

Activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench

Antioxidant and Antibacterial Activities of the Extracts of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench

H. Boubakeur · K. Rebbas · R. Belhattab

© Lavoisier SAS 2017

Résumé L'objectif de ce travail est d'évaluer les activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* issues de deux méthodes d'extraction : d'une part, macération et décoction, d'autre part, l'eau et l'éthanol comme solvants. Les extraits contiennent une quantité considérable en métabolites phénoliques, déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu, comprise entre 310,337 et 188,742 µg/ml. Les activités antioxydantes de la plante ont été évaluées sur les extraits par la réduction de DPPH avec de l'hydroxytoluène butylé comme antioxydant standard. Les résultats de ce test ont montré que les extraits éthanoliques isolés par décoction ont de très bonnes activités antioxydantes par rapport aux extraits obtenus par macération (27,132 µg/ml). De plus, il existe une corrélation positive ($[R^2 = 0,679]$, $[R^2 = 0,673]$) entre ces activités et les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes respectivement. Les tests antibactériens ont été réalisés sur des souches bactériennes de référence ATCC (American Type Culture Collection) dans un milieu solide en utilisant la méthode des puits, montrant que certaines bactéries testées sont sensibles aux extraits éthanoliques telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* et *Klebsiella pneumoniae*, avec des valeurs de diamètre d'inhibition comparables à celles des antibiotiques testés. Par contre, d'autres sont résistantes comme *Escherichia coli*. Les extraits aqueux obtenus par les deux méthodes d'extraction (décoction, macération)

sont inefficaces pour la majorité des bactéries étudiées, sauf *Klebsiella pneumoniae*.

Mots clés *Helichrysum stoechas* (L.) Moench · Macération · Décoction · Activité antioxydante · Activité antibactérienne

Abstract The objective of this work was to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of the extracts of *Helichrysum stoechas* from two extraction methods (maceration and decoction) using two solvents, water and ethanol. The extracts contain a considerable amount of phenolic metabolites between 310.337 and 188.742 µg/ml determined by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity of this plant was evaluated using the extracts by reducing DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazylhydrate) radical scavenging with butylated hydroxytoluene (BHT) as standard antioxidant. The results of this test showed that ethanolic after decoction extracts have very good antioxidant properties compared with extracts obtained by maceration (27.132 µg/ml). In addition, there is a positive correlation ($[R^2 = 0.679]$, $[R^2 = 0.673]$) between these activities and the contents of total polyphenols and flavonoids, respectively. Antibacterial tests were determined using ATCC reference bacterial strains according to the Agar-well diffusion method, showing that certain bacteria tested are sensitive to ethanol extracts as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, and *Klebsiella pneumoniae* with diameter of inhibition values comparable with the antibiotics tested. There are other bacteria which are insensitive to different extracts of *Helichrysum stoechas* such as *Escherichia coli*. The aqueous extracts obtained by the two extraction methods (decoction and maceration) are ineffective for the majority of bacteria tested, except *Klebsiella pneumoniae*.

H. Boubakeur (✉)
Département de microbiologie et biochimie, faculté des sciences,
université Mohamed-Boudiaf, M'Sila, Algérie
e-mail : rebbaskhellaf@yahoo.fr

K. Rebbas
Département des sciences de la nature et de la vie,
faculté des sciences, université Mohamed-Boudiaf, M'Sila,
Algérie

R. Belhattab
Département de biochimie,
faculté des sciences de la nature et de la vie,
université Ferhat-Abbas, Sétif, Algérie

Keywords *Helichrysum stoechas* (L.) Moench · Maceration · Decoction · Antioxidant activity · Antibacterial activity

Introduction

Le genre *Helichrysum* renferme environ 500–600 espèces herbacées et arbustives largement distribuées en Europe du Sud, en Afrique (y compris Madagascar), en Asie du Sud, en Inde du Sud, au Sri Lanka et en Australie. Malgré le grand intérêt de ce genre, on en sait peu sur l'espèce *Helichrysum stoechas* qui est généralement aromatique, vivace, ayant des feuilles denses avec des têtes de fleurs rustiques. L'immortelle a été utilisée pour traiter les plaies, les infections topiques et les affections respiratoires [1]. L'objectif de la présente étude est la détermination des métabolites secondaires d'*Helichrysum stoechas* et leurs activités antioxydante et antibactérienne.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les parties aériennes de la plante ont été collectées pendant la saison de floraison en 2014 dans les montagnes de Dirah (Bouira) situées dans l'Est de l'Algérie à une altitude de 250 m. Un spécimen a été identifié par K. Rebbas. Les parties de la plante ont été découpées en petits morceaux et séchées à l'abri du soleil, à la température du laboratoire pendant environ une semaine, et stockées dans un récipient stérile pour la préparation des extraits aqueux et éthanolique.

Extraction à froid

Macération

L'extrait hydroalcoolique et l'extrait aqueux des parties aériennes (tiges feuilletées et fleurs) ont été préparés selon la méthode décrite par Coulibaly et al. [2] avec une légère modification : 50 g du matériel végétal broyé est mis à macérer dans 500 ml d'un mélange éthanol/eau (80/20 v/v) ou 500 ml d'eau distillée sous agitation magnétique et à une température ambiante [2]. Cette macération est répétée trois fois successivement avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Les macérats aqueux et hydroalcoolique obtenus sont soumis à la double filtration sur coton hydrophile et sur papier-filtre Whatman n° 1.

Les filtrats obtenus sont concentrés à l'évaporateur rotatif de type (Büchi R-114) à la température de 45 et 50 °C respectivement. Après séchage à l'étuve (45 °C) pendant 24 heures, les extraits obtenus ont été nommés EtOH_(M) et Aq_(M) et utilisés pour les tests phytochimiques et biologiques.

