

Effet antimicrobien de l'huile essentielle du Zaatar / C. Hilan, S. Dagher, E. Satout. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — n° 1 (1998), pp. 375-384.

Bibliographie. Tableaux.

I. Phytothérapie. II. Plantes médicinales — Liban. III. Plantes — Liban. IV. Plantes aromatiques — Liban.

Dagher, S.. — Satout, E.

PER L1049 / FA56156P

EFFET ANTIMICROBIEN DE L'HUILE ESSENTIELLE DU ZAAATAR

C. HILAN
S. DAGHER
E. SATOUT

RÉSUMÉ

La consommation du «Zaatar» au Liban (*Origanium syriacum*) entre dans les habitudes culinaires du pays. Mélangé avec le sésame et le sumac, il est ensemencé sur la pâte nommée «Mankouché» consommée au petit déjeuner. L'extraction de l'huile essentielle à partir des sommités fleuries et feuilles de la plante permet de pousser les expérimentations concernant les caractéristiques de cette huile et ouvrir de nouveaux horizons pour l'exploiter sur le plan industriel.

L'huile essentielle extraite par la distillation à l'eau est analysée qualitativement et quantitativement sur la chromatographie en phase gazeuse, deux composants principaux le thymol et le carvacrol sont identifiés et dosés, la concentration du thymol est de 11% et celle du carvacrol est de 66,8%.

Il s'est avéré que l'huile essentielle est plus efficace que les antibiotiques testés contre les bactéries et la levure suivants: *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Staphylocoque aureus*, *Streptocoque fecalis*.

ABSTRACT

The plant *Origanium syriacum* known commonly in Lebanon as «Zaatar» grows wild in vast areas of the country. The leaves and flowers of this plant are dried, ground and formulated into a food commonly consumed in Lebanon particular for breakfast in the form of a baked pastry known as «Mankouche». The extraction and separation of volatile oil of «zaatar» allows in depth studies of its characteristics and pave the way for further investigation and eventual exploitation of the plant.

In this study the volatile oil of zaatar was collected by simple distillation and analysed by gas chromatography to determine the identity and quantity of its major components. In this respect carvacrol was found to be the major constituent comprising of the oil, while thymol was present at the level of 11%. Other components which were 16 in numbers were judged to be minor constituents and were present in very small concentrations.

The oil was also investigated for its antimicrobial effect on several bacterial strains and one yeast species. It was demonstrated that this oil had outstanding antibacterial properties and was shown to be much more potent than the tested antibiotics which are in common use.

The following organisms were found to be very susceptible to the action of the zaatar oil: Bacillus subtilis, Candida albicans, Escherichia coli, Klebsiella azaenae, Salmonella paratypi, Staphylococcus aureus, Streptococcus fecalis, Pseudomonas aeruginosa.

INTRODUCTION

Il est bien connu que toutes les plantes médicinales contiennent des substances actives qui peuvent servir comme matière première dans la fabrication des produits pharmaceutiques, car elles ont sur l'organisme un effet plus bénéfique que la même substance obtenue par chimiosynthèse (CLEMENT, 1979).

La substance active, issue de la plante, n'est pas uniquement un composé chimique, mais présente un équilibre physiologique. Elle est mieux assimilable par l'organisme et ne présente pas d'effets nocifs. C'est en cela que réside le grand avantage de la médecine naturelle (BRUNETON, 1987).

Le Zaatar ou le thym nommé en latin *Origanum syriacum* (MOUTERDE, 1986), consommé habituellement au Liban, est une des plantes médicinales les plus appréciées et dont l'effet antimicrobien est encore ignoré. Il a une grande extension géographique car il est localisé dans les montagnes et sur le littoral, de la région basse à la région subalpine (THIEBAUT, 1953).

De même, le Zaatar est utilisé comme plante aromatique dans les divers plats (SVENDSEN *et al.*, 1985). Il entre dans les habitudes culinaires du pays. Desséché, moulu, puis mélangé à une faible proportion des graines de sésame

grillées, du sumac (*Rhus coriaria*) desséché, et de l'huile d'olive, il est ensemencé sur une pâte de pain cuite, formant la Mankouché que la plupart des libanais consoient au petit déjeuner.

