

Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter

F. Bssaibis*, N. Gmira*, M. Meziane **

* Laboratoire de Biodiversité et Ressources Naturelles, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc
bssaibisfatna@yahoo.fr

** Laboratoire d'Hydrobiologie et Ecologie Générale, Université Mohammed 1er, Faculté des Sciences, Oujda, Maroc

Résumé

Dittrichia viscosa (L.) W. Greuter est une plante largement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle marocaine, surtout dans le milieu paysan, pour le traitement de diverses affections ou maladies telles que les bronchites, le diabète, les blessures...etc.

Dans le présent travail, nous avons préparé des extraits à partir des feuilles et des fleurs de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter dans différents solvants (éthanol, méthanol et acétone). Les meilleurs rendements d'extractions ont été obtenus avec l'éthanol comme solvant (31,72% et 28.82% respectivement pour les feuilles et les fleurs), suivi du méthanol et de l'acétone. Les tests antibactériens de différents extraits de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter ont été opérés sur des souches bactériennes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Nous avons trouvé une activité antibactérienne optimale avec l'extrait des fleurs au méthanol qui préservent une activité inhibitrice sur les trois souches utilisées jusqu'à la dilution 1/100.

Les résultats obtenus par analyse phytochimique nous permettent d'attribuer cette activité aux différents métabolites secondaires (principalement les composés

phénoliques et les terpénoïdes) appartenant à des classes connues pour ce type de propriétés, ce qui explique, l'efficacité des indications traditionnelles de *D. viscosa* dans le traitement diverses pathologies pouvant être causées par ces germes.

Mots clés : *Dittrichia viscosa*, activité antimicrobienne, extraits à l'éthanol, extraits au méthanol, extraits à l'acétone.

1. Introduction

Dittrichia viscosa (L.) W. Greuter = *Inula viscosa* (L.) Aiton., est de la famille des *Asteraceae*. Elle est connue au Maroc sous les noms vernaculaires : *Terhalâ*, *Mâgrâmân*, Bagramane ou encore *Amagramane*, très répandue dans le bassin méditerranéen. C'est une plante vivace, légèrement ligneuse à la base, à fleurs jaunes et à forte odeur. Elle est largement présente dans la pharmacopée traditionnelle marocaine pour traiter les bronchites, le diabète, les blessures, les troubles gastriques et intestinaux...etc. (Bellakhdar J., 1997). *Dittrichia*, est aussi communément utilisée dans tous les pays de la région méditerranéenne, où elle est connue par ses propriétés anti-inflammatoires (Al-Dissi N. M. & al. in Barbeti & al., 2001), antiseptiques et antipyrétiques (Al-Dissi N. M. & al. in Lauro & Rolih, 2001) (Stamatis G. & al, 2003), pour le traitement du diabète (Al-Dissi N. M. & al. in Yaniv & al., 2001) (Zeggwagh N.A. & al, 2006) mais aussi dans le traitement des troubles gastro-duodénaux (Al-Dissi N. M. & al. in Lastra & al., 2001). La plante est aussi dotée de propriétés antioxydantes (Hernandez V. & al, 2005; Manez S. & al, 1999)

Notre étude consiste en la recherche de l'activité biologique des extraits des feuilles et des fleurs vis-à-vis de trois souches bactériennes *d'Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Préparation du matériel végétal

La récolte de la plante a été effectuée aux alentours de la ville de Kenitra, en Août 2006, période qui coïncide avec la pleine floraison. Les feuilles et les fleurs ont été séchées séparément à l'air libre à l'abri de la lumière et de l'humidité, puis conservées jusqu'au moment de l'extraction.

Après broyage des feuilles et des fleurs on a procédé par deux types d'extraction : au soxhlet à l'éthanol et au méthanol ; et par macération à l'acétone. Les extraits obtenus ont été filtrés et concentrés au rotavapor.

Les extraits fixes obtenus ont été dilués dans de l'éthanol à 70 % pour la réalisation des tests en milieux solides, par diffusion (Biondi & al in Hmamouchi J., 2002).