Extraction à chaud

Décoction

L'extraction par décoction a été effectuée selon le protocole décrit par Chavan et al. [3]. Une quantité de 50 g du matériel végétal broyé est mise à bouillir pendant 15 minutes dans 500 ml d'un mélange éthanol/eau (80/20 v/v) ou 500 ml d'eau distillée. Après filtration sur Büchner, les filtrats ont été ensuite concentrés et séchés dans l'étuve et nommés EtOH_(D) et Aq_(D), puis conservés à 4 °C pour les travaux ultérieurs.

Criblage phytochimique de l'extrait de la plante

Réactions de caractérisation

L'analyse phytochimique a été réalisée respectivement sur l'extrait obtenu par l'infusion des tiges feuillues et des fleurs en utilisant des procédures standard pour identifier les constituants comme décrit par Aiyegoro et Okoh [4], Sheikh et al. [5] et Tamilselvi et al. [6].

La révélation de certaines familles chimiques de la plante a été réalisée grâce aux tests de détection chimique tels que : les alcaloïdes (test de Mayer et réactif de Dragendorff), les composés phénoliques et les tanins (réaction au chlorure ferrique), les flavonoïdes (réaction à la cyanidine), les saponosides (indice de mousse), les stérols et triterpènes (réaction de Liebermann-Buchard), coumarines (test de confirmation).

Criblage qualitatif par CCM

Dix microgrammes par litre de chaque extrait organique sont analysés sur chromatoplaque (silica gel 60 F254, support rigide en aluminium, Merck) par les gradients de solvant de migration. Après séchage, les chromatogrammes sont révélés soit dans le visible, soit sous UV/254/366 nm avec ou sans révélateurs appropriés. Les spots ont été marqués à l'aide d'un crayon, et le facteur de rétention (R_f) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$R_f = \text{hauteur de migration}/\text{hauteur du front de solvant}.$$

Les chromatogrammes des extraits ont été obtenus avec un gradient : acétate d'éthyle–acide acétique glacial–acide formique–eau distillée (100:11:11:26 v/v) [7].

Détermination des composés phénoliques totaux

La teneur totale en polyphénol des extraits a été déterminée par colorimétrie par la méthode de Folin-Ciocalteu (un mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate) mentionnée par Albayrak et al. [8–10].

Dans un tube à essais, 20 µl de l'extrait de plante (1 mg/ml) ont été mélangés avec 1,2 ml d'eau distillée, puis 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué avec l'eau distillée (1:10 v/v) ont été ajoutés, et le contenu a été mélangé

soigneusement. Après trois minutes, 300 µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 7,5 %) ont été ajoutés, et le volume a été porté à 2,0 ml avec de l'eau distillée. Après deux heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm et comparée à une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0–200 µg/ml). Les résultats sont présentés comme la moyenne des trois exemplaires et exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (mg EAG) par gramme d'extrait sec (g d'extrait sec).

Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits d'*Helichrysum stoechas* [11]. À 1 ml d'échantillon ou standard (préparé dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2 % dans le méthanol). Après dix minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) réalisée par la quercétine à différentes concentrations (0–40 µg/ml) dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine (mg EQ) par gramme d'extrait sec (g d'extrait sec).

Activité antioxydante

Dans ce test, les antioxydants réduisent le 2,2-diphénol-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, la diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

Cinquante microlitres de chaque échantillon ou de standard à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydant standard ; le butylhydroxytoluène (BHT) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons tests [12–14].

Expression des résultats

Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs\ c - Abs\ t) / Abs\ c] \times 100$$

Abs c : absorbance du contrôle, Abs t : absorbance de l'échantillon testé.

La capacité de piégeage des extraits a été exprimée en EC_{50} obtenue à partir du graphe de l'activité de piégeage (en %) tracé en fonction de la concentration d'échantillons, elle est nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, deux autres paramètres ont été calculés :

- pouvoir antiradicalaire (APR) [$APR = 1/EC_{50}$] ;
- indice d'activité antioxydante (AAI) [$AAI = \text{concentration de DPPH} (\mu\text{g/ml})/EC_{50}$].

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures.

Étude de l'activité antibactérienne des extraits

Micro-organismes étudiés

Les souches de référence sont sous forme de lots ATCC et sont : *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC4352, *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus cereus* (ATCC10876) et *Enterococcus faecalis* ATCC2035. Ces souches sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive.

Tests de l'activité antibactérienne

Les tests de l'activité antibactérienne des différents extraits ont été réalisés en utilisant la méthode de diffusion suivant la procédure décrite par Manasa et al., avec une légère modification [15].

Après 30 minutes de diffusion à la température du laboratoire, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits et des disques à l'aide d'un pied à coulisse. L'activité antimicrobienne a été exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition des souches vis-à-vis de l'extrait et interprétée selon Celikel et Kavas, Moreira et al. [16,17] (résistante : diamètre inférieur à 8 mm ; sensible : diamètre compris entre 9 et 14 mm ; très sensible : diamètre compris entre 15 et 19 mm ; extrêmement sensible : diamètre supérieur à 20 mm).

Analyse statistique des résultats

Les données statistiques sont exprimées en erreur standard moyen (m ± SEM) à partir de n expériences séparées. La signification des différences observées simultanément entre les concentrations a été faite à l'aide de l'analyse des variances (Anova) du test de comparaison multiple, $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

Résultats et discussion

Rendement d'extraction éthanolique et aqueux

Les deux méthodes d'extraction ont permis d'obtenir quatre extraits bruts ; deux extraits éthanoliques $\text{EtOH}_{(\text{D})}$ et $\text{EtOH}_{(\text{M})}$, et deux extraits aqueux, $\text{Aq}_{(\text{D})}$ et $\text{Aq}_{(\text{M})}$.

