae) en Afrique de l'Ouest : utilisations et implications dans la conservation des peuplements naturels. *Fruits*, 65 : 343-354.
- Vernin G. (1970). *Chromatographie en couche mince: Techniques et applications en chimie organique*, Dunod Edition, Paris (France), 7 p.
- Xu J. J., Fan J. T., Zeng G. Z. & Tan N. H. (2011). A new tetracyclic diterpene from *Jatropha curcas*. *Journal of Helvetica Chimica Acta*, 94 : 842-846.
- Yaacoub R. (2009). Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux. Intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés. Thèse de doctorat. N° 2009A GPT 0048. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech), Paris (France), 176 p.
- Yadav N. K., Raghuvanshi A., Sharma G., Beg S., Katare O. P. & Nanda S. (2016). QbD-Based development and validation of a stability-indicating HPLC method for estimating ketoprofen in bulk drug and proniosomal vesicular system. *Journal of Chromatography A*, 54(3) : 377-389.
- Yakusu K. E., Monthe S. F., Bourland N., Hardy J. O., Louppe D., Mbele B. L., Hubau W., Muhongya K. M. J., Bulcke D. V. J., Acker V. J. & Beeckman H. (2018). Le genre *Entandrophragma* (Meliaceae) : taxonomie et écologie d'arbres africains d'intérêt économique (synthèse bibliographique). *Biotechnology, agronomy, society and environment*, 22(2) :1-15.
- Yassin A. & Saad F. (2007). Improvement of sexual function in men with late-onset hypogonadism treated with testosterone only. *Journal of Sexual Medicine*, 4(2) : 497-501.
- Yu J. & Wang L. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23 ; 53(6) : 2009-2014.

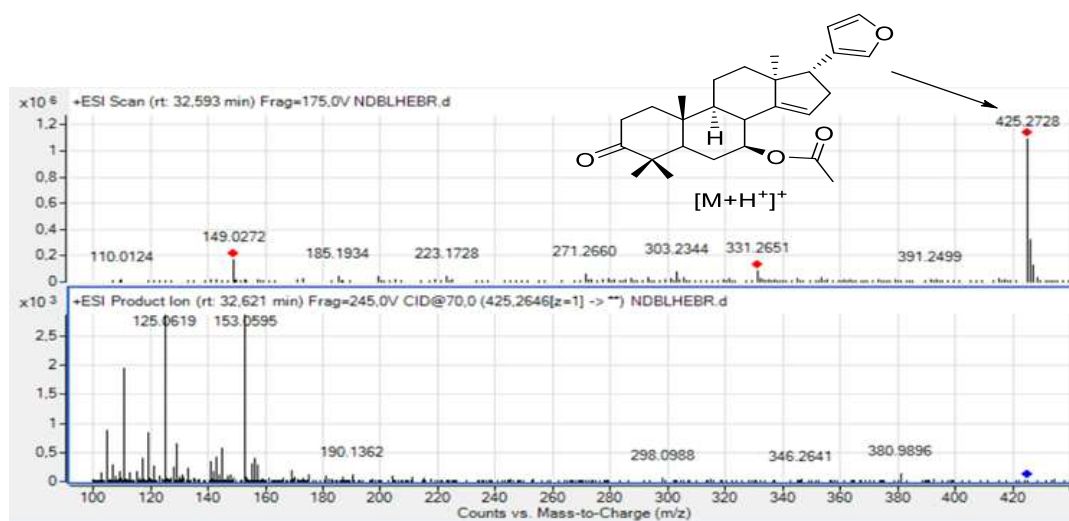
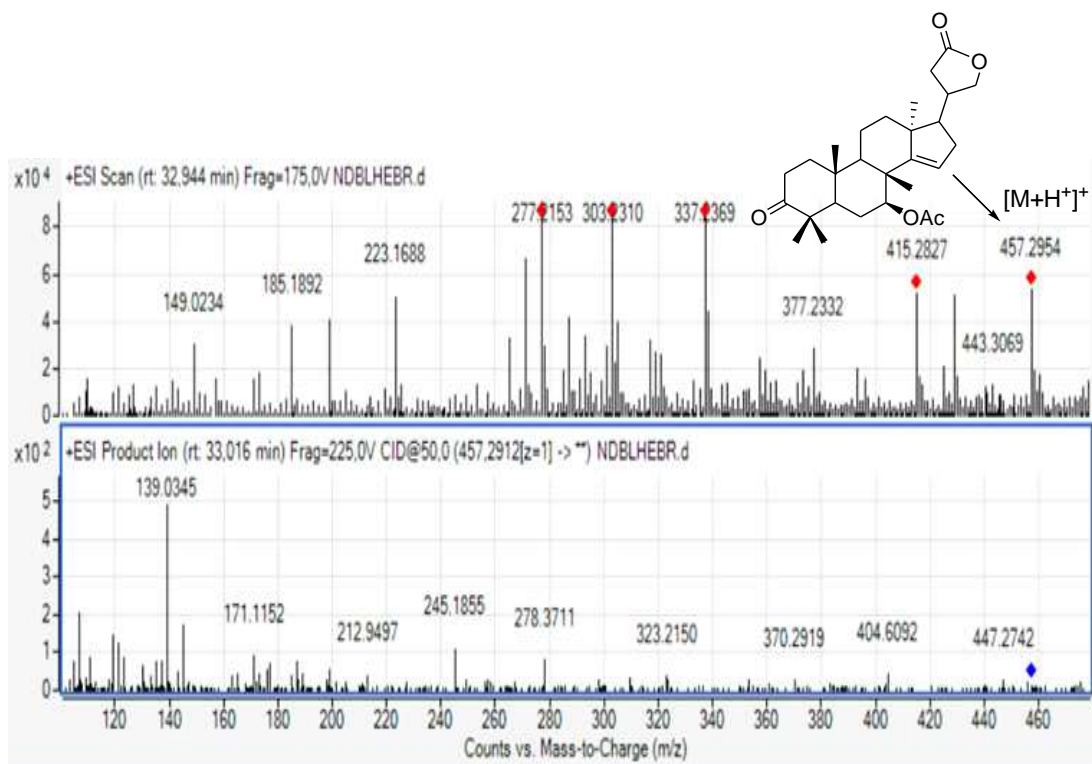
-
- Yu S. S., Yan Z., Hao T. L., Chuan H. W., Hesham R., Wen K. Y., Zi W. W, Chun B. L., Xu-Fu Z. & Guo Y. K. (2020). Limonoids from Citrus : Chemistry, anti-tumor potential, and other bioactivities. *Journal of Functional Foods*, 75 : 104-213.
- Yuan C. M., Tang G. H., Wang X. Y., Zhang Y., Cao M. M., Li X. H. & Hao X. J. (2013). New steroids and sesquiterpene from *Turraea pubescens*. *Fitoterapia*, 90 : 119-125.
- Yuan B., Derek M. & Matthew M. (2019). Methods for trace analysis of short, medium, and longchain chlorinated paraffins : Critical review and recommendations. *Journal of Analytical Chimical Actal*, 1074 : 16-32.
- Zhang J., Kinnon M., Leaman D., Arnason J. T. & Philogene J. R. (2007). Antifeedant activities of triterpenoids isolated from tropical Rutales. *Journal of Stored Products Research*, 43 : 92-96.
- Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y. & Wang X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Royal Society of Chemistry*, 137(2) : 293-300.
- Zhao H. R., Zhao S. X., Sun C. Q. & Guillaume D. (1989). Glucosylsterols in extracts of *Euryale ferox* identified by high resolution NMR and Mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 30 : 1633-1637.

ANNEXES

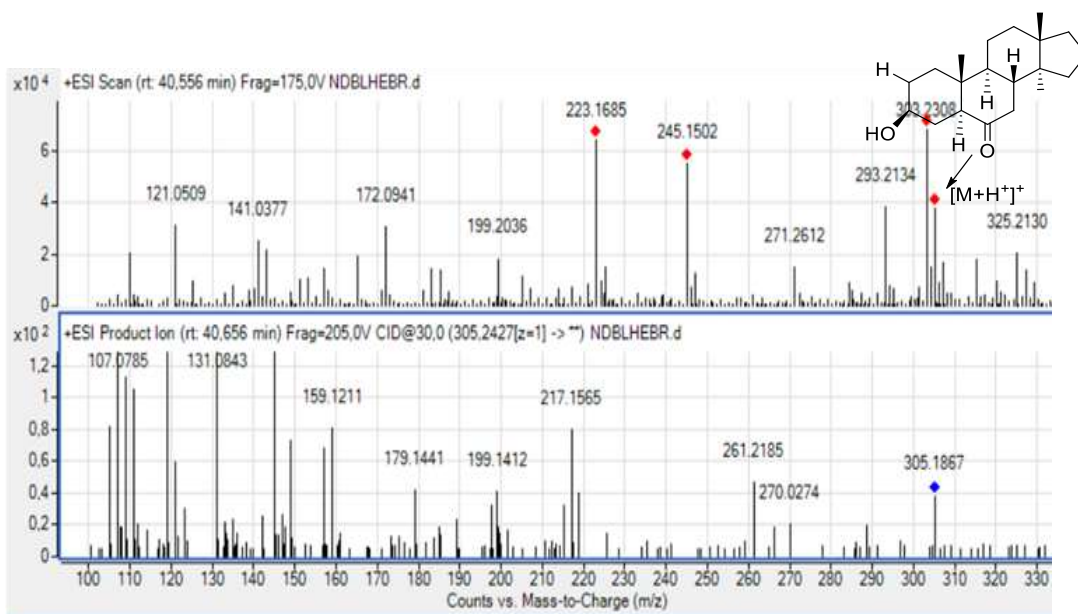
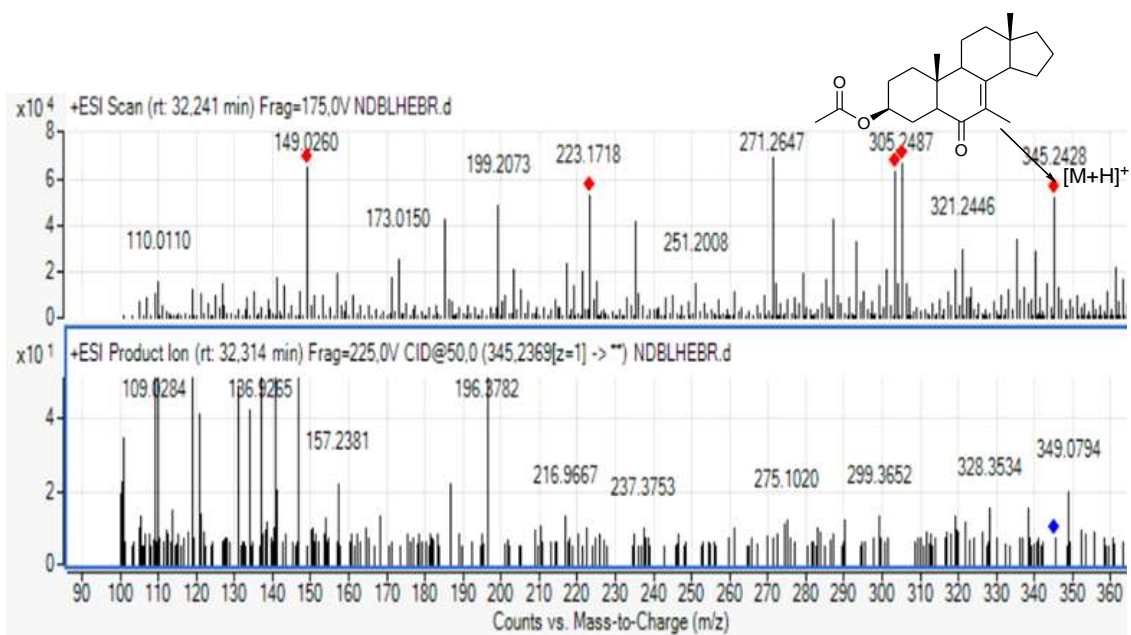
Annexe 1 : Composés identifiés de l'extrait des feuilles de *Turraea heterophylla*.


