

## Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*

Manuscrit reçu le 3 janvier 2016 et accepté le 18 août 2016

### Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*

Farah HADDOUCHI<sup>1</sup>, Khadidja ZERHOUNI<sup>2</sup>, Adel SIDI-YEKHELEF<sup>3</sup> et

Tarik Mohammed CHAOUCHE<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de produits naturels, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, 13000, Algérie.

<sup>2</sup> Laboratoire de microbiologie moléculaire et protéomique et santé, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbes, 22000, Algérie.

<sup>3</sup> Laboratoire de la population et développement durable en Algérie, Département de démographie, Faculté des Sciences Humaines et Sociales, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, 13000, Algérie.

### Résumé

Les plantes médicinales constituent une source riche et diversifiée de métabolites secondaires, qui ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux. Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux antimicrobiens naturels à partir d'une plante de la région de Tlemcen. Il s'agit des fleurs et des tiges feuillées d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. Les extractions successives, par des solvants de polarités croissantes (hexane, dichlorométhane, méthanol et aqueux), ont abouti à des rendements en extraits méthanoliques et aqueux beaucoup plus importants par rapport aux solvants de faible polarité. Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne, réalisée par la méthode des disques et celle des dilutions sur milieu liquide, montrent que quelques extraits, à l'exception des extraits aqueux, sont doués d'une activité antibactérienne modérée. Les souches les plus sensibles sont *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*, avec des diamètres compris entre 11 et 13 mm. Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont montré un large éventail de valeurs (jusqu'à 25 mg/ml) en comparaison avec les zones d'inhibition (13 mm). Les extraits des deux plantes n'ont montré aucune activité antifongique.

**Mots clés:** *Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre*, polarité, activité antimicrobienne, CMI

---

\* Adresse électronique pour la correspondance : [tarik.chaouche@mail.univ-tlemcen.dz](mailto:tarik.chaouche@mail.univ-tlemcen.dz)

## Abstract

Medicinal plants are a rich and diverse source of secondary metabolites, which have a commercial application in the pharmaceutical and biomedical industry. Our work is part of the search for new natural antimicrobial from parts of a plant in the region of Tlemcen. These are flowers and leafy stems of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. Results of the successive extractions with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, methanol and aqueous), show that the yields of methanolic and aqueous extracts are much larger compared to those of low polarity solvents. The results of the study of the antimicrobial activity, carried out by the disc method and the dilutions in liquid medium show that some extracts, with the exception of aqueous extracts, are endowed with a moderate antibacterial activity. The most sensitive strains are *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Escherichia coli*, with diameters of 11 and 13 mm. Minimal inhibitory concentration (MIC) values show a wide range of values (up to 25 mg/ml) compared with the zones of inhibition (13 mm). The extracts of the two plants showed no antifungal activity.

**Keywords:** *Helichrysum stoecha* subsp. *Rupestre*, polarity, antimicrobial activity, MIC.

## 1. Introduction

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Elles constituent une source importante de molécules bioactives qui font généralement partie des métabolites secondaires [1]. Face à l'apparition de formes résistantes de plusieurs bactéries à certains antibiotiques, la recherche de nouvelles molécules actives et à large spectre d'action est devenue une nécessité [2]. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle [3].

Le choix est porté sur une plante médicinale *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* caractérisée par des capitules en corymbe peu nombreux. Feuilles tomenteuses en-dessus (bien que vertes), très blanches en-dessous. Bractées de l'involucre aiguës, les intérieurs linéaires à partie coriace couverte de glandes dorées [4].

Cette plante contient des terpènes, des huiles essentielles, des flavonoïdes [5], des acides phénoliques, des coumarines et des micronutriments (Cu, Mn, Zn) [6-7].

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne des fleurs et des tiges feuillées d' *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* extrait avec plusieurs solvants de polarité croissante et la détermination de la concentration minimale inhibitrice des souches qui ont montré une certaine sensibilité.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* a été récoltée en mois de mars 2013 (période de floraison). Dans la région de Honâine à environ 44 km au Nord-Ouest de Tlemcen (Algérie). Après séchage à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, les fleurs et les tiges feuillées de cette espèce ont été séparées et broyées grossièrement dans un moulin électrique.

### 2.2. Extraction par des solvants organiques à polarité croissante

L'extraction est effectuée par épauvements successifs du matériel végétal par un extracteur Soxhlet sous agitation continue durant 24 heures, en utilisant quatre solvants à polarité croissante : hexane (Hx), dichlorométhane (D), méthanol (M) et eau (A). La méthode a été décrite par Chaouche *et al.* [8]. Cette technique est retenue car elle favorise une extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale [9].

