

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2019

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par

BANOUH Radia & AZZOUZ Amel

Thème

*Evaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et
activité antioxydante de l'huile essentielle de clou de girofle
(*Syzygium aromaticum*)*

Soutenu le : 06 / 07/ 2019

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr BOUCHIBANE M.

MAA.

Univ. de Bouira

Président

Mme KARBACHE F.

MCA

Univ. de Bouira

Promotrice

Mr IMESSAOUDENE A.

MAA

Univ de bouira

Examineur

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciement

Au terme de ce projet, nous tenons à remercier sincèrement Dieu, pour sa miséricorde et

Pour nous avoir accordée courage pour réaliser ce travail.

Nous remercions nos parents pour leur patience, générosité ; qui nous ont toujours souhaité beaucoup de motivation et d'encouragement.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur **Mme. KARBACHE** ; son précieux de votre conseil et son aide durant toute la période du travail. Pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être menée au bon part. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury de soutenance composés de Mme .le présidente **Me. BOUCHIBANE** et Examineur **Me. IMESSAUDENE** Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années des études.

Nous tenons à remercier tous nos collègues d'études, particulièrement Notre
Promotion.

Enfin. Nous Tenons A Remercier Egalement toutes Les Personnes dont leur contribution à notre travail est non négligeable, notamment tout le personnel de l'administration, du laboratoire de la faculté de BLIDA et de l'hôpital de BOUIRA.

Dédicaces

Je dédie ce travail à Ma famille AZZOUZ et aux personnes les plus chères au monde mes
chers

Parents ;

A ma très chère mère **Janine** :

Tu es l'exemple de dévouement qui n pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et
Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder

Santé, longue vie et bonheur.

A mon père **Hamou** :

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.
Ce travail est fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Je dédie spécial Mon mari **Hani** pour ses encouragements, sa confiance et son amour.

A mes sœurs et mes frères : *Hassina, Yassemina, Linda, Djamel, Khaled.*

Sortant a ma grand sœur **Hassina** tu es la lumière de ma vie sans votre présence je pourrai
jamais avancer.

A mes neveux et mes nièces: **Mayessan, Selyane, Hocine, Farah, Malak, Ghilas.**

A mon binôme **Radia** qui a partagée avec moi les moments difficiles et agréables passés
ensembles duré ce travail ainsi qu'à toute sa famille.

Mes adorables amis : Kahina, Linda, Samah, et tous mes amis SNV.

Amel

Dédicaces

Je dédie ce travail à Ma famille « **Banouh** » Et aux personnes les plus chère au monde, qui souffert nuit et jour pour nous couvrir de leur amour, mes parents.

A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux ,ma mère « »

A mon père « » pour son patient avec moi et son encouragement

Que le bon ALLAH vous garde en bonne santé

*Je dédie spécial Mon mari « **Sami** »qui n'a jamais cessé de croire source d'amour et de tendresse sans toi ce mémoire n'aurait jamais un le jour*

*A ma meilleure cadeau de ma-vie : Ma Fille **Annais***

A ma sœur : , tante :

A mes frère :

A mon binôme **AMEL** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.je lui souhaite un avenir radieux.

Mes adorables amis :

RADIA

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEUX

INTRODUCTION.....1

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I.1. Historique.....	3
I.2. Définition.....	3
I.3. Localisation des huiles essentielles	4
I.4. Eléments de synthèse des huiles essentielles.....	5
I.5. Rôle des huiles essentielles	5
I.6. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles	6
I.7. Facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	6
I.7.1. Facteurs intrinsèques.....	7
I.7.2. Facteurs extrinsèques.....	7
I.8. Toxicité des huiles essentielles	7

CHAPITRE II : PRESENTATION DE L'ESPACE GIROFLIER

Syzygium aromaticum

II.1. Historique.....	8
II.2. Origine.....	8
II.3. Culture et récolte.....	9
II.4. Le stockage.....	9
II.5. Utilisations des produits du giroflier.....	10

