

# Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton

## Evaluation of the Antioxidant and Antibacterial Activity of the Aqueous Extract of Leaves and Flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton

M. Bammou · E.D.T. Bouhlali · K. Sellam · L. El-Rhaffari · J. Ibijbjen · L. Nassiri

© Lavoisier SAS 2020

**Résumé** L'objectif de ce travail était d'évaluer le pouvoir antioxydant et l'activité antibactérienne des extraits aqueux (EA) des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.). Les résultats révèlent qu'aussi bien les feuilles que les fleurs contiennent des teneurs élevées en phénols totaux estimées respectivement à  $141,4 \pm 1,43$  mg équivalent d'acide caféique (EAC)/g d'extrait et  $128,11 \pm 3,00$  mg EAC/g d'extrait. Par ailleurs, le test de *ferric reducing antioxidant power* montre que le pouvoir réducteur de l'EA des feuilles est plus élevé ( $64,27 \pm 2,97$  mg ET/g d'extrait) que celui des fleurs ( $53,61 \pm 3,81$  mg ET/g d'extrait). La capacité de piégeage du radical libre DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est très intéressante avec une  $CI_{50}$  égale à  $0,203 \pm 0,002$  mg/ml pour l'EA des feuilles et à  $0,457 \pm 0,003$  mg/ml pour l'EA des fleurs. En outre, les deux extraits testés présentent une activité protectrice antiradicalaire traduite par un temps de demi-hémolyse important, de  $133,61 \pm 1,22$  et  $103,45 \pm 6,63$  minutes respectivement pour les feuilles et les fleurs. Quant aux essais d'activité antimicrobienne, l'EA des feuilles s'est avéré plus efficace que celui des fleurs, il montre une activité remarquable sur toutes les souches étudiées. L'effet de cet extrait est notable vis-à-vis *Bacillus subtilis* avec un maximum d'inhibition de l'ordre de  $13,33 \pm 0,57$  mm.

**Mots clés** *Bituminaria bituminosa* · Activité antioxydante · Activité antibactérienne · Activité antihémolytique · Extrait aqueux

**Abstract** This work aimed to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of the aqueous extracts (AE) of leaves

and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.). The results reveal that both the leaves and flowers contain high levels of total phenols, estimated respectively at  $141.4 \pm 1.43$  mg EAC/g of extract and  $128.11 \pm 3.00$  mg EAC/g of extract. Also, the test shows that the FRAP reducing power AE leaves is higher ( $64.27 \pm 2.97$  mg ET/g of extract) as that of the flowers ( $53.61 \pm 3.81$  mg ET/g of extract). Scavenging capacity of DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical is very interesting with an  $IC_{50}$  equal to  $0.203 \pm 0.002$  mg/ml for AE leaves and  $0.457 \pm 0.003$  mg/ml for AE flowers. Furthermore, the two extracts tested exhibit protective anti-radical activity resulted in a half time of major hemolysis,  $133.61 \pm 1.22$  min and  $103.45 \pm 6.63$  min respectively to the leaves and flowers. As for testing antimicrobial activity, AE leaves proved more effective than the flowers extract, it shows a remarkable activity against all the strains studied. The effect of this extract is significantly for *Bacillus subtilis* with a maximum inhibition of approximately  $13.33 \pm 0.57$  mm.

**Keywords** *Bituminaria bituminosa* · Antioxidant activity · Antibacterial activity · Anti-hemolytic activity · Aqueous extract

## Introduction

La résistance aux antibiotiques atteignant le point de crise dans beaucoup de pays, il y a des besoins urgents de compléter le niveau de notre arsenal d'agents anti-infectieux [1]. De plus, les effets nuisibles du stress oxydant sur la santé humaine sont devenus un problème grave, l'utilisation de molécules antioxydantes de synthèse (butylhydroxyanisole, BHA, du butylhydroxytoluène, BHT...) est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels [2]. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants et d'antimicrobiens naturels sont recherchées [3]. En effet, les polyphénols sont des composés

M. Bammou (✉) · J. Ibijbjen · L. Nassiri  
Équipe de microbiologie du sol et de l'environnement,  
faculté des sciences, Meknès, Maroc  
e-mail : bammou.mohamed@gmail.com

M. Bammou · E.D.T. Bouhlali · K. Sellam · L. El-Rhaffari  
Équipe de l'environnement et santé,  
faculté des sciences et techniques, Errachidia, Maroc

naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé [4]. Leur rôle comme antioxydants naturels suscite un grand intérêt pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies [5].

*Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. est une légumineuse sauvage vivace largement distribuée dans le Bassin méditerranéen et les îles Canaries [6]. Elle a été observée au Maroc entre Targuist et Beni Bounsar [7], à la montagne de Zerhoun et Ouazzane [8] et sur les Jbel Bouhachem et Jbel Sougna au Rif [9], cette plante est riche en isoflavonoïdes qui ont des activités antibactériennes, antifongiques, anti-insectes remarquables [10–12] en plus d'un pouvoir antitumoral puissant [11]. Une étude récente a montré que les extraits chloroformique et hexanique ont un effet important sur les deux virus de l'herpès (HSV1 et HSV2) [13].

Ainsi, les feuilles de *Bituminaria bituminosa* sont utilisées en cataplasme pour traiter des blessures (callosités et dureté de la peau) et contre les hémorroïdes [14]. De plus, *Bituminaria morisiana*, deuxième espèce du genre *Bituminaria* est dotée d'une activité antioxydante puissante [15], d'une activité antifongique, antibactérienne, antiappétante, et anti-VIH et d'un effet cytotoxique remarquable [12].

Aussi, dans la présente étude, l'objectif principal consiste en la valorisation du trèfle bitumeux à travers l'évaluation, d'une part, du pouvoir antioxydant des extraits aqueux (EA) de ses feuilles et des fleurs et, d'autre part, de l'activité antibactérienne de cette espèce.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (Figs 1, 2) récoltées dans le champ d'application du département de microbiologie de la faculté



Fig. 1 Feuilles de *Bituminaria bituminosa* (L.)



Fig. 2 Fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.)

des sciences de Meknès. Les feuilles et les fleurs ont été séchées et réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

### Préparation des extraits végétaux

La préparation de l'extrait total aqueux (EA) a été faite selon la méthode décrite par Guédé-Guina et al. qui consiste à macérer séparément 80 g de poudre de feuilles et de fleurs dans 1 l d'eau distillée [16]. Le macérât est homogénéisé pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur magnétique de type IKAMAG®-RCT. L'homogénat est filtré une fois sur du papier-filtre Wattman 3 mm. Le filtrat obtenu est évaporé à l'aide d'une étuve à 50 °C pour donner une poudre qui constitue l'EA. Ce dernier est conservé à 4 °C avant l'utilisation.

### Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée selon la méthode décrite par Singleton et Rossi [17]. Ainsi, 30 µl de l'échantillon (0,005 g/ml) furent mélangés avec 250 µl de réactif de Folin-Ciocalteu ; puis on a ajouté 500 µL d'une solution de carbonate de sodium à (0,1 g/ml). Le volume final a été ajusté à 5 ml avec l'addition de l'eau distillée.

L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 725 nm. La courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant des concentrations (0 à 0,03 g/l) de l'acide caféique. Les composés phénoliques totaux ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide caféique (EAC) par 1 g d'EA.

### Activité antioxydante

Trois méthodes fondées sur différents mécanismes chimiques ont été choisies pour prendre en compte la large variabilité et la gamme d'action des antioxydants des extraits

étudiés ; il s'agit du pouvoir réducteur d'un échantillon par FRAP (*ferric reducing antioxidant power*), de la capacité de piégeage du radical stable commercial DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), et le test d'inhibition de l'AAPH (2-2-azobis 2-amidinopropane dihydrochloride).

#### **Pouvoir réducteur du fer FRAP**

Le pouvoir réducteur du fer a été déterminé selon la méthode de Benzie et Strain [18]. Le réactif de FRAP a été préparé en mélangeant 50 ml de tampon acétate (0,3 M) à pH 3,6, 5 ml de la solution tripyridyltriazine (TPTZ) 10 mM préparée dans l'HCl (40 mM) et 5 ml de solution de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) [20 mM]. Deux millilitres du réactif de FRAP fraîchement préparé a été ajouté à 10 µl de l'extrait (5 mg/ml). Après dix minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 593 nm contre le blanc. La courbe standard a été construite en utilisant Trolox avec une gamme de concentration allant de 0 à 3,08 mg/l. Le résultat a été exprimé en milligrammes équivalent de Trolox par 1 g d'EA. En principe, plus l'absorbance est grande, plus la puissance de réduction est importante.