Du point de vue de la rentabilité, l'extrait hydroalcoolique a donné la proportion la plus élevée avec une moyenne de 9,716 %, alors que l'extrait aqueux a présenté une moyenne de 8,948 % (Tableau 1).

Criblage phytochimique

Réactions de caractérisation

Les résultats de l'étude triphytochimique réalisée sur la plante indiquent la présence de flavonoïdes, de tanins, de coumarines et de saponines, ainsi que des alcaloïdes (Tableau 2). Cette richesse en principes actifs confère à la plante des propriétés remarquables qui pourraient justifier son utilisation en médecine traditionnelle.

Criblage qualitatif par CCM

C'est la chromatographie sur couche mince (CCM) qui nous a permis de confirmer les résultats des réactions de caractérisation et de séparer les constituants chimiques contenus dans les extraits. Chaque constituant est caractérisé par son R_f . Le Tableau 3 rapporte les informations sur les R_f , l'observation à l'UV (254 et 366 nm) et les différentes colorations après la révélation par le réactif de Godin.

Les mêmes taches observées avec le décocté éthanolique se retrouvent au niveau du macéré éthanolique. À 254 nm, la plupart des constituants de nos extraits aqueux et alcoolique sont visibles et apparaissent sous forme de taches noires. À 366 nm, les taches apparaissent en bleu indiquant la présence de coumarines. Après révélation avec le réactif de Godin, les taches noires et blanches sont colorées en brun, gris noirâtre et jaune.

Tableau 1 Aspect, couleur et rendement de différents extraits d'*Helichrysum stoechas*

Méthode	Solvant	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Décocction	Éthanol	Visqueux	Vert foncé	10,776
	Eau	Visqueux	Marron	9,837
Macération	Éthanol	Visqueux	Vert foncé	8,656
	Eau	Visqueux	Marron	8,06

Tableau 2 Criblage phytochimique de l'extrait d'*Helichrysum stoechas* (réactions en tube)

<i>Helichrysum stoechas</i>	Tiges feuillues	Fleurs
Flavonoïdes	Rose ++	Orange-rouge +++
Tanins	Vert +++	Bleu-noir ++
Alcaloïdes	Trouble et précipité	Trouble et précipité
Mayer	+++	+++
Dragendorff	Trouble et précipité +++	Trouble et précipité +++
Stérols et triterpènes	Vert-violet ++	Verte-bleu ++
	Hétérosides terpéniques	Hétérosides Stéroïdiques
Saponosides	+++	++
Coumarines	+++	++

+++ : réaction fortement positive ; ++ : réaction moyennement positive

Les taches de couleur grise nous orientent vers la présence de tanins. Les colorations jaunes obtenues au R_f 0,98, 0,90 et 0,86 peuvent être celles des flavonoïdes. Par calcul des rapports frontaux des différents extraits et leur comparaison avec ceux des témoins, les composés suivants ont été identifiés : l'acide gallique, la quercétine dans les extraits $\text{EtOH}_{(\text{D})}$ et $\text{EtOH}_{(\text{M})}$ et l'acide ascorbique dans l'extrait $\text{Aq}_{(\text{D})}$.

Analyses quantitatives de polyphénols totaux et de flavonoïdes

La teneur en polyphénols totaux de chaque extrait a été déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée en utilisant comme standard l'acide gallique $y = 0,001 \times -0,009$ et $R^2 = 0,995$ et exprimée en microgrammes d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$) (Fig. 1, Tableau 4).

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = 0,039 \times +0,037$) et $R^2 = 0,995$ et réalisée par la quercétine à différentes concentrations (0–40 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 2).

L'étude statistique des teneurs en polyphénols totaux obtenus par les deux méthodes d'extraction, présentées sur la Figure 3 et dans Tableau 4, révèle une différence significative ($p < 0,05$) pour la majorité des extraits. Toutefois, la décocction semble être la meilleure méthode d'extraction des polyphénols totaux, soit en moyenne 262,220 contre 188,742 $\mu\text{g EAG/mg d'extrait sec}$ pour la macération.

Extraits/témoins	R _f	Observation à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Godin
Quercétine	0,98	—	Jaune	Jaune
Acide gallique	0,94	—	Brune	Brune
Acide ascorbique	0,71	Visible	Brune	Brune
EtOH _(D) /EtOH _(M)	0,98	—	Jaune	Jaune
	0,94	—	—	Brune
	0,90	—	Jaune	—
	0,86	Visible	Jaune	—
	0,82	Visible	Blanche	—
	0,78	Visible	Brune	Brune
	0,74	Visible	Bleue	—
	0,64	—	Bleu-vert	—
	0,51	—	Bleue	Grise
	0,37	—	—	Grise
Aq _(D)	0,86	—	Jaune	—
	0,78	—	Brune	—
	0,71	Visible	Brune	—
	0,63	—	Jaune	—
Aq _(M) /Aq _(D)	0,82	Visible	Blanche	—
	0,74	Visible	Bleue	—

Par ailleurs, les extraits éthanoliques enregistrent des teneurs moyennes en polyphénols totaux plus élevées (265,786 µg EAG/mg d'extrait sec) que les extraits aqueux (185,17 µg EAG/mg d'extrait). Les résultats de la teneur en flavonoïdes des décocôtes et des macérats par les deux solvants (Fig. 3) montrent que la décoction est préférable pour extraire les flavonoïdes, à savoir une moyenne de 63,428 µg EQ/mg d'extrait contre 40,350 µg EQ/mg d'extrait en moyenne pour la macération.

En ce qui concerne le solvant d'extraction, quel que soit le mode d'extraction, l'éthanol reste le meilleur extracteur des flavonoïdes, soit en moyenne 71,957 µg EQ/mg d'extrait contre 31,821 µg EQ/mg d'extrait pour l'eau. Statistiquement, la différence entre les teneurs en flavonoïdes en fonction de la méthode d'extraction utilisée est hautement significative ($p < 0,05$).