Le volume de solvant doit être approprié à la quantité de matière végétale. Un rapport de 1/4 à 1/6 (P/V) est adopté selon la capacité d'absorption du solvant par la matière végétale. Après le passage de chaque solvant, les extraits sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait aqueux était, pour sa part, lyophilisé grâce à un lyophilisateur.

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec en calculant la perte de poids en pourcentage de la matière sèche de départ :

$$\text{Rdt (\%)} = [P1 - P2 / P3] \times 100$$

où :

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale sèche de départ.

Les rendements ont été énoncés dans la moyenne  $\pm$  écart type de trois répétitions. L'extrait sec est pesé et repris dans quelques millilitres de DMSO pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Les échantillons ont été conservés à 4 °C pour une utilisation ultérieure [10].

### 2.3. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée en utilisant des souches de référence de laboratoire (American Type Culture Collection "ATCC" pour les bactéries et *Candida albicans*, Musé National d'Histoire Naturelle "MNHN" pour les champignons filamenteux), obtenues par le Laboratoire des produits naturels, département de Biologie (Université de Tlemcen, Algérie) :

- Bactéries à Gram positif: *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Enterobacter cloacea* (ATCC 13047), *Enterococcus faecalis* (ATCC 49452), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- Bactéries à Gram négatif: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090).

- Champignon non filamenteux : *Candida albicans* (ATCC 444), *Candida albicans* (ATCC 10231).
- Champignons filamenteux : *Aspergillus fumigatus* (MNHN 566), *Aspergillus flavus* (MNHN 994294), *Fusarium oxysporum* (MNHN 963917).

Les souches ont été revivifiées et la turbidité a été ajusté à 0,5 McFarland, ce qui correspond à  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml pour les bactéries (D.O = 0,08 à 0,1/ $\lambda$  = 625 nm),  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml pour *C. albicans* (D.O = 0,12 à 0,15 /  $\lambda$  = 530 nm) [11] et  $10^6$  spores / ml pour les champignons filamenteux (68-82 % de transmittance /  $\lambda$  = 530 nm) [12]. Les cultures ont été diluées avec du bouillon Mueller-Hinton pour les bactéries, du bouillon Sabouraud pour *C. albicans* et une solution saline stérile pour les souches fongiques, afin d'atteindre des densités optiques correspondantes pour chaque test.

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne, *in vitro* : une méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé et les méthodes de dilution (méthode de micro-dilution en bouillon pour les bactéries et *C. albicans*, la méthode de dilution en milieu gélosé pour les champignons), selon le Comité national des normes du laboratoire clinique [11]. Les zones d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la gentamicine et de l'amphotéricine B ont été également déterminées dans des expériences parallèles afin de contrôler la sensibilité des micro-organismes d'essai. Tous les tests ont été effectués en triple.

### 2.3.1. Méthode de diffusion en disque

Les extraits ont été testés pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en disques, en utilisant 100  $\mu$ l de suspension des microorganismes testés, contenant  $2 \times 10^8$  UFC / ml pour les bactéries,  $1 - 5 \times 10^6$  UFC / ml pour *C. albicans* et  $2 \times 10^5$  spores / ml pour les souches fongiques. Les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud gélosés, stériles et refroidis jusqu'à 45-50 °C, ont été distribués dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre (15 ml). Les disques de papier filtre (6 mm de diamètre) ont été individuellement imprégnés avec 5  $\mu$ l de l'extrait (500  $\mu$ g/disque) et ensuite placés sur la surface des milieux gélosés déjà inoculés avec les microorganismes testés.

Les boîtes de Pétri ont été conservés à 4 °C pendant 2 h et ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 24h pour les bactéries, à 30 °C pendant 24 h pour *C. albicans* et 48 h pour les souches de champignons. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés, y compris le diamètre des disques [13]. La gentamicine (15  $\mu$ g / disque) et l'amphotéricine B (20  $\mu$ g / disque) ont servi de témoins positifs.

### 2.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour les bactéries et *C. albicans*, la méthode de micro-dilution en bouillon a été utilisée pour déterminer la CMI. Tous les tests ont été effectués dans le milieu Mueller Hinton en bouillon. Les extraits étudiés ont été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1 %, puis dilués à la

concentration la plus élevée. Des dilutions en série ont été préparées dans une microplaque de microtitration de 96 puits dans la gamme de concentrations choisie. Les souches, dont la concentration finale a été ajusté à  $5 \times 10^5$  UFC/ml pour les bactéries et à  $2,5 \times 10^6$  UFC/ml pour *C. albicans*, sont ajoutées dans chaque puits. Les bactéries et *C. albicans* ont été respectivement incubées, à 37 °C et à 30 °C, pendant 24 h. La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'extrait à laquelle le micro-organisme ne montre pas une croissance visible. La croissance des microorganismes a été indiquée par la turbidité. La gentamicine a été utilisée comme composé de référence.

