



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Analyse phytochimique, activité antibactérienne des extraits hydrométhanoliques des tiges de *Ximenia americana*, espèce de Côte d'Ivoire sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Baudelaire AFFI KAKOU¹, Anoubile BENIE^{1*}, Alain Hugues N'GUESSAN¹,
Konan K. FERNIQUE², N. K. GUESSENND² et Yves-Alain BEKRO¹

¹Laboratoire de Chimie Bio Organique et de Substances Naturelles (LCBOSN), Unité de Formation et de Recherche Sciences Fondamentales et Appliquées (UFR SFA), Université NANGUI ABROGOUA, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Institut Pasteur, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant ; E-mail: anoubko@gmail.com

Received: 19-09-2020

Accepted: 22-12-2020

Published: 31-12-2020

RESUME

L'apparition de bactéries résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques constitue, de nos jours, un problème de santé publique dans le monde. Pour y remédier, l'exploration de sources de molécules actives à partir des substances naturelles s'est avérée nécessaire. Ainsi, l'objectif de cette étude était de réaliser le tri phytochimique des extraits hydrométhanoliques de tiges de *Ximenia americana* et d'évaluer leurs activités antibactériennes sur la croissance *in-vitro* des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. Le screening phytochimique réalisé a permis d'identifier des saponines, des stérols et polyterpènes, des polyphénols, des tanins et des flavonoïdes. L'analyse à la HPLC-MS/MS a permis d'identifier une variété de flavan-3ol, de la quercétine et dérivées. L'étude de l'activité antibactérienne réalisée sur 5 souches cliniques multirésistantes et sur une souche de référence par la méthode de diffusion et de dilution en milieu gélosé Muller-Hinton a montré que les extraits étaient actifs sur toutes les souches avec des CMI variant de 6,25 à 100 mg et des CMB variant de 12,5 à 100 mg. Le potentiel antibactérien de ces extraits mis en évidence dans cette étude pourrait faire de cette plante une candidate à des investigations approfondies pouvant aboutir à la découverte de nouvelles molécules antibactériennes.

© 2020 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: Phyto composé, *Ximenia americana*, *Staphylococcus aureus*, méticilline, chromatographie, screening.

Phytochemical analysis, antibacterial activity of hydromethanol extracts from stems of *Ximenia americana*, Côte d'Ivoire species on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The emergence of bacteria resistant to several families of antibiotics is nowadays a public health problem in the world. To overcome this, it appeared necessary to explore sources of active molecules from natural

© 2020 International Formulae Group. All rights reserved.

8667-IJBCS

DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v14i9.36>

substances. Thus, the objective of this study was to carry out the phytochemical sorting of hydromethanol extracts from *Ximenia americana* stems and to evaluate their antibacterial activities on the *in-vitro* growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The phytochemical screening performed allowed us to identify saponins, sterols and polyterpenes, polyphenols, tannins and flavonoids. HPLC-MS/MS analysis lead to the identification of a variety of flavan-3ol, quercetin and derivatives. The study of antibacterial activity carried out on 5 multi-resistant clinical strains and on a reference strain by the Muller-Hinton agar medium diffusion and dilution method showed that the extracts were active on all the strains with MICs ranging from 6.25 to 100 mg and MBCs ranging from 12.5 to 100 mg. The antibacterial potential of these extracts highlighted in this study could make this plant a candidate for in-depth investigations that could lead to the discovery of new antibacterial molecules.

© 2020 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Phytocompound, *Ximenia americana*, *Staphylococcus aureus*, methicillin, chromatography, screening.

INTRODUCTION

La souche de *Staphylococcus aureus* est une bactérie courante qui colonise différentes parties du corps humain telles que les narines et la peau (Messad, 2016) et peut, dans certains cas, être à l'origine de multiples infections, comme des infections cutanées, pneumoniques ou septicémiques. Un groupe de ce germe, habituellement sensible à de nombreux antibiotiques, a développé, avec l'usage, une résistance à des familles d'antibiotique telles que celles de la classe des bêta-lactames, dont la méticilline est l'un des représentants (Ghernaout-benchouk, 2013). En raison de cette résistante, le traitement par antibiotique d'infection par le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) devient de plus en plus difficile (Marisa et al., 2012). Face à ce fléau, la recherche de nouvelles molécules issues des plantes médicinales est devenue une urgence pour la communauté scientifique. Différents travaux ont été élaboré et parmi eux de nombreux alternatifs à la méticilline ont été réalisé à partir de plantes médicinales (Kipré et al., 2017). Afin de contribuer à la recherche de solution à ce phénomène d'antibiorésistance, cette étude a porté sur *Ximenia americana*, une plante de la famille des Olacaceae, utilisée localement pour traiter de nombreuses pathologies à savoir la carie dentaire, la fièvre, le cancer (Baggnian et al., 2018). Le présent travail visait, d'une part, à identifier les métabolites secondaires contenus dans des extraits hydrométhanoliques de tiges de *Ximenia americana* et, d'autre part, évaluer leurs activités antibactériennes.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Matériel végétal

Les tiges de *Ximenia americana* ont été récoltées à Toumodi au centre de la Côte d'Ivoire et identifiées à l'herbier du Centre National de Floristique (CNF) de Côte d'Ivoire conformément aux spécimens existants.