#### **Test de piégeage du radical libre DPPH**

L'activité du balayage du radical DPPH par l'EA de fleurs et des feuilles a été évaluée selon la méthode décrite par Blois [19], avec de légères modifications. Le mélange réactionnel contenait 100 µl de chaque extrait à une concentration allant de 1,25 à 20 g/l et 1,9 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,3 mM).

Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 20 minutes, et l'absorbance a été lue à 517 nm. L'hydroxytoluène butyle (BHT) a été l'antioxydant de référence utilisé pour le contrôle positif. Les valeurs de CI<sub>50</sub> (concentration provoquant l'inhibition de 50 %) ont été déterminées graphiquement. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante [20] :

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / (\text{Abs}_{\text{control}} \times 100)$$

#### **Activité antihémolytique**

L'activité hémolytique induite par le générateur de radicaux libres AAPH a été mesurée selon la méthode établie par Prost avec des modifications mineures [21]. Deux cents microlitres de sang de lapin hépariné ont été mélangés avec 10 µl de l'EA des fleurs et des feuilles, ensuite on a ajouté 600 µl de l'AAPH (10 %). Le mélange a été incubé à 37 °C et l'absorbance a été mesurée à 450 nm toutes les cinq minutes. L'EA a été remplacé par Trolox et par une solution saline (NaCl 0,9 %) dans le contrôle positif et négatif respectivement. L'effet protecteur des extraits envers l'hémolyse

induite par des radicaux libres a été estimé par la détermination du temps de demi-hémolyse.

#### **Tests des activités biologiques des extraits**

##### **Matériel bactérien**

Le matériel bactérien utilisé était composé de six souches de référence provenant de l'Institut d'hygiène de Rabat : trois souches Gram (+), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Salmonella abony* (NCTC 6017) et trois souches Gram (-), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

##### **Méthode des disques**

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits préparés, la méthode de diffusion sur milieu gélosé consistant en la détermination des diamètres des zones d'inhibition [22,23] a été utilisée. Des disques stérilisés de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 10 µl de différentes concentrations d'EA, respectivement 1 mg/disque, 0,5 mg/disque, 0,25mg/disque et ont été déposés à la surface d'un milieu préalablement ensemencé par une suspension microbienne ayant une turbidité voisine à celle de McFarland 0,5 (10<sup>6</sup> UFC/ml).

Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, les zones d'inhibition formées autour des disques ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. Chaque essai a été répété trois fois dans les mêmes conditions d'expérimentation.

##### **Méthode de microdilution**

La solution de résazurine (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) a été préparée à raison de 0,075 % (w/v) dans de l'eau distillée et stérilisée par filtration ; elle peut être stockée à 4 °C pendant une semaine [24].

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits a été mesurée par la méthode de microdilution [25], réalisée dans des plaques de 96 puits. Dans cet essai, 100 µl d'une solution de résazurine de couleur violette (750 µg/ml) ont été placés dans les puits de contrôle de stérilité (colonne 11) sur la plaque. 7,5 ml de la solution de résazurine ont été mélangés avec 5 ml de l'organisme d'essai (10<sup>8</sup> UFC/ml), suivis par le transfert de 100 µl dans les puits de contrôle de croissance (colonne 12) et les puits de test (1<sup>re</sup>-10<sup>e</sup> colonnes) sur la plaque. Dans les puits de test, les différentes souches ont été soumises à des concentrations différentes de l'extrait (6,66, 5, 3,33, 2, 0,9 et 0,47 mg/ml). Enfin, la plaque a été incubée à 37 °C pendant environ cinq heures. Chaque essai a été répété trois fois dans les mêmes conditions d'expérimentation.