II.6. Clou de girofle.....	10
II.6.1. Classification.....	10
II.6.2. Origine.....	10
II.6.3. Description.....	10
II.6.4. Propriétés de clou de girofle.....	11
II.6.4.1. Activité antibactérienne.....	11
II.6.4.2. Activité antifongique.....	11
II.6.4.3. Activité antivirale.....	12
II.6.4.4. Activité anti inflammatoire.....	12
II.6.4.5. Anti cancérigène.....	12
II.6.4.6. Activité insecticide.....	12
II.6.4.7. Soins buccaux.....	12

CHAPITRE III : MODE MICROBIENNE ET LES DIFFERENTES ACTIVITES

III. Souche bactérienne.....	13
III.1. La morphologie et la structure.....	13
III.2. Escherichia coli.....	13
III.3. Pseudomonas aeruginosa.....	14
III.4. Staphylococcus aureus.....	14
III.5. Souche fongique.....	14
III.5.1. <i>Candida albicans</i>	14
III.6. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	14
III.7. Activité antifongique.....	15

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

I.1. Objectif.....	16
I.2. Présentation du lieu de l'étude expérimentale.....	16
I.3. Matériel	16

I.3.1. Matériel végétal.....	16
I.3.2. Matériel microbien.....	17
I.3.3. Milieux de culture.....	17
I.4. Méthode expérimentale.....	17
I.4.1. Extraction de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> par hydrodistillation....	17
I.4.1.1. chauffage.....	18
I.4.1.2. Relargage.....	18
I.4.1.3. Décantation.....	19
I.4.1.4. Séchage et filtration.....	19
I.5. Détermination du taux d'humidité du matériel végétal.....	20
I.6. Calcul du rendement.....	20
I.7. analyse physico-chimique de l'huile essentielle.....	20
I.7.1. Les propriétés physique.....	20
I.7.1.1. La densité.....	20
I.7.1.2. Indice de réfraction.....	21
I.7.2. les propriétés chimique.....	22
I.7.2.1. La mesure de pH.....	22
I.8. Analyse de la composition chimique d'huile essentielle par CPG.....	23
I.9. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>S.aromaticum</i>	24
I.9.1. Choix des souches.....	24
I.9.2. Milieu de culture.....	25
I.9.3. évaluation de l'activité antibactérienne.....	25
I.9.3.1. Le ré-isolément des souches bactériennes.....	25
I.9.3.2. préparation d'inoculum.....	25
I.9.3.3. L'ensemencement.....	25
I.9.3.4. Préparation des disque d'aromatogramme.....	26
I.9.3.5. Incubation et lecture.....	27
I.9.4. Evaluation de l'activité antifongique.....	27

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Description de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	29
II.1.1. Le taux d'humidité.....	29
II.1.2. Le rendement.....	29
II.2. Analyses physico-chimiques	30
II.2.1. Etude des propriétés organoleptiques.....	30
II.2.2. Les propriétés physiques.....	30
II.2.2.1. La densité.....	30
II.2.2.2. Indice de réfraction.....	31
II.2.3. Les propriétés chimiques.....	31
II.2.3.1. Le pH.....	31
II.3. L'analyse chimique de l'huile essentielle par CPG	32
II.4. Activité anti microbienne	33
II.4.1. Activité anti bactérienne.....	33
II.4.2. Activité anti fongique.....	35
CONCLUSION	37
REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUE	39
ANNEXE	45

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs : Absorbance.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

BCC : bouillon cœur cervelle.

CG : clou de girofle .

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

°C : Degré Celsius.

DO : densité optique. .

E.coli : *Escherichia coli*.

g : Gramme.

H (%):Taux d'humidité.

HE: huiles essentielle.

HEC : huile essentielle de clou de girofle.

HK : hecktoen.

IR : indice de réfraction.

MH: milieu de Mueller Hinton.

ml : millilitre.