2.2. Calcul des rendements :

Le rendement n'est autre que la quantité d'extrait obtenue à partir d'une matière végétale, il est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche. En pratique, on pèse 5g de matériel végétal qu'on met à une étuve à 104 +/- 2°C pendant 4 heures, après refroidissement, on repèse la masse du végétal séché. La différence des deux pesées permet de calculer l'humidité selon l'équation :

$$\mathbf{H (\%) = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100}$$

H (%) : pourcentage de l'humidité,

m0 : Masse de l'échantillon avant étuvage en g,

m1 : Masse de l'échantillon après étuvage en g

Le rendement est calculé par rapport à la quantité de matière sèche initialement

utilisée.

$$R (\% \text{ MS}) = M_1 \times 10^4 / [M_0 (100 - H (\%))]$$

R (% MS) : Rendement en extraits fixes en g /100g de matière sèche

M1 : quantité d'extrait récupérée exprimée en g

M0 : quantité utilisée pour l'extraction exprimée en g.

MS : Matière sèche, avec MS = 100 – H (%).

2.3. Tests de l'activité antimicrobienne :

2.3.1. Souches :

Les souches utilisées dans le présent travail sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme. Ils nous proviennent de différents prélèvements cliniques du CHU de Rabat. Il s'agit de :

- une souche bactérienne à Gram négatif : *Escherichia coli*.
- deux espèces à Gram positif : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

2.3.2. Tests :

Pour les essais des activités antibactériennes nous avons utilisé la technique de diffusion en milieu gélosés de Muller Hinton en boîtes de Petri. Les milieux sontensemencés par quelques millilitres de l'inoculum (10^6 UFC/ml pour les espèces bactériennes (Cavallo J.D., 2006)) de façon à recouvrir toute la surface gélosée. Les boîtes de pétri sont ensuite mises à sécher 15 min à 37°C.

A l'aide d'emporte-pièce stérile ont été effectué des puits de 6 mm de diamètre, qui recevront chacun 50 µl de la solution à tester (*extrait pur, extrait dilué ou éthanol à 70% comme témoin*). Les boîtes sont incubés dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

2.3.3. Lecture des résultats

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du puits contenant l'extrait à tester. La lecture s'effectue

par la mesure du diamètre d'inhibition observé. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix (Ponce & al, 2003), (Duraffourd C. & al, 1990) : est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (+ +), extrêmement sensible (+ + +), celle ayant un diamètre $D < 8\text{mm}$, $9\text{mm} \geq D \leq 14\text{mm}$, $15\text{mm} \geq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$.

2.4. Analyse phytochimique :

La réalisation de la CPG-SM a été effectuée au Centre national Scientifique et Technique de rabat (CNRST-Rabat). La séparation et l'identification des composés volatils ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (type : trace GC ultra) couplé à un spectromètre de masse (type : polaris Q). Les conditions de l'expérience sont comme suit :

La colonne utilisée est la V 65 (95 % diméthylpolysiloxane ; 5 % diphényl) ; Comme phase mobile l'Hélium pur avec un débit de 1 ml/min ; Mode d'injection : split ; le volume d'injection est de 1.0 μL ; la température de l'injecteur : 250 °C celle de l'interface : 300 °C et Les spectres de masse ont été de : $m/z = 40$ jusqu'à $m/z = 450$.

3. Résultats :

3.1. Rendements des extractions :

Les rendements pour les différentes fractions varient entre 31,72 % et 13,48 % (figure 1). Parmi les trois solvants utilisés, c'est le méthanol (le plus polaire) qui a donné les valeurs les plus élevées. Concernant l'organe utilisé les rendements les plus élevés ont été obtenus à partir des feuilles.