Aussi, le principe de ce protocole expérimental est fondé sur le fait qu'en présence de micro-organismes en croissance, la couleur violette vire au rose, voire devient incolore. Si la croissance est bloquée par la présence d'une substance bactériostatique, on remarque que la couleur violette persiste.

En outre, la CMI est déterminée en suivant le virage de la couleur de la résazurine après l'incubation ; le premier puits dont la couleur ne varie pas indique que la CMI correspond à un niveau de 99 % d'inhibition de la croissance.

### Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triple, et les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  l'écart-type. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel statistique *R*, en utilisant le test de Student. Les différences ont été considérées significatives au seuil de probabilité de 5 % ( $***p < 0,001$  ;  $0,001 < **p < 0,01$  ;  $0,01 < *p < 0,05$ ).

## Résultats et discussion

### Rendement en extraits secs

Le rendement en extraits secs de l'EA de *Bituminaria bituminosa* a été de l'ordre de  $24,83 \pm 0,55$  % et  $21,00 \pm 0,66$  % respectivement pour les feuilles et les fleurs.

### Teneur en phénols totaux

La figure 3 présente la teneur en phénols totaux dosée par la méthode de Folin-Ciocalteu et rapportée en milligrammes EAC/g d'extrait.

Les résultats indiquent que les deux parties de la plante ont des teneurs élevées en phénols totaux avec une diffé-

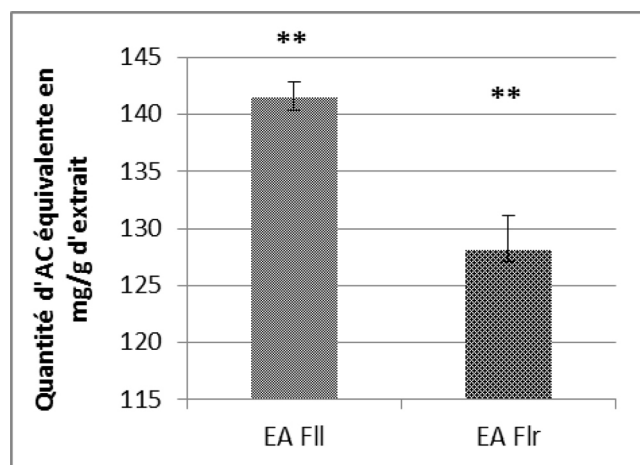


Fig. 3 Teneur en phénols totaux dans l'EA des feuilles et des fleurs

rence moyennement significative ( $0,001 < **p < 0,01$ ) ; celle-ci est de  $141,01 \pm 1,43$  mg EAC/g d'extrait pour l'EA des feuilles et de  $128,11 \pm 3,00$  mg EAC/g d'extrait pour celui des fleurs.

Selon Pecetti et al., la teneur en polyphénols totaux était similaire chez *Bituminaria bituminosa* de différentes provenances en Italie, la plupart des valeurs sont autour de 11–12 mg EAG/g du poids sec [26].

Aussi, il a été rapporté que le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques, tel que la partie de la plante utilisée en plus de facteurs extrinsèques [27].

### Pouvoir réducteur par test (FRAP)

Il s'agit d'une méthode de mesure de la puissance des substances des extraits à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  qui constitue l'un des mécanismes antioxydants.

Dans la présente étude, le test de FRAP a révélé que l'EA des feuilles a un pouvoir réducteur élevé comparé à celui de l'EA des fleurs ; ainsi, la capacité de réduction du fer de l'EA des feuilles est estimée à  $64,27 \pm 2,97$  mg ET/g d'extrait alors que celle de l'EA des fleurs est de l'ordre de  $53,61 \pm 3,81$  mg ET/g d'extrait (Fig. 4).

Aussi, le pouvoir réducteur de *Bituminaria bituminosa* serait probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. En effet, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs d'oxydants [28].

### Activité antioxydante mesurée par le radical DPPH

Les résultats obtenus sont reportés sur les figures 5, 6 ; on y voit une diminution importante et dose-dépendante en concentration du radical DPPH en relation avec l'activité piégeuse de l'EA.