Souches bactériennes

Le matériel bactérien était constitué de six souches bactériennes, dont cinq souches cliniques (Tableau 1) et une souche de référence sensible, *S. aureus* ATCC 29213 provenant de l'Unité des Antibiotiques, des Substances Naturelles et de la Surveillance des Micro-organismes Anti-Infectieux (ASSURMI) du département de Bactériologie et Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI).

Méthodes

Préparation de l'extrait hydrométhanolique 80%

Les différents organes récoltés ont été lavés à l'eau courante puis séchés sous climatisation permanente (18 °C) pendant deux semaines. Après séchage, les organes ont été pulvérisés à l'aide d'un broyeur électrique afin d'obtenir des poudres fines. Vingt grammes de poudre de drogue ont été macérés dans 150 ml de méthanol 80% pendant 24 h sous agitation permanente. Après élimination du solvant, l'extrait obtenu est conservé dans un bocal fermé hermétiquement au réfrigérateur à 4 °C (Zirihi et al., 2003).

Méthodes d'identification des composés phénoliques par réaction en tube

La détection des phytoconstitués a été réalisée suivant les protocoles décrits par Békro et al. (2007).

Méthodes d'identification des composés phénoliques par LC-MS/MS

L'analyse a été réalisée sur une chaîne HPLC (Agilent 1260 Infinity) couplée à un spectromètre de masse (Q-TOF-MS Agilent 6530) équipé d'une source ESI. Une colonne C18 Sunfire® Waters de longueur 150 mm, de diamètre 2,1 mm avec des particules de diamètres 3,5 µm a été utilisée. La phase mobile était constituée d'un gradient de solvants A (H₂O + 0,1% HCO₂H) et B (CH₃CN). Un gradient linéaire a été utilisé pendant 41 min dans les proportions suivantes : 0-5% de B (0-5 min), 5-95% de B (5-15min), 95-100% de B (15-25 min), 100% de B (25-30 min), 100-0% de B (30-32 min) et 0% de B (32-41min). Le volume d'injection des échantillons et le débit d'écoulement ont été fixés respectivement à 5 µL et 250 µL/min. L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel Agilent MassHunter Workstation.

Test antibactérien des extraits

Préparation des gammes de concentration

Une solution initiale (200 mg/ml) de l'extrait a été préparée. À partir de cette solution mère, une série de double dilution selon une progression géométrique de raison 2 a été effectuée afin d'obtenir 10 concentrations allant de 200 mg/mL à 0,39 mg/mL (Kouadio et al., 2017).

Test de stérilité

Un mélange de 0,1 g de l'extrait à tester dans 10 mL de bouillon thioglycolate a été incubé à 37 °C pendant 24 h. L'ensemble a été ensuite ensemencé dans une boîte de Pétri contenant la gélose ordinaire, puis incubé à 37 °C pendant 24 h. La substance était déclarée stérile si aucune colonie n'était visible dans la boîte gélosée (Akers, 1985).

Préparation d'inoculum pour les tests en milieu solide

L'inoculum a été préparé à partir d'une colonie jeune de 18 à 24 h. Elle a été homogénéisée dans 2 mL de suspension NaCl 85%. Ensuite, la densité optique a été ajustée à

0,5 Mac Farland. Un volume de 100 µL de cette suspension a été déposé dans 10 mL d'eau physiologique (0,9%, de NaCl) constituant ainsi l'inoculum bactérien. Cet inoculum a permis à l'écouvillonnage des géloses Mueller-Hinton (MH), pour la réalisation du test.

Test de sensibilité par diffusion en milieu solide

Le test a consisté à déposer 50 µL d'extraits de 200 mg, 100 mg et 50 mg dans des puits creusés dans une gélose ensemencée par une souche bactérienne cible (Wiegand et al., 2007). L'ensemble a été incubé pendant 24 h à 37 °C, puis le diamètre des disques d'inhibition autour de chaque cupule a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. La souche était déclarée résistante à la substance lorsque le diamètre mesuré était inférieur à 8 mm. Elle était dite sensible lorsqu'il était compris entre 9 et 14 mm, très sensible, entre 15 et 19 mm et extrêmement sensible, supérieur à 20 mm (Ponce et al., 2003).

Préparation de l'inoculum bactérien pour les tests en milieu liquide

Deux colonies isolées d'une culture bactérienne de 18 heures ont été homogénéisées dans 10 mL de bouillon Muller-Hinton et incubées pendant 3 heures à 37 °C pour avoir une préculture. Un prélèvement de 0,1 mL du bouillon de préculture a été déposé dans un tube contenant 10 mL de bouillon Muller-Hinton. Cette suspension bactérienne réalisée a constitué l'inoculum bactérien de dilution 10⁰ (Konan et al., 2013).

Numération de l'inoculum bactérien

L'inoculum bactérien a été homogénéisé puis dilué de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10⁻⁴. Ensuite, l'inoculum bactérien initial et les 4 dilutions successives ont été ensemencés à l'aide d'une anse calibrée de 2 µL dans des boîtes gélosées de Müller-Hinton (MH) sur des stries de 5 cm de long. Cette préparation a constitué la boîte A qui a aidé à déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) (Ouattara et al., 2016).

Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

Les extraits végétaux (100 µl) de différentes concentrations ont été déposés sur

une microplaque de 8×12 puits. Les 10 premiers puits ont été numérotés de la plus grande à la plus petite concentration et 100 µl de l'inoculum bactérien de dilution 10⁰ précédemment préparé ont été ajoutés dans chaque puits. Dans le 11^{ème} puits, 100 µl de Bouillon de Mueller-Hinton additionnés à 100 µl de l'inoculum bactérien de dilution 10⁰ ont servi de témoin de croissance (Tc). Quant au 12^{ème} puits, 200 µl de Bouillon de Mueller-Hinton stérile ont été introduit pour le contrôle de stérilité (Ts). Après incubation, la plus faible concentration pour laquelle aucun trouble n'a été observé à l'œil nu, correspondait à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) (Dosso et Fayé-Kété, 2000 ; Koné et al., 2004).

Détermination de la CMB

A l'aide d'une anse calibrée (2 µL), le contenu des puits de la plus faible concentration a été prélevé et ensemencé sur une gélose Mueller-Hinton par stries parallèles de 5 cm de long en commençant par le puit de la CMI (boite B). Cette boîte B a été incubée

pendant 24 h à 37 °C puis le nombre de colonies sur les stries de la boîte a été comparé à celui de la boîte A. Ainsi, le premier puits dont le nombre de germes présents sur sa strie était inférieur ou égal à celui de la dilution 10⁻⁴ correspondait à la CMB (concentration minimale bactéricide la plus faible de substance qui laisse au plus 0,01% de germes survivants).

Analyses statistiques

L'analyse statistique a été faite à partir de l'analyse de variance Two-way ANOVA pour la comparaison de l'activité des extraits de *X. americana* avec le témoin négatif qui est l'eau distillée et la céfoxitine (FOX), témoin positif selon l'espèce bactérienne. Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne ± Ecart type. Les valeurs de probabilité P < 0,05 ont été considérées statistiquement significatives. Tous les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel d'analyse statistique *GraphPad Prism 5*.

Tableau 1: Souches d'infection d'origine hospitalière.

Souches cliniques	Code	Phénotype de Résistance	Produit biologique
<i>S. aureus</i>	735UB/18CNRA	MLST01, BLST04	Sang
<i>S. aureus</i>	537UB/18CNRA	AMST02; MLSBI; BLST04	Sang
<i>S. aureus</i>	549UB/18CNRA	BLST04	Suppuration
<i>S. aureus</i>	566UB/18CNRA	AMST02; BLST04	Escarre
<i>S. aureus</i>	595UB/18CNRA	PASEHN; MLST01; AM00; TETR; BLST04	Manuportage

PASEHN: Pénicillinase de haut niveau; MLST01: Phénotype MLSb constitutif; AM00: Phénotype sauvage (aminoglycoside s); TETR: Résistance croisée aux tétracyclines; AMST02: Phénotype KTG; MLSBI: Phénotype MLSb inductible; BLST04: Phénotype Méti R.

RESULTATS

Phytocomposés dépistés par les tests colorés

Le résultat des réactions en tube des extraits de tige de *X. americana* a été mentionné dans le Tableau 2. Il a révélé la présence de polyphénols, de flavonoïdes, de tanins, de saponines, de stérols, de terpènes et l'absence de coumarines et d'alcaloïdes.

Analyse HPLC-SM/SM des extraits de tiges de *Ximenia americana*

Les chromatogrammes ESI-TIC ont été présentés sur la Figure 1. Ils ont révélé plusieurs composés phénoliques dont 12 composés connus et 4 composés non encore connus (signaux 8 ; 10 ; 15 et 16). Le Tableau 3 a regroupé les caractéristiques des 16 signaux identifiés. Les signaux 1 à 7, avec des temps de rétention compris entre $T_r = 15,181$ min et $19,963$ min, ont permis d'identifier la catéchine et ses dérivées avec des longueurs d'ondes d'absorptions maximales situées entre 277 et 280 nm. Les signaux 9 ; 11, 12, 13 et 14 ont, quant à eux, permis d'identifier la quercétine et ses dérivées (T_r compris entre $22,187$ min et $24,311$ min) avec des longueurs d'ondes maximales de 280 nm.

Activités antibactériennes

Stérilité des extraits végétaux

Les tests de stérilité effectués ont montré que tous les extraits végétaux ne présentaient aucun signe de Contamination au regard de l'absence de colonies dans les différentes boîtes gélosées après 24 h d'incubation.

Activité antibactérienne en milieu solide

Le Tableau 4 a indiqué que toutes les souches de *S. aureus* ont été sensibles vis-à-vis des extraits de plante à des concentrations de 100 mg/mL et 200 mg/mL. Les souches de *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* 549UB/18CNRA, ont, par ailleurs, été très sensible aux extraits avec des diamètres d'inhibitions respectifs de 15 ± 1 mm et 18 ± 1 mm à la concentration de 200 mg/mL.

Activité antibactérienne en milieu liquide

Les CMI obtenues sont comprises entre 6,25 à 100 mg/mL et CMB entre 12,5 à 100 mg/mL. Quant aux rapports CMB/CMI, ils ont indiqué des activités bactéricides pour 4 souches cliniques dont *S. aureus* 735UB/18CNRA, *S. aureus* 549 UB/18CNRA, *S. aureus* 595 UB/18CNRA, *S. aureus* 566 UB/18CNRA, et une activité bactériostatique pour la souche de référence *S. aureus* ATCC 29213. Ces résultats sont mentionnés dans le Tableau 5.

Tableau 2: Résultats des tests par réactions colorées.