Activité antioxydante

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus ont été testés par la méthode du DPPH, les valeurs d'EC₅₀ ont été obtenues à partir du graphe tracé en fonction du pourcentage de l'inhibition de piégeage de DPPH et de la concentration d'échantillon, cette valeur est nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH (Figs 4, 5).

Les valeurs d'EC₅₀ révèlent que les extraits de *Helichrysum stoechas* possèdent une activité antiradicalaire dose-dépendante (Tableau 4). Tous les extraits de la plante présen-

tent des activités antioxydantes nettement supérieures à celle du produit de référence BHT.

Les extraits hydroalcooliques ont une activité élevée dans tous les essais in vitro d'EC₅₀ entre (27,132 et 39,697 µg/ml) par rapport aux extraits aqueux (valeurs d'EC₅₀ allant de 39,697 à 63,194 µg/ml). Cela est en accord avec les composés phénoliques de concentration élevée (265,786 mg/g) présents dans l'extrait hydroalcoolique par rapport aux extraits aqueux (185,17 mg/g). Ces corrélations ont été analysées par le test de Pearson. Un résultat de corrélation positive a été observé pour les polyphénols et les flavonoïdes

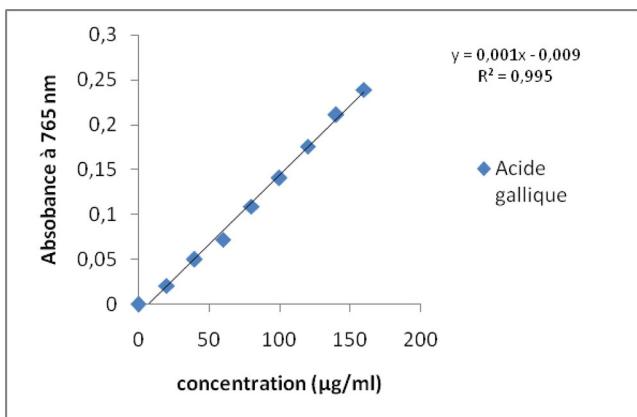


Fig. 1 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 4 Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et activité antiradicalaire des différents extraits d' <i>Helichrysum stoechas</i> et standards						
Méthode d'extraction	Solvant/extrats	Polyphénols (µg EAG/mg d'extract)	Flavonoïdes (µg EQ/mg d'extract)	EC ₅₀ (µg/ml)	APR (ml/µg)	AAI
Décoction	Éthanol	310,337 ± 10,239 ^c	84,941 ± 1,54 ^c	27,132 ± 0,423 ^{ns}	0,037 ± 0,001	0,922 ± 0,014
	EtOH _(D)					
	Eaux	214,103 ± 11,046 ^a	41,914 ± 0,296 ^c	32,313 ± 0,429 ^{ns}	0,031 ± 0,0007	0,774 ± 0,010
	Aq _(D)					
Macération	Éthanol	221,23 ± 9,966 ^c	58,974 ± 0,571 ^c	39,697 ± 0,636 ^c	0,025 ± 0,001	0,630 ± 0,014
	EtOH _(M)					
	Eaux	164,744 ± 4,249 ^a	21,726 ± 0,267 ^c	63,194 ± 6,807 ^c	0,016 ± 0,001	0,397 ± 0,019
	Aq _(M)					
Moyenne ± SEM (décoction)	EtOH _(D) -Aq _(D)	262,220 ± 39,287 ^c	63,428 ± 21,513 ^c	29,723 ± 2,590 ^c	0,034 ± 0,003	0,848 ± 0,074
Moyenne ± SEM (Macération)	EtOH _(M) -Aq _(M)	188,742 ± 26,530 ^b	40,350 ± 18,624 ^c	51,446 ± 11,749 ^c	0,021 ± 0,005	0,514 ± 0,117
BHT				45,41 ± 0,642 ^c	0,0220 ± 0,0003	0,551 ± 0,004

EAG : équivalent d'acide gallique ; EQ : équivalent de quercétine. APR : pouvoir antiradicalaire ; AAI : indice d'activité antioxydante Selon les auteurs [14], lorsque l'AAI est inférieur à 0,5, l'échantillon possède une faible activité antioxydante, entre 0,5 et 1,0 une forte activité antioxydante et supérieur à 1,0 une très forte activité antioxydante. Dans ce travail la majorité des extraits ont une activité antioxydante forte. Les valeurs de probabilité *p* inférieur à 0,05 ont été considérées comme significatives. ns : non significative

^a Peu significative

^b Significative

^c Très significative

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM (*n* = 3)

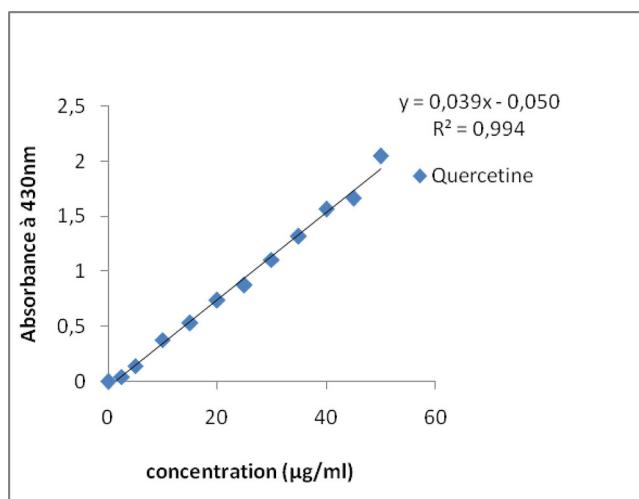


Fig. 2 Courbe d'étalonnage de la quercétine

respectivement $R^2 = 0,679$ et $R^2 = 0,673$ (Fig. 6). Ainsi, les composés phénoliques pourraient être parmi les composants principaux responsables de l'inhibition par les radicaux libres dans les extraits de plantes analysés [18].

Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* ont montré que les extraits possèdent une activité large contre les micro-organismes testés en comparaison aux antibiotiques témoins (Figs 7–9, Tableau 5).

La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits. Les bactéries à Gram positif sont les plus sensibles à l'effet de l'extrait éthanolique décocté, avec des diamètres allant jusqu'à 20,333 mm pour *Staphylococcus aureus*, 18,333 mm pour *Enterococcus faecalis* et 18 mm pour *Bacillus cereus*. La souche *Escherichia coli* est non sensible aux différents extraits. Par contre, *Klebsiella pneumoniae* est sensible aux extraits de différents

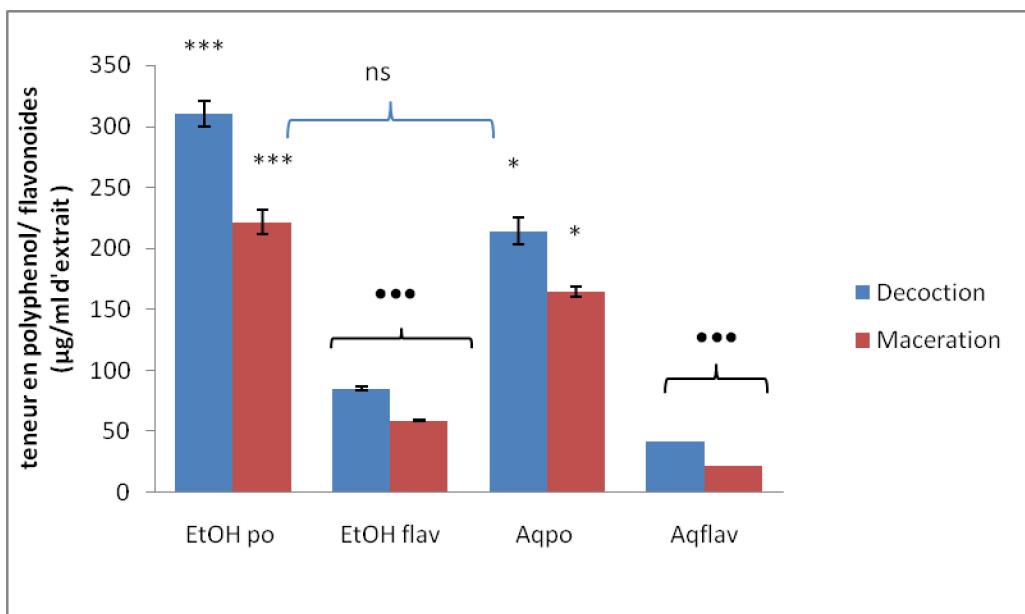


Fig. 3 Évaluation des polyphénols totaux et des flavonoïdes des différents extraits d'*Helichrysum stoechas*

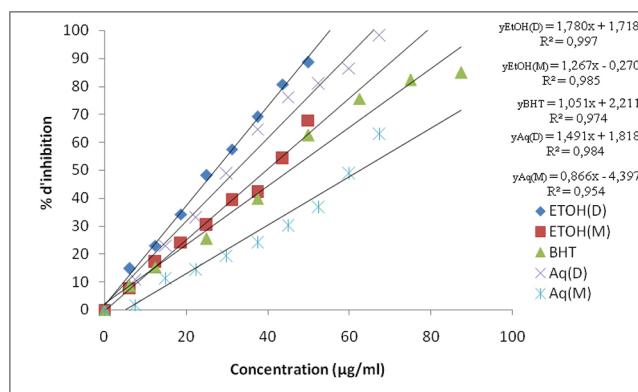


Fig. 4 Activité antioxydante de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* et les standards (BHT), exprimée par l'inhibition de l'activité radicalaire du DPPH

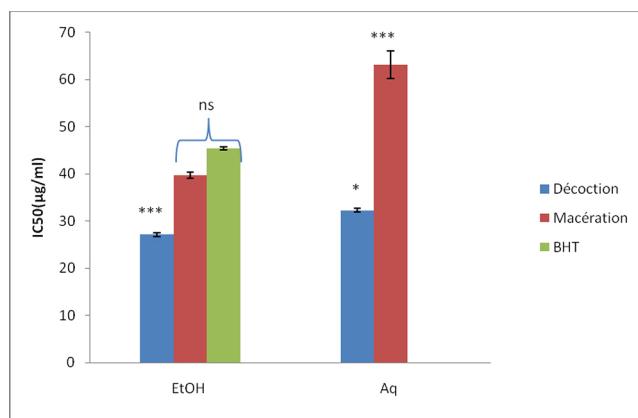


Fig. 5 Les valeurs EC₅₀ (µg/ml) pour les extraits d'*Helichrysum stoechas* et les standards

solvants et de différentes méthodes, avec un diamètre qui varie entre 16,167 et 14,667 mm pour les extraits éthanoliques (EtOH(D), EtOH(M)) et de 14,333 à 13 mm pour les extraits aqueux (Aq(D), Aq(M)). Ces derniers sont actifs seulement sur *Klebsiella pneumoniae*. Nos résultats permettent de classer les bactéries selon leur sensibilité comme suit : *Staphylococcus aureus* > *Enterococcus faecalis* > *Bacillus cereus* > *Klebsiella pneumonia*.

L'analyse statistique a été faite à partir de l'analyse de la variance Anova One-Way suivie du test Tukey pour la comparaison entre l'activité des extraits aqueux et alcoolique à 150 mg/ml, celle d'antibiotique et le témoin. Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne ± SEM. Les histogrammes avec des exposants différents (a et c) sont significativement différents ($p < 0,05$). Les valeurs ont été considérées comme significatives (a : non significative ; c : très significative). Tous les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel d'analyse statistique GraphPad Prism 5.