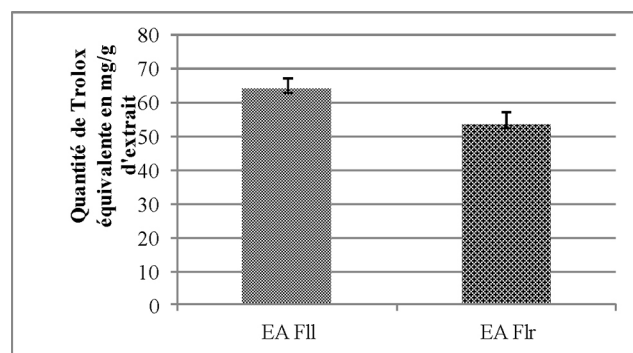


Fig. 4 Pouvoir réducteur de l'EA des feuilles et des fleurs par FRAP



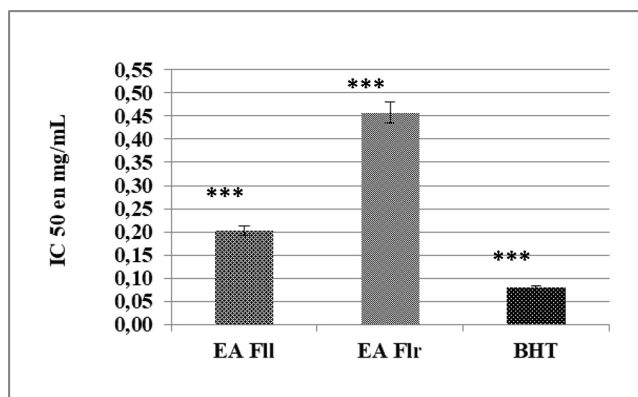


Fig. 5 Pourcentage d'inhibition de l'EA des feuilles et des fleurs

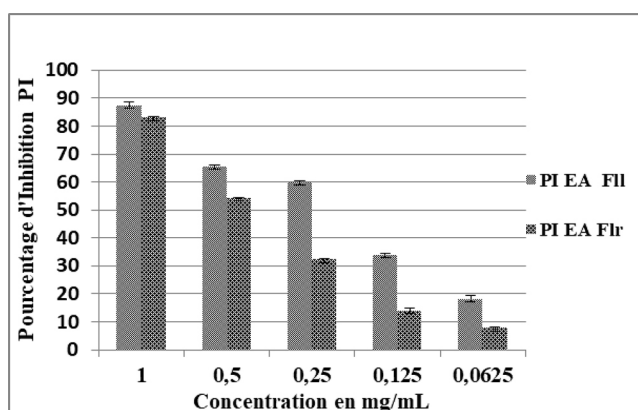


Fig. 6 Concentration inhibitrice de 50 % des radicaux DPPH

Ainsi, l'EA des feuilles à une concentration de 1 mg/ml inhibe  $87,23 \pm 1,22$  % des radicaux libres de DPPH alors qu'avec la même concentration, l'EA des fleurs en inhibe  $83,01 \pm 0,36$  %.

L'EA des feuilles présente une forte activité antiradicalaire avec une  $CI_{50}$  égale à  $0,203 \pm 0,002$  mg/ml en comparaison avec de l'EA des fleurs qui présente une  $CI_{50}$  égale à  $0,457 \pm 0,003$  mg/ml, mais reste toutefois d'une efficacité significativement moindre par rapport à celle exprimée par le BHT ( $CI_{50} = 0,08 \pm 0,0003$  mg/ml) [\*\*\* $p < 0,001$ ].

Aussi, les  $CI_{50}$  trouvées pour l'EA des feuilles sont comparables à celles trouvées pour trois plantes appartenant à la même famille que *Bituminaria bituminosa*, celles des Fabacées ; il s'agit de *Baphia racemosa* avec  $0,210 \pm 0,065$  mg/ml, *Virgilia divaricata*  $0,271 \pm 0,051$  mg/ml [29] et *Mellilotus officinalis*  $0,252 \pm 0,051$  mg/ml [30].

En outre, la  $CI_{50}$  et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnelles. Enfin, la capacité de balayage du DPPH de l'EA pourrait être attribuée à la présence de composés phénoliques [31].

## Activité antihémolytique

Une action antioxydante de l'extrait étudié se traduit respectivement par une augmentation du temps de demi-lyse cellulaire lors de l'agression radicalaire des érythrocytes isolés ou du sang total [32].