Composés Phytochimiques								
Polyphénols	Flavonoïdes		Coumarines		Tanins	Alcaloïdes	Saponines	Sté et Poly
RCH	RC	RV	RH	RL	RS	RD	TM	RLI
+	+	+	-	-	+	-	+	+

+ = présence ; - = absence.

Sté et Poly: Stérols et polyterpènes; RCH : réaction au chlorure de fer trois; RC = Réaction à la Cyanidine ; RV : réaction à la vanilline ; RH ; réaction à l'hydroxyde de potassium ; RL = Réaction sur Lactones; RS = Réactif de Stiasny; RD: Réactif de Dragendorff ; TM = Test de Mousse; RLI: Réaction de Liebermann;

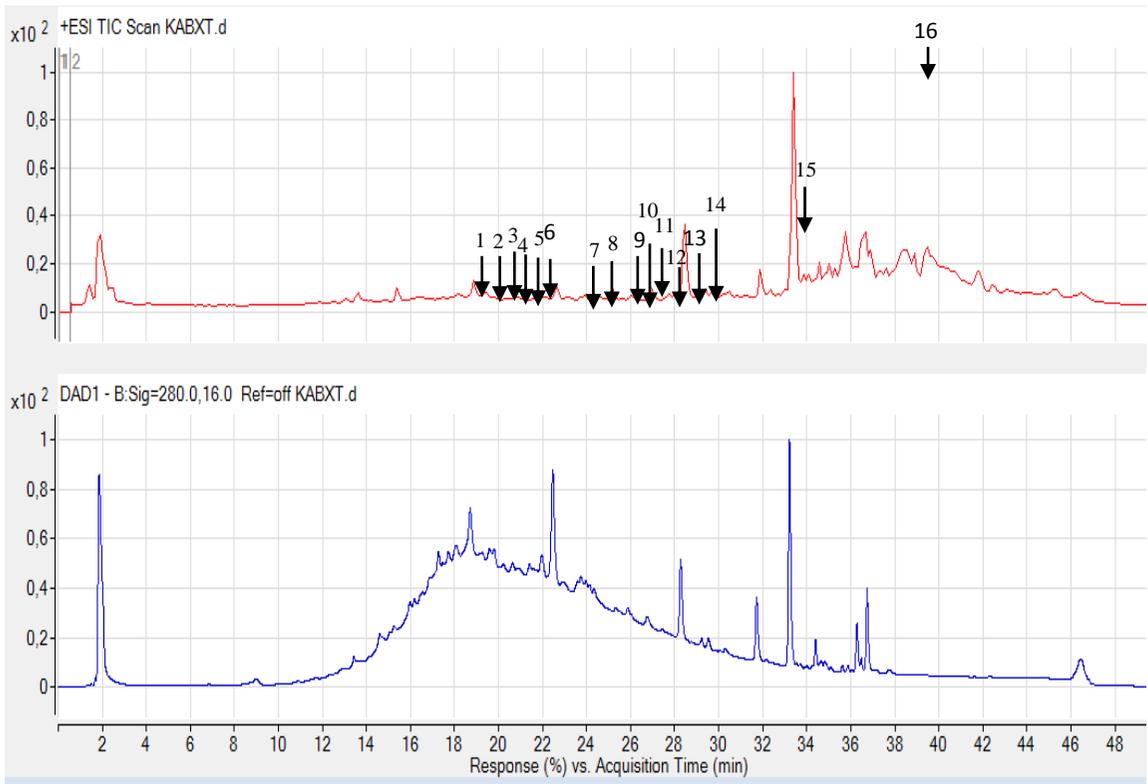


Figure 1 : Chromatogrammes HPLC-UV-MS de l'extrait de tiges de *X. americana*.

Tableau 3: Synopsis de la composition phytochimique par LC-MS/MS de l'extrait brute des tiges de *X. americana*.

Pic	Tr (min)	M	Ion [M+H] ⁺	Ion MS /MS	Formule brute	Phytocomposés identifiés	λ _{max} (nm)
1	15,181	594	595	289 ;139 ;127 ;123 ;109	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	Catéchine-épigallocatechine	235 ; 277
2	15,983	290	291	289 ;271 ;139 ;157 ;123	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catéchine	235 ; 277
3	16,234	746	747	576 ;287 ;163 ;139 ;123	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₇	Catéchine-épigallocatechine-galate	235 ; 280
4	16,719	578	579	290 ;169 ;163 ;151 ;139	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procyanidine B	235 ; 280
5	16,964	730	731	561 ; 409 ; 287 ; 153 ; 139 ;123	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	Procyanidine B galloyle	235 ; 280
6	17,856	458	459	306 ;139 ;125 ;153	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	Epigallocatechine galate	237 ; 280
7	19,963	442	443	291 ;257 ;139 ;123	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	Epicatechine gallate	240 ; 280
8	20,783	448	449	287 ; 165,135 ;125		Non identifié	243 ; 280
9	22,187	616	617	465 ;302 ;153 ;125	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	Quercétine 3-Glucoside2"-Gallate	243 ; 280
10	22,421	504	505	350 ;293 ;151 ;123		Non identifié	280 ; 240
11	22,550	610	611	303 ;153 ;145 ;109	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	Rutine	280 ; 242

12	22,572	302	303	287 ;257 ;239153	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercétine	280 ; 243
13	23,709	608	609	447 ;301 ;286 :164 ;127	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	Kaempféride 3-Glucoside-7-Rhamnoside	278 ; 244
14	24,311	434	435	289 ;165 ;137 ;153	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	Quercetine-3 arabinofuranoside	280 ; 245
15	28,509	247	248	197 ;147 ;134 ;117		Non identifié	280
16	33,308	223	224	205 ;177 ;128 ;115		Non identifié	260

Tableau 4: Diamètres des zones d'inhibition des extraits des tiges de *X. americana* et de la céfoxitine sur les souches de *Staphylococcus aureus*.