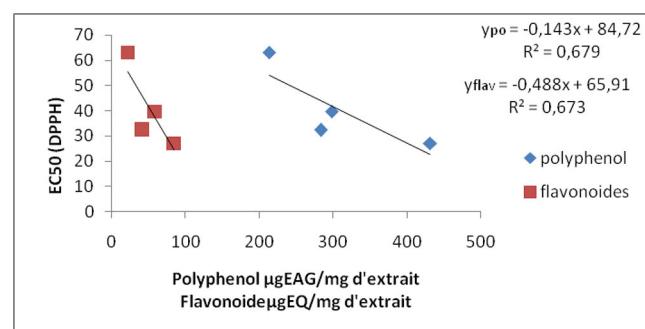


Fig. 6 Corrélation entre les polyphénols, les flavonoïdes et l'activité antioxydante

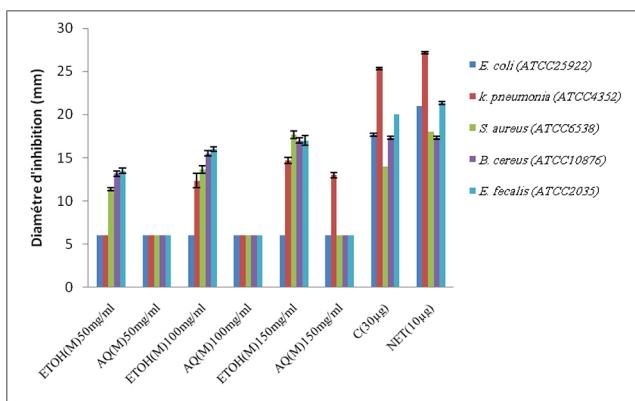


Fig. 7 Activité antibactérienne des antibiotiques et des extraits hydroalcooliques et aqueux d'*Helichrysum stoechas* obtenus par macération. NET : nélilmicine, C : chloramphénicol

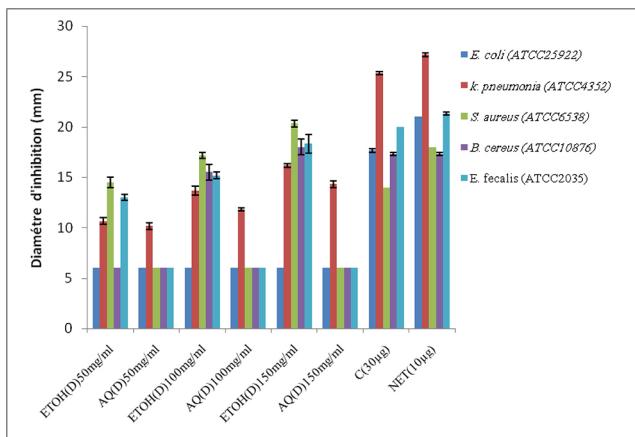


Fig. 8 Activité antibactérienne des antibiotiques et des extraits hydroalcooliques et aqueux d'*Helichrysum stoechas* obtenus par décoction. NET : nélilmicine ; C : chloramphénicol

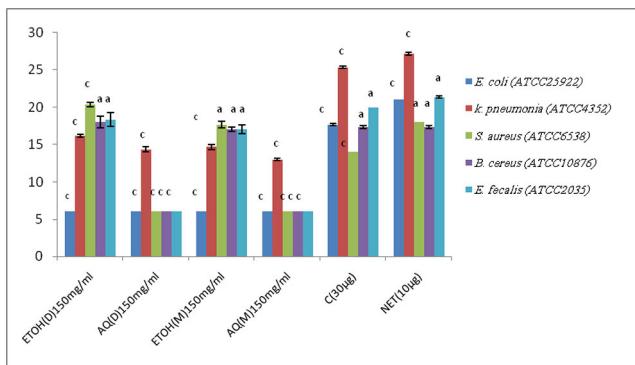


Fig. 9 Comparaison de l'activité antibactérienne de la nélilmicine, du chloramphénicol et des extraits hydroalcooliques et aqueux d'*Helichrysum stoechas* obtenus par macération et par décoction

Discussion

Les espèces d'*Helichrysum* ont été étudiées par certains chercheurs sur le contenu phénolique et l'activité antioxydante. Leurs résultats montrent la richesse de ces espèces en polyphénols antioxydants.

Concernant l'espèce *Helichrysum stoechas* étudiée, le résultat en polyphénols pour les extraits éthanoliques est très élevé (265,786 mg/g) par rapport à celui trouvé par Barroso et al. [19] (135,61 mg/g) et par Albayrak et al. [8,9] (94,16 mg/g). Le choix du système de solvant d'extraction est très important dans la détermination des teneurs en polyphénols totaux. En effet, la décoction éthanolique semble être convenable pour l'extraction des polyphénols totaux. Cela s'expliquerait par le fait que les rendements d'extraction en polyphénols sont plus élevés avec les solvants de polarité inférieure à celle de l'eau, et la même observation a été faite par Barroso et al. [19].

En ce qui concerne l'activité de piégeage des radicaux utilisant le test DPPH, les extraits éthanoliques ont montré une activité plus faible (27,132 µg/ml) que les extraits de méthanol d'*Helichrysum stoechas* subsp. *barellieri* de Turquie (la valeur d'EC₅₀ est de 7,95 µg/ml [8]) et plus forte que les extraits de méthanol d'*Helichrysum stoechas* du Portugal (la valeur d'EC₅₀ est de 36,62 µg/ml [19]).