L'addition de l'AAPH conduit à une diminution fortement significative dans le temps de demi-hémolyse de  $176,52 \pm 3,12$  à  $94,67 \pm 4,46$  minutes ( $p < 0,001$ ).

L'application de l'EA des feuilles à la suspension d'érythrocytes avec AAPH a induit une augmentation fortement significative du temps de demi-hémolyse à  $133,61 \pm 1,22$  minutes ( $p < 0,001$ ), alors que l'application de l'EA des fleurs induit une augmentation non significative du temps de demi-hémolyse à  $103,45 \pm 6,63$  minutes ( $p > 0,05$ ) (Tableau 1).

Les teneurs en polyphénols, les activités antiradicalaires et les pouvoirs chélateur et réducteur sont significativement affectés par des facteurs biologiques, environnementaux et techniques [33].

## Activité antibactérienne

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien des deux extraits investis dans cette étude, on a opté pour deux cibles, des souches Gram+ (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Salmonella abony* (NCTC 6017)) et des souches Gram- (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)). En effet, chacun des deux types possède une structure cellulaire propre et un métabolisme particulier. Aussi, des antibiotiques de référence ont été utilisés et testés sur ces souches (Tableau 2).

Ainsi, il apparaît que les souches Gram- sont plus sensibles aux deux extraits que les souches Gram+ (Tableau 3).

L'EA des fleurs est inactif sur les deux souches de *Staphylococcus aureus* et montre une légère activité contre *Salmonella abony* et *Escherichia coli* 2.

Tableau 1 Activité antihémolytique de l'EA des feuilles et des fleurs

	Temps de demi-hémolyse	Écart-type
Sang + Trolox	168,17	9,29
Sang + eau physiologique	176,52	3,12
Sang + AAPH	94,67	4,46
Sang + AAPH + EA des feuilles	133,61	1,22
Sang + AAPH + EA des fleurs	103,45	6,63

Tableau 2 Antibiotogrammes des souches testées						
Souches bactériennes	Antibiotiques					
	P <sub>10</sub>	C <sub>30</sub>	CN <sub>10</sub>	S <sub>10</sub>	AMC <sub>30</sub>	CIP <sub>5</sub>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	23,33 ± 0,57	21,67 ± 0,57	12,33 ± 0,57	10,33 ± 0,57	23,67 ± 1,11
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	NA	26,33 ± 0,57	21,67 ± 0,57	12,00 ± 0,00	17,00 ± 1,00	12,33 ± 0,57
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	NA	17,00 ± 1,00	23,67 ± 1,11	21,67 ± 0,57	34,33 ± 1,15	30,33 ± 0,43
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	34,33 ± 1,15	29,00 ± 1,00	24,66 ± 0,57	20,00 ± 0,00	33,66 ± 0,57	15,33 ± 0,57
<i>Salmonella abony</i> NCTC 6017	15,33 ± 0,57	26,33 ± 0,57	21,00 ± 1,00	16,66 ± 0,57	23,33 ± 0,57	14,670.43
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	34,66 ± 0,57	35,33 ± 1,15	30,66 ± 0,57	21,33 ± 0,57	29,66 ± 1,15	21,67 ± 0,57

P<sub>10</sub> : pénicilline (10 µg/disc) ; C<sub>30</sub> : chloramphénicol (30 µg/disc) ; CN<sub>10</sub> : gentamicine (10 µg/disc) ; S<sub>10</sub> : streptomycine (10 µg/disc) ; AMC<sub>30</sub> : amoxicilline/acide clavulanique (30 µg/disc) ; CIP<sub>5</sub> : ciprofloxacine (5 µg/disc) ; NA : non actif