Pour les champignons filamenteux, les CMI ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélosé [14]. Les souches testées ont été cultivées dans l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA), dans des boîtes de Pétri, pendant 5-7 jours. Les extraits testés, dissous dans du DMSO à 1%, ont été utilisés à différentes concentrations. Chaque concentration a été mélangée avec le milieu PDA semi-solide et stérile et ensuite versé dans des boîtes de Pétri stériles (15 ml dans chaque plaque). Un disque de 6 mm de diamètre de la gélose recouverte de mycélium a été placé sur la surface de la gélose. Les plaques ont été incubées pendant 5-7 jours à 28 °C. Deux répétitions ont été faites pour chaque test. L'amphotéricine B a été utilisée comme composé de référence.

### 3. Résultats

#### 3.1. Rendements des extractions

Les extractions successives par des solvants de polarité croissante permettent de séparer les composés de la matière végétale selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Les différents rendements obtenus, ainsi que les aspects et les couleurs des différents extraits, sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Aspects, couleurs et rendements massique (%) des extraits obtenus par extraction au Soxhlet

Parties de la plante	Solvants	Aspect	Couleur	Rendement %
Fleurs	Hexane	Visqueux	Vert jaunâtre	1,765
	Dichlorométhane	Visqueux	Vert clair	0,35
	Méthanol	Visqueux	Jaune	24,01
	Aqueux	Poudre	Marron	9,65
Tiges feuillées	Hexane	Visqueux	Vert	2,44
	Dichlorométhane	Poudre	Vert foncé	1,17
	Méthanol	Visqueux	Jaune	8,017
	Aqueux	Poudre	Marron	11,97

Les extraits méthanoliques et aqueux ont les rendements les plus élevés par rapport à ceux d'hexane et de dichlorométhane. Le rendement en extrait du méthanol est plus élevé dans le cas de la partie des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*.

### 3.2. Étude de l'activité antimicrobienne

#### 3.2.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé

Les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis de tous les extraits. Les souches de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacea*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, se sont montrées résistantes à tous les extraits.

*Bacillus cereus* et *Acinetobacter baumannii* vis-à-vis des extraits d'hexane des fleurs et des tiges feuillées et *Proteus mirabilis* vis-à-vis de l'extrait d'hexane des fleurs, avec des diamètres de 13 mm.

*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* vis-à-vis de l'extrait du méthanol des tiges feuillées, avec des diamètres de 12 mm.

*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* vis-à-vis de l'extrait d'hexane des tiges feuillées d' *H. stoechas* subsp. *rupestre*, avec des diamètres de 11 mm.

Les résultats de cette activité, montrent qu'aucun des extraits n'a une activité antifongique sur les champignons filamenteux et sur les deux souches de *Candida albicans*, testés.

#### 3.2.2. Détermination des Concentrations Minimale Inhibitrice

Pour les souches qui ont montré une certaine sensibilité (11-13 mm), nous avons déterminé les CMI. Les résultats sont représentés dans le tableau, pour les extraits (mg/ml) et l'antibiotique de référence, Gentamicine (µg/ml).

**Tableau 2.** Concentrations Minimales Inhibitrices.

	HSF Hexane	HSTF Hexane	HSTF Méthanol	Gentamicine
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	3,12 – 6,25	/	0,25 – 0,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	0,78 – 1,56	3,12 – 6,25	4 - 8
<i>Proteus mirabilis</i>	1,56 – 3,12	/	/	1 - 2
<i>Escherichia coli</i>	/	25	/	0,5 - 1
<i>Bacillus cereus</i>	1,56 – 3,12	12,5 - 25	/	0,25 – 0,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25	0,78 – 1,56	/	> 8

HSF : fleurs d' *H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d' *H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : tiges feuillées *P. saxatile* subsp. *saxatile*, / : non testés

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées dans une large gamme de concentration allant de 0,78 à 25 mg/ml. L'extrait le plus actif, avec les concentrations les plus faibles (0,78-1,56 mg/ml), est celui de l'hexane des tiges feuillées

contre *Enterococcus faecalis* et *Acinetobacter baumannii* suivi par l'extrait de l'hexane de fleurs contre *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus* (1,56-3,12 mg/ml).