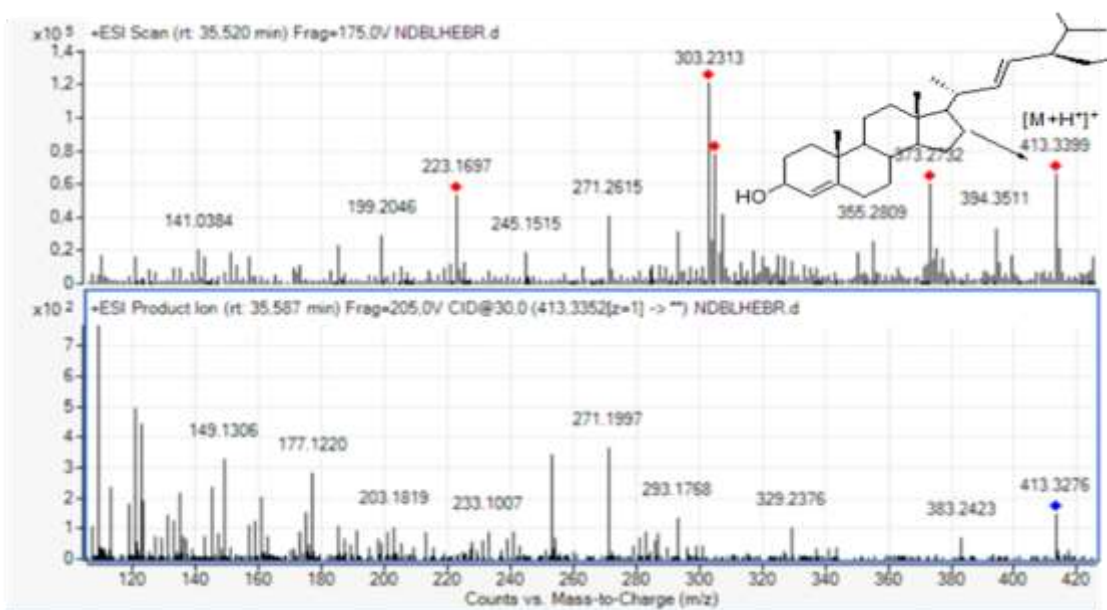
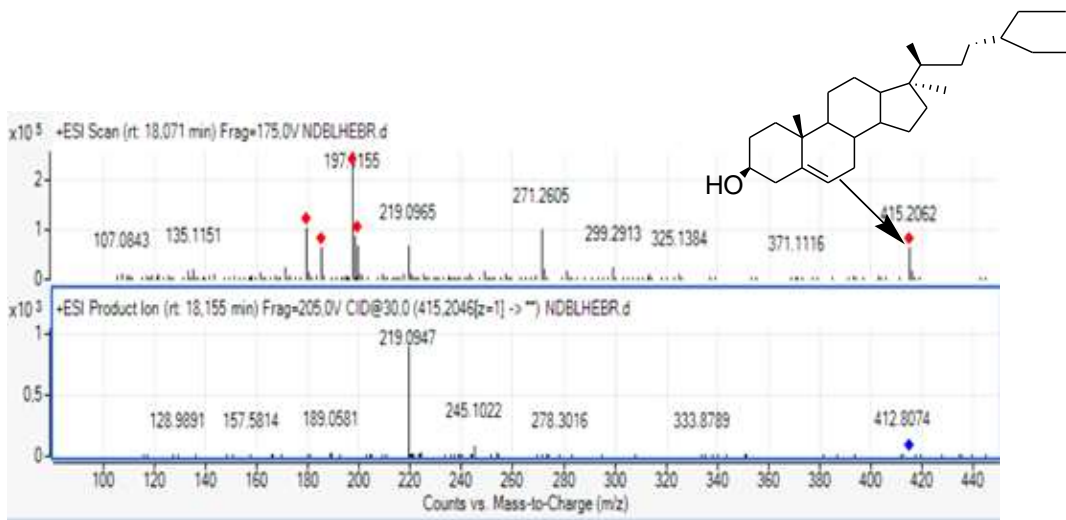
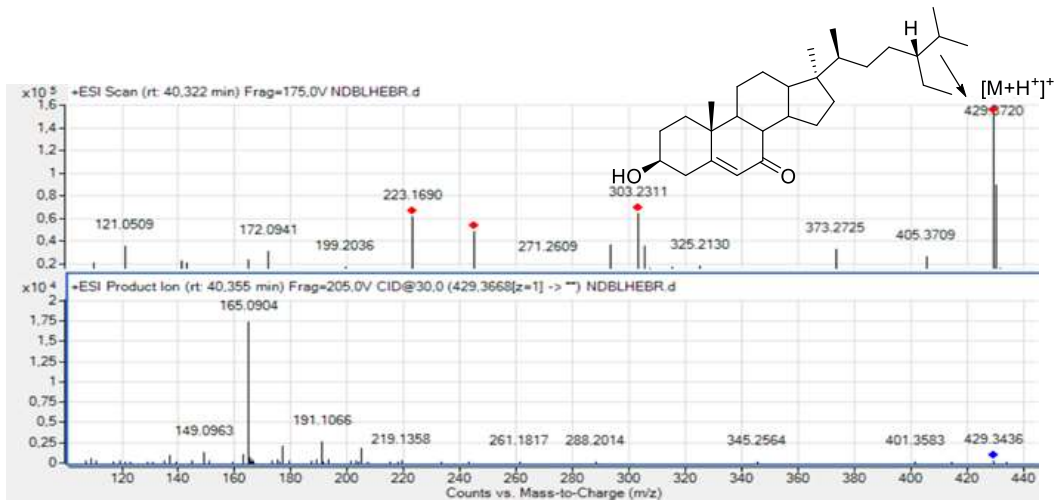
Annexe 2 : Composés limonoïdes

