

Criblage phytochimique, évaluation des activités antimicrobiennes et antiradicalaires des extraits de la partie aérienne de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions

Héritier UWIKUNDA SERONDO^{1,2*}, Albert BAHATI MATEGEKO¹, Libérata NIZIGIYIMANA²
et Pius MPIANA TSHIMANKINDA³

¹ Institut Supérieur Pédagogique de Bukavu, Département de Chimie, BP 854 Bukavu, Sud-Kivu, République Démocratique du Congo

² Université du Burundi, Ecole Doctorale, Département de Chimie, BP 1550 Bujumbura, Burundi

³ Université de Kinshasa, Département de Chimie, BP 190 Kinshasa, République Démocratique du Congo

(Reçu le 30 Août 2022; Accepté le 15 Octobre 2022)

* Correspondance, courriel : serondo1084@gmail.com

Résumé

Le présent travail valorise scientifiquement *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae), une plante médicinale congolaise, en la caractérisant par un criblage phytochimique, et en évaluant ses propriétés antimicrobiennes et antiradicalaires. Le criblage phytochimique des extraits de cette plante a mis en évidence la présence des alcaloïdes, des anthraquinones, des coumarines, des flavonoïdes, des glycosides cardiaques, des saponines, des stéroïdes, des tanins et des triterpénoïdes. L'évaluation des propriétés antimicrobiennes de l'extrait à l'éthanol et de ses fractions a été réalisée par la méthode de microdilution et les propriétés antiradicalaires par la méthode du piégeage du radical libre DPPH. L'extrait à l'éthanol a montré une activité antimicrobienne significative contre *S. pneumoniae* TCC461916 avec une CMI de 62,5 µg/mL. L'activité était modérée contre *S. aureus* ATCC43300, *S. aureus* ATCC29213, *S. typhi* isolé, *P. aeruginosa* HM801, *K. Pneumoniae* isolé et *E. coli* ATCC25322. Les souches bactériennes *E. faecalis* ATCC25922, *P. mirabilis* et *P. aeruginosa* QC76110 étaient résistantes à cet extrait puisqu'aucune activité n'a été observée. La fraction au *n*-butanol n'a eu aucun effet contre *E. faecalis* ATCC25922, *P. aeruginosa* QC76110, *S. typhi* isolé et *S. aureus* ATCC29213. Par contre, la fraction au *n*-butanol a montré une activité antimicrobienne significative contre *S. aureus* ATCC43300 et *S. pneumoniae* TCC461916 avec des valeurs de CMIs de 31,25 et 62,5 µg/mL respectivement. *P. aeruginosa* QC76110 était résistante à l'extrait éthanolique et à toutes les fractions. Pour les autres fractions, l'activité antimicrobienne était modérée avec des valeurs de CMIs comprises entre 125 et 500 µg/mL, sauf pour la fraction à l'acétate d'éthyle qui a montré une activité antimicrobienne significative contre *K. Pneumoniae* isolé avec une valeur de CMI de 62,5 µg/mL. Pour l'évaluation des propriétés antiradicalaires, l'extrait à l'éthanol ($CI_{50} = 1,18 \pm 0,03$ µg/mL) et ses fractions au *n*-butanol ($CI_{50} = 1,52 \pm 0,04$ µg/mL) et à l'acétate d'éthyle ($CI_{50} = 1,65 \pm 0,05$ µg/mL) ont présenté un bon pouvoir antioxydant par rapport à la fraction au *n*-hexane ($CI_{50} = 6,4 \pm 0,09$ µg/mL). Les résultats de la présente étude confirment l'usage traditionnel de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et suggèrent que certaines de ses fractions (fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol) possèdent des composés avec des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes qui peuvent être utilisés en tant que agents thérapeutiques dans de nouveaux médicaments.

Mots-clés : *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br., criblage phytochimique, activité antimicrobienne, activité antiradicalaire.

Abstract

Phytochemical screening, evaluation of antimicrobial and free radical scavenging activities of extracts from the aerial part of *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) and its fractions

This work gives the scientific valorization of *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae), a Congolese medicinal plant by characterizing with phytochemical screening, evaluating of the antimicrobial and antiradical properties. The phytochemical screening on the extracts of this plant highlighted the presence of alkaloids, anthraquinones, coumarins, flavonoids, cardiac glycosides, saponins, steroids, tannins and triterpenoids. The antimicrobial properties of the ethanol extract and its fractions were evaluated by the microdilution method and the antiradical properties by the DPPH free radical scavenging method. The ethanol extract showed significant antimicrobial activity against *S. pneumoniae* TCC461916 with an MIC of 62.5 µg/mL. The antimicrobial activity was moderate against *S. aureus* ATCC43300, *S. aureus* ATCC29213, *S. typhi* clinical isolate, *P. aeruginosa* HM801, *K. Pneumoniae* clinical isolate and *E. coli* ATCC25322. The bacterial strains *E. faecalis* ATCC25922, *P. mirabilis* clinical isolate and *P. aeruginosa* QC76110 were resistant to this extract since no activity was observed. The *n*-butanol fraction had no effect on the bacterial strains *E. faecalis* ATCC25922, *P. aeruginosa* QC76110, *S. typhi* clinical isolate and *S. aureus* ATCC29213. This *n*-butanol fraction showed significant antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC43300 and *S. pneumoniae* TCC461916 with MIC values of 31.25 and 62.5 µg/mL respectively. *P. aeruginosa* QC76110 was resistant to the ethanol extract and to all fractions. For the other fractions, the antimicrobial activity was moderate with MIC values between 125 and 500 µg/mL, except for the ethyl acetate fraction, which showed significant antimicrobial activity against *K. Pneumoniae* isolé with a MIC value of 62.5 µg/mL. For the assessment of free radical scavenging activities, the ethanol extract ($IC_{50} = 1.18 \pm 0.03$ µg/mL) and its *n*-butanol ($IC_{50} = 1.52 \pm 0.04$ µg/mL) and ethyl acetate ($IC_{50} = 1.65 \pm 0.05$ µg/mL) fractions exhibited good antioxidant power compared to the *n*-hexane fraction ($IC_{50} = 6.4 \pm 0.09$ µg/mL). The results of the present study confirm the traditional use of *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. and suggest that some of its fractions (ethyl acetate and *n*-butanol fractions) possess compounds with antimicrobial and antioxidant properties that can be used as therapeutic agents in new drugs.