Souches bactériennes	Concentrations (mg/ml)			Tem	Antibiotique Céfoxitine (FOX, 30µg)
	200	100	50		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	15 ± 1 ^a	14,33 ± 1,52 ^a	13 ± 1 ^a	6 ± 0 ^b	24 ± 0 ^c
<i>S. aureus</i> 566 UB/18CNRA	14 ± 1 ^a	11,66 ± 1,15 ^b	10,66 ± 1,15 ^b	6 ± 0 ^c	10 ± 0 ^b
<i>S. aureus</i> 595 UB/18CNRA	14,33 ± 0,58 ^a	11 ± 0 ^b	10,33 ± 0,58 ^b	6 ± 0 ^c	16 ± 1 ^a
<i>S. aureus</i> 735 UB/18CNRA	18 ± 1 ^a	14,33 ± 1,52 ^b	12,66 ± 1,15 ^b	6 ± 0 ^c	11 ± 0 ^b
<i>S. aureus</i> 549 UB/18CNRA	10,33 ± 0,58 ^a	10,33 ± 0,58 ^a	6 ± 0 ^b	6 ± 0 ^b	12,67 ± 0,58 ^a
<i>S. aureus</i> 537 UB/18CNRA	12,66 ± 1,15 ^a	11,33 ± 0,58 ^a	10,33 ± 0,58 ^b	6 ± 0 ^c	14 ± 0 ^a

S. aureus : *Staphylococcus aureus* ; ATCC : American Type Culture Collection ; Tem : Témoin (eau distillée stérile). Les lettres différentes affectées aux moyennes au sein d'une même ligne indiquent des différences significatives (p < 0,05).

Tableau 5 : Valeurs des paramètres antibactériens des extraits de tiges de *X. americana* sur les souches de *S. aureus*.

Souches bactériennes	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB /CMI	Pouvoir antibactérien
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	12,5	50	4	Bactériostatique
<i>S. aureus</i> 735UB/18CNRA	50	100	2	Bactéricide
<i>S. aureus</i> 537UB/18CNRA	100	>100	-	-
<i>S. aureus</i> 549 UB/18CNRA	50	100	2	Bactéricide
<i>S. aureus</i> 566 UB/18CNRA	6,25	12,5	2	Bactéricide
<i>S. aureus</i> 595 UB/18CNRA	12,5	25	2	Bactéricide

S. aureus: *Staphylococcus aureus*; CMI : concentrations minimales inhibitrices ; CMB: concentrations minimales bactéricides. ATCC : American Type Culture Collection.

DISCUSSION

Le screening phytochimique a révélé la présence de polyphénols, de flavonoïdes, de tanins, de saponines, de stérols et polyterpènes, et l'absence de coumarines et d'alcaloïdes dans les tiges de *X. americana*. Ces résultats sont comparables à ceux de la littérature, hormis la détection d'alcaloïdes et coumarines. En effet, Maikai et al. (2008) ont noté la présence d'alcaloïdes dans les extraits aqueux d'écorces des tiges d'une espèce nigériane de *X. americana*. Quant aux coumarines, leur présence a été détectée dans les tiges et feuilles de l'espèce soudanaise (Zeinab et al., 2016).

L'analyse du chromatogramme dont l'élution des composés issus de l'extrait a été suivie à 210, 254 et 280 nm, a révélé plusieurs composés. Le signal 2 a fait apparaître un ion précurseur à m/z 291[M+H]⁺ et les ions fils respectifs m/z 289, 271, 139, 147 selon la voie de fragmentation de la catéchine (Flamini, 2012). Le signal 12 a fait apparaître la quercétine à m/z 303[M+H]⁺ et des ions fragments à m/z 287, 257, 239, 153. La présence de catéchine et de quercétine dans *X. americana* a été évoquée dans les travaux de Uchôa et al. (2016) qui les ont isolés respectivement dans les tiges et feuilles de cette plante. Zhen et al. (2015) ont, quant à eux, identifié dans les feuilles de *Ximenia caffra* de la catéchine. Les phytophénols matérialisés par les signaux 4 et 5 sur le massif entre le temps de rétention de 16,719 min et de 16,964 min ont été identifiés comme des tanins (Lantto et al., 2009). Ainsi l'ion moléculaire m/z 579 [M+H]⁺ assigné au signal 4 est un tanin condensé attribué à la procyanidine B, dimère de la catéchine, dont l'ion fils m/z 290 [M+H-289]⁺ correspondrait à la perte d'une unité de catéchine. L'ion précurseur à m/z 731[M+H]⁺ au pic 5 est un dimère galloylé de la catéchine. Selon la littérature, en mode positif, le fragment m/z 579 est un dimère du flavan-3-ol, et le fragment m/z 731, son dimère galloylé (Flamini et al., 2009). Au niveau du signal 1, l'ion précurseur à m/z 595[M+H]⁺ et les ions fragments m/z 289[M+H-306]⁺ issus de la perte d'unité gallo-catéchine, les ions fragments m/z 139 ; 123 caractéristiques de la catéchine (Zeng, 2015), ont mis en évidence la catéchine-