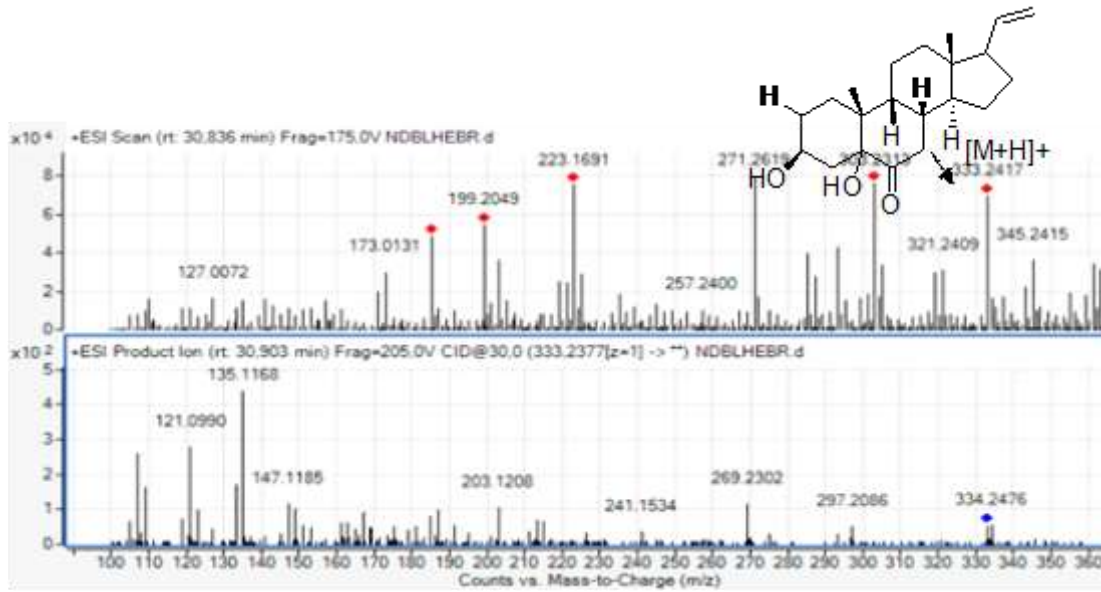




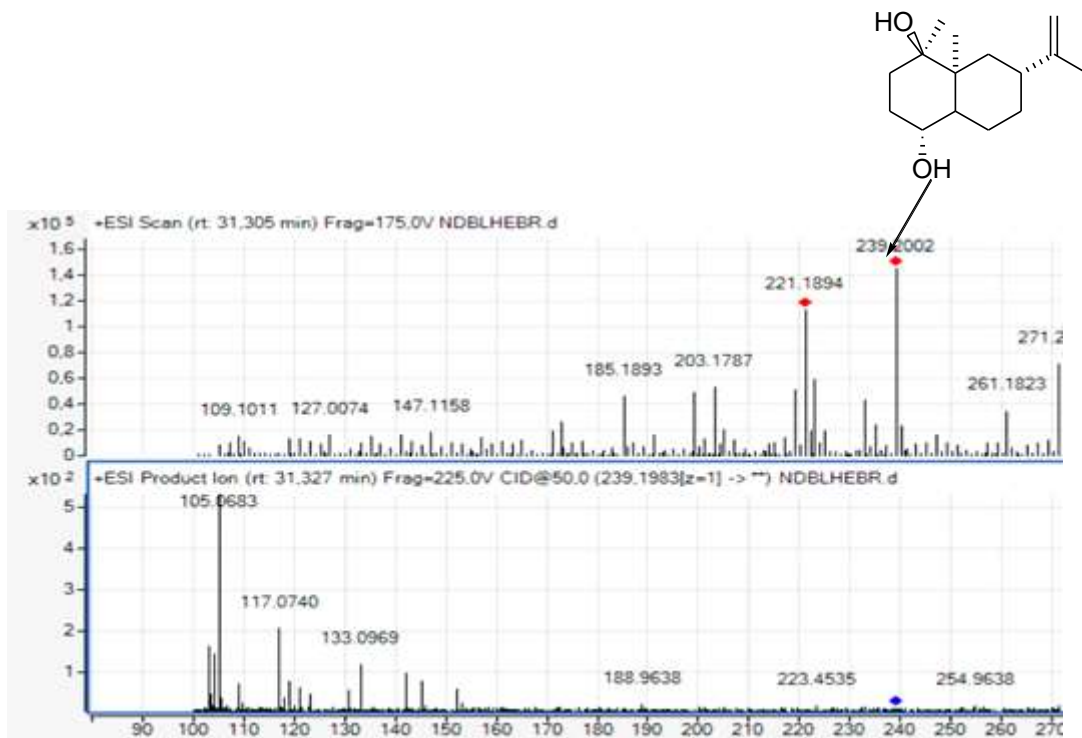
Annexe 3 : Composés stéroïdes







Annexe 4 : Composés sesquiterpénoïdes



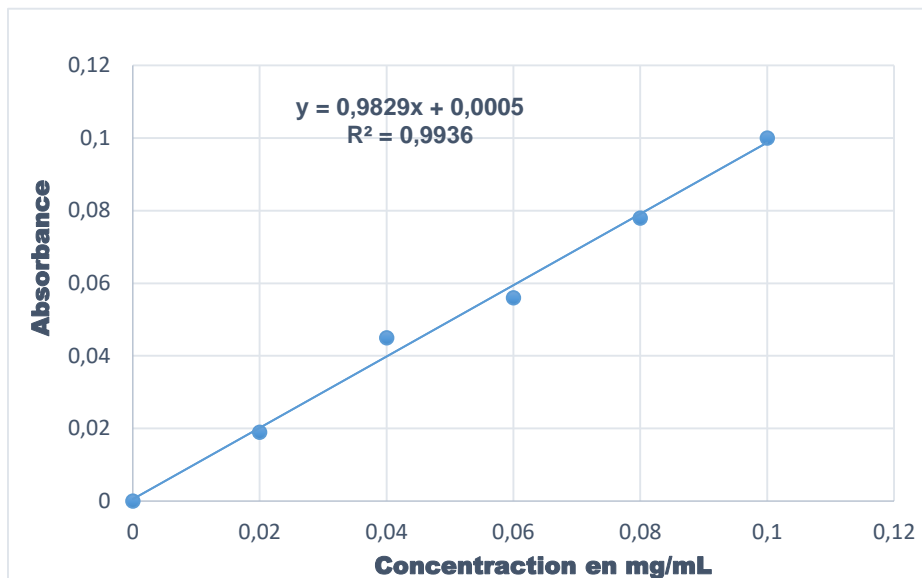
Annexes 5 : Tableaux récapitulatifs des composés identifiés.

Pics	Temps de rétention	Formules brutes	Ion sélectionné	Masses expérimentales/ m/z	Valeur calculée /m/z	Erreur mDa	Fragments MS ²	Composants chimiques (Références)
Limonoïdes C₂₇₋₄₄H₃₀₋₅₀O₅₋₁₇								
7	19,125	C ₃₈ H ₅₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	701,3527	702,0027	-0,65	668,8919 ; 555,3166 ; 500,1503 ; 441,9465 ; 384,2323 ; 305,1855 ; 263,0774 ; 234,1099 ; 177,0503 ; 129,1374.	28-nor-4α-carbométhoxy-11β-acétoxy-12α-(2-méthylbutanoyloxy) 14,15- déoxyhavanensin-1,7-diacétate (Ndung'u <i>et al.</i> , 2004).
24	32,593	C ₃₁ H ₃₉ O ₄	[M+H] ⁺	425,2728	427,2828	-2,01	380,9896 ; 346,2641 ; 298,0988 ; 190,1362 ; 153,0595 ; 125,0619.	1,2-dihydroazadirone (Rajab <i>et al.</i> , 1988 ; Bentley <i>et al.</i> , 1992)
25	32,944	C ₂₈ H ₄₀ O ₅	[M+H] ⁺	457,2954	459,4054	-2,11	447,2742 ; 404,6092 ; 370,2919 ; 323,2150 ; 278,3711 ; 245,1855 ; 212,9457 ; 171,1152 ; 139,0345	Turranolide (Rajab <i>et al.</i> , 1988 ; Bentley <i>et al.</i> , 1992)
25	32,944	C ₂₈ H ₄₀ O ₅	[M+H] ⁺	457,2954	459,4054	-2,11	424,9184 ; 371,9377 ; 338,7283 ; 306,4160 ; 279,1294 ; 244,1073 ; 197,0194 ; 170,0648 ; 139,0373.	Mzikonol (Rajab <i>et al.</i> , 1988 ; Bentley <i>et al.</i> , 1992)
Stéroïdes C₁₉₋₂₉H₂₅₋₅₀O₁₋₃								
20	30,836	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	[M+H] ⁺	333,2417	331,0517	2,19	297,2086 ; 269,2302 ; 241,1534 ; 203,1208 ; 147,1185 ; 135,1168 ; 121,0990.	Villosterol (Chiplukar <i>et al.</i> , 1993 ; Sarker <i>et al.</i> , 1997)
23	32,241	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	[M+H] ⁺	345,2428	345,0128	0,23	328,3534 ; 299,3652 ; 275,1020 ; 237,3753 ; 216,9667 ; 196,3782 ; 157,2381 ; 186,1265	3β-acétoxy-5α-prégn-7,20-dièn-6-one (Wang <i>et al.</i> , 2008 ; Yuan <i>et al.</i> , 2013)
35	38,691	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	[M+H] ⁺	427,3565	422,7665	4,59	413,1975 ; 381,1567 ; 346,8304 ; 324,3293 ; 301,2211 ; 256,4069 ; 225,0881 ; 185,1135 ; 137,1314 ; 123,0734.	Oxo-stigmastérol (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley <i>et al.</i> , 1995)

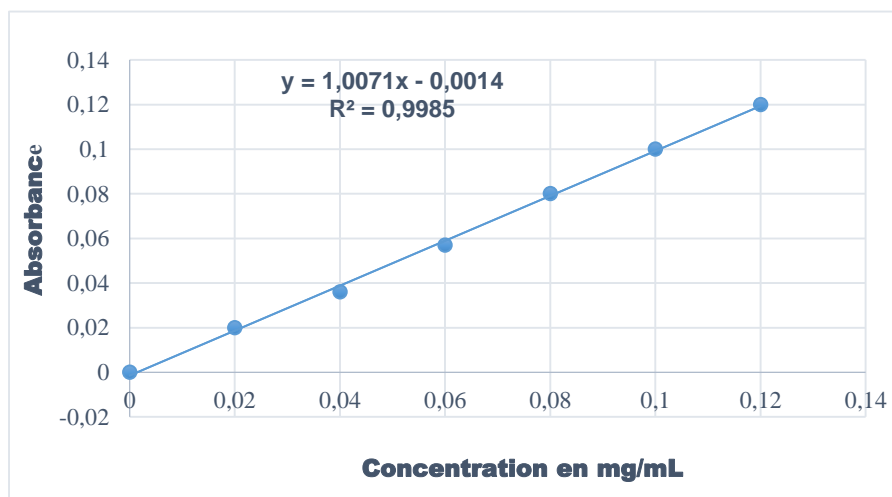
38	40,322	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	[M+H] ⁺	429,3720	428,6120	0,76	429,3436 ;401,3583 ;345,2564 ;288,2014 ; 261,1817 ;219,1358 ;191,1066 ;165,0904	Oxo-β-sitostérol (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley <i>et al.</i> ,1995
39	40,556	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	305,1867	305,6167	-0,43	270,0274 ;261,2185 ;217,1565 ;199,1412 ;1 31,0843 ;107,0785.	3-β-hydroxy-5α-prégn -6-one (Wang <i>et al.</i> , 2008; Yuan <i>et al.</i> , 2013)
8	20,071	C ₃₁ H ₂₆ O	[M+H] ⁺	415,2062	416,6962	-1,49	412,8074 ;333,3789 ;278,3016 ;245,1022 ;2 19,0947 ;189,0581 ;157,5814 ; 128,9891.	β-sitostérol (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley <i>et al.</i> ,1995)
30	35,520	C ₂₉ H ₄₈ O	[M+H] ⁺	413,3399	410,8299	2,51	383,2423 ;319,2376 ;293,1768 ;271,1997 ;2 33,1007 ;203,1819 ;177,1220 ;149,1306.	Stigmastérol (Mulholland & Taylor, 1988 ; Bentley <i>et al.</i> ,1995)
Sesquiterpénoïde C₁₅₋₁H₂₂₋₂₆O₂₋₈,								
21	31,305	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	[M+H] ⁺	239,2002	235,4002	3,8	223,4535 ;188,9638 ;133,0969 ;117,0740 ; 105,0683.	Cyperusol C (Wang <i>et al.</i> ,2008; Yuan <i>et al.</i> , 2013)