Keywords : *Leucas martinicensis*, phytochemical screening, antimicrobial activity, antiradical activity.

1. Introduction

Pour se soigner, l'Homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes administrés par frictions, inhalations, cataplasmes, massages ou encore par voie orale [1]. On estime qu'environ 80 % de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire, soit par choix ou à cause de l'inaccessibilité ou de la non disponibilité de la médecine moderne [2]. Les médicaments à base de plantes restent donc largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international [3]. Dans la pharmacopée traditionnelle africaine, les plantes de la famille des Lamiaceae sont utilisées comme diurétiques, antisyphilitiques, antidiarrhéiques, cicatrisantes, antiseptiques et dans le traitement de nombreuses affections telles que les problèmes intestinaux ou encore le météorisme (ballonnement du ventre dû à des gaz) [4]. *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. est utilisé dans la médecine traditionnelle congolaise pour traiter les maladies d'origine bactérienne et celles dues au stress oxydatif. Parmi ces maladies, on peut citer: l'asthme, la dysenterie, le panaris, les plaies infectées, les inflammations, la tuberculose, les mycoses, l'anorexie, les furoncles, la diarrhée, l'épilepsie, la malaria cérébrale, les troubles nerveux et hépatiques, les vers intestinaux, les morsures de serpent, les intoxications

alimentaires et les rougeurs cutanées [5]. Ainsi, vue les phénomènes de résistance microbiennes qui cause environ 700000 morts chaque année dans le monde [6], nous scrutons les extraits/fractions majeures issues de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. à la recherche des extraits/fractions qui seraient doués des propriétés antimicrobiennes et/ou antioxydantes. L'objectif de notre travail est de collecter et préparer les extraits/fractions de la partie aérienne de la plante *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. afin d'évaluer leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Les souches microbiennes utilisées sont *Enterococcus faecalis* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC25322, *Klebsiella Pneumoniae* isolé, *Proteus mirabilis* isolé, *Pseudomonas aeruginosa* HM801, *Pseudomonas aeruginosa* QC76110, *Salmonella typhi* isolé, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus aureus* ATCC43300 et *Streptococcus pneumoniae* ATCC461916.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

La partie aérienne de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (**Photo 1**) a été récoltée en Novembre 2020 dans le territoire de Kabare, Province du Sud-Kivu, à l'Est de la République Démocratique du Congo dans la région de Lwiro. Cette région est couverte d'un sol volcanique et est formée par l'alternance des collines et des vallées qui bénéficient d'un climat tropical humide. Ce climat comprend une longue saison de pluie de 9 mois (septembre à mai) et une courte saison sèche de 3 mois (juin - août). La température annuelle moyenne de l'air est de 19,5 °C et l'humidité relative varie entre 68 % et 75 % offrant un climat favorable à une diversité agricole [7]. Après identification de cette plante au sein de l'Herbarium du Centre de Recherche en Sciences Naturelles de Lwiro (CRSN/Lwiro), ses parties aériennes ont été découpées, séchées à température ambiante puis broyées pour l'obtention de poudre végétale. La poudre a été conservée dans un sachet bien fermé sous une température ambiante pour les analyses ultérieures.



Photo 1 : Partie aérienne de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae)

2-2. Préparation des extraits

La préparation des extraits de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. a été faite par macération en utilisant différents solvants (eau, éthanol, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-hexane) pendant 24 heures. Après

filtration, les différents filtrats ont été conservés dans des flacons étiquetés pour les tests phytochimiques afin de mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires. La concentration des extraits a été faite sur un ratavapeur à pression réduite en cas de besoin. Une partie de l'extrait éthanolique a été prélevée pour la partition. La partition a été effectuée dans une petite ampoule à décanter en utilisant du *n*-hexane, de l'acétate d'éthyle et du *n*-butanol. L'extrait à l'éthanol a été dissous dans l'eau distillée avant la partition.

2-2-1. Extrait aqueux

Une quantité de 12 g de poudre de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. a été dissout dans 200 mL d'eau distillée, macérée à froid pendant 24 heures puis filtrée. Le filtrat obtenu a été conservé dans un flacon étiqueté.

2-2-2. Extrait à l'éthanol

Une quantité de 12 g de la poudre de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. ont été dissouts dans 200 mL d'éthanol puis on les laisse macérer pendant 24 h. Après filtration, le filtrat a été conservé dans un flacon étiqueté.