épigallocatechine. Aussi, l'épigallocatechine gallate a été identifiée au pic 6 avec un ion moléculaire m/z 459[M+H]⁺ et la perte d'un fragment galloylé (m/z 153) matérialisé par son ion fils m/z 306[M+H]⁺. L'ion moléculaire à m/z 747[M+H]⁺ au pic 3, a été attribué à la catéchine-épigallocatechine-gallate. La catéchine d'acide gallique a été aussi identifiée au pic 7 à m/z 443[M+H]⁺. La rutine a été détectée au signal 11 avec un ion moléculaire à m/z 611[M+H]⁺ et un ion fils à m/z 303[M+H-308]⁺ traduisant la perte d'un rhamnose et d'un glucose. L'ion moléculaire m/z 617 [M+H]⁺ au signal 9 a mis en évidence la quercétine 3-glucoside-2''-gallate traduit par la perte d'acide gallique (m/z 152) et de glucose (m/z 162). Le signal 13, a révélé la présence de la kaempféride 3-glucoside-7-rhamnoside avec son ion moléculaire à m/z 609[M+H]⁺ et ses ions fragments m/z 447[M+H-162]⁺ et m/z 301[M+H-162-146]⁺ traduisant respectivement la perte de glucose et de rhamnose. Quant à l'ion moléculaire m/z 435 (signal 14) avec un ion fragment m/z 289[M+H-146]⁺ traduisant la perte d'un sucre à 5 atomes de carbone a été attribué à la quercétine 3-arabinofuranoside.

Les composés identifiés dans les tiges ont présenté des similarités avec ceux observés par Kabran et al. (2017) dans feuilles de *X. americana* à 320, 360 et 520 nm. Cependant, ces derniers ont souligné une richesse plus importante en tanins galliques, condensés et en flavonols. Cette différence pourrait être justifiée par la nature de l'organe étudié. En effet, d'une manière générale, les organes supérieurs des végétaux sont plus riches en composés phénoliques que les organes inférieurs (Enneb et al., 2015). Aussi, Collin et Crouzet (2011) ont expliqué, que bien qu'une analyse à 280 nm permettait une observation de tous les composés phénoliques, celles effectuées à des longueurs d'ondes plus intenses conduisaient à une détection plus sélective et une quantification plus précise de plusieurs types de composés phénoliques comme les flavonols.

Quant à l'activité antibactérienne des extraits hydrométhanoliques de tiges de *X. americana* évaluée sur la croissance *in vitro* des 5 souches de *S. aureus* résistant à la

méticilline et une souche de référence, a montré que les extraits ont été actifs sur toutes les souches, avec des zones d'inhibition variant de $10,33 \pm 0,58$ mm à 18 ± 1 mm de diamètres. L'extrait de tige de *X. americana* comparativement à la Céfoxitine (FOX, 30 μ g), a été significativement plus actif sur les souches de *S. aureus* 735UB/18CNRA et *S. aureus* 566 UB/18CNRA avec des zones d'inhibitions respectifs de 18 ± 1 mm et $14 \pm 0,58$ mm, contre celle de la céfoxitine qui a été de 11 ± 0 mm et 10 ± 0 mm. Ces résultats sont comparables à ceux de Zeinab et al. (2016). Ces auteurs ont obtenu des zones d'inhibitions de 17 mm à 16 mm pour l'extrait hydrométhanolique de l'espèce soudanaise sur *S. aureus*, valeur proche de celle observée avec *S. aureus* 735 UB/CNRA (18 mm). Quant à Omer et al. (2003), ils ont montré que l'action de l'extrait de tige de cette plante sur 22 souches de *S. aureus* produisait des zones d'inhibitions inférieures à 18 mm pour 12 souches. Shagal et al. (2013) ont déterminé des zones d'inhibitions de $11 \pm 0,3$ mm et $12 \pm 0,3$ mm de diamètre pour des extraits aqueux et éthanoliques d'écorces de tiges de l'espèce nigériane. Ces valeurs sont assez proches de celles observées sur *S. aureus* 537 UB/18 CNRA.

Les valeurs du rapport CMB/CMI obtenues ont indiqué que les extraits hydrométhanoliques de tiges de *X. americana* ont manifesté une activité bactéricide (CMB/CMI ≤ 2) (Fauchere et Avril, 2002) sur toutes les souches cliniques, à l'exception de *S. aureus* 537UB/18CNRA dont la CMB n'a pas pu être déterminée. Par ailleurs, ces extraits ont été bactériostatiques sur *S. aureus* ATTC 29213 (CMB/CMI > 2). Selon les travaux de Silva et al. (2015), les CMI des extraits éthanoliques de tiges de *X. americana* espèce brésilienne sont de l'ordre de 1,04 mg/ml à 4,16 mg/ml. Ces valeurs sont différentes de celles obtenues avec des CMI qui ont varié de 6,25 à 100 mg/ml. Cet écart pourrait être expliqué par la différence d'extraction et de l'habitat des espèces.