Comme plante médicinale, l'origanum entre dans la composition des tisanes antitussives, car il est désinfectant, expectorant et antispasmodique (VOLAK et STODORA, 1983).

Il est efficace en cas d'inappétence, de troubles gastriques ou biliaires et contre la diarrhée. Une infusion de Zaatar agit contre la fatigue nerveuse, l'asthénie générale de l'organisme et contre les troubles sexuels, (VOLAK et STODOLA, 1983). Il a été démontré dernièrement (BEZANGER et BEAUQUESNE, 1990) que le thymol manifeste des propriétés antimicrobiennes aussi bien qu'antifongiques utilisables contre les caries dentaires.

Les objectifs de l'étude du Zaatar Libanais (*Origanum syriacum*) sont:

- L'obtention de l'huile et l'identification de ses deux composantes principales.
- La variation dans la composition du Thymol et du Carvacrol suivant le stade de maturité de la plante, en vue de déterminer la meilleure date de la cueillette.
- L'effet antimicrobien de l'huile essentielle. Étude de l'effet bactériostatique et de l'effet bactériolytique de l'huile contre des germes pathogènes alimentaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

La collecte des échantillons s'est effectuée dans une région du Liban Nord à 950 m. d'altitude, où les facteurs climatologiques sont favorables à la pousse du zaatar libanais (*Origanum syriacum*). Plusieurs stades de croissance de la plante ont été choisis: avant la floraison, au cours de la floraison et post floraison. Les tiges portant feuilles et fleurs sont séchées à l'ombre et conservées à la température ambiante jusqu'au moment où elles sont soumises à la distillation pour extraire l'huile essentielle.

Les matériels et instruments utilisés pour l'extraction, l'analyse chimique et l'étude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle du Zaatar sont:

- 1) Appareil à distillation en verre, ordinaire.
- 2) Equipements et matériel d'un laboratoire de microbiologie.

3) Chromatographie à gaz Perkin Elmer: le gaz vecteur du mélange est l'azote, le détecteur est un FID (ionisation de flamme) et la colonne capillaire utilisée est du type carbowax 20M, en acier inoxydable, 6 ft de long et 1/8 inch de diamètre (RHYU, 1979).

4) Les milieux de culture utilisés sont: bouillon nutritif, gélose de soya, gélose de sabouraud, gélose de Mac Conkey, gélose de Mannitol, gélose nutritive et gélose au sang, gélose SS (*Salmonella Shigella*). Tous ces milieux sont lyophilisés et préparés par la compagnie Difco.

5) Les organismes de référence testés sont: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus fecalis*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

6) Les antibiotiques utilisés sont: La sulfate de streptomycine à la dilution de 0,01 g/ml d'eau et la Kanamycine à la dilution de 0,1 g/ml d'eau.

La distillation à l'eau consiste à porter l'eau à ébullition, à condenser les vapeurs émises et à recueillir le liquide formé par condensation. Les fleurs et les feuilles sont fragmentées et macérées dans de l'eau froide pendant une demi-heure (600 ml d'eau pour 100g de l'échantillon).

La chromatographie en phase gazeuse débute par un conditionnement de la colonne carbowax 20M à une température d'utilisation supérieure à 130°C pour éliminer les impuretés volatiles de la phase stationnaire. Cette colonne est alors traversée par l'azote comme gaz vecteur durant une nuit généralement. Des paramètres permettent de fixer précisément la vitesse d'ébullition: ce sont la température du four et de la colonne, et le débit des gaz:

- flux d'hydrogène: 40 ml/minute;
- flux de l'air: 450 ml/minute;
- flux de l'azote: 30 ml/minute.

Plusieurs essais ont été faits afin d'accéder à la fixation des paramètres adéquats et efficaces pour l'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de zaatar (GUENTHER, 1952).

Une courbe étalon a été tracée en prenant cinq concentrations différentes du thymol ou du carvacrol de référence:

- Le premier, présenté sous forme de cristaux, est pesé à 7 mg, 5,25 mg, 3,5 mg, 2,25 mg et 1 mg. Chaque pesée est diluée dans 1 ml de la solution composée de 20 ml d'Hexane et de 40µl d'anisaldéhide choisi comme étalon interne.