2-2-3. Extrait au dichlorométhane

Une quantité de 12 g de poudre de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. ont été dissouts dans 200 mL de dichlorométhane, macérée pendant 24 heures puis filtrée. Après filtration, le filtrat a été conservé dans un flacon étiqueté.

2-2-4. Extrait à l'acétate d'éthyle

Une quantité de 12 g de poudre de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. ont été dissouts dans 200 mL d'acétate d'éthyle, macérée pendant 24 heures puis filtrée. Après filtration, le filtrat a été conservé dans un flacon étiqueté.

2-2-5. Extrait au *n*-hexane

Une quantité de 12 g de poudre de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. ont été dissouts dans 200 mL de *n*-hexane, macérée pendant 24 heures puis filtrée. Après filtration, le filtrat a été conservé dans un flacon étiqueté.

2-3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique a été fait pour mettre en évidence la présence ou l'absence des grandes classes des métabolites secondaires dans les différents extraits du *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. Les méthodes utilisées sont celles décrites par [3, 8 - 11] avec quelques adaptations en fonction des conditions de travail dans notre laboratoire.

2-3-1. Recherche des alcaloïdes

Un volume de 5 mL d'acide chlorhydrique (1 %) a été ajouté à 1 mL de chaque extrait. Le mélange a été incubé au bain-marie pendant 10 minutes et la solution obtenue a été divisée en deux parties dans deux tubes à essai distincts. Le réactif de Mayer a été ajouté à la première et le réactif de Wagner à la seconde. L'apparition d'un précipité blanc ou brun indique la présence des alcaloïdes.

2-3-2. Recherche de flavonoïdes

Réaction au magnésium (Mg): La détection des flavonoïdes a été réalisée en ajoutant à 1 mL d'extrait, 1 mL d'acide chlorhydrique concentré et trois copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge, orange ou rose indiquait la présence de ces derniers.

2-3-2-1. Recherche de tannins

Réaction de Stiasny: En présence du réactif de Stiasny, les tanins condensés précipitent. 0,2 g d'extrait sec a été ajouté à 3 mL d'acétate d'ammonium (5 M). Dans la solution, 3 à 4 gouttes de solution de FeCl_3 (2 %) ont été ajoutés. Une coloration noir bleuté confirmait la présence de tanins galliques. *Réaction de Bate-Smith :* 0,2 g d'extrait sec a été introduit dans un tube à essai puis 1 mL d'acide chlorhydrique a été ajouté. Après homogénéisation, le mélange a été porté à ébullition pendant 5 minutes. L'apparition d'une couleur rouge-brique indiquait la présence de tannins catéchiques.

2-3-2-2. Recherche des stéroïdes

Un volume de 2 mL d'anhydride acétique a été ajouté à 2 mL de chaque extrait suivi d'un ajout de 2 mL d'acide sulfurique concentré. Après homogénéisation, le passage d'une coloration violette au bleue indiquait la présence de stéroïdes.

2-3-2-3. Recherche des triterpénoïdes

A un volume de 3 mL de chaque extrait était ajouté à 2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique concentré pour former une monocouche de coloration rouge-brun à l'interface (eau-chloroforme) indiquant la présence des triterpénoïdes.

2-3-2-4. Recherche des saponines

Dans 3 tubes à essai marqués de A à C; 2, 4 et 6 mL de la solution à analyser ont été introduits dans ces tubes respectivement. Les volumes ont été ajustés à 10 mL dans chaque tube à essai par ajout d'eau distillée. Chaque tube à essai a été secoué dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de 2 secousses par seconde. Après un repos de 15 minutes, la hauteur de la mousse produite dans chaque tube a été mesurée. Une hauteur de mousse d'au moins un centimètre indiquait la présence de saponines.

2-3-2-5. Recherche des anthraquinones

A un volume de 2 mL de chaque extrait, nous avons ajouté quelques gouttes de NaOH 0,1 N. La présence des anthraquinones a été confirmée par l'apparition d'une coloration jaune, rouge ou violet de la solution.

2-3-2-6. Recherche des coumarines

Dans une capsule, 5 mL d'extrait de chaque extrait a été évaporé, puis 2 mL d'eau chaude a été ajoutée au résidu. Après homogénéisation, la solution a été partagée entre 2 tubes à essai. Au contenu de l'un des tubes, 0,5 ml de NH_4OH à 25 % a été ajouté. La fluorescence a été observée sous U.V à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube indiquait la présence de coumarines. L'autre tube a servi de témoin négatif (aucune fluorescence observée sous l'U.V à 366 nm).

2-3-2-7. Recherche de glucosides cardiaques

Un volume de 2 mL de chloroforme a été ajouté à 1 mL de chaque extrait, l'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentrée indiquait la présence des glycosides cardiaques.