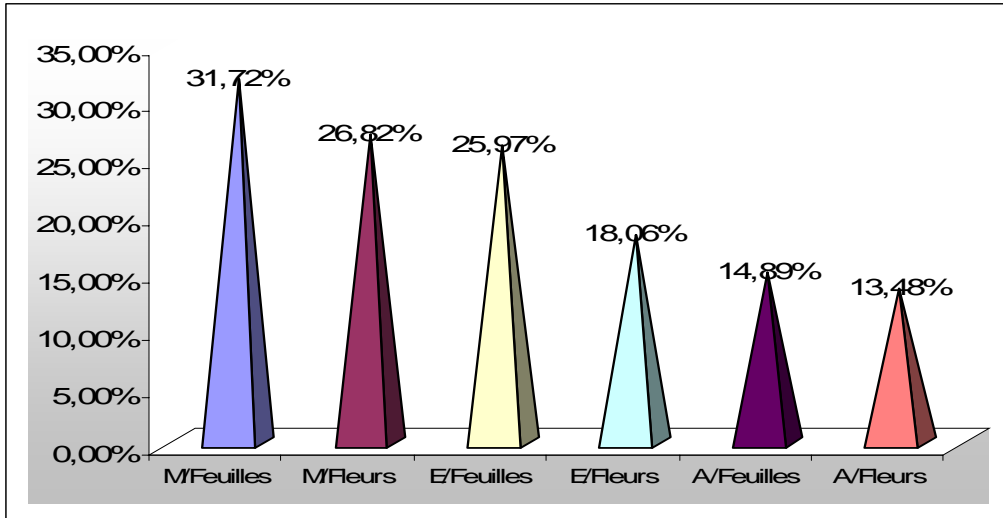


Figure 1 : Rendements des extraits de *D. viscosa*

M/Feuilles : extraction à partir des feuilles par soxhlet au solvant Méthanol,
M/Fleurs : extraction à partir des fleurs par soxhlet au solvant Méthanol,
E/Feuilles : extraction à partir des feuilles par soxhlet au solvant Ethanol,
E/Fleurs : extraction à partir des fleurs par soxhlet au solvant Ethanol,
A/Feuilles : extraction à partir des feuilles par macération au solvant Acétone,
A/Fleurs : extraction à partir des fleurs par macération au solvant Acétone

Les résultats présentés dans le tableau (I) montrent que tous les extraits purs sont extrêmement actifs sur les souches bactériennes de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* quelque soit l'organe et le solvant d'extraction. Par contre, nos résultats montre une corrélation entre le solvant d'extraction des dilutions et l'effet antibactérien. En effet, les extraits à l'acétone perdent leur effet à partir de la dilution 1/100 sur l'ensemble des souches testées. Seuls, les extraits de fleurs au méthanol préservent une activité jusqu'aux au 1/100^{ème} de dilutions sur les 3 souches. Pour, les autres extrais, E1, E2 et E3, l'effet antibactérien des dilutions au 1/100 varie en fonction de la souche utilisée et du solvant d'extraction.

Tableau I : résultats des tests de sensibilité des trois souches aux extraits purs et à leurs dilution.

Type d'extrait	Dilutions							
	Souches	Pur	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200
E1 Feuilles à l'éthanol	<i>S. aureus</i>	+++	++	+	+	+	+	-
	<i>S. epidermidis</i>	+++	++	+	+	-	-	-
	<i>E. coli</i>	+++	++	++	+	+	+	-
E2 Fleur à l'éthanol	<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	++	++	-	-
	<i>S. epidermidis</i>	+++	++	++	++	+	+	-
	<i>E. coli</i>	+++	+++	++	++	+	+	-
E3 Feuilles au méthanol	<i>S. aureus</i>	+++	++	+	+	+	-	-
	<i>S. epidermidis</i>	+++	++	++	++	+	+	-
	<i>E. coli</i>	+++	+	+	+	+	-	-
E4 Fleurs au méthanol	<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	++	+	+	-
	<i>S. epidermidis</i>	+++	++	++	++	+	+	-
	<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	++	++	+	-
E5 Feuilles à l'acétone	<i>S. aureus</i>	+++	+++	++	+	+	-	-
	<i>S. epidermidis</i>	+++	++	++	+	+	-	-
	<i>E. coli</i>	+++	++	++	+	+	-	-
E6 Fleurs à l'acétone	<i>S. aureus</i>	+++	+++	++	+	+	-	-
	<i>S. epidermidis</i>	+++	++	+	+	-	-	-
	<i>E. coli</i>	+++	++	++	+	+	-	-

3.2. Analyse phytochimique :

Lors de l'analyse par CPG, les composés sont rapidement volatilisés, puis poussés par le gaz vecteur (l'hélium), vers le colonne analytique, et selon leurs affinités respectives avec la phase stationnaire, ils avanceront plus ou moins vite, et le temps mis jusqu'à leur sortie de la colonne correspond au temps de rétention (RT).

