

Effet antimicrobien de l'huile essentielle de l'*Hypericum Thymifolium* Banks et sol / C. Hilan, C. Said et R. el Hajj. — Extrait de : *Annales de recherche scientifique*. — N° 2 (2000), pp. 49-57.

Bibliogr. Tabl.

I. Plantes médicinales. II. Huiles essentielles. III. Antibactériens.

Said, C.. — Hajj, R. el

PER L1049 / FA76633P

Effet antimicrobien de l'huile essentielle de l'*Hypericum Thymifolium* Banks et sol / C. Hilan, C. Said et R. el Hajj. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 2 (2000), pp. 49-57.

Bibliogr. Tabl.

I. Plantes médicinales. II. Huiles essentielles. III. Antibactériens.

Said, C.. — Hajj, R. el

PER L1049 / FA76633P

EFFET ANTIMICROBIEN DE L'HUILE ESSENTIELLE DE L'*HYPERICUM* *THYMIFOLIUM* BANKS ET SOL

C. HILAN¹, C. SAID²,
R. EL HAJJ¹

¹Institut de Recherche Agronomique,
Laboratoire de Fanar.

²Université Saint-Esprit de Kaslik. Faculté
des Sciences Agronomiques.
B.P. 446, Jounieh, Liban.

RÉSUMÉ

L'objectif de cette recherche est l'évaluation du contenu en huile essentielle dans les sommités fleuries de l'*Hypericum thymifolium* Banks et Sol. Les principaux constituants: pinène, β pinène, limonène, linalol, bornéol, carvacrol et thymol ont été identifiés, au moyen de la chromatographie en phase gazeuse et avec la chromatographie en phase liquide à haute performance le taux d'hypéricine dans l'extrait de l'*Hypericum thymifolium* Banks et Sol a été quantifié.

Après l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle des sommités fleuries et de l'*Hypericum thymifolium* Banks et Sol, son activité antibactérienne et antifongique a été déterminée.

L'huile essentielle s'est révélée plus active contre le *Staphylococcus aureus*, le *Pseudomonas aeruginosa*, le *Proteus mirabilis* et le *Streptococcus fecalis* que les antibiotiques testés et recommandés contre ces germes grâce à sa teneur élevée en linalol, thymol, carvacrol et autres produits.

INTRODUCTION

La connaissance des relations entre les plantes médicinales, l'environnement et les conditions écologiques dans lesquelles elles vivent, est indispensable tant pour leur protection que pour leurs utilisations. La région méditerranéenne, avec son climat doux et ensoleillé, est riche en plantes aromatiques médicinales, et la production des huiles essentielles à partir de ces plantes peut constituer une source économique pour notre pays. L'*Hypericum thymifolium* est l'une des plantes utilisées pour des raisons thérapeutiques (Hayek, 1996). Elle appartient à la famille des *Hypericaceae* (ou *Guttiferae*) appartenant au genre *Hypericum*, sous arbrisseau glabre, 80 – 100 cm à rameaux longs, floraison en cyme à fleurs jaunes. Au Liban, on la trouve dans les boisements surtout dégradés, sur les pentes calcaires et marneuses, en association avec d'autres espèces (Mouterde, 1970). Elle est très connue pour son efficacité contre les verrues, l'asthme, les affections des bronches, les insuffisances hépatiques, les digestions difficiles et en applications externes pour calmer les douleurs des rhumatismes et cicatriser les plaies et les ulcères (Poletti, 1988).

Beaucoup de recherches ont été faites sur différentes espèces d'*Hypericum*, telles que l'*Hypericum perforatum* L., l'*Hypericum japonicum*, *reflexum*, etc. Les résultats ont montré des activités antimicrobiennes efficaces sur plusieurs germes tel que le *Staphylococcus aureus* et autres, et des propriétés photosensibilisatrices, conférées par l'hypéricine, un des composants chimiques de la plante (Marsh, 1930).

L'objectif de cette étude est la connaissance spécifique de l'activité de l'huile essentielle de l'*Hypericum thymifolium* pour donner à cette plante une place thérapeutique officielle plus importante que celle de la médecine chimique conventionnelle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les sommités fleuries d'*Hypericum thymifolium* pour les tests des activités antimicrobienne et antifongique ont été récoltées dans une même région du Chouf (Kfarniss), mais pour l'étude de la variabilité du rendement en huile essentielle du distillat, trois régions ont été choisies (Saïda, Kfarniss et Awkar) pour la récolte des échantillons, pendant trois périodes différentes (avant, durant et après la floraison).