2-4. Évaluation des propriétés antimicrobiennes

Les propriétés antimicrobiennes ont été évaluées par la méthode de microdilution en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) décrite par Eloff [12] avec quelques modifications apportées par Kuete et ses collaborateurs [13]. L'activité antimicrobienne de l'extrait à l'éthanol et de ses fractions a été évalué sur les souches bactériennes: *Enterococcus faecalis* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC25322, *Klebsiella Pneumoniae* isolé, *Proteus mirabilis* isolé, *Pseudomonas aeruginosa* HM801, *Pseudomonas aeruginosa* QC76110, *Salmonella typhi* isolé, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus aureus* ATCC43300 et *Streptococcus pneumoniae* ATCC461916. La Ciprofloxacine (CIP) et la gentamycine (GEN) ont été utilisées comme antibiotique de référence. Un volume de 100 µL de milieu de culture MHB (Muller Hinton Broth) a été introduit dans chaque puits (96 puits) de microplaques suivies de l'ajout d'un volume de 100 µL de solution mère des extraits ou des produits concentrés à 4096 µg/mL dans les premiers puits de chaque colonne. Les dilutions successives en série à raison de 2 ont été effectuées suivies de l'introduction dans chaque puits d'un volume de 100 µL d'inoculum bactérien pour un volume final de 200 µL par puits. Les concentrations des extraits et des produits variaient de 2 à 2048 µg /mL. Les plaques ont ensuite été scellées à l'aide du papier parafilm et incubées à 37 °C pour une durée de 18 à 24 heures. Les témoins étaient constitués des puits contenant exclusivement le MHB pour le contrôle neutre, le MHB et l'inoculum en plus du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 2,5 % pour le témoin négatif et d'un antibiotique de référence (ciprofloxacine) pour le témoin positif dont la gamme des concentrations variait de 2 µg/mL à 256 µg /mL. Après incubation, la révélation de la croissance bactérienne a été faite par un test de colorimétrie rapide. L'introduction de 40 µL du chlorure de para-iodonitrotétrazolium (INT) à 0,2 % et à 30 minutes de réincubation environ, l'INT se réduit et rosit le milieu en présence de bactéries viables. La CMI a été définie comme la plus petite des concentrations minimales pour lesquelles l'on n'observait pas de croissance bactérienne (absence de la coloration rose dans les puits). Les tests ont été réalisés en triplet (répétés trois fois).

2-5. Évaluation de l'effet de piégeage des radicaux DPPH

La méthode utilisée est le piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Ce radical (DPPH) a été l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure/activité antioxydante des composés phénoliques. Depuis lors, certaines modifications ont été apportées et un paramètre important a été introduit : la CI_{50} définie comme la concentration du substrat entraînant une diminution de 50 % de l'absorption. À cette concentration, 50 % du DPPH se trouve sous sa forme réduite [14]. Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH de couleur violette en un composé jaune, la 2,2-diphénylpicryl-1-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel [15]. Une gamme de concentrations (0,5-8 mg/mL) d'extrait d'éthanol et de fractions de *n*-hexane, d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol et d'acide ascorbique (antioxydant de référence) a été préparée dans du méthanol distillé. Le DPPH a été préparé à une concentration de 100 µM. Après homogénéisation, le mélange a été incubé à température ambiante (25 °C) dans l'obscurité. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 517 nm contre un blanc. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculés à partir de l'Équation 1 ci-dessous :

$$P.I = \frac{Ab-As}{Ab} \times 100 \tag{1}$$

où, P.I : Pourcentage d'inhibition (%), Ab : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs sauf l'extrait testé), As : Absorbance de l'échantillon testé (extrait).

Les CI₅₀, qui sont des concentrations d'extrait/fractions ou de l'acide ascorbique (contrôle positif) responsables de l'inhibition de 50 % des radicaux DPPH, ont été déterminés à l'aide de la **Figure 1** représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait/fraction et de l'acide ascorbique.

3. Résultats

3-1. Résultats du screening phytochimique

Les résultats obtenus lors du screening phytochimique des différents extraits de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. sont présentés dans le **Tableau 1** ci-dessous.

Tableau 1 : Métabolites secondaires identifiés dans différents extraits de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br (Lamiaceae)

Classes de composés	Extrait à l'éthanol	Extrait au DCM	Extrait à l'AcOEt	Extrait au n-Hexane	Extrait aqueux
Alcaloïdes	+	-	-	-	+
Anthraquinones	+	-	-	+	-
Coumarines	+	-	+	+	+
Flavonoïdes	+	-	+	+	+
Glycosides cardiaques	-	+	-	-	+
Saponines	+	+	-	-	+
Stéroïdes	+	-	-	+	-
Tannins catéchiques	+	-	-	-	+
Tannins galliques	+	+	+	-	+
Triterpénoïdes	+	-	+	+	-

+ : Présence des métabolites secondaires; - : Absence des métabolites secondaires, AcOEt: Acétate d'éthyle, DCM: Dichlorométhane.

3-2. Résultats de l'évaluation des propriétés antimicrobiennes

Les résultats obtenus lors des tests d'évaluation des propriétés antimicrobiennes exprimés par les CMI (en µg/mL) sont présentés dans le **Tableau 2** ci-dessous :

Tableau 2 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI en $\mu\text{g/mL}$) de l'extrait à l'éthanol de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions

Souches bactériennes	Échantillons						
	EE	FH	FA	FB	FW	CIP	GEN
<i>E. faecalis</i> ATCC25922	-	500	1000	-	-	-	0,125
<i>E. coli</i> ATCC25322	250	125	500	1000	125	0,250	0,015
<i>K. Pneumoniae</i> isolé	250	1000	62,5	1000	100	0,125	0,250
<i>P. mirabilis</i> isolé	-	500	-	500	500	0,250	0,125
<i>P. aeruginosa</i> HM801	125	250	250	500	500	0,125	0,125
<i>P. aeruginosa</i> QC76110	-	-	-	-	-	-	0,015
<i>S. typhi</i> isolé	250	500	100	-	1000	-	0,062
<i>S. aureus</i> ATCC29213	500	-	500	-	500	0,125	0,031
<i>S. aureus</i> ATCC43300	250	500	250	31,25	250	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> TCC461916	62,5	250	125	62,5	125	0,125	0,062

EE : Extrait à l'éthanol, FH : Fraction au n-hexane, FA : Fraction à l'acétate d'éthyle, FB : Fraction au n-butanol, CIP : Ciprofloxacine (antibiotique de référence), GEN : gentamycine (antibiotique de référence).