NaCl : chlorure de sodium.

pH: potentiel hydrométrique.

R(%): Rendement (%).

S.aromaticum : *Syzygium aromaticum*.

T: Température.

LISTE DES ABREVIATIONS

t_r : Temps de rétention.

μl: Microlitre.

V:Volume.

% : Pourcentage.

Listes des figures

Figure 1 : répartition de clou de girofle à Madagascar.....	8
Figure 2 : Arbre de giroflier.....	9
Figure 3 : clou de girofle.....	10
Figure 4 : les feuilles et les fleurs du giroflier et quelques boutons floraux.....	11
Figure 5 : les parois des bactéries Gram négatif.	13
Figure 6 : Mode d'action des antibiotiques.....	15
Figure 7 : Boutons de clou de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>).	16
Figure 8 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation.....	18
Figure 9 : les étapes de l'hydrodistillation (originale).	19
Figure 10 : Réfractomètre.....	22
Figure 11 : Papier pH.	22
Figure 12 : Chromatographique en CPG.....	23
Figure 13 : L'ensemencement des souches bactériennes.....	26
Figure 14 : Dépôt des disques.....	27
Figure 15 : Mesure des halos d'inhibition.....	27

LISTE DES TABLEAU

Tableau 1 : Les souches bactériennes utilisées lors de notre expérimentation.....	24
Tableau 2 : La souche fongique utilisée.....	24
Tableau 3 : Résultat du taux d'humidité d'HE de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i>	29
Tableau 4 : Résultat du rendement d'HE de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i>	29
Tableau 5 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i>	30
Tableau 6 : Résultat de la densité de l'HE de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i>	31
Tableau 7 : Résultat de l'indice de réfraction.....	31
Tableau 8 : Résultat du pH d'HE de <i>Syzygium aromaticum</i>	31
Tableau 9 : Composition chimique de l'huile essentielle du Clou de girofle.....	32
Tableau 10 : Résultats de l'antibiogramme de l'HEC sur les trois souches bactériennes.....	34
Tableau 11 : résultats se disque d'éthanol sur les trois souches bactériennes.....	34
Tableau 12 : les résultats de l'activité antifongique.....	35
Tableau 13 : les résultats de témoin sur la souche fongique.....	35

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans ces derniers temps, l'importance clinique des thérapeutiques à base des plantes (phytothérapie) a reçu une attention considérable car ils présentent une riche source de médicaments par ce qu'ils produisent une foule de molécules bioactives : Les plantes médicinales comme les autres remèdes thérapeutiques et l'étiologie ont toujours été intégrés à la culture d'une époque, : l'histoire officielle de la phytothérapie prend ses racines il y a plusieurs millénaires. (Small et Catling ; 2000)

La phytothérapie est pour but de désigner le soin par les plantes aromatiques. Elle est considérée comme médecine complémentaire voire alternative pour certains, et elle est souvent perçue comme moins nocive et iatrogène que les médicaments issus de l'industrie chimique elle est souvent utilisée dans l'esthétique. (BELLAMINE, 2017)

Ces différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire. La composition chimique des HE est assez complexe, les composés terpéniques et aromatiques représentant les principaux constituants. (MARCHAND, 2019)

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (Pauli, 2001). Pour tenter de trouver de nouveaux remèdes aux fléaux actuels, la communauté scientifique s'est récemment tournée vers les constituants des huiles essentielles ; Les huiles essentielles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives.

Lors du processus d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, un produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'entraînement des composés volatils. Cette eau, appelée hydrolat, contient en faible quantité des molécules odorantes de la plante ainsi que des composés plus polaires non retrouvés dans l'huile essentielle, et une partie organique qui constitue essentiellement des molécules odorantes. (Catty, 2001; Price et al., 2004).