L'activité antibactérienne des extraits de tiges de *X. americana* serait due à la richesse en polyphénols (Aragão et al., 2018). Par

ailleurs, Kakou et al. (2018) ont montré que ces extraits riches en polyphénol manifestaient une bonne activité antioxydante. Ces derniers auraient donc inhibé la croissance des souches de *S. aureus* résistante à la méticilline. Ces activités antibactériennes de composés phénoliques ont été mises en évidence dans les travaux de Amiour et al. (2014) qui ont montré que des extraits de dattes (*Phoenix dactylifera* L) contenant de la quercétine et la catéchine inhibaient la croissance de souches de *S. aureus*. Des résultats ont été obtenus par d'autres auteurs, notamment, Boubeker et al. (2018) dans l'étude d'extraits éthanoliques de *Helichrysum stoechas* (L.) et Ghedadba et al. (2018) dans leurs travaux sur les feuilles de *Marrubium deserti*.

La présence de molécules phénoliques comme la quercétine et ses dérivées, la catéchine et ses dérivées contenues dans *X. americana* seraient donc tributaires de ces activités antibactériennes sur *S. aureus*.

Conclusion

Notre étude a montré que l'extrait méthanolique 80% des tiges de *X. americana* a une richesse en composés phénoliques notamment en flavonoïdes avec la présence des flavan-3ols (catéchines et dérivées, procyanidine B) et de quercétine et dérivées. L'activité antibactérienne des extraits a été active sur toutes les souches de *S. aureus*. Les CMI obtenues ont été comprises entre 6,25 à 100 mg/ml. Quant aux CMB, elles ont varié entre 12,5 à 100 mg/ml. Les rapports CMB/CMI ont indiqué des activités bactéricides pour 4 souches cliniques dont *S. aureus* 735UB/18CNRA, *S. aureus* 549 UB/18CNRA, *S. aureus* 595 UB/18CNRA, *S. aureus* 566UB/18CNRA et une activité bactériostatique pour la souche de référence *S. aureus* ATCC 29213. Vu l'importance de ces activités sur ces souches résistantes à la céfoxitine, ces extraits pourraient contribuer au traitement des infections bactériennes à *Staphylococcus aureus*.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont aucun conflit d'intérêts.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

L'auteur BAK a conduit l'étude du tri phytochimique, l'élaboration spectrale des échantillons et les tests antibactériens. Les analyses phytochimique et spectrale ont été effectuées par AB et AHN sous la direction de YAB. La partie de la microbiologie a été réalisée sous la supervision de KKF et GNK. L'analyse des résultats ainsi que la révision de la rédaction du manuscrit ont été réalisées par AB.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) et l'Université NANGUI ABROGOUA pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- Akers MJ. 1985. *Parenteral Quality Control: Sterility, Pyrogen, Particulate and package Integrity Testing* (1st ed). Marcel Dekker Inc: New York.
- Amiour DS, Alloui-Lombarkia O, Bouhdjila F, Ayachi A, Hambaba L. 2014. Étude de l'implication des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes dans son activité antibactérienne. *Phytothérapie*, **12**(2): 135-142. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0843-9>
- Aragão TP, Prazeres LDKT, Brito SA, Neto PJR, Rolim LA, Almeida JRGS, Caldas GFR, Wanderley AG. 2018. Contribution of Secondary Metabolites to the Gastroprotective Effect of Aqueous Extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) Stem Bark in Rats. *Molecules*, **23**(1): 112. DOI: [10.3390/molecules23010112](https://doi.org/10.3390/molecules23010112)
- Baggnian I, Laouali A, Yameogo JT, Moussa I, Toudou A. 2018. Etude ethnobotanique des plantes médicinales vendues sur les marchés du centre ouest du Niger. *Journal of Applied Biosciences*, **132**: 13392-13403. DOI: [10.4314/jab.v132i1.1](https://doi.org/10.4314/jab.v132i1.1)
- Békro YA, Mamyrbekova BJA, Boua BB, Tra Bi FH, Ehilé EE. 2007. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. Et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sciences et Nature*, **4**(2): 217-225. DOI: [10.4314/scinat.v4i2.42146](https://doi.org/10.4314/scinat.v4i2.42146)
- Boubeker H, Rebbas K, Belhattab R. 2018. Activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench. *Phytothérapie*, **16**(3): 122-132. DOI: [10.3166/phyto-2018-0043](https://doi.org/10.3166/phyto-2018-0043)
- Collin S, Crouzet J. 2011. *Polyphénols et Procédés: Transformation des Polyphénols au Travers des Procédés Appliqués à l'Agro-alimentaire*. Lavoisier –Eds (Tec) et Doc: Paris.
- Dosso M, Faye-Kette H. 2000. Contrôle de qualité de l'antibiogramme en pratique courante : Expérience du laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. *Bactériolo. Int.*, **53**.
- Enneb H, Belkadhi A, Cheour F, Ferchichi A. 2015. Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology*, **20**(2): 788-793.
- Fauchere IL, Avril JL. 2002. *Bactériologie Générale et Médicale*. Editions Ellipses: Paris.
- Flamini R, Guo DA, Valko M, Stafilov T. 2012. Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols. *ISRN Spectroscopy*, **2013**: 1-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/813563>
- Flamini R, Traldi P. 2009. *Mass Spectroscopy in Grape and Wine Chemistry*. John Wiley and Sons Inc.: New Jersey.
- Ghedadba N, Ha ML, Ayachi A, Aberkane M, Bousselsela H, Oueld-Mokhtar SM. 2018. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, **13**: 118–129. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0944-4>
- Ghermaout-benchouk. 2013. Prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus*: son rôle dans l'infection du site