Nous avons analysé les extraits au méthanol qui ont un rendement d'extraction le plus important et qui ont le meilleur effet antibactérien. Dans le tableau (II) on récapitule les résultats de l'analyse phytochimique et les chromatogrammes sont présentés dans les figures 2 et 3.

La composition des extraits au méthanol montre une diversité chimique et une dissemblance quantitative et qualitative entre les fleurs et les feuilles. En effet, le 2-(2-Methoxyphenyl)-1H-pyrrole est présent à 23 % dans l'extrait des feuilles et seulement à 14 % dans celui des fleurs. Germacrene-D, compte 17 % de la composition de l'extrait des fleurs, contre seulement 6 % de celle de l'extrait des feuilles, et comme dissemblance qualitative, le cas du : 1-Naphthol, 1,2,3,4-tetrahydro-4,5,7-trimethyl- (CAS) qui constitue 11% de l'extrait des fleurs et indécélable dans celui feuilles.

Tableau II : Composition chimique qualitative et quantitative des extraits au méthanol (RT : temps de rétention ; E3 : feuilles au méthanol ; E4 : fleurs au méthanol)

RT	Composé	E3	E4
20.87	Caryophyllene	7.27 %	13.53 %
22.79	Germacrene-D	5.95 %	16.95 %
25.81	(-)-Caryophyllene oxide	3.85 %	5.97 %
29.09	1,1'-Bi(5,5'-dimethoxy-2,2,2',2'-tetramethylindan)	10.84 %	4.39 %
38.77	2-(2-Methoxyphenyl)-1H-pyrrole	22.95 %	13.78 %
41.59	1-Naphthol, 1,2,3,4-tetrahydro-4,5,7-trimethyl- (CAS)	Non détecté	11.15 %

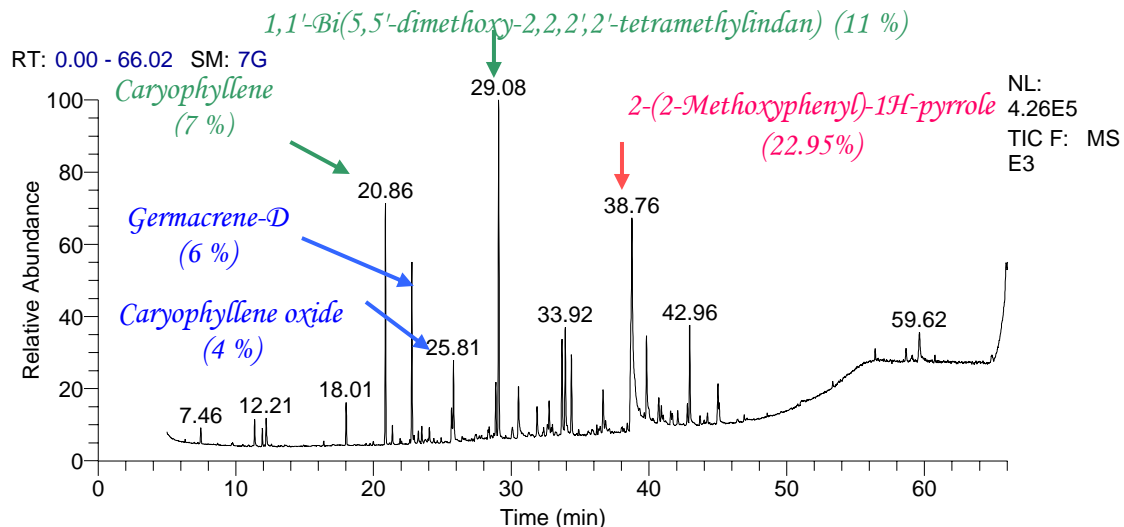


Figure 2 : Chromatogramme de l'extrait des feuilles au méthanol (E₃)