Annexe 6 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux

- Droite d'étalonnage de l'acide gallique



- Droite d'étalonnage de la quercétine



Annexe 7 : Tableaux biologiques

- Suivi du poids des rates

Météo hebdomadaire	Lots	1 ^{er} jour	3 ^e jour	6 ^e jour	9 ^e jour	12 ^e jour	15 ^e jour
Poids en (g) des rates témoins non traitées	1	108± 2	109± 3	111± 2	114± 2	115± 4	117± 3
	2	110± 3	112± 2	114± 3	115± 4	117± 3	119± 2
	3	112± 2	114± 3	115± 3	117± 3	119± 2	121± 4
Poids M (T)		110±2,3	111±2,7	113±2,7	115±3	117 ±3	119±3
	□		+1	+2	+2	+2	+2
Poids en (g) des rates traitées à la dose de 5 mg / kg de poids corporel	1	109± 3	112± 2	115± 3	118± 2	121± 2	124± 2
	2	111± 2	113± 3	116± 4	118± 3	122± 3	125± 3
	3	112± 3	113± 2	116± 4	119± 2	121± 2	125± 2
Poids M (5 mg)		110±2,7	112±2,7	115±3,6	118±2,7	121±2,7	124±2,7
	□		+2	+3	+3	+3	+3
Poids en (g) des rates traitées à la dose de 50 mg / kg de poids corporel	1	108± 2	111± 3	115± 2	118± 3	121± 2	125± 3
	2	110± 4	113± 3	117± 3	121± 4	123± 3	126± 3
	3	112± 3	114± 2	115± 2	119± 3	123± 3	128± 2
Poids (50 mg)		110±3	112±2,7	115±2,7	119±3,3	122±2,7	126±2,7
	□		+2	+3	+3	+3	+4
Poids en (g) des rates traitées à la dose de 300 mg / kg de poids corporel	1	111± 3	114± 4	117± 3	121± 3	125± 3	127± 2
	2	112± 2	115± 4	117± 3	122± 3	126± 3	128± 3
	3	114± 2	118± 4	120± 3	124± 3	126± 3	128± 3
Poids M (300 mg)		112±2,7	115±4	118±3	122±3	125±3	127±2,7
	□		+3	+3	+3	+3	+2
Poids en (g) des rates traitées à la dose de 2000 mg / kg de poids corporel	1	111± 2	113± 3	115± 3	119± 2	123± 2	128± 3
	2	112± 4	113± 3	117± 2	121± 3	125± 2	129± 4
	3	115± 3	117± 2	121± 3	124± 4	128± 3	132±2
Poids M (2000 mg)		112± 3	114±2,7	117±2,7	121±3	125±2,3	129±3
	□		+2	+4	+4	+4	+4

- Dosage de DPPH

DOSAGE DE DPPH									
Concentration (mg/mL)	0,5	1	1,5	2	2,5	3,5	4	4,5	5
Abs Extrait Aqueux	0,6107	0,6098	0,5774	0,6009	0,5593	0,5156	0,4554	0,4319	0,3805
	0,6109	0,6088	0,5777	0,6019	0,5590	0,5159	0,4559	0,4329	0,3807
	0,6105	0,6085	0,5770	0,6028	0,5597	0,5155	0,4551	0,4317	0,3809
Abs moyen	0,6107	0,6090	0,5773	0,6018	0,5593	0,5156	0,4554	0,4321	0,3807
% Inhibition DPPH	30,50	30,69	34,29	31,50	36,35	41,31	48,17	50,82	56,67
Abs Acetate	0,5985	0,5959	0,5881	0,5595	0,5255	0,4674	0,3965	0,3925	0,3890
	0,5988	0,5962	0,5895	0,5596	0,5266	0,4685	0,3971	0,3924	0,3889
	0,5989	0,5963	0,5914	0,5599	0,5278	0,4672	0,3983	0,3932	0,3893
Abs moyen	0,5987	0,5961	0,5896	0,5597	0,5267	0,4677	0,3973	0,3927	0,3891
% Inhibition DPPH	31,86	32,10	32,90	36,30	40,05	46,77	54,78	55,31	55,72
Abs Methanol	0,6974	0,6970	0,6314	0,6100	0,6131	0,4467	0,4329	0,3330	0,3287
	0,6975	0,6669	0,6313	0,6101	0,6134	0,4468	0,4327	0,3332	0,3289
	0,6977	0,6975	0,6312	0,6100	0,6132	0,4469	0,4328	0,3328	0,3292
Abs moyen	0,6975	0,6971	0,6314	0,6100	0,6132	0,4468	0,4328	0,3330	0,3289
% Inhibition DPPH	20,62	20,67	28,14	30,57	30,21	49,15	50,74	62,10	62,57
Abs Hexane	0,7015	0,6878	0,6787	0,5864	0,6879	0,7012	0,6629	0,4763	0,4353
	0,7017	0,6880	0,6785	0,5863	0,6878	0,7015	0,6630	0,4766	0,4354
	0,7019	0,6883	0,6789	0,5868	0,6880	0,7013	0,6631	0,4765	0,4353
Abs moyen	0,7017	0,6880	0,6787	0,5865	0,6879	0,7013	0,6630	0,4765	0,4353
% Inhibition DPPH	20,12	21,70	22,75	33,25	21,71	20,19	24,55	45,77	50,46
Abs DCM	0,6888	0,6709	0,5908	0,6145	0,5644	0,5560	0,5571	0,5502	0,4374
	0,6892	0,6715	0,5906	0,6144	0,5647	0,5561	0,5572	0,5501	0,4375
	0,6893	0,6711	0,5907	0,6148	0,5648	0,5560	0,5573	0,5500	0,4376
Abs moyen	0,6891	0,6712	0,5907	0,6146	0,5646	0,5560	0,5572	0,5501	0,4375
% Inhibition DPPH	21,58	23,61	32,77	30,05	35,75	36,72	36,59	37,39	50,21
Abs acide ascorbique	0,5360	0,5263	0,4029	0,3471	0,2750	0,1527	0,1217	0,0324	0,0127
% Inhibition	39,00	46,10	54,15	60,50	68,70	82,62	86,15	96,31	97,55

- Dosage de l'ABTS

DOSAGE DE L'ABTS									
Concentration (mg/mL)	0	3,75	5	6,25	10	11,25	11,5	13,75	15
Abs Aqueux	0	0,5619	0,4923	0,4738	0,4596	0,4661	0,3944	0,3768	0,3172
% Inhibition ABTS	0	20,81	31,50	34,07	36,05	35,15	45,12	47,57	55,87
Abs Acétate d'éthyle	0	0,5636	0,5225	0,5354	0,4470	0,4301	0,3942	0,3833	0,3084
% Inhibition ABTS	0	21,58	27,30	25,50	37,80	40,15	45,15	46,67	57,09
Abs Méthanol	0	0,5655	0,5636	0,5630	0,4669	0,4798	0,3943	0,3227	0,2318
% Inhibition ABTS	0	21,31	21,58	21,66	35,03	33,24	45,13	55,10	67,75
Abs Hexane	0	0,4915	0,4821	0,4679	0,4741	0,5133	0,5424	0,3104	0,4393
% Inhibition ABTS	0	31,61	32,92	34,90	34,03	28,58	24,53	56,81	58,87
Abs DCM	0	0,5674	0,5354	0,5092	0,1887	0,4561	0,5061	0,3557	0,2512
% Inhibition ABTS	0	21,05	25,50	29,15	23,74	36,54	29,58	50,50	65,05
Abs Trolox	0	0,5801	0,5169	0,4782	0,3518	0,3203	0,2856	0,2255	0,1839
% Inhibition	0	19,29	27,69	33,46	51,05	55,43	60,25	68,62	74,41

- Signes cliniques observés chez les rates

Observations	Lot Témoin		Lot Expérimental	
	6 heures	12 heures	6 heures	12 heures
Peau et fourrure	Normal	Normal	Normal	Normal
Yeux	Normal	Normal	Normal	Normal
Muqueuses	Normal	Normal	Normal	Normal
Diarrhées	Absence	Absence	Absence	Absence
Salivation	Absence	Absence	Absence	Absence
Léthargies	Absence	Absence	Absence	Absence
Rythmes cardiaque	Normal	Normal	Normal	Normal
Agressivité	Absence	Absence	Absence	Absence
Somnolence	Non	Non	Non	Non
Alimentation	Oui	Oui	Oui	Oui
Mobilité	Oui	Oui	Oui	Oui
Mortalité	Non	Non	Non	Non

PUBLICATIONS

Des résultats de la présente étude ont fait l'objet de publications dans des revues indexées et à comité de lecture (voir en annexe) :

Articles :

Kouadio Kouassi Blaise, Kablan Ahmont Landry Claude ; Ahoua Angora Rémi Constant, Konan Dibi Jacques ; Oussou Kouamé Raphael ; Attioua Koffi Barthélemy and Dongui Bini Kouamé (2021).

Criblage phytochimique, dosages des polyphénols totaux et flavonoïdes totaux, et évaluation de l'activité antibactérienne des feuilles de *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 33 (2) : 405-413. ISSN Online: 2028-9324

<http://www.ijias.issr-journals.org/> ;

Kouadio Kouassi Blaise, Kablan Ahmont Landry Claude, Konan Dibi Jacques, Oussou Kouamé Raphaël, Dongui Bini Kouamé & Attioua Koffi Barthélemy (2021).