3-3. Résultats de l'évaluation de l'effet de piégeage du radical DPPH

Les résultats obtenus lors des tests d'évaluation de l'activité antiradicalaire exprimés en pourcentage d'inhibition de l'extrait à l'éthanol de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions comparés à l'antioxydant de référence (acide ascorbique) sont présentés sur la **Figure 1** ci-dessous :

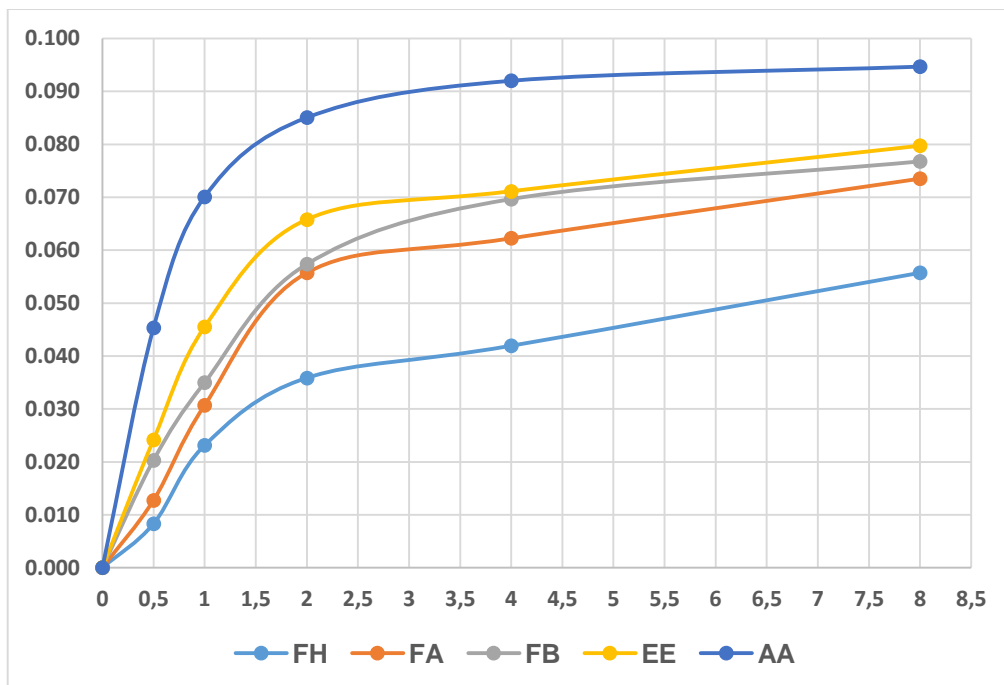


Figure 1 : Pourcentages d'inhibition de l'extrait à l'éthanol de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions en fonction de la concentration (mg/mL)

EE : Extrait à l'éthanol, FH : Fraction au n-hexane, FA : Fraction à l'acétate d'éthyle, FB : Fraction au n-butanol, AA : Acide ascorbique (antioxydant de référence).

De la **Figure 1**, les CI_{50} de l'extrait à l'éthanol de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions ont été déterminées. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3** suivant:

Tableau 3 : Valeurs de CI_{50} de l'extrait à l'éthanol de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions

Échantillons	Valeurs des CI_{50} (mg/mL)
Acide ascorbique (Contrôle positif)	0,61 ± 0,05
Extrait à l'éthanol	1,18 ± 0,03
Fraction au <i>n</i> -butanol	1,52 ± 0,04
Fraction à l'acétate d'éthyle	1,65 ± 0,05
Fraction au <i>n</i> -hexane	6,4 ± 0,09