L'huile essentielle a été obtenue par distillation à l'aide d'un hydro-distillateur, et avec le Soxhlet par les solvants organiques, l'obtention de l'extrait des fleurs d'*Hypericum thymifolium* a eu lieu (Southwell *et al*, 1990).

L'huile essentielle a été identifiée en utilisant un chromatographe à phase gazeuse (CPG), Shimadzu 17A avec un contrôleur à flux automatique, et un injecteur automatique AOC 17, avec les conditions telles que: le gaz vecteur est l'azote N 50, la colonne est en silice, Supelco Wax 10 (30 m de longueur; 0,53 mm de diamètre interne; 0,5 m d'épaisseur), le flux est de 10 ml/min, le détecteur est un DIF (détecteur à ionisation de flamme), température de l'injecteur = 250°C, la programmation thermique est 75°C (5 min), la rampe est de 4°C/min de 75°C à 220°C (3 min), durée du programme 44 3'', le solvant est l'hexane, l'intégrateur est du type Shimadzu C-R7A. Les standards ont été préparés par dilution dans du méthanol. Le chromatographe à phase liquide de haute performance (CLHP), du type Shimadzu-LC 10A (Pradeau, 1992) a été utilisé pour identifier le taux d'hypéricine dans l'extrait de l'*Hypericum thymifolium*. Les conditions d'analyse ont été comme suit: Colonne LC18 15 cm de longueur, 4,6 mm de diamètre; 5 m de porosité. L'appareil est muni d'un détecteur U.V. visible. La phase mobile est {A: acétonitrile (40%), B: 0,68 mg phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄), dissout dans mille ml d'eau distillée et ajustée à pH 6,8 avec le phosphate de potassium dibasique (K₂HPO₄)}. Le flux est de: 1,5 ml/min, la longueur d'onde: 590 nm. Le diluant est le méthanol.

La méthode du test d'inhibition des organismes et du dénombrement des germes se basait sur la mise en contact des germes *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus fecalis*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans* qui ont été fournis par la Faculté de Santé Publique de l'Université Libanaise et isolées des malades hospitalisés, à différentes concentrations avec l'huile essentielle à plusieurs volumes et en fonction du temps. Après 24 h d'incubation dans le milieu de culture Nutrient Broth, le nombre de germes encore vivants est calculé par l'intermédiaire des boîtes contenant les milieux de culture spécifiques, Müller Hinton, Sabouraud et Kligler Iron Agar produits par la compagnie Biolife Milano-Italy (Hilan *et al*, 1998).

L'antibiorésistance des germes utilisés a été étudiée et testée par les disques d'antibiotiques comme: Céphalexine, Céamandole, Néomycine, Sulfamides, Doxycycline, Fosfomycine, Kanamycine, Ticarcilline, Lincomycine,

Acide nalidixique, Minocycline, Acide oxalinique, Flumequine, avec la technique de diffusion sur gélose de Müller Hinton.

Pour tracer les courbes d'étalonnage des produits, les standards d'huile essentielle et d'hypericine, produits par la compagnie Reidel De Hein ont été utilisés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le choix des trois régions différentes a été basé sur la différence écologique et climatique durant trois périodes différentes du développement de la plante (avant, durant et après la floraison).

Saïda : Altitude: 200-300 m. Sol argilo-calcaire. Site très ensoleillé.

Kfarniss : Altitude: 950-1000 m. Sol calcaire. Site ensoleillé.

Awkar : Altitude: 100-200 m. Sol argilo-siliceux. Site moyennement ensoleillé.

Les tableaux 1, 2 et 3 résument les résultats.

Tab. 1: Variation du rendement en huile essentielle de l'espèce *Hypericum thymifolium* au cours de la phase du développement de la plante dans la région du Saïda.

Période	Masse (g)	V H ₂ O ajouté (ml)	V d'extrait (ml)	V d'huile (ml)	Rendement en huile (%)
Avant floraison	500	750	500	1,7	0,30
Durant floraison	520	750	500	2,0	0,38
Après floraison	500	750	510	2,5	0,50

Tab. 2: Variation du rendement en huile essentielle de l'espèce *Hypericum thymifolium* au cours de la phase du développement de la plante dans la région du Kfarniss.