Dans une étude concernant d'autres espèces de mêmes genres menée par Albayrak et al. [20] sur la réduction du DPPH par les extraits méthanoliques, il a été noté que l'extrait méthanolique de *Helichrysum sanguineum* donne une capacité maximale antiradicalaire (IC₅₀ = 12,90 µg/ml) et que la capacité antiradicalaire minimale a été observée pour l'extrait d'*Helichrysum chasmolyticum* (IC₅₀ = 25,33 µg/ml). Lourens et al. [21] ont également montré que des extraits acétoniques d'*Helichrysum dasyanthum* étaient les plus actifs piégeurs de radicaux libres (IC₅₀ = 9,53 µg/ml) par rapport aux autres *Helichrysum* étudiés.

Le screening chimique des parties aériennes d'*Helichrysum stoechas* déterminé par CCM montre que la plante contient en particulier de la quercétine, de l'acide gallique et de la coumarine. Albayrak et al. [8,9] ont déterminé à partir des extraits méthanoliques d'*Helichrysum stoechas* subsp. *barellieri* par HPLC plusieurs composés phénoliques (acide chlorogénique, acide caféïque, acide férulique, acide p-coumarique, apigénine, apigénine-7-glucoside, épicatechine, hespéridine la naringénine et la quercétine). Ces deux derniers composés se trouvent dans la majorité des extraits de plusieurs espèces d'*Helichrysum* étudiées par le même auteur.

L'analyse chimique de l'extrait éthanolique obtenu à partir de l'*Helichrysum stoechas* par Sobhy et El-Feky a révélé l'identification de dix constituants dans l'extrait, y compris la quercétine, la naringénine et l'apigénine [22].

Tableau 5 Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits d'*Helichrysum stoechas*

Bactéries testées	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Diamètres de zone d'inhibition + SD (mm)				Contrôle antibiotique	Témoins		
		Décoction		Macération					
		$\text{EtOH}_{(\text{D})}$	$\text{Aq}_{(\text{D})}$	$\text{EtOH}_{(\text{M})}$	$\text{Aq}_{(\text{M})}$				
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	50	6 \pm 0,00(–)	6 \pm 0,00	6 \pm 0,00 (–)	6 \pm 0,00	21 \pm 0,000(++)	6 \pm 0,00		
				(–)	(–)	17,667 \pm 0,167	(–)		
	100	6 \pm 0,00(–)	6 \pm 0,00	6 \pm 0,00(–)	6 \pm 0,00				
<i>Klebsiella pneumonia</i> (ATCC4352)	50	10,667 \pm 0,333(+)	10,167 \pm 0,333(+)	6 \pm 0,00(–)	6 \pm 0,00	27,16 \pm 0,167(++)	6 \pm 0,00		
				(–)	(–)	25,333 \pm 0,167(++)	(–)		
	100	13,667 \pm 0,441(+)	11,833 \pm 0,167(+)	12,333 \pm 0,833(+)	6 \pm 0,00				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	50	14,500 \pm 0,500(+)	6 \pm 0,00 (–)	11,333 \pm 0,167(+)	6 \pm 0,00 (–)	18 \pm 0,000(++)	6 \pm 0,00		
						14 \pm 0,000(++)	(–)		
	100	17,167 \pm 0,333(++)	6 \pm 0,00 (–)	13,667 \pm 0,441(+)	6 \pm 0,00 (–)				
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC10876)	50	20,333 \pm 0,333(++)	6 \pm 0,00 (–)	17,667 \pm 0,441(+)	6 \pm 0,00 (–)				
						17,333 \pm 0,167(++)	6 \pm 0,00		
	100	15,500 \pm 0,764(++)	6 \pm 0,00 (–)	15,500 \pm 0,289(++)	6 \pm 0,00 (–)				
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC2035)	50	18 \pm 0,764	6 \pm 0,00	17 \pm 0,289	6 \pm 0,00				
				(–)	(++)				
	100	13,000 \pm 0,289(+)	6 \pm 0,00	13,500 \pm 0,289(+)	6 \pm 0,00	21,333 \pm 0,167(++)	6 \pm 0,00		
						20 \pm 000(++)	(–)		
	150	15,167 \pm 0,333(++)	6 \pm 0,00	16,000 \pm 0,289(++)	6 \pm 0,00				
						18,333 \pm 0,928(++)	6 \pm 0,00		
							0,577(++)		

Le diamètre des trous 6 mm est inclus. Témoin : l'eau distillée et DMSO. NET : nétilmicine, C : chloramphénicol. Les valeurs + et – représentent le degré de sensibilité des souches : non sensible ou résistante (–) : diamètre < 8 mm ; sensible (+) : $9 \text{ mm} < \text{diamètre} < 14$ mm ; très sensible (++) : $15 \text{ mm} < \text{diamètre} < 19$ mm ; extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm. Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne \pm SEM

Lavault et Richomme [23] ont séparé par chromatographie sur colonne et par CCM et identifié 18 composés phénoliques (les α -pyrones, les phloroglucinols, les acides phénoliques, les flavonoïdes et la coumarine) à partir des parties aériennes d'*Helichrysum stoechas* var. *olonnense*.

Carini et al. [24] ont identifié dans des échantillons d'*Helichrysum stoechas* en provenance d'Italie cinq à sept acides phénoliques et flavonoïdes, parmi eux la flavone, l'apigénine et de la naringénine.

Concernant l'activité antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas*, cette étude a révélé que les extraits éthanoliques sont très efficaces sur les bactéries Gram positif testées. Parmi elles, le *Staphylococcus aureus*, alors qu'il n'a eu aucun effet sur *Escherichia coli* (Gram négatif). Ces résultats étaient similaires à ceux rapportés par Aslan et al. [25] et Giovannini et al. [26] sur les extraits éthanoliques d'*Helichrysum stoechas* normal et régénéré par transgenèse. Par contre, Sobhy et El-Feky [22] et

Albayrak et al. [8] ont constaté que les extraits hydroalcooliques sont très actifs sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Pour d'autres germes tels que *Mycobacterium tuberculosis*, Buzayan et El-Garbuli [27] ont constaté que l'extrait aqueux d'*Helichrysum stoechas* n'a aucun effet sur le germe testé [27]. Quant aux propriétés antibactériennes des espèces différentes d'*Helichrysum*, elles ont révélé que les extraits de quatre plantes étudiées (*Helichrysum arenarium* subsp. *erzincanicum* *Helichrysum arenarium* subsp. *rubicundum*, *Helichrysum armenium* subsp. *araxinum*, *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoduplicatum*) sont actifs contre *Staphylococcus aureus* et inactifs contre *Escherichia coli*. Les mêmes résultats ont été déterminés sur les extraits de trois *Helichrysum* (*Helichrysum pamphylicum*, *Helichrysum sanguineum*, *Helichrysum chasmolyticum*) [8,20].