- Le second, liquide visqueux, est dosé à 10 μ l, 7,5 μ l, 5 μ l, 3,5 μ l et 2 μ l. Chaque volume est dilué dans 1 ml de la solution composée de 20 ml d'Hexane et 40 μ l d'anisaldéhide.

Les concentrations de l'huile dans l'alcool (μ l/ml) utilisées sont représentées selon le tableau suivant:

Tableau n°1: Les concentrations de l'huile dans l'alcool

Dilution	Huile	Alcool	Concentration
1/2	0,5 ml	0,5 ml	2,5 μ l/ml
1/3	0,5 ml	1 ml	1,6 μ l/ml
1/6	0,5 ml	2,5 ml	0,8 μ l/ml
1/11	0,5 ml	5 ml	0,45 μ l/ml

Les disques en papier filtre, préalablement stérilisés, sont imbibés de 5 μ l des 4 dilutions de l'huile sus mentionnées, puis mis pendant ½ heure dans l'incubateur à 37°C. D'autres disques sont imbibés à la même concentration d'alcool ou de l'antibiotique sus mentionné.

Le dénombrement des germes en vue de définir les concentrations bactériennes adéquates à l'étude de l'effet antimicrobien se fait par la technique de dilutions en série.

Pour chaque concentration bactérienne, 1 ml de bouillon de culture est mélangé dans une boîte de pétri avec 20 ml de milieu de culture. Après gélification à la température ambiante, les disques en papier filtre de différentes dilutions sont mis à la surface des géloses qui seront par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures. La zone d'inhibition est alors mesurée et les résultats enregistrés.

Le dénombrement de bactéries et la mesure de la zone d'inhibition permettent la détermination de la concentration de bactéries et la dilution de l'huile essentielle qui doivent être utilisées dans le but d'étudier l'effet bactériostatique et bactériolytique. 10 ml de bouillon de culture à la concentration bactérienne désignée sont mélangés avec une quantité de l'huile essentielle à la concentration convenable préétablie. 1 ml du mélange est prélevé à 0, 1, 2, 5 et 10 minutes et ensemencé sur la gélose qui sera incubée pendant 24 heures à 37°C. L'énumération des colonies bactériennes est alors effectuée et les résultats enregistrés.

Chaque test est répété à plusieurs reprises afin d'éviter toute erreur et aboutir à des résultats fiables.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Suite à la distillation à l'eau des échantillons de la plante de zaatar, un mélange total de 140 ml de liquide laiteux et de l'huile essentielle à été collecté. La proportion en huile varie de 3 à 5%; elle a été prélevée de la surface du mélange après l'avoir laissé au repos pendant une demi heure. L'huile recueillie a été conservée à +4°C.

La détermination quantitative par la chromatographie en phase gazeuse des deux constituants principaux de l'huile de zaatar à ses divers stades de croissances est représentée par le tableau suivant.

Tableau n°2: Détermination des concentrations de Carvacrol et du Thymol en fonction des stades de floraison

Stade de floraison	Concentration du Carvacrol	Concentration du Thymol
Pré-floraison	30%	32,5%
Début de floraison	63%	9,3%
Pleine floraison	65,5%	4%
Floraison avancée	75,9%	20,3%
Floraison très avancée	61,8%	13,8%

On constate que la concentration du thymol est minimale au stade de floraison, celle du carvacrol est minimale au stade de pré-floraison. Mais au stade de floraison avancée les concentrations des deux principales composantes sont maximales.

Le mélange de toutes les huiles recueillies a donné la concentration en carvacrol de 66,8% et la concentration en thymol de 11%. Ce mélange a été utilisé pour l'étude bactériologique.

Les diamètres des zones d'inhibition correspondant à 4 dilutions d'huile essentielle et à 3 concentrations bactériennes différentes, sont mesurés en mm. Ils figurent dans le tableau 3. Le diamètre du disque en papier filtre est de 6mm.

1- Le *Bacillus subtilis* présente une zone d'inhibition maximale 36,1 mm. à la concentration bactérienne 10^{-3} (21×10^4 organismes/ml.) et à la concentration d'huile de 1,6 microlitre/ml. La valeur de cette zone d'inhibition est double de celle provoquée par la streptomycine.