#### 4. Discussion

Des études ont été consacrées à la détermination de ce pouvoir de certains extraits du genre *Helichrysum*, originaires de l'Afrique du sud. Celle réalisée par Meyer et Dilika. [15], sur plusieurs extraits d' *H. pedunculatum*, préparés séparément, montre que l'extrait de dichlorométhane a été le plus actif suivi par l'extrait aqueux. Celui préparé à partir du méthanol était totalement inactif. D'autres études réalisées sur cinq espèces d' *Helichrysum*, montrent que les extraits d'acétone et du méthanol d' *H. dasyanthum*, *H. felinum*, *H. excisum* et *H. petiolare* [16] et d'hexane d' *H. tenax* [17] sont actifs contre *Bacillus cereus*, les quatre premières espèces contre *Staphylococcus aureus* et la cinquième sur *Staphylococcus epidermidis*.

Donc, il n'existe pas une relation directe entre l'activité antimicrobienne et la polarité des solvants (dichlorométhane, eau, méthanol, acétone, hexane) utilisés pour nos extractions [18] et de plusieurs espèces d' *Helichrysum* étudiés par Meyer et Dilika [15] et Lourens *et al.* [16].

Les valeurs de CMI ont montré un large éventail de valeurs (jusqu'à 25 mg/ml) en comparaison avec les zones d'inhibition (13 mm). Ceux-ci suggèrent que la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas la réelle efficacité antibactérienne d'un composé. Ce point était en accord avec les suggestions de Cimanga *et al.* [19]. Mais selon Tegos *et al.* [20], ces valeurs de CMI ne signifient pas que tous les extraits testés soient inactifs.

#### 5. Conclusion

Cette recherche a permis de mettre en évidence l'effet antimicrobien des extraits organiques des fleurs et des tiges feuillées d' *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. Les extraits méthanolique et hénanique ont montré une activité antibactérienne modérée. Toutefois, d'autres études seront nécessaires pour l'isolement et la caractérisation des composés responsables de cette activité et l'identification de leur mécanisme d'action *in vivo*.

#### Références

1. Haddouchi F, Chaouche TM, Ksouri R, et al. (2014) Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of aqueous-extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*. Chin J Nat Med 12(6): 415–22
2. Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, et al. (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria. Food Chem 141(1): 253–8
3. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, et al. (2013) *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. Phytothérapie 11(4):244–9

4. Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition Centre national de la recherche scientifiques, Tome II
5. Czinner E, Hagymasi K, Blazovics AK, et al. (2000) *In vitro* Antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *J Ethnopharmacol* 73(3): 437–43
6. Dombrowicz E, Swiatek L, Kopycki W. (1994) Phenolic acids in *Inflorescentia Helicrysum* and herba *Hieracii pilosellae*. *Pharmazie* 47: 469–70
7. Hwisa N, Auzi A, Parvez N, et al. (2011) Antinociceptive effect of *Helichrysum stoechas* in experimental animals. *IJPI's J Pharmacol Toxicol* 1(2): 23–7
8. Chaouche TM, Haddouchi F, Atik-Bekara F et al. (2015) Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus*. *Ind Crop Prod* 64: 182–7
9. Romanik G, Gilgenast E, Przyjazny A, et al. (2007) Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J Biochem Biophys Methods* 70(2): 253–61
10. Mezouar D, Lahfa FB, Abdelouahid DE, et al. (2014) Activité antimicrobienne d'extraits d'écorce de racines de *Berberis vulgaris*. *Phytothérapie* 12: 380–5
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2001) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, PA, USA
12. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson Å et al. (1998) Evaluation of the Etestmethod for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by usingthree different agar media. *J Clin Microbiol* 36(9): 2586–9
13. Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamzic v et al. (2004) Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Trad pharmacol med Afr* 13: 11–20.
14. Merghache D, Boucherit-Atmani Z, Boucherit K (2012) Évaluation de l'activité antifongique de différents extraits de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*). *Phytothérapie* 10: 215–21
15. Meyer JJM, Dilika F (1996) Antibacterial activity of *Helichrysum pedunculatum* used in circumcision rites. *J Ethnopharmacol* 53(1): 51–4
16. Lourens ACU, Reddy D, Baser KHC et al. (2004) *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *J Ethnopharmacol* 95(2-3): 253–8
17. Drewes SE, Van Vuuren SF (2008) Antimicrobial acylphloroglucinols and dibenzyloxy flavonoids from flowers of *Helichrysum gymnocomum*. *Phytochem* 69: 1745–9
18. Ali-Shtayeh MS, Abu-Ghdeib SI (1999) Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* 42(11-12): 665–72
19. Cimanga K, Kambu K, Tona L, et al. (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 79(2): 213–20
20. Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, et al. (2002) Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (10): 3133–41