Identification of limonoids and steroids from the leaves of *Turraea heterophylla* (Smith) by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS methods. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10 (6) : 50-55.

Doi : <https://doi.org/10.22271/phyto.2021.v10.i6a.14>

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 (ammoniacal 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'ammoniacal 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 essai, 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.ég.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.ég.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.

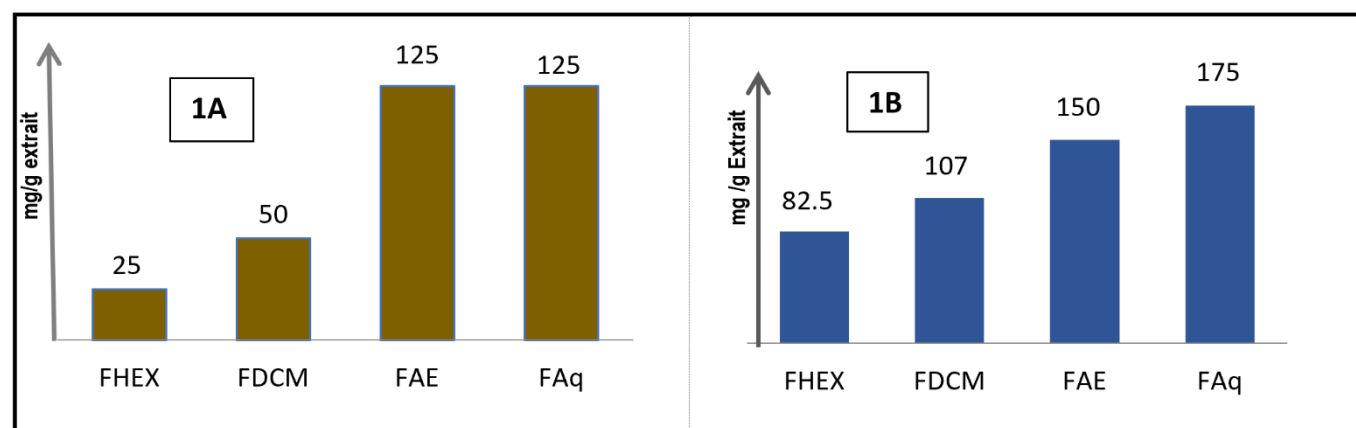


Fig. 1. Histogramme des teneurs en polyphénols totaux (1A) et flavonoïdes totaux (1B) des fractions

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	Tetracycline	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.



E-ISSN: 2278-4136

P-ISSN: 2349-8234

www.phytojournal.com

JPP 2021; 10(6): 50-55

Received: 22-07-2021

Accepted: 26-08-2021

Kouadio Kouassi Blaise

a) Laboratoire des Sciences et Technologies de l'Environnement, UFR Environnement, Université Jean Lorougnon GUEDE, Daloa, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire
 b) Laboratoire de Constitution et Réaction de la Matière, UFR Sciences des Structures de la Matière et Technologie, Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Kablan Ahmont Landry Claude

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

Konan Dibi Jacques

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

Oussou Kouamé Raphael

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

Dongui Bini Kouamé

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

Attioua Koffi Barthélemy

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

Corresponding Author:**Kouadio Kouassi Blaise**

a) Laboratoire des Sciences et Technologies de l'Environnement, UFR Environnement, Université Jean Lorougnon GUEDE, Daloa, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire
 b) Laboratoire de Constitution et Réaction de la Matière, UFR Sciences des Structures de la Matière et Technologie, Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Identification of limonoids and steroids from the leaves of *Turraea heterophylla* (Smith) by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS methods

Kouadio Kouassi Blaise, Kablan Ahmont Landry Claude, Konan Dibi Jacques, Oussou Kouamé Raphael, Dongui Bini Kouamé and Attioua Koffi Barthélemy

DOI: <https://doi.org/10.22271/phyto.2021.v10.i6a.14256>

Abstract

Turraea heterophylla (Smith) is a species used in Ivoirian medicine as antimalarial, aphrodisiac and various human diseases. Using the dereplication method, the analysis of the crude methanol extract of the leaves led to the identification of six compounds including three limonoids (28-nor-4 α -carbomethoxy-11 β -acetoxy-12 α -(2-methylbutanoyloxy) 14,15- deoxyhavanensin-1,7-diacetate; mzikonol; 1,2- dihydro-azadirone) and three steroids (3 β -acetoxy-5 α -pregn-7,20-dien-6-one; 3 β -hydroxy-5 α -pregn-6-one; villostero). These secondary metabolites, which are reported for the first time in *T. heterophylla*, were identified according to their HPLC-ESI-QTOF-MS/MS data.

Keywords: *Turraea heterophylla*, dereplication, identification, limonoids, steroids

1. Introduction

Medicinal plants are widely used in Africa traditional medicine to treat various diseases such as malarial, hemorrhoids, hypertension and Buruli ulcer [Gnaoré *et al.*, 2020; Jacques *et al.*, 2019] ^[1, 2]. Many of them are used without their chemical composition being known; among them are species of *Turraea*. The genus *Turraea* belongs to the Maliaceae family. Species of this family are widely distributed in tropical regions of the world [APG III, 2009; ATIBT, 2016] ^[3, 4]. *Turraea* plants grow as trees or shrubs [Mabberley *et al.*, 2008] ^[5], and their chemical composition is varied [Wang *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2013] ^[6, 7]. The species that interests us here is *Turraea heterophylla* (Smith). In Côte d'Ivoire, this species is found in both forest and savanna regions; and it is known as aphrodisiac [Neuwinger 1996] ^[8]. It is also used to treat asthma, emphysema, lumbago and headaches [Bouquet et Debray, 1974] ^[9]. Concerning the chemistry of this species, the literature reports the presence of tannins, saponins, terpenes, steroids and limonoids in the roots bark [Boua *et al.*, 2013; Akrofi, 2011] ^[10, 11]. In addition to this, our previous study of the leaves revealed the presence of polyterpenes, steroids, alkaloids, saponins, polyphenols and flavonoids; with a very high content of flavonoids and polyphenols in this organ [Kouadio *et al.*, 2021] ^[12]. Present study aims to identify the structure of these secondary metabolites. For this, extraction was performed using methanol and compounds were detected and identified by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS method.

2. Material and Methods**2.1 Plant material**

The fresh leaves of *T. heterophylla* were collected from the forest area of Daloa department, west of Côte d'Ivoire, and identified by the National Floristic Center of the Félix HOUPHOUËT-BOIGNY University (CNF), where a specimen is kept under the herbarium number 31235. The fresh leaves were then cleaned with distilled water and dried in an oven at 50 °C for 4 days before being reduced to powder using an electric mill (RETSCH, type SM 100).

2.2 General Experimental Procedures

The secondary metabolites were extracted using methanol 90% (v/v), and the solvent was removed using a rotary evaporator BÜCHI461 type. The sample analysis were carried out in positive polarity, using Analytical HPLC runs coupled to an Agilent LC-MS system (Agilent 1260 Infinity HPLC and to an Agilent 6530 ESI-QTOF-MS/MS). The HPLC device was equipped with a C₁₈ column (150 x 4.6 mm, i.d. 5 μ m, Waters) and a binary pump

(Waters 2525); visualization was realized upon a UV-visible diode array detector (190-600 nm, Waters 2996).

2.3 Methods

2.3.1 Preparation of methanol extract from the leaves of *T. heterophylla*

The crude methanol extract of the leaves of *T. heterophylla* was prepared following the method described by Kouadio *et al.* 2021 [12]. The dried and ground plant material (200.0 g) was extracted by maceration in 600 mL of methanol for 24 hours. After filtration on Whatman n°2 paper, the Mac is extracted twice in a row with the same amount of methanol for 24 hours each. The filtrates were combined, concentrated and evaporated to dryness under reduced pressure (at 60 °C), using a rotary evaporator. Part (5mg) of crude methanol extract was dissolved in 1 mL of methanol (analytic, grad HPLC), and then with the help of a syringe, 1mL of this extract is taken in 1 mL of methanol. The extract is filtered again through a nylon syringe filter 0.5 µm. Finally, 300 µL is taken to be stored in a Vial before HPLC-QTOF-MS/MS analysis.

2.3.2 Analysis of the methanol extract by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS method

The HPLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis, or dereplication, is a new method that allows identifying very quickly and efficiently the known compounds in a complex mixture, such as crude plant extracts. With this method, it becomes easy to tell the difference between known and unknown compounds in a complex mixture, based on database search [Jongmin *et*

al., 2017] [13]. This analytical method is based on the coupling system ESI-QTOF-MS/MS (electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectroscopy), that provides sufficient information to determine the exact structure of a known compound [McFarland *et al.*, 2004] [14]. For the analysis of the crude methanol extract, using the system an Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF coupled with a 1260 Agilent Infinity LC system, the flow rate was fixed to 0.25 mL/min, and mass spectra were acquired in positive mode in the mass range of m/z 100 to 1200 Da.

3. Results and Discussion

The automated processing of raw data obtained from HPLC-ESI-QTOF-MS analysis of *T. heterophylla* (Smth) leaves extract, followed by analysis by Agilent Masshunter Workstation Software, led to identify known constituents of this crude extract. From the LC-ESI-MS and MS / MS spectra obtained, a list of raw formulas was generated; then the structure corresponding to the formula closest to the mass is retained. Each protonated molecules $[M+H]^+$ were selected according to their great abundance and their greater regularity of fragmentation. To confirm the structures of the molecules, the ESI-QTOF-MS/MS data were compared to those in the public databases (DNP, Reaxys and SciFinder). The analysis of the crude methanol extract from *T. heterophylla* gave the LC-ESI-MS chromatography (Figure 1), which reveals several peaks corresponding to the major constituents. Each peak was analysis by Agilent Masshunter Workstation Software.