- opérateur. Thèse de doctorat de médecine, Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen, Algérie, 197 p.
- Kabran GRM, Mamyrbekova-Bekro JA, Pirat JL, Lecouvey, Sainte-Catherine O, Sommerer N, Verbaere A, Meudec E, Békro YA. 2017. UPLC-MS Quantification and Anticancer Potential of *Ximenia Americana* Hydro-Acetic Crude Extract Leaves. *Der Chemica Sinica.*, **8**(1): 70-74.
- Kakou BA, Kabran GRM, N'Guessan AH, Bohoussou KV, Benie A, Mamyrbekova-Békro JA, Békro Y-A. 2018. Phytochemical and antioxidant investigations of five ivoirien medicinal plants used against dental caries. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, **24**(4): 1794–1804.
- Kipre BG, Guessenn NK, Koné MW, Gbonon V, Coulibaly JK, Dosso M. 2017. Antibacterial activity of the stem bark of *Tieghemella Heckelii* Pierre ex. A Chev against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **17**(1): 170. DOI: 10.1186/s12906-017-1681-8
- Konan FK, Guessenn N, Ouattara K, Bahi A, Coulibaly A, Dosso M. 2013. Action antibactérienne de l'extrait éthanolique 70% de *Clerodendrum splendens* (G. Don) (Verbenaceae) sur des souches bactériennes isolées de selles chez des enfants diarrhéiques. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **7**(3): 1332-1337. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v7i3.38>.
- Koné WM, Kamanzi AK, Terreaux C, Hostettmann K, Traore D, Dosso M. 2004. Traditional medicine in North Côte d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**(1): 43-49. DOI: 10.1016/j.jep.2004.03.006.
- Kouadio NJ, Witabouna KM, Guessenn NK, Bamba M, YAO K, Allagba-Atsain MR, Tra-Bi FH, Konan KF, Bakayoko A, Dosso M. 2017. Evaluation de l'activité antibactérienne des feuilles de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) sur la croissance *in-vitro* de souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE) et tri phytochimique. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, **20**(2): 431-440.
- Lantto TA, Dorman HJD, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Tikhonov VP, Raasmaja A. 2009. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a *Siberian pine* (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*, **112**(4): 936-943. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.008
- Maikai VA, Kobo PI, Auda AO. 2008. Acute toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Ximenia americana*. *Afr. J. Biotech.*, **7**(10): 1600-1603.
- Marisa H, Jouy E, Madec J-Y, Laurent F. 2012. *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline (SARM): un partage entre l'Homme et l'animal? *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, Spécial Antibiotiques et Antibiorésistances*, **53** : 40-43.
- Messad N. 2016. *Staphylococcus aureus* colonisant / *Staphylococcus aureus* infectant dans le modèle du pied diabétique. Thèse de doctorat, Université de Montpellier, France, 133 p.
- Omer MEF, Elnima E. 2003. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. *Fitoterapia*, **74**: 122–126. DOI: 10.1016/s0367-326x(02)00302-7
- Ouattara LH, Kabran GRM, Guessenn NK, Konan KF, Mamyrbekova-Bekro J, Bekro Y-A. 2016. Activités antibactériennes *in vitro* des extraits d'écorces de racines de *Mezoneuron benthamianum* et de tiges de *Paullinia pinnata* : 2 plantes de la pharmacopée ivoirienne. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **18**(1): 31-40.
- Ponce AG, Fritz R, Del Vallec, Rouras I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology*, **36**(7): 679-684. DOI:

- [http://dx.doi.org/10.1016/S00236438\(03\)00088-4](http://dx.doi.org/10.1016/S00236438(03)00088-4)
- Shagal MH, Kubmarawa D, Barminas JT. 2013. Evaluation of antimicrobial property of *Ximenia americana*. *E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, **4**(6): 99-102.
- Silva KMA, Chaves TP, Santos RL, Brandao DO, Fernandes FHA, Ramos-Junior FJL, Santos VL, Felismino DC, Medeiros ACD. 2015. Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenia americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl. *Bol. Latinoam Caribe Plant Med. Aromat.*, **14**(2): 92-98.
- Uchôa VT, Sousa CMM, Carvalho AA, Goulard AE, Chaves MH. 2016. Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **6**(2): 091-096. DOI: 10.7324/JAPS.2016.60213.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. 2007. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, **3**: 163-175. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Zeinab MMA, Saeed AEM, Khalid HS. 2016. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Ximenia americana* L bark and leaves. *American Journal of Research Communication*, **4**(1): 122-129.
- Zeng L. 2015. Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, France, 234 p.
- Zhen J, Guo Y, Villani T, Carr S, Brendler T, Mumbengegwi DR, Wu Q. 2015. Phytochemical Analysis and Anti-Inflammatory Activity of the Extracts of the African Medicinal Plant *Ximenia caffra*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2015**: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/948262>.
- Zirih G, Kra AKM, Guédé-Guina F. 2003. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck O.Kuntze Asteraceae) «PYMI» sur la croissance *in-vitro* de *Candida albicans*. *Revue Med. Pharm, Afric.*, **17**(3): 11-18.