Tableau 3 Diamètres d'inhibition de la croissance bactérienne en millimètres						
Souches bactériennes	Extraits (mg/disque)					
	EA Feuilles			EA Fleurs		
	1	0,5	0,25	1	0,5	0,25
Gram-						
<i>E.c1</i> ATCC 25922	10,66 ± 0,57	NA	NA	09,66 ± 0,57	NA	NA
<i>E.c2</i> ATCC 8739	12,00 ± 0,00	11,66 ± 0,57	09,66 ± 0,57	10,66 ± 0,57	08,00 ± 0,00	NA
<i>B.s</i> ATCC 6633	13,33 ± 0,57	12,00 ± 0,00	09,66 ± 0,57	12,66 ± 0,57	09,66 ± 0,57	07,67 ± 0,44
Gram+						
<i>S.a2</i> ATCC 25923	10,00 ± 0,00	08,33 ± 0,57	NA	NA	NA	NA
<i>S.a1</i> ATCC 6538	12,66 ± 0,57	11,33 ± 1,15	09,67 ± 0,44	NA	NA	NA
<i>S.ab</i> NCTC 6017	11,66 ± 0,57	10,66 ± 0,57	NA	08,66 ± 0,57	07,66 ± 0,57	NA

E.c : *Escherichia coli* ; S.a : *Staphylococcus aureus* ; S.ab : *Salmonella abony* ; B.s : *Bacillus subtilis*. EA : extrait aqueux ; NA : non actif

De son côté, l'EA des feuilles s'est avéré plus efficace que celui des fleurs et montre une activité dose-dépendante remarquable sur toutes les souches étudiées. L'effet de cet extrait est notable vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, avec un maximum d'inhibition de l'ordre de 13,33 ± 0,57 mm de diamètre.

Par ailleurs, une étude récente conduite avec les extraits dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du n-butanol de *Bituminaria bituminosa* a montré que ceux-ci ont un pouvoir ; le maximum d'activité a été obtenu avec le dichlorométhane à une concentration de 2 mg/ml et les zones d'inhibition ont été de l'ordre de 20,45, 16,41 et 15,74 mm respectivement contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* ATCC 25922 [34].

Par ailleurs, le large spectre de sensibilité des six souches de référence utilisées est surtout lié à la combinaison de familles phytochimiques au sein de l'extrait et surtout à leur synergie [35].

Certes l'activité inhibitrice de l'EA des feuilles et des fleurs sur les souches testées est plus faible que celle due

aux antibiotiques de référence (Tableau 2) ; cependant, cet extrait exerce une activité antibactérienne dans la mesure où il est un extrait brut et non pas un produit pur [36].

D'un autre côté, dans le tableau 4 sont reportées les CMI des deux extraits sur les souches testées. On remarque que les CMI sont inversement proportionnels aux diamètres des zones d'inhibition ; en effet, plus le diamètre d'inhibition est important, moins la CMI est grande. Il apparaît donc clairement que toutes les souches testées ont été sensibles à l'action antimicrobienne des deux extraits à des degrés de dilutions différents. Ainsi, les souches les plus sensibles et dont les CMI sont les plus basses sont dans l'ordre de sensibilité suivant : *Bacillus subtilis* > *Escherichia coli* > *Salmonella abony* pour l'extrait des feuilles.

## Conclusion

Afin d'isoler de nouvelles substances naturelles permettant de mettre au point de nouvelles voies d'application tant dans

Tableau 4 Concentrations minimales inhibitrices		
Souches bactériennes	CMI en mg/ml	
	EA Fleurs	EA Feuilles
Gram+		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5,00	0,90
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1,66	0,90
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1,66	0,33
Gram-		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5	3,33
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6,66	5
<i>S. aureus</i> NCTC 6017	3,33	1,66

*E.c.* : *Escherichia coli* ; *S.a.* : *Staphylococcus aureus* ; *S.ab.* : *Salmonella abony* ; *B.s.* : *Bacillus subtilis*

les domaines de la pharmacie et du cosmétique, ce travail est une contribution à l'étude d'activités biologiques de *Bituminaria bituminosa* issue du champ d'application du département de microbiologie de la faculté des sciences de Meknès (Maroc). L'analyse quantitative réalisée par spectrophotométrie a révélé des teneurs appréciables en polyphénols, et une activité antioxydante remarquable vis-à-vis différents substrats (minéral, organique et biologique), ainsi qu'une activité antibactérienne importante.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références