Période	Masse (g)	V H ₂ O ajouté (ml)	V d'extrait (ml)	V d'huile (ml)	Rendement en huile (%)
Avant floraison	480	730	475	1,3	0,27
Durant floraison	600	750	500	2,0	0,33
Après floraison	550	750	510	2,5	0,45

Tab. 3: Variation du rendement en huile essentielle de l'espèce *Hypericum thymifolium* au cours de la phase du développement de la plante dans la région du Awkar.

Période	Masse (g)	V H ₂ O ajouté (ml)	V d'extrait (ml)	V d'huile (ml)	Rendement en huile (%)
Avant floraison	510	750	500	1,1	0,21
Durant floraison	500	750	500	1,4	0,28
Après floraison	510	750	500	1,9	0,37

Il existe une variation du rendement en huile essentielle selon la région considérée et selon la période de croissance de la plante. De même l'ensoleillement et la nature du sol sont des facteurs d'influence sur le rendement en huile essentielle. Le distillat le plus concentré est dans la région du Saïda après la floraison (0,5%) avec un minimum de concentrations (0,21%) à Awkar avant la floraison.

Une comparaison entre les composants des huiles essentielles de deux espèces d'*Hypericum* est détaillée dans le tableau ci-dessous.

Tab. 4: Comparaison des constituants chimiques de deux espèces d'*Hypericum*.

Huiles Essentielles Standards	Huile essentielle			
	<i>Hypericum thymifolium</i> (1999)			<i>Hypericum perforatum</i> .L (%) (Weyerstahl et al,1995)
	Saïda (%)	Kfarniss (%)	Awkar (%)	
α-pinène	2,17	-	-	67,3
β-pinène	9,12	1,75	1,40	2,70
Limonène	10,76	2,34	1,80	1,00
Linalol	16,39	24,98	22,6	0,50
Bornéol	7,27	12,14	4,10	0,03
Thymol	9,30	13,62	14,0	-
Carvacrol	11,91	10,11	12,2	-

Le tableau 4 montre une différence en pourcentage des composants non seulement entre les deux espèces mais au sein du même espèce (*Hypericum thymifolium*).

Les constituants majeurs sont le linalol, le thymol et le carvacrol pour l'*Hypericum thymifolium* avec des pourcentages inférieurs pour les autres constituants.

En ce qui concerne le taux de l'hypéricine dans l'extrait des fleurs d'*Hypericum thymifolium* des trois lots récoltés dans la région du Kfarniss, la concentration a été de l'ordre de 0,23% en moyenne, résultat très proche de celui de l'*Hypericum perforatum* qui est de l'ordre de 0,215% (Hobbs, 1996).

Cinq souches de bactéries gram-négatives, deux gram-positives et une souche de levure ont été testées avec le distillat d'*Hypericum thymifolium* à plusieurs volumes en fonction du temps et de la concentration microbienne.

Le tableau ci-dessous est une synthèse de tous les tests d'inhibition.

Tab. 5: Nombre de germes inhibés totalement en fonction du temps et en fonction de volume d'extrait d'*Hypericum thymifolium*.

Extrait d' <i>H. thymifolium</i>	1 V			2 V			4 V		
	10'	1 h	24 h	10'	1 h	24 h	10'	1 h	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	120	12000	120	1200	12000	120	1200	12000
<i>Salmonella typhi</i>	-	18	18	18	180	1800	18	180	1800
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	37	37	37	37	37000	37000
<i>Escherichia coli</i>	-	74	74	-	74	74	74	740	740
<i>Proteus mirabilis</i>	24	24	24	24	240	240	24	240	24000
<i>Streptococcus fecalis</i>	-	770	70	-	770	770	-	770	77000
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	-	15	150	150
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	2	2	2

On désigne par:

1 V = 1 ml de la suspension bactérienne ajouté à 1 ml du distillat.

2 V = 1 ml de la suspension bactérienne ajouté à 2 ml du distillat.

4 V = 1 ml de la suspension bactérienne ajouté à 4 ml du distillat.

- = Zéro germe inhibé

Le tableau 5 montre la variation des activités antimicrobienne et antifongique du distillat de l'*Hypericum thymifolium* sur les germes. A titre d'exemple 12000 germes de *Staphylococcus aureus* ont été inhibés avec 1 volume du distillat pendant 24 h et 770 germes de *Streptococcus fecalis* ont été inhibés avec 1 volume du distillat pendant une heure. Le *Staphylococcus aureus* s'est montré le plus susceptible et le *Candida albicans* le plus résistant.