4. Discussion

4-1. Screening phytochimique

L'activité d'un extrait végétal dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels figure la concentration en principes actifs [16]. Le screening phytochimique a révélé la présence des alcaloïdes, anthraquinones, coumarines, flavonoïdes, saponines, stéroïdes, triterpénoïdes, glycosides cardiaques et tanins. Nos résultats sont conformes à ceux de Muhammad et de ses collaborateurs [17], qui n'a utilisé que deux extraits, à savoir: extraits au méthanol et au chloroforme. Par contre, on constate qu'il y absence d'autres familles chimiques. Ceci peut être expliqué par une différence au niveau de plusieurs paramètres soit géographiques, physicochimiques ou biologiques tels que: la différence du site de récolte y compris l'environnement de la plante, la lumière, les précipitations, la topographie, la saison, type de sols, période de récolte, le patrimoine génétique, la procédure d'extraction utilisée, la partie de la plante étudiée ou leurs produits phytochimiques [18 - 20]. Parmi ces composés révélés par le screening phytochimique, nombreux sont reconnus pour leurs effets antibactériens. Les alcaloïdes jouent un rôle important dans les structures biologiques et apparaissent comme des puissants anticholinergiques [21, 22]. Les alcaloïdes ont une activité directe sur le corps, réduisant les spasmes et soulageant la douleur [23]. Leur présence dans la plante *Leucas martinicensis* (Jacq.) R.Br pourrait expliquer son utilisation dans le traitement des troubles nerveux, rhume et toux. Les tanins sont reconnus pour le traitement des maladies de la peau, morsures, et des diarrhées [24]. Leur présence dans *Leucas martinicensis* (Jacq.) R.Br justifierait l'utilisation de cette dernière dans le traitement des morsures des serpents et des diarrhées. Nombreux travaux ont montré que les flavonoïdes, les coumarines, les saponines, les stéroïdes et les triterpènes révélés par le screening phytochimique sont dotés d'un pouvoir anti-inflammatoire [25]. Leur présence dans *Leucas martinicensis* (Jacq.) R.Br justifierait son utilisation pour le traitement du rhume, du panaris et des furoncles. Quant aux résultats négatifs observés dans les différents extraits, cela serait dû à l'affinité entre les composés et les différents solvants. En effet, pour les composés polaires, il faut des solvants polaires ou moyennement polaires pour les extraire du matériel végétal. Les composés apolaires sont extraits du matériel végétal par des solvants apolaires ou moyennement polaires [26].

4-2. Évaluation des propriétés antimicrobiennes

Les extraits bruts à l'éthanol (EE), les fractions à l'hexane (FH), à l'acétate d'éthyle (FA), au *n*-butanol (FB) et aqueux (FW) des parties aériennes de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. ont été évalués *in vitro* pour leurs activités antimicrobiennes contre les souches bactériennes suivantes: *Enterococcus faecalis* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC25322, *Klebsiella Pneumoniae* isolé, *Proteus mirabilis* isolé, *Pseudomonas aeruginosa*

HM801, *Pseudomonas aeruginosa* QC76110, *Salmonella typhi* isolé, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Streptococcus pneumoniae* ATCC461916 par la méthode de microdilution. La ciprofloxacine (CIP) et la gentamycine (GEN) ont été utilisées comme antibiotiques de référence. Les résultats des activités antimicrobiennes trouvés ont été classés selon l'échelle de classification des activités des extraits des plantes en fonction de leurs valeurs de CMI établie par Kuete [13]. Selon cette classification, l'activité d'un extrait est significative quand la CMI est inférieure à 100 µg/mL; elle est modérée lorsque $100 < \text{CMI} \leq 625$ µg/mL et elle est faible lorsque la CMI est supérieure à 625 µg/mL. Ainsi, en comparant les CMI de l'extrait à l'éthanol et de ses différentes fractions, nous remarquons que l'extrait à l'éthanol a montré une activité antimicrobienne significative contre *S. pneumoniae* TCC461916 avec une CMI de 62.5 µg/mL. L'activité a été modérée contre *S. aureus* ATCC43300, *S. aureus* ATCC29213, *S. typhi* isolé, *P. aeruginosa* HM801, *K. Pneumoniae* isolé et *E. coli* ATCC25322. Les souches bactériennes *E. faecalis* ATCC25922, *P. mirabilis* isolé et *P. aeruginosa* QC76110 ont été résistantes à cet extrait car aucune activité n'a été observée. Pour les fractions, les activités antimicrobiennes trouvées étaient significatives et/ou modérées sauf pour la fraction au *n*-butanol. En effet, cette fraction n'a eu aucun effet sur les souches bactériennes *E. faecalis* ATCC25922, *P. aeruginosa* QC76110, *S. typhi* isolé et *S. aureus* ATCC29213. Quant à la souche bactérienne *P. aeruginosa* QC76110, elle a été résistante à l'extrait à l'éthanol et à toutes les fractions. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres chercheurs [27, 28] dans lesquels plusieurs plantes du genre *Leucas* se sont avérées être potentiellement antimicrobiennes, parmi lesquelles nous pouvons citer : *Leucas indica*, *Leucas aspera*, *Leucas mollissima*, *Leucas lavandulifolia*.

4-3. Évaluation de l'activité antiradicalaire

Il ressort de l'analyse de la **Figure 1** que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration conformément aux travaux de Salem [30]. Le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique ($\text{CI}_{50} = 0,61 \pm 0,04$ µg/mL) est nettement supérieur à celui de l'extrait à l'éthanol ($\text{CI}_{50} = 1,18 \pm 0,03$ µg/mL) et de ses fractions au *n*-butanol ($\text{CI}_{50} = 1,52 \pm 0,04$ µg/mL), à l'acétate d'éthyle ($\text{CI}_{50} = 1,65 \pm 0,05$ µg/mL) et au *n*-hexane ($\text{CI}_{50} = 6,4 \pm 0,09$ µg/mL). Cette différence serait due au fait que l'acide ascorbique est un antioxydant de synthèse contrairement à l'extrait à l'éthanol et de ses fractions qui sont encore des mélanges des plusieurs composés bioactifs qu'il faut encore purifier. Plus la valeur de la CI_{50} est faible, plus le pouvoir antioxydant de l'extrait/fractions est fort [31]. Ainsi, comparativement aux valeurs des CI_{50} , les fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol ont montré un bon pouvoir antioxydant par rapport à la fraction au *n*-hexane. En effet, plusieurs auteurs ont montré que les polyphénols, les tanins, les coumarines, les flavonoïdes, les quinones confèrent les propriétés antioxydantes aux extraits des plantes [32 - 36]. L'extrait à l'éthanol ($\text{CI}_{50} = 1,18 \pm 0,03$ µg/mL) a montré une forte activité antioxydante, ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans la plante *Leucas aspera* (Lamiaceae) [37]. Cette activité antioxydante est due à la composition chimique de l'extrait à l'éthanol riche en polyphénols conformément aux résultats présentés dans la **Tableau 1**. Lors de la partition, ces composés polyphénoliques se sont retrouvés concentrer dans les fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol ce qui expliquerait les valeurs faibles de CI_{50} de ces deux fractions comparativement à la fraction au *n*-hexane. L'extrait à l'éthanol de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et certaines de ces fractions (fractions au *n*-butanol et à l'acétate d'éthyle) pourraient donc constituer une alternative à certains additifs synthétiques et intervenir dans la prévention contre diverses maladies induites par le stress oxydant et accélérer leur guérison.