2- L'huile essentielle du zaatar provoque une zone d'inhibition maximale 48,58mm. à la concentration de levures *Candida albicans* 10^{-3} (64×10^2

organismes/ml.) et à la concentration de l'huile de 2,5 microlitres/ml. Elle a été prouvée plus efficace que la kanamycine.

3- À la concentration bactérienne d'*Escherichia coli* 10^{-2} (52×10^5 organismes/ml.) et à la concentration d'huile 1,6 microlitre/ml la zone d'inhibition enregistrée est maximale 29,42 mm. Elle est de loin meilleure que celle provoquée par la streptomycine.

4- À la concentration bactérienne de *Klebsiella ozaenae* 10^{-3} (92×10^3 organismes/ml.) et à la concentration d'huile 2,5 microlitres par ml. La zone d'inhibition enregistrée est maximale 31,8mm.

5- Le *Pseudomonas aeruginosa* s'est avéré résistant à toutes les dilutions d'huile essentielle du zaatar en présence des diverses concentrations bactériennes.

Tableau n°3: Comparaison de l'efficacité de l'huile de Thym par rapport aux antibiotiques

Concentration bactérienne	Dilution et concentration d'huile				Antibiotique	Alcool
	1/2 2,5 µl/ml	1/3 1,6µl/ml	1/6 0,8µl/ml	1/11 0,45µl/ml		
<i>Bacillus Subtilis</i> 10^{-1}	33,5	30,7	18,83	10,83	15,25	0
10^{-2}	29,2	35,42	15,42	9,67	17,92	0
10^{-3}	27,5	36,1	15	10,42	15,92	0
<i>Candida Albicans</i> 10^{-1}	37,25	29,16	23,66	11,41	15	0
10^{-2}	35,33	37,25	20,75	11	16,5	0
10^{-3}	48,58	37,8	26	10,16	15,5	0
<i>Escherichia coli</i> 10^{-1}	21	21,2	15,58	9,42	9	0
10^{-2}	24,92	29,42	13,33	9,66	8	0
10^{-3}	23,75	24,08	14,5	11	9,58	0
<i>Klebsiella ozaenae</i> 10^{-1}	26	22,5	15,5	12,25	23,6	0
10^{-2}	28,4	22,2	14,6	10,4	25,5	0
10^{-3}	31,8	21,5	15,8	10,4	27,5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10^{-1}	0	0	0	0	12,1	0
10^{-2}	0	0	0	0	17,3	0
10^{-3}	0	0	0	0	16	0
<i>Salmonella paratyphi</i> 10^{-1}	21,2	14,3	11	8,7	15,2	0
10^{-2}	15,8	12,5	11,25	9,1	16,2	0
10^{-3}	16,25	12,7	10,5	9,5	16,4	0
<i>Staphylocoque aureus</i> 10^{-1}	19,75	15,8	11,9	8	16	0
10^{-2}	21	15,75	11	8,3	19,3	0
10^{-3}	24,1	16,5	14,16	8	22,25	0
<i>Streptocoque fecalis</i> 10^{-1}	16,2	12,4	13,1	0	9,7	0
10^{-2}	17,4	13,75	12,3	0	8,2	0
10^{-3}	13,1	10,6	8,8	0	8,4	0

6- La *Salmonella paratyphi*, bactérie à pouvoir pathogène grave, montre la meilleure zone d'inhibition à la concentration d'huile de 2,5 microlitres/ml. et à la concentration bactérienne de 10^{-1} (15×10^5 organismes/ml.). Cette zone d'inhibition est supérieure à celle provoquée par la streptomycine.

7- La zone d'inhibition maximale 24,1mm. correspond à la concentration 10^{-3} de *Staphylocoque aureus* (13×10^4 organismes/ml) et à la dilution d'huile 2,5 microlitres/ml.

8- Le *Streptocoque fecalis* s'est avéré susceptible à la concentration d'huile 2,5 microlitres/ml et à la concentration bactérienne 10^{-2} (19×10^5 organismes/ml). La zone d'inhibition maximale 17,4mm. est supérieure à celle enregistrée avec la streptomycine.