Conclusion

Afin d'isoler de nouvelles substances naturelles permettant de mettre au point de nouvelles voies d'application tant dans les domaines de la pharmacie, du cosmétique que de l'agroalimentaire, le présent travail a mis en évidence la richesse d'*Helichrysum stoechas* en composés polyphénoliques, notamment en flavonoïdes. Ces composés ayant des propriétés antimicrobiennes connues, leur présence pourrait donc expliquer les propriétés antibactériennes observées. Par ailleurs, il apparaît que cette plante détient un potentiel antiradicalaire significatif, ces résultats justifient certains usages ethnopharmacologiques. Il serait par conséquent intéressant d'entreprendre des études de purification et de toxicité des extraits de cette plante et d'envisager la mise au point de médicaments traditionnels.

Liens d'intérêts Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

1. Viegas DA, de Oliveira AP, Salgueiro L, et al (2014) *Helichrysum italicum*. From traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol* 151:54–65
2. Coulibaly B, N'Guessan KR, Aka N, et al (2011) Activité antimycobactérienne in vitro des extraits de *Phyllanthus amarus* (Schum et Thonn) sur les souches de *Mycobacterium ulcerans* en Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège* 80:759–71
3. Chavan UD, Shahidi F, Naczk M (2001) Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *J. Food Chem* 75:509–12
4. Aiyegoro OA, Okoh AI (2010) Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complement Altern Med* 10:10–21
5. Sheikh N, Kumar Y, Misra AK, et al (2013) Phytochemical screening to validate the ethnobotanical importance of root tubers of *Dioscorea* species of Meghalaya, North East India. *J Med Plants Studies* 1:62–9
6. Tamilselvi N, Krishnamoorthy P, Dhamotharan R, et al (2012) Analysis of total phenols, total tannins and screening of phyto-components in *Indigofera aspalathoides* (Shivanar Vembu) Vahl EX DC. *J Chem Pharm Res* 4:3259–62
7. N'gaman Kohué Ch., Békro Y.-A., Mamyrbékova-Békro J. et al (2009) Sur la composition en métabolites secondaires et l'activité antioxydante d'extraits bruts de *Gmelina arborea* Roxb. (Verbenaceae) de Côte-d'Ivoire, Afrique de l'Ouest : analyse par chromatographie en couche mince. *Eur J Sci Res* 36:161–71
8. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, et al (2010) Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from Eastern Anatolia, Turkey. *Turk J Biol* 34:463–73
9. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, et al (2010) Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chem* 119:114–22
10. Albayrak S, Aksoy A, Albayrak S, et al (2013) In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian J Sci Technol* A1:1–9
11. Patel M, Verma R, Srivastav P (2014) Antioxidant activity of *Boerhavia diffusa* extract. *IJPPR* 6:598–605
12. Heilerova L, Buckova M, Tarapcik P, et al (2003) Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), and agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech J Food Sci* 21:78–84
13. El Youbi A, Bousta D, Jamoussi B, et al (2012) Activités antioxydante, apoptotique et antiproliférative de *Tetraena gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie* 10(3):151–60
14. Batiston WP, Maruyama SA, Gomes STM, et al (2013) Total phenolic content and antioxidant capacity of methanolic extracts of ten fruits. *Acta Sci Technol* 35:581–5
15. Manasa GC, Meena Kumari P, Muniyappa N et al (2015) Evaluation of the phytochemical, antiproliferative, antioxidant, antibacterial activities of *Kalanchoe blossfeldiana* leaves. *World J Pharm Res* 4:1201–14
16. Celikel N, Kavas G (2008) Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J Food Sci* 26:74–81
17. Moreira MR, Ponce AC, del Valle CE, et al (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 38:565–70
18. Kumaran A, Karunakaran RJ (2007) In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40:344–52
19. Barroso MR, Barroso L, Duenas M, et al (2014) Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Ind Crops Prod* 53:330–6
20. Albayrak S, Sagdic O, Aksoy A, et al (2008) Antimicrobial and antioxidant activities of *Helichrysum* species from the Mediterranean region of Turkey. *Asian J Chem* 20:3143–52
21. 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* 95:253–8

22. Sobhy EA, El-Feky SS (2007) Chemical constituents and antimicrobial activity of *Helichrysum stoechas*. Asian J Plant Sci 6:692–5
23. Lavault M, Richomme P (2004) Constituents of *Helichrysum stoechas* variety olon-nense. Chem Nat Comp 40:118–21
24. Carini M, Aldini G, Furlanetto S, et al (2001) LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. J Pharm Biomed Anal 24:517–26
25. Aslan M, Katircioglu H, Oohan İ, et al (2007) Antibacterial potential of the capitula of eight Anatolian *Helichrysum* species. Turk J Pharm Sci 4:71–7
26. Giovannini A, Mascarello M, Pipino L, et al (2008) *Agrobacterium rhizogenes* — mediated transformation in Mediterranean *Helichrysum*. Transgenic Plant J 2:54–61
27. Buzayan MM, El-Garbuli FR (2012) Antibacterial activity of medicinal aqueous plant extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. Malaysian J Microbiol 18:203–6