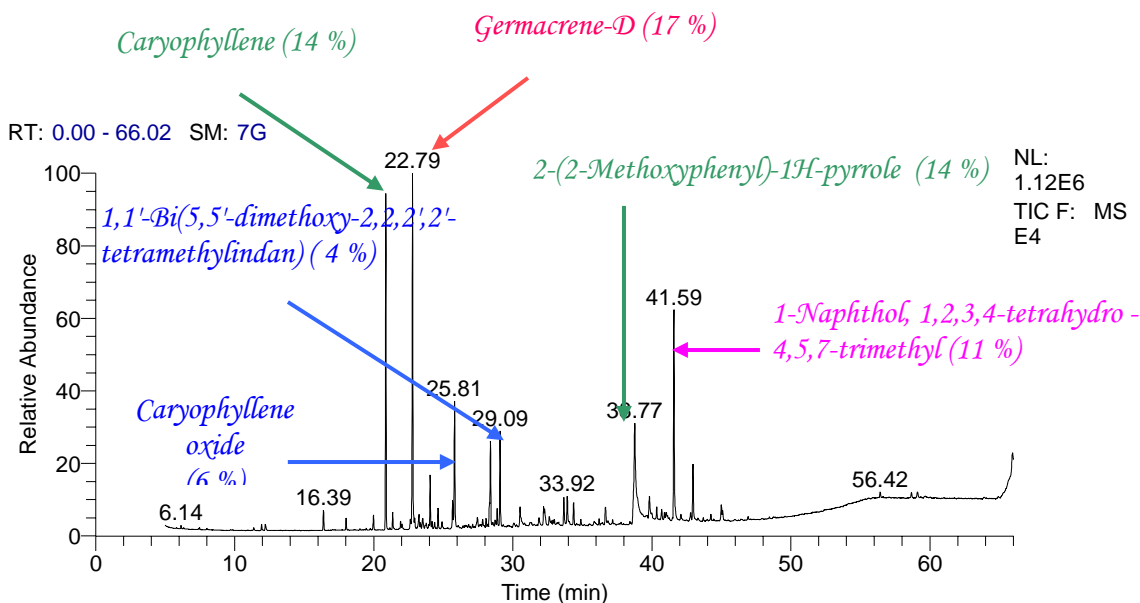


Figure 3 : Chromatogramme de l'extrait des fleurs au méthanol (E₄)

Discussion :

Les tests de sensibilité aux différents extraits de *D. viscosa*, nous ont permis de révéler la présence d'une activité antibactérienne des différents extraits. Ce résultat corrobore, d'une part, les travaux de M.S. Ali-Shtayeh & al, 1998 et M. Maoz & I. Neeman, 1998 qui ont noté une activité antibactérienne des extraits de *D. viscosa* vis-à-vis des bactéries à Gram+ et à Gram-. Et d'autre part, ils expliqueraient au moins en partie l'efficacité de la plante dans la pharmacopée traditionnelle, pour le traitement les infections cutanées et gastro-intestinales Bellakhdar J., 1997 ; Al-Dissi N. M. & al. in Lastra & al., 2001. Par ailleurs, nos résultats montrent que les activités antibactériennes sont en relation avec l'origine de l'extrait (feuille ou fleur), la nature du solvant et la souche testée. En effet, les extraits au méthanol sont les plus actifs, suivis par ceux à l'éthanol, puis ceux à l'acétone. Ce ci pourrait être expliqué par le fait que le méthanol (solvant le plus polaire) est capable d'extraire le maximum des principes actifs appartenant à diverses classes de métabolites. La souche *Escherichia coli* a montré la plus grande sensibilité aux différents extraits, suivie par les deux staphylocoques.

Enfin Cette action anti-microbiennes peut être expliquée par le fait que la plante produit différents métabolites secondaires appartenant à certaines classes connues pour avoir ce type d'activité tel : les composés phénoliques (Stavrianakou S. & al., 2005) et terpénoïdes (Ceccherelli P. & al., 1985 ; Grande M. & al., 1992

En définitive, la composition des extraits au méthanol montre une diversité chimique et une dissemblance quantitative et qualitative entre les fleurs et les feuilles ce qui pourrait expliquer la relation entre les activités antibactériennes et l'origine des extraits démontrée dans ce travail.