Fig 1: HPLC-ESI-QTOF-MS chromatogram of the methanol extract of the leaves of *T. heterophylla*

3.1 28-nor-4 α -carbomethoxy-11 β -acetoxy-12 α -(2-methylbutanoyloxy) 14, 15-deoxyhavanensin-1, 7-diacétate
In the HPLC-ESI-QTOF-MS chromatogram (Figures 1), the peak 1 at retention time $R_T = 19.125$ min was identified to 28-

nor-4 α -carbomethoxy-11 β -acetoxy-12 α -(2methylbutanoyloxy) 14,15- deoxyhavanensin-1,7-diacetate. To generate its ESI-MS and ESI-MS/MS spectra (Figure 2), this peak was analysis by Agilent Masshunter Workstation Software.

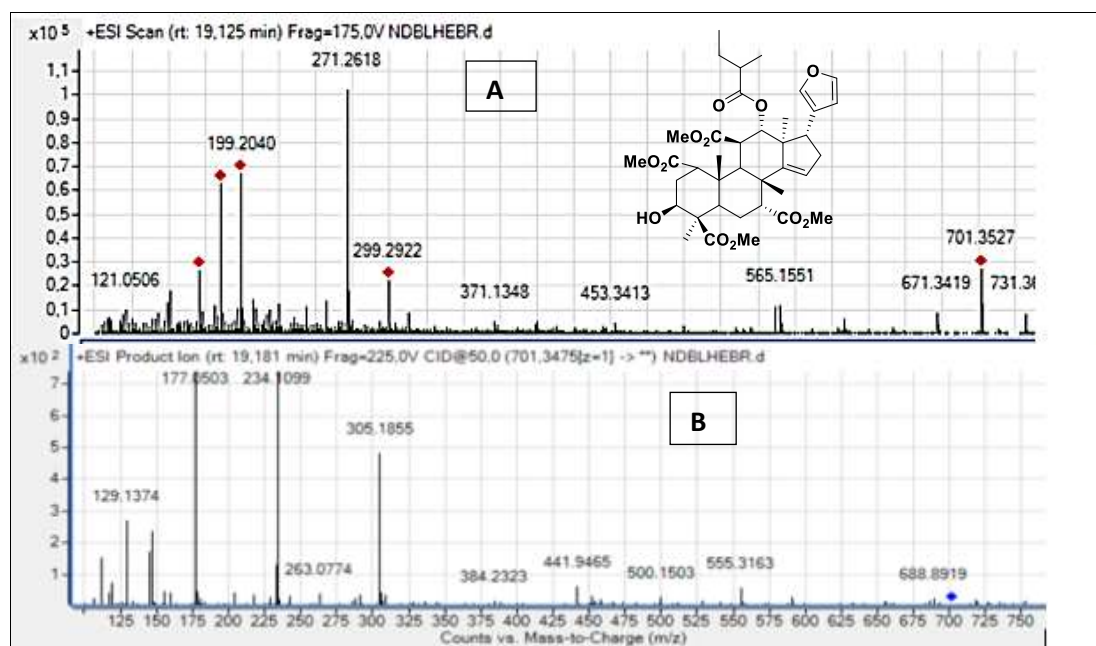


Fig 2: ESI-MS spectrum (A) and ESI-MS/MS spectrum (B) of 28-nor-4 α -carbomethoxy-11 β -acetoxy-12 α -(2-methylbutanoyloxy) 14,15-deoxyhavanensin-1,7-diacetate.

According to the Masshunter software data, the molecular ion peak at m/z 701.3527 [M+H]⁺ on the ESI-MS spectrum (Figure 2A) matches the molecular formula C₃₈H₅₂O₁₂ (Cal.700.3449). In addition, several characteristic ion fragments MS/MS (Figure 2B) were observed at m/z: 555.3163 [M+H-143]⁺; 441.9465[M+H-143-114]⁺; 305.1855[M+H-143-114-57-79]⁺; 234.1099[M+H-143-114-57-79-71]⁺. According to this fragmentation pathway, the corresponding structure was found in the databases Reaxys and Dictionary of Natural Products (DNP) to be 28-nor-4 α -carbomethoxy-11 β -acetoxy-12 α -(2-methylbutanoyloxy) 14,15-deoxyhavanensin-1,7-diacetate. It is a known limonoid previously isolated of *Turraea floribunda* [Torto *et al.*, 1995; McFarland *et al.*, 2004; Mulholland, 1998, 1999; Ndung'u *et al.*, 2004] [15, 14, 16, 17].

3.2 1, 2-dihydroazadirone

The compound corresponding to peak 2 at retention time R_T=32.593 min (Figure 1) was identified to 1,2-dihydroazadirone (Figure 3). Its ESI-MS and ESI-MS/MS spectra (Figures 3A and 3B) were generated by Agilent Masshunter Workstation Software. The molecular ion peak corresponding to this compound was observed at m/z 425.2646 [M+H]⁺ on the ESI-MS spectrum (Figure 3A), and this matches the molecular formula C₂₇H₃₆O₄ (Cal. 424.2650). Several characteristic ion fragments MS/MS (Figure 3B) were observed at m/z: 425.5810 [M+H]⁺; 380.2351[M+H-44]⁺; 346.1933[M+H-44-34]⁺; 298.2297[M+H-44-82]⁺; 190.1358[M+H-44-82-108]⁺.

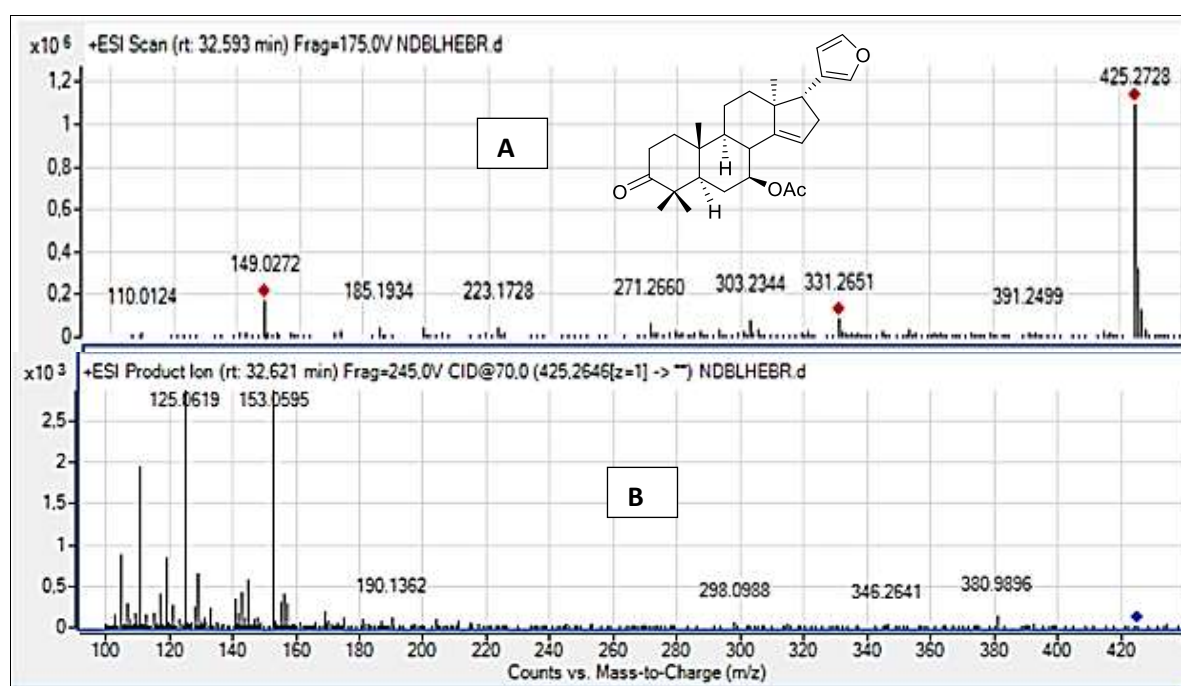


Fig 3: ESI-MS spectrum (A) and ESI-MS/MS spectrum (B) of 1,2-dihydroazadirone

This fragmentation pathway matches the chemical structure of 1,2-dihydroazadirone (Figure 3); what structure was found in the databases Reaxys and Dictionary of Natural Products (DNP). This structure is also a known limonoid previously isolated from the roots bark and stem bark of *Turraea robusta* [Rajab *et al.*, 1988; Bentley *et al.*, 1992] [18, 19].

3.3 Mzikonol

The ESI-MS and ESI-MS/MS spectra (Figures 4A and 4B) of the compound that gave the peak 3 at retention time $R_T=32.944$ min (Figure 1) were generated by Agilent Masshunter Workstation Software. The molecular formula corresponding to the molecular ion peak at m/z 457.2954 $[M+H]^+$ (Figure 4A) was deduced as $C_{28}H_{40}O_5$ (Cal. 456.2876).