5. Conclusion

Dans le but de trouver de nouvelles sources d'antimicrobiens et d'antioxydants naturels, nous nous sommes intéressés au screening phytochimique et à l'évaluation des propriétés antimicrobiennes et antiradicalaires des différents extraits de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae). Ainsi, le screening phytochimique de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) a révélé un grand nombre des métabolites secondaires comme les triterpénoïdes, les flavonoïdes, les coumarines, les tanins, qui sont des métabolites secondaires dotés des diverses propriétés biologiques. L'extrait à l'éthanol et les différentes fractions utilisées ont présenté une activité antimicrobienne encourageante sauf la souche microbienne *P. aeruginosa* QC76110 qui a été résistante à l'extrait éthanolique et à toutes les fractions. Les tests antiradicalaires de l'extrait à l'éthanol de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et de ses fractions ont été effectués par la méthode du piégeage du radical libre DPPH. L'extrait à l'éthanol et ses différentes fractions ont présenté une bonne activité antiradicalaire à l'exception de la fraction au *n*-hexane ($CI_{50} = 6,4 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$) qui a présenté une activité antiradicalaire faible. Les propriétés antimicrobiennes et antiradicalaires de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) observées sont dues à sa richesse en diverses classes des métabolites secondaires ayant des effets antimicrobiens et antioxydants. Les résultats de la présente étude confirment l'usage traditionnel de *Leucas martinicensis* (Jack.) R.Br. (Lamiaceae) et suggèrent que certaines de ses fractions (fractions à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol) possèdent des composés avec des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes qui peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens et antioxydants dans de nouveaux médicaments. Les fractions les plus actifs peuvent être soumis à une isolation des antimicrobiens et antioxydants thérapeutiques et procéder à d'autres évaluations pharmacologiques.

Remerciements

Les auteurs remercient le Laboratoire de Chimie de L'Institut Supérieur pédagogique de Bukavu pour la facilitation de screening phytochimique, le Laboratoire de de Pharmaco-Chimie des Substances Naturelles (LPSN) de l'Université de Yaoundé I/Cameroun pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire et les Laboratoires du projet Yaoundé - Bielefeld Bilateral Graduate School Natural Products with Antiparasite and Antibacterial Activity (YaBiNaPA) pour l'évaluation des propriétés antimicrobiennes.

Références

- [1] - N. CHAACHOUAY, Etude floristique et ethnomédicinale des plantes aromatiques et médicinales dans le Rif (Nord du Maroc). Thèse de Doctorat, Université Ibn Tofail, Maroc, (2020), 254 p.
- [2] - A. KHADHRI, Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera*. *Revue Tunisienne de Sciences Sociales et Naturelles*, 39 (2013), 44 - 52
- [3] - E. H. HAMID, B. MONCEF, B. ASSIA, T. HIND, B. RACHID, Screening phytochimique d'une plante médicinale : *Mentha Spicata* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 7 (2018), 226 - 233
- [4] - F. NAGHIBI, M. MOSADDEGH, M. S. MOHAMMADI, A. GHORBANI, Labiatae family in folk medicine in Iran : from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2 (2005), 63 - 79
- [5] - H. U. SERONDO. Etude des constituants chimiques et évaluation des propriétés antimicrobiennes d'une plante médicinale au Sud-Kivu (RDC) : *Leucas martinicensis* (Lamiaceae), Mémoire de Master, Université Dschang, Cameroun, (2020), 63 p.