Références Bibliographiques :

- Abil alkhair alichbili (12^{ème} siècle).** Umdat Attabib fi Maârifat Annabat. Edition de l'Academie du Royaume du Maroc (1990). Tome 1- Tome 2.
- Al-Dissi N. M., Salhab A. S., Al-Hajj H. A.; (2001).** Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats Journal of Ethnopharmacology. Vol.77, p: 117–121.
- Ali-Shtayeh M.S., Yaghmour R.M.-R., Faidi Y.R., Salem K., Al-Nuri M.A.; (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. Journal of Ethnopharmacology 60 265–271.
- Bellakhdar J.; (1997).** La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press. 764pp.
- Cavallo J.D., Chardon H., Chidiac C., Choutet P., Courvalin P., Dabernat H., Dugeon H., Dubreuil L., Goldstein F., Jarvalier V., R.LeclercQ, M. H. Nicolas-Chanoine, Philipon A., Quentin C., Rouveix B., Sirot J. & Soussy C.J ; (2006).** Communiqué de la Comité Française de l'Antibiogramme. Société Française de Microbiologie. Edition de janvier 2006
- Ceccherelli P., Curini M., Marcotullio M. C. & menghinA. I ;(1985).** Sesquiterpene Acids from *Dittrichia viscosa*. Phytochemistry, Vol. 24, N°.12, P: 2987-2989
- Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lapraz J.C.; (1990).** Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2^{ème} Edition Masson (Paris). 87 pp
- Grande M., Torres P., Piera F. & Bellido I. S.; (1992).** Triterpenoids from *Dittrichia viscosa*. Phytochemisry, Vol. 31, N°. 5, p: 1826-1828.
- Hernandez V., Manez S., Rechio M. C., Giner R.M. & Rios J.L.; (2005).** Anti-inflammatory profile of déhydrocistic acid, a novel sesquiterpene acid with a pharmacophoric conjugated diene. European journal of Pahraceutical Sciences (Editions Elsevier). 26, p: 162-169.
- Hmamouchi J.; (2002).** Contribution à l'étude chimique et antimicrobienne de 94 plantes médicinales marocaines et valorisation pharmacologique d'Origanum

compactum (BENTH). thèse de doctorat. Université mohamed V-Souissi, rabat.

Manez S., Rechio M.D.C., Gil I., Gomez C., Giner R-M., Waterman P.G. & Rios J.L.; (1999). A glycosyl Analogue of Diacylglycerol and Other Antiinflammatory Constituents from *Inula viscosa*. American chemical society and American society of pharmacognosy. J. Nat. Prod. 62, p: 601-604.

Maoz M., Neeman I.; (1998). Antimicrobial effects of aqueous plants extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and three bacterial species. Letters en Applied microbiology 26 pp 61-63.

Maoz M., Neeman I.; (2000). Effect of *Inula Viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans* Journal of Ethnopharmacology 71 pp 479–482.

Melitiou-Christou M.S., Banilas G.P., Diamantoglou S.; (1998). Seasonal trends in energy contents and storage substances of Mediterranean species *Dittrichia viscosa* and *Thymelaea tartonraira*. Environmental and Experimental Botany. (Elsevier). 39, p: 21-32.

Nègre R.; (1962). Petite Flore des régions Arides du Maroc Occidental. Tome I et II. Editions du centre National de la Recherche Scientifique. 566pp

Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. Roura S.I. ; (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Society of Food Science and Technology (Elsevier). 36 p: 679-684.

Stamatis G., Kyriazopoulos P., Golegou S. , Basayiannis A. , Skaltsas S. & Skaltsa H.; (2003). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines Journal of Ethnopharmacology 88 175–179.

Stavrianakou S., Liakopoulos G. & Karabourniotis G. ; (2005). Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (*Asteraceae*). Environmental and Experimental Botany (Elsevier). p : 293-300.

Zeggwagh N.A., Ouahidi M.L., Lemhadri A., Eddouks M.; (2006). Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 108, p: 223–227.