- Cushnie T, Lamb AJ (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 38:99–107
- Lu Y, Yeap Foo L (2000) Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem* 68:81–5
- Suhaj M (2006) Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J Food Compos Anal* 19:531–7
- Koechlin-Ramonatxo C (2006) Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr Clin Metab* 20:165–77
- Vârban D I, Duda M, Varban R, et al (2009) Research concerning the organic technology for *Satureja hortensis* (L.) Culture. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture* 66:224–9
- Minissale P, Brullo C, Brullo S, et al (2013) *Bituminaria basaltica* (Fabaceae), a new species from Italy. *Phytotaxa* 98:1–15
- Deil U (2006) Distribution, ecology and phytosociology of the Moroccan endemic *Ptilostemon leptophyllus* (Compositae). *Willdenowia* 36:413–22
- Valdés B, Melero D (2013) The contribution of the "Iter Mediterraneo V" to the chorological knowledge of N Moroccan vascular plants. *Bocconea* 26:133–43
- Chambouleyron M (2012) Contribution à la connaissance de la flore de la péninsule tingitane (Maroc). *Lagasalia* 32:35–227
- Berdegue M, White KK, Trumble JT (1997) Feeding deterrence of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by low concentrations of linear furanocoumarins. *Environ Entomol* 26:912–9
- Maurich T, Pistelli L, Turchi G (2004) Anti-clastogenic activity of two structurally related Pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa* in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 561:75–81
- Jiménez-González L, Álvarez-Corral M, Muñoz-Dorado M, et al (2008) Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochem Rev* 7:125–54
- Noccioli C, Bertoli A, Agus E, et al (2014) HPLC-DAD-MS analysis and antiviral activity of different extracts and isolated constituents from *Bituminaria bituminosa*. *Chem Nat Comp* 50:726–9
- Benítez G, González-Tejero M, Molero-Mesa J (2010) Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J Ethnopharmacol* 129:87–105
- Rosa A, Deiana M, Corona G, et al (2005) Antioxidant properties of extracts and compounds from *Psoralea morisiana*. *Eur J Lipid Sci Tech* 107:521–9
- Guédé-Guina F, Vangah-Manda M, Harounad D, et al (1996) Potencies of MISCAs a plant source concentrate against fungi. *J Ethnopharmacol* 14:45–53
- Singleton V, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–58
- Benzie I, Strain J (1999) Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay. *Methods Enzymol* 299:15–27
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199–200
- Barros L, Baptista P, Ferreira IC (2007) Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food Chem Toxicol* 45:1731–7
- Prost M (1989) Utilisation de générateur de radicaux libres dans le domaine des dosages biologiques. *French Patent* 2: 526–642
- Gupta VK, Roy A, Nigam VK, et al (2010) Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *J Med Plants Res* 4:1656–61
- Marmonier A (1987) Antibiotiques. Technique de diffusion en gélose méthode des disques. *Bactériologie médicale. Techniques usuelles*. SIMEP SA, Paris, France, pp 237–43
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, et al (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2720–2
- Drummond AJ, Waigh RD (2000) The development of microbiological methods for phytochemical screening. *Recent research developments in phytochemistry*, 4:143–52
- Pecetti L, Tava A, Pagnotta MA, et al (2007) Variation in forage quality and chemical composition among Italian accessions of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. *J Sci Food Agric* 87:985–91
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, et al (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *CR Biol* 331:372–9
- Siddhuraju P, Becker K (2007) The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem* 101:10–9
- Dzoyem JP, McGaw LJ, Eloff JN (2014) In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC Complement Altern Med* 14:147

30. Žugić A, Đorđević S, Arsić I, et al (2014) Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Ind Crops Prod* 52:519–27
31. Yeşilyurt V, Halfon B, Öztürk M, et al (2008) Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. *Food Chem* 108:31–9
32. Prost M, Durand P, Prost E, et al (2002) Test biologique de mesure du potentiel de défense antiradicalaire; application à l'évaluation de l'activité protectrice antiradicalaire de divers extraits de plantes aromatiques. *Acta Botanica Gallica* 149:114–5
33. Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, et al (2008) Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *CR Biol* 331:865–73
34. Azzouzi S, Zaabat N, Medjroubi K, et al (2014) Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* (L.) (Fabaceae). *Asian Pac J Trop Med* 7:S481–S4
35. Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12:564–82
36. Sanogo R, Diallo D, Diarra S, et al (2006) Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Med* 21:18–24