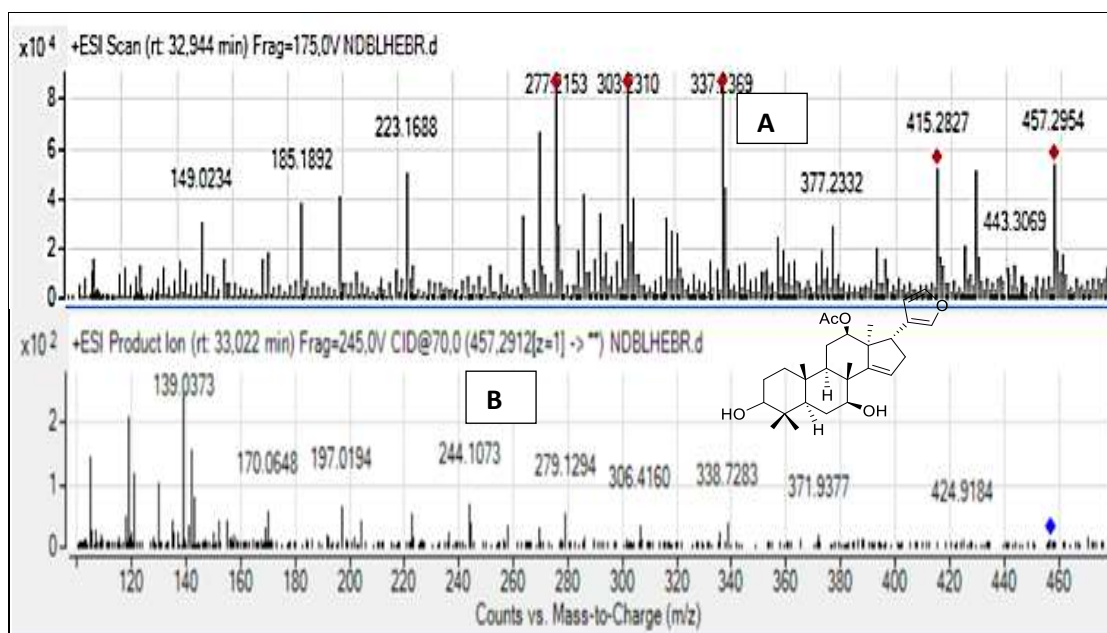


Fig 4: ESI-MS spectrum (A) and ESI-MS/MS spectrum (B) of Mzikonol

The corresponding structure was founded in the databases Reaxys and Dictionary of Natural Products (DNP) to be Mzikonol. This known limonoid was previously isolated from the roots bark and stem bark of *Turraea robusta* [Rajab *et al.*, 1988; Bentley *et al.*, 1992] [18, 19]. Several characteristic ion fragments MS/MS (Figure 4B), confirming this structure, were observed at m/z : 457.2954 $[M+H]^+$; 371.9377 $[M+H-$

86] $^+$; 279.1294 $[M+H-86-92]^+$; 244.1073 $[M+H-86-92-35]^+$.

3.4 Villosterol

The peak 4 at retention time $R_T=30.836$ min (Figure 1) was analysis by Agilent Masshunter Workstation Software to generate the ESI-MS and ESI-MS/MS spectra (Figures 5A and 5B).

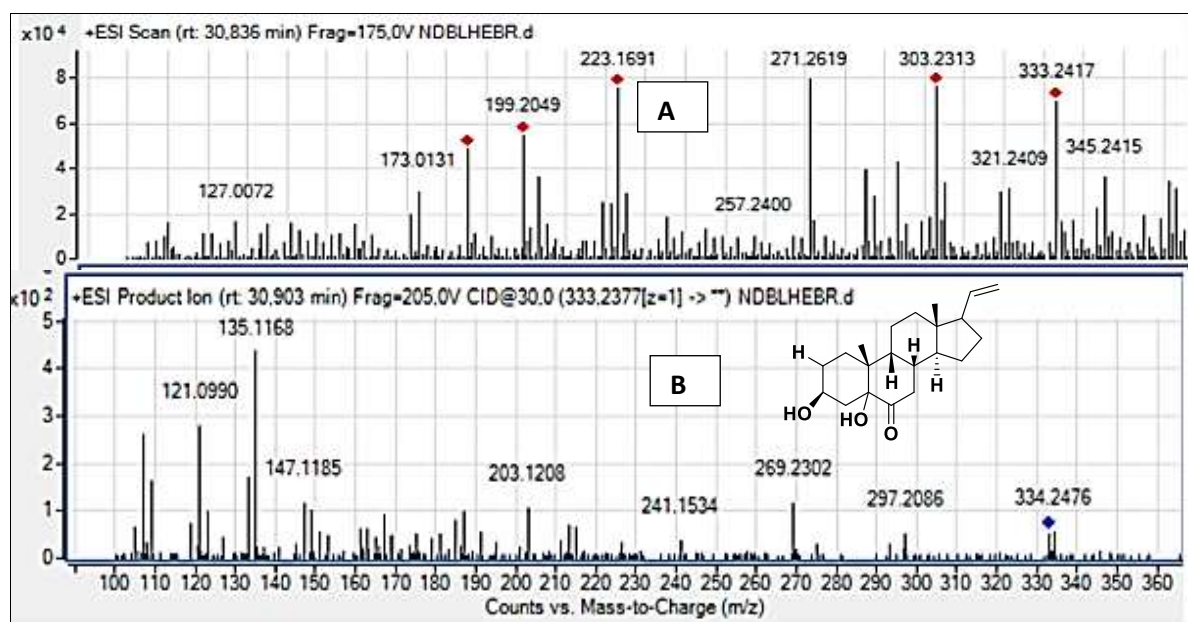


Fig 5: ESI-MS spectrum (A) and ESI-MS/MS spectrum (B) of Villosterol.

On the ESI-MS spectrum (Figure 5A), the molecular ion peak was observed at m/z 333.2417 $[M+H]^+$, and the corresponding formula was deduced as $C_{21}H_{32}O_3$ (Cal. 332.2339). In addition, several characteristic ion fragments MS/MS (Figure

5B) were observed at m/z : 334.2476 $[M+2H]^+$; 297.2086 $[M+H-36]^+$; 269.2302 $[M+H-36-28]^+$; 241.1534 $[M+H-36-28-28]^+$; 203.1208 $[M+H-36-28-28-38]^+$. According to this fragmentation pathway, the corresponding structure was

founded in the data bases Reaxys and Dictionary of Natural Products (DNP) to be Villostero. This compound is also a steroid derivative which was previously isolated from the seeds of *Turraea obtusifolia* [Fraser *et al.*, 1995; Mulholland *et al.*, 1998; Sarker *et al.*, 1997] [20, 21, 22].

3.5 3 β -acetoxy 5 α -pregn 7,20-dien-6-one

In the Figure 1, the peak 5 at retention time $R_T = 32.241$ min was analysis by Agilent Masshunter Workstation Software to generate the ESI-MS and ESI-MS/MS spectra (Figures 6A and 6B). According to these data, the ion peak at m/z 345.2428[M+H]⁺ was attributed to the molecular ion (Figure

5A), which value matches the molecular formula C₂₂H₃₂O₃ (Cal. 344.2350). Several characteristic ion fragments MS/MS (Figure 6B) were observed at m/z : 345.2351 [M+H]⁺; 328.3534 [M+H-17]⁺; 299.3652 [M+H-17-29]⁺; 275.1020[M+H-17-29-24]⁺; 196.3782 [M+H-17-29-24-79]⁺. According to this fragmentation pathway, the corresponding structure was founded in the data bases Reaxys and Dictionary of Natural Products (DNP) to be 3 β -acetoxy-5 α -pregn-7,20-dien-6-one. This steroid derivative was previously isolated from the leaves and roots bark of *Turraea pubescens* [Wang *et al.*, 2008; Yuan, *et al.*, 2013] [6, 7].

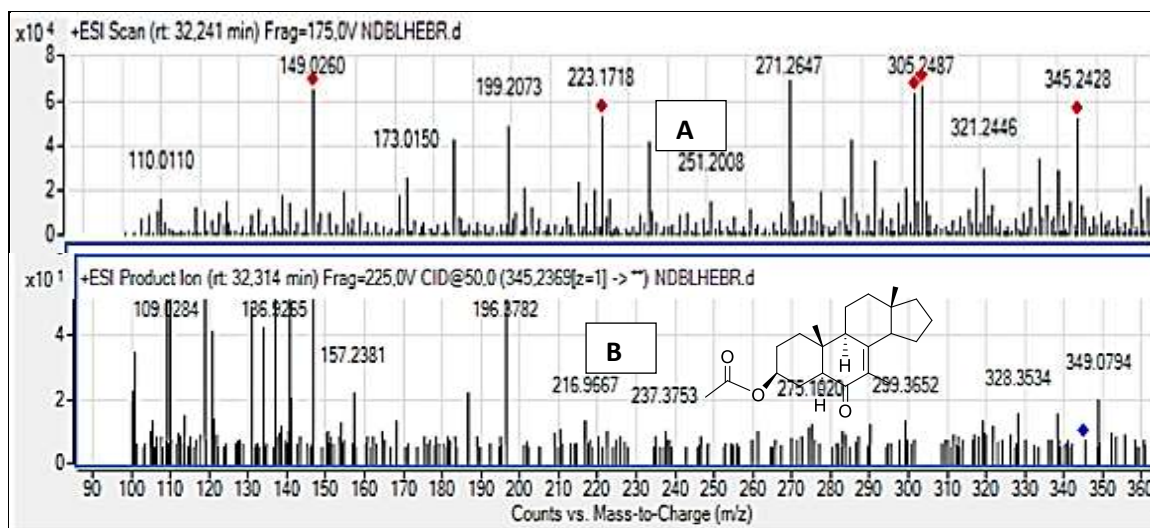


Fig 6: ESI-MS spectrum (A) and ESI-MS/MS spectrum (B) of 3 β -acetoxy-5 α -pregn-7, 20-dien-6-one

3.6 3 β -hydroxy-5 α -pregn-6-one

The analysis of the peak 6 at $R_T = 40.556$ min (Figure 1), using Masshunter software, generated the ESI-MS spectrum (Figure 7A) with the molecular ion peak at m/z 305.1867[M+H]⁺. This value matches the molecular formula C₂₀H₃₂O₂ (Cal. 304.1789). Several characteristic ion fragments MS/MS (Figure 7B) were observed at m/z : 305.1867[M+H]⁺; 286.2297[M+H-18]⁺; 270.0274[M+H-18-

16]⁺; 217.1565[M+H-18-16-53]⁺. According to this fragmentation pathway, the corresponding structure was founded in the data bases Reaxys and Dictionary of Natural Products (DNP) to 3 β -hydroxy-5 α -pregn-6-one. This molecule is steroid derivative previously isolated from the leaves of *Turraea pubescens* [Wang *et al.*, 2007, 2008; Yuan, *et al.*, 2013] [20, 7].