La résistance et la sensibilité des souches utilisées pour le test d'inhibition sont détaillées dans le tableau suivant:

Tab. 6: Antibiogramme, nombre de germes inhibés par différents disques d'antibiotiques, (lecture des résultats après 24h).

Germes	<i>Sta.</i> <i>aureus</i>	<i>S.</i> <i>typhi</i>	<i>P.</i> <i>aerug</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>Pr.</i> <i>mirabilis</i>	<i>St.</i> <i>fecalis</i>	<i>Sh.</i> <i>sonnei</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>
Antibiotiques								
Cefalexine	0	36	0	40	26	0	24	0
Cefamandole	22	56	0	145	57	0	76	0
Neomycine	61	56	9	89	26	68	30	0
Sulfamides	95	91	23	281	0	0	0	0
Doxycycline	137	47	9	89	0	211	0	0
Fosfomycine	111	43	0	110	9	0	55	0
Kanamycine	0	80	4	110	0	0	30	0
Ticarcilline	0	47	0	40	0	0	51	0
Lincomycine	35	0	0	0	0	53	0	0
A.nalidixique	0	65	2	171	0	0	76	0
Minocycline	95	26	3	110	0	171	30	0
A.oxalinique	0	91	9	246	0	0	106	0
Flumequine	0	91	15	246	0	0	93	0
Nombre de germes/ml	1100	640	260	1980	1260	1695	750	1000

Le tableau 6 montre très clairement la résistance du *Candida albicans* aux antibiotiques utilisés avec zéro germe tué par les antibiotiques. Les réactions des autres souches diffèrent les unes des autres suivant la puissance de chaque type d'antibiotique.

D'après ces résultats, l'huile essentielle de l'*Hypericum thymifolium* s'est montrée plus efficace que les antibiotiques utilisés et sa liposolubilité confirme son avantage pour un effet antiseptique.

CONCLUSION

L'*Hypericum thymifolium* (عشبة الثالول) a été moyennement riche en huile essentielle dont la composition varie selon la région et selon les stades du développement de la plante.

Les résultats de la chromatographie gazeuse ont montré une concentration élevée du linalol, du thymol et du carvacrol, par comparaison aux autres composants.

Les pourcentages d'hypéricine dans les fleurs sèches ont été de 0,2 % et 0,25 %. Ces taux sont relativement inférieurs à ceux des médicaments préparés avec l'extrait de l'*Hypericum perforatum* L., standardisés à 0,3 % d'hypéricine. (Hobbs, 1996).

L'étude de l'activité biologique de l'huile essentielle de l'*Hypericum thymifolium* a prouvé que ce dernier a un potentiel inhibiteur élevé sur divers germes étudiés, le *Staphylococcus aureus* s'est montré le plus susceptible, tandis que le *Candida albicans* n'a donné qu'une faible réaction.

Etant donné les bons résultats de la replantation et la reproduction de la plante d'*Hypericum thymifolium* dans différentes régions, la réussite de son exploitation sur le plan industriel est sûre, et comme proposition, une exploitation de l'huile essentielle est efficace dans l'usage des produits pharmaceutiques et paramédicaux.

BIBLIOGRAPHIE

- HAYEK, M., 1996. موسوعة النباتات الطبية، المعجم الثاني، مكتبة لبنان-ناشرون ص. ٨٩.
- HILAN, C., KHAZZAKHA, K., SFEIR, R., 1998. Antimicrobial effect of essential oil of *Salvia libanotica* (Sage), Lebanese Scientific Research Reports, Vol. 3(1), p.8-15.
- HOBBS, C., 1996. [http://www. Healthy.net/library/articles/hobbs/hypericm.htm](http://www.Healthy.net/library/articles/hobbs/hypericm.htm). p.1-14.
- MARSH, C.D., 1930. Toxic effect of St. Jhon's wort (*Hypericum perforatum*) on cattle and sheeps. USDA Technical bulletin ,(202), p.115-120.
- MOUTERDE, P., 1970. Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. Tome II, Dar-El Machreq, Beyrouth, p.522.
- POLETTI, A., 1988. Fleurs et plantes médicinales, Deuxième édition. Paris, p.133.
- PRADEAU, D., 1992. Analyse pratique des médicaments, Tec et Doc lavoisier, Paris, p.419-434.
- SOUTHWELL, A., MALCOLM, H., CAMPBELL .,1990. Hypericin content variation in *Hypericum perforatum* Australia. *Phytochemistry*, Vol.30 (2), p.475-478.