- [6] - J. O'NEILL, Antimicrobial resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, 10 (2016), 1 - 84
- [7] - A. M. BISUSA, B. E. OMBENI, B.W. CHISHIBANJI, M. B. MASUNGA, Infestation par les tiques des prairies naturelles dans les groupements de Bugorhe et Irhambi-Katana en province du Sud-Kivu, en République Démocratique du Congo. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9 (2014), 1966 - 1980
- [8] - R. A. HETTY-MANURUNG, R. A. NUGROHO, Y. PUSPITA-SARI, R. CHERNOVITA, A. AULIANA, Phytochemical analysis and antioxidant activity of leaves extracts of endemic plant Jahe balikpapan (Etingera balikpapanensis A.D. Poulsen). *International Journal of Scientific and Technology Research*, 8 (2019), 2132 - 2139
- [9] - A. HASSAN, Z. AKMAL, N. KHAN, The phytochemical screening and antioxidants potential of *Schoenoplectus triquetra* L. Palla. *Hindawi Journal of Chemistry*, 20 (2020), 1 - 8
- [10] - O. HOUTA, H. CHOUAEB, M. NEFFATI, H. AMRI, Criblage chimique préliminaire des protéines et caroténoïdes présents dans un *Crithmum maritimum* cultivé en Tunisie. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 1 (2012), 77 - 82
- [11] - S. K. MANOHARAN, D. S. K. SIVAGNANAM, R. R. M. KRISHNA, S. ANBUSELVI, Preliminary phytochemical analysis of *Dodonaea viscosa* leaves. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3 (2013), 43 - 46
- [12] - J. N. ELOFF, A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64 (1998), 711 - 713
- [13] - V. KUETE, Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Medica*, 76 (2010), 1479 - 1491
- [14] - W. BRAND-WILLIAMS, M. E. CUVELIER, C. L. BERSET, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and technology*, 28 (1995), 25 - 30
- [15] - C. SANCHEZ-MORENO, Review : Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (2002), 121 - 137
- [16] - J. THANGARA, O. ADJEI, B. ALLEN, F. PORTAELS, In *Vivo* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 45 (2000), 231 - 233
- [17] - S. MUHAMMAD, A. FATIMA, M. YAHAYA, The phytochemical components of *Leucas Martinicensis* that cause Repellence of Adult Mosquito. *International journal of Modern Botany*, 2 (2012), 1 - 5
- [18] - F. MALIK, S. HUSSAIN, A. SADIQ, G. PARVEEN, A. WAJID, S. SHAFAT, R. A. CHANNA, R. MAHMOOD, H. RIAZ, M. ISMAIL, F. R. YASIN. Phytochemical analysis, anti-allergic and antiinflammatory activity of *Mentha arvensis* in animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (2012), 613 - 619
- [19] - P. SUJANA, T. M. SRIDHAR, P. JOSTHNA, C. NAIDU, Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Mentha piperita* L. An important multipurpose medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences*, 4 (2013), 77 - 83
- [20] - N. AKHTAR, H. IHSAN, M. BUSHRA, Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*, 32 (2015), 756 - 760
- [21] - F. SCAZZOCCHIO, M. F. COMETA, L. TOMASSINI, M. PALMERY, Antibacterial activity of *Hydrastis Canadensis* extract and its major isolated alkaloids. *Planta medica*, 67 (2001), 561 - 564
- [22] - Y. YUMEI, L. XING, Z. CHUNHONG, L. LIJUAN, G. BING, L. MINHUI, Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids : A review. *MDPI Antibiotics*, 10 (2021), 318 - 348
- [23] - E. P. JACQUES, Les alcaloïdes In Dictionnaire de la botanique, Encyclopaedai universalis. Editions Albin, Paris, France, (2000), 326 p.

- [24] - J. BRUNETON, Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 4ème édition. Paris, Lavoisier Tech. & Doc, (2009) 915 p.
- [25] - K. GHEDIRA, Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois thérapeutiques. *Phytothérapie*, 4 (2005), 162 - 169
- [26] - A. TADEUSZ, Alkaloids-secrets of life : Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. *1st Edition Elsevier Science*; (2007), 334p.
- [27] - C. KU, S. CHEN, J. WANG, J. WU, S. KUO, Studies on anti-inflammatory constituents of *Leucas mollissima* WALL. var. *Chinensis* Benth. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 52 (2000), 261 - 273
- [28] - K. CHANDRASHEKAR, I. MAKHIJA, L. RICHARD, Phytochemical and pharmacological profile of *Leucas lavandulifolia* : A review. *Research journal of medicinal plant*, 5 (2011), 500 - 507
- [29] - B. NEELESH, C. AKASH, S. AJEET, S. RAMVEER, A. NAVNEET. Therapeutic potential and pharmacological properties of *Leucas indica*: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 7 (2018), 564 - 568
- [30] - N. SALEM, A. MANSOUR, M. CIUFFO, B. FALK, M. TURIN. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of virology*, 161 (2016), 503 - 506
- [31] - B. KOUADIO, C. DJENEB, K. YAO, N. GUEDE. Potentiel antiradicalaire des extraits de feuilles de *Bersama abyssinica* Fresen (melianthaceae). *Journal of Biochemistry Sciences*, 11 (2007), 2962 - 2970
- [32] - L. B. IGOR-PASSI. Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxylodes* Lam. (Rutaceae). *Thèse de doctorat*, Université de Bamako, Bamako, Mali, (2002), 133 p.
- [33] - J. YU, L. WANG, R. L. WALZEM, E. G. MILLER, L. M. PIKE, B. PATIL, J. AGRIC, Antioxidant activity of *Citrus Limonoids*, flavonoids, and coumarins. *Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005), 2009 - 2014
- [34] - Y. Z. CAI, M. SUN, J. XING, Q. LUO, H. CORKE. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78 (2006), 2872 - 2888
- [35] - H. B. LI, K. W. CHENG, C. C. WONG, K. W. FAN, F. CHEN, Y. JIANG. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102 (2007), 771 - 776
- [36] - N. BOUGANDOURA, N. BENDIMERAD, Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Revue « Nature & Technologie » B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, 9 (2013), 14 - 19
- [37] - M. RAHMAN, Antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of the phytochemicals of whole *Leucas aspera* extract. *Asian pacific journal of Tropical Biomedecine*, 3 (2007), 273