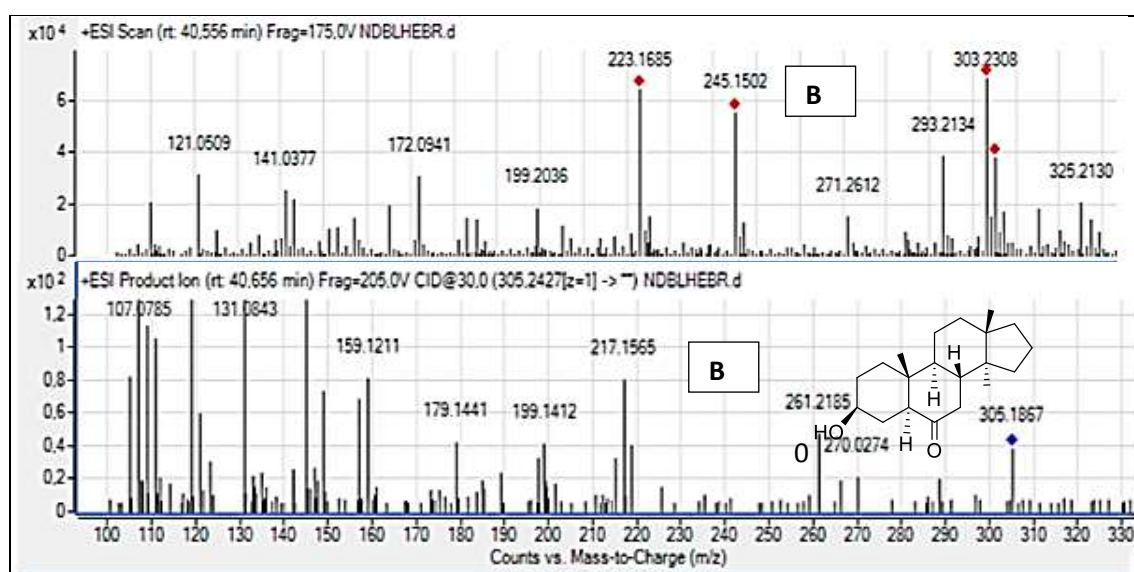


Fig 7: ESI-MS spectrum (A) and ESI-MS/MS spectrum (B) of 3 β -hydroxy-5 α -pregn-7,20-dien-6-one

4. Conclusion

The analysis by the HPLC-ESI-QTOF-MS / MS method of the methanol extract of the leaves of *T. heterophylla* made it

possible to identify the structures of three limonoids (1 - 3) and three steroids (4 - 6). In addition, several peaks (A - F) revealed were not identified because their structures were not

found in the databases used. Regarding the identified compounds, they could justify the traditional used of *T. heterophylla* as aphrodisiac. Indeed, limonoids and steroids are known for their beneficial effects on the functioning of the heart.

5. Notes

The authors declare no competing financial interest.

6. Acknowledgments

None

7. References

- Gnaoré YTD, Koffi BA, Yaya S, Faustin AK, Landry CAK, Marc V, *et al.* Nor-cucurbitacins from the leaves of *Mareya micrantha* (Benth.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Fitoterapia* 2020, 104538.
- Jacques DK, Barthelemy KA, Claude-Landry AK, Faustin AK, Paul AK, Sandrine AAG, *et al.* New cassane diterpenoids from the root bark of *Erythrophleum suaveolens*. *Phytochem. Lett* 2019;31:166-169.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc* 2009;161:105-121.
- ATIBT. Nomenclature générale des bois tropicaux. Paris, France, Association technique internationale des bois tropicaux (ATIBT) 2016, 152.
- Mabberley DJ, Mabberley' Plant-Book. A Portable Dictionary of Plants, Their Classifications and Uses, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK 2008.
- Wang XN, Fan CQ, Yin S, Lin LP, Ding J, Yue JM. Cytotoxic terpenoids from *Turraea pubescens*. *Helvetica Chimica Acta* 2008;91:510-519.
- Yuan CM, Tang GH, Zhang Y, Wang XY, Cao MM, Guo F, *et al.* Bioactive limonoid and triterpenoid constituents of *Turraea pubescens*. *J. Nat. Prod* 2013;76:1166-1174.
- Neuwinger HD. African Ethnobotany: Poisons and Drugs: Chemistry, Pharmacology, Toxicology; CRC Press: Weinheim, Germany 1996.
- Bouquet A, Debray M. Plantes médicinales de Côte-d'Ivoire, Imprimerie Louis Jean, Paris (France) 1974, 232.
- Boua BB, Mamyrbekova-Bekro JA, Kouame BA, Bekro YA. Criblage phytochimique et érectile de *Turraea Heterophylla* de Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.* 2013.
- 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) 2011, 90.
- Kouadio KB, Koffi MA, Oussou KR, Ahoua AR, Kablan ALC, Dongui BK, *et al.* Phytochemical screening, determination of total polyphenols and flavonoids, and evaluation of the antibacterial activity of leaves of *Turraea heterophylla* Smith (Meliaceae). *J. Pharmacogn. Phytochem* 2021;10(5):16-21.
- Jongmin A, Hee-Sung C, Young-Won C, Jinwoong K. Dereplication-Guided Isolation of New Phenylpropanoid-Substituted Diglycosides from Cistanche salsa and Their Inhibitory Activity on NO Production in Macrophage. *Molecules* 2017;22:1138.
- McFarland K, Mulholland DA, Fraser LA. Limonoids from *Turraea floribunda* (Meliaceae). *Phytochemistry* 2004;65:2031-2037.
- Torto B, Bentley MD, Cole JW, Hassanali A, Huang FY, Gelbaum L, *et al.* Limonoids from *Turraea floribunda*. *Phytochemistry* 1995;40:239-243.
- Mulholland DA, Monkhe TV, Taylor DA, Rajab MS. Triterpenoids from *Turraea holstii*. *Phytochemistry* 1999;52:123-126.
- Ndung'u MW, Kaoneka B, Hassanali A, Lwande W, Hooper AM, Tayman F, *et al.* New mosquito larvicidal tetranortriterpenoids from *Turraea wakefieldii* and *Turraea floribunda*. *J. Agric. Food Chem* 2004;52:5027-5031.
- Rajab MS, Bentley MD, Hassanali A, Chapya A. A new limonoid from *Turraea robusta*. *Phytochemistry* 1988;27:2353-2355.
- Bentley MD, Gaul F, Rajab MS, Hassanali A. Tetranortriterpenes from *Turraea robusta*. *J. Nat. Prod* 1992;55:84-87.
- Fraser LA, Mulholland DA, Nair JJ. Limonoids from the seed of *Turraea floribunda*. *Phytochemistry* 1995;35:455-458.
- Mulholland DA, Taylor DA. Protolimonoids from *Turraea nilotica*. *Phytochemistry* 1988;27:1220-1221.
- Sarker SD, Savchenko T, Whiting P, Šik V, Dinan L. Two limonoids from *Turraea obtusifolia* (Meliaceae), prierianin and rohitukin, antagonise 20-hydroxyecdysone action in a *Drosophila* cell line. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 1997;35:211-217.

RESUME

Turraea heterophylla Smith (Meliaceae) est une espèce végétale utilisée en médecine traditionnelle ivoirienne pour ses propriétés antipaludiques et aphrodisiaques. Cette étude réalisée sur les feuilles de *T. heterophylla* s'inscrit dans le contexte de la valorisation des espèces végétales médicinales de la flore ivoirienne. Pour ce faire, les méthodes d'extraction, de dosages, de chromatographie, de spectroscopie et d'évaluations biologiques ont été utilisées. Le criblage phytochimique réalisé grâce aux tests de caractérisation chimique a révélé la présence de polyterpènes, de stéroïdes, d'alcaloïdes, de saponines, de flavonoïdes et de composés phénoliques. La quantification spectrophotométrique des polyphénols et des flavonoïdes totaux indique une très forte concentration de flavonoïdes et de polyphénols dans l'extrait méthanolique et les contre-extractions à l'acétate d'éthyle et aqueux résiduel. L'identification des molécules par la spectroscopie ultraviolet (UV) et la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectroscopie de masse tandem (HPLC-ESI-QTOF-MS/MS) de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. heterophylla* a permis d'identifier les structures des limonoïdes, des stéroïdes et des sesquiterpénoïdes. L'évaluation du potentiel pharmacologique de l'extrait méthanolique total des feuilles a montré une atoxicité par voie orale et une faible activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (CIP 54127AF) et *Pseudomonas aeruginosa* (CIP 103467) enregistrant des valeurs de diamètre d'inhibition (9-9,5mm). Quant au potentiel antiradicalaire réalisé, il a montré une activité antioxydante modérée vis-à-vis du DPPH et ABTS.

Mots clés : *Turraea heterophylla*, phytochimie, polyphénols totaux, limonoïdes, stéroïdes, sesquiterpénoïdes, antibactériens, antioxydants.

ABSTRACT

Turraea heterophylla Smith (Meliaceae) is a plant species used in traditional Ivorian medicine for its antimalarial and aphrodisiac properties. This study carried out on the leaves of *T. heterophylla* falls within the context of the development of medicinal plant species of the Ivorian flora. To do this, the methods of extraction, assays, chromatography, spectroscopy and biological evaluations were used. Phytochemical screening carried out through chemical characterization tests revealed the presence of polyterpenes, steroids, alkaloids, saponins, flavonoids and phenolic compounds. The spectrophotometric quantification of polyphenols and total flavonoids indicates a very high concentration of flavonoids and polyphenols in the methanolic extract and the residual aqueous and ethyl acetate counter-extractions. The identification of molecules by ultraviolet (UV) spectroscopy and high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectroscopy (HPLC-ESI-QTOF-MS/MS) of the methanolic extract of *T. heterophylla* leaves made it possible to identify the structures of limonoids, steroids and sesquiterpenoids. Evaluation of the pharmacological potential of the total methanolic extract of the leaves showed oral atoxicity and weak antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (CIP 54127AF) and *Pseudomonas aeruginosa* (CIP 103467) recording values of inhibition diameter (9-9.5mm). As for the realized antiradical potential, it showed a moderate antioxidant activity towards DPPH and ABTS.

Keywords: *Turraea heterophylla*, phytochemistry, total polyphenols, limonoids, steroids, sesquiterpenoids, antibacterials, antioxidants.