L'effet bactériolytique de l'huile essentielle du zaatar a été déterminé par le dénombrement de bactéries vivantes, unités formatrices de colonies après différents intervalles de temps de contact.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4:

Tableau n°4: L'effet bactériolytique de l'huile en fonction du temps

Microorganismes	0 min.	1 min.	2 min.	5 min.	10 min.
Bacillus subtilis	++	++	++	++	++
Candida albicans	++	++	++	++	920
Escherichia coli	++	++	++	1200	17
Klebsiella ozaenae	24	0	0	0	0
Salmonella paratyphi	+	240	160	0	0
Staphylocoque aureus	++	++	+	+	5000
Streptocoque fecalis	++	+	+	3100	0
++ = pousse bactérienne en film épais. + = pousse bactérienne en film mince.					

L'effet bactériolytique est le plus élevé pour les klebsielles (1 minute) et le plus faible pour les bacillus (plus de 10 minutes). Après 5 minutes de contact, les Salmonelles sont tuées. Mais les *Candidas albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylocoque aureus* et *Streptocoque fecalis* nécessitent une durée de contact autour de 10 minutes avec l'huile essentielle du zaatar pour que ces microorganismes commencent à se lyser.

CONCLUSION

Le zaatar libanais est riche en huile essentielle dont la composition varie suivant les stades de floraison. La concentration maximale au cours d'une floraison avancée peut être expliquée par la hausse du métabolisme secondaire de la plante. Les deux composantes principales de cette huile sont le carvacrol et le thymol. La concentration du premier s'élève au cours de la maturité de la fleur, tandis que la concentration du second s'élève au stade de la préfloraison. La proportion du thymol par rapport au carvacrol est de 1/6.

L'étude de l'effet antimicrobien a prouvé que cette huile a un haut potentiel inhibiteur sur divers microorganismes:

- À la concentration 2,5 microlitres/ml., *Candida albicans* s'est montrée la plus susceptible. Mais le *Streptocoque fecalis* et *Salmonelle paratyphi* se sont montrés assez susceptibles. *Klebsiella ozaenae* a subi un effet bactériolytique après un temps de contact d'une minute. Le *Staphylocoque aureus* a besoin d'un temps de contact dépassant les 20 minutes pour subir l'effet bactériolytique de l'huile de zaatar.

- À la concentration de 1,6 microlitre/ml., *Escherichia coli* s'est montré très susceptible et *Bacillus subtilis* a subi un effet bactériostatique.

- Le *Pseudomonas aeruginosa* s'est montré résistant à toutes les dilutions d'huile essentielle. À une concentration supérieure à 10 microlitres/ml avec une durée de contact variant entre 10 et 40 minutes, l'huile de zaatar a développé un effet germicide sur ce germe antibiorésistant.

Enfin, l'huile essentielle du zaatar s'est montrée plus efficace que les antibiotiques: Kanamycine et Streptomycine. Une exploitation de cette huile sur le plan industriel pourrait être efficace dans l'usage des produits pharmaceutiques et paramédicaux.

L'étude de l'effet antimicrobien des produits chimiquement purs du carvacrol et du thymol s'avère intéressante pour savoir laquelle des deux composantes de l'huile essentielle du zaatar est la plus efficace.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUNETON, J., 1987, *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Lavoisier, Tec et Doc, Paris.
- BEZANGER, L. et BEAUQUESNE, L., 1990, *Plantes médicinales des régions tempérées*, 2^e édition, Malouie, Paris.
- CLÉMENT, J., 1979, *La santé par les plantes*, Baudouin, Paris.
- GUENTHER, Ernest, 1952, *Essential oils*, vol. 1, vol. 3, D. Van Nostrand co., Inc., New York.
- MOUTERDE, PAUL, 1986, *Nouvelle flore du Liban et de la Syrie*, Tome III, Dar al-Machreq, Beyrouth.
- RHYU, Y., 1979, Gas chromatographic characterization of oregano and other selected spices of the labiate family, in *Journal of Food Science* 44, pp. 1373-1387.
- SVENDSEN, A. Baerheim & SCHEFFER, J.J.C, 1985, *Essential oils and aromatic plants*, Martinus Nijhoff and Dr. Wjunk, The Nertherlands.
- THIEBAUT, J. 1953, *Flore libano-syrienne*, CNRS, Paris.
- VOLAK, J. et STODOLA, J., 1983, *Plantes médicinales*, Grund, Paris.