Notre travail consiste à extraire l'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium Aromaticum*) à fin de réaliser des différentes analyses physico-chimiques et biologiques :

- Dans la première partie, les généralités sur les huiles essentielles et l'aromathérapie sont développées, afin de mettre en lumière les différentes caractéristiques des huiles essentielles et leur usage; Le lien entre la structure biochimique des huiles essentielles et leurs propriétés qui est important à remarquer.
- La deuxième partie de ce document est consacré à une synthèse bibliographique sur clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), ainsi qu'un aperçu général sur les activités : antibactérienne, antifongique et antioxydante de l'huile essentielle de notre plante.
- La troisième partie est consacrée à la partie expérimentale, à savoir : Extraction des huiles essentielles de clou de girofle par la méthode chromatographie à phase gazeuse, puis faire une analyse chimique et physique de l'huile essentielle, en fin, évaluer les activités antibactérienne, antifongique et antioxydante de cette l'huile essentielle.

PARTIE I :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
GENERALITE SUR LES
HUILES ESSENTIELLES

I. Généralité sur les huiles essentielles

I.1. Historique

Les huiles essentielles (HE) sont connus depuis des millénaires pour leur action bénéfique sur l'homme. Quatre mille ans avant JC, les égyptiens utilisaient déjà les HE comme parfum dans les momifications des corps. Il faudra attendre le XIV^{ème} siècle pour voir apparaître la généralisation de la production et de l'utilisation des HE, grâce aux travaux sur les HE de romarin, de bois de genièvre, de lavande. (Lamaty et *al*, 1997)

Selon Ntezurubanza (2000), l'histoire de l'aromathérapie, qui est celle des huiles essentielles, peut se résumer en quatre époques suivantes :

L'époque au cours de laquelle étaient utilisées des plantes aromatiques telles qu'elles ou sous forme d'infusion ou de décoctions.

Celle dans laquelle les plantes aromatiques étaient brûlées ou mises à infuser ou à macérer dans une huile végétale. A cette époque, intervient la notion d'activité liée à la substance odorante.

La troisième correspond à la recherche de l'extraction de cette substance odorante. Il apparaît le concept " Huile essentielle " qui aboutit à la création et au développement de la distillation.

Enfin, la dernière qui est la période moderne dans laquelle la connaissance des composants des huiles essentielles intervient et explique les effets physiques, chimiques, biochimiques, physiologiques, voire électroniques des arômes végétaux.

La valeur médicinale des plantes est de plus en plus prouvée scientifiquement; c'est ce qui constitue d'ailleurs un argument de taille pour leur usage en médecine.

I.2. Définition

Selon Durville (1930), Les essences ou huiles essentielles, connues également sous le nom d'huiles volatiles, de parfums, etc., sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres, inflammables qui s'altèrent facilement à l'air en se résinifiant. Elles sont liquides à température ordinaire, quelques unes sont solides ou en partie cristallisées, elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité. Leur odeur plus ou moins forte, suave, piquante ou désagréable. Elles ont la propriété de ne pas laisser de tache durable sur le papier.

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydro distillation ou par expression mécanique. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. (Bousbia,nabil. 2011).

L'hydro distillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales. Les métabolites secondaires sont extraits des plantes par un entrainement à la vapeur d'eau. Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison.

Les huiles essentielles peuvent aussi être obtenues par expression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes. (Pibiri M.C, 2006).

L'Association Française de Normalisation (AFNOR), a défini les huiles essentielles comme étant : des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques. (AFNOR, 2000)

I.3. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs, en particulier les sommités fleuries (lavande, menthe, bergamotier, tubéreuse) mais aussi les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (cannelier), les bois (bois de rose, santal, camphrier), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre), les fruits (tout-épices, anis, badiane), les graines (muscade) et les boutons floraux (clou de girofle). (Bruneton, 1999)

La composition chimique pouvant varier d'un organe à un autre. Ainsi dans le cas du citronnier, la fleur et le fruit fournissent des essences de composition chimique différentes. (Baaliouamer, 1987)

I.4. Eléments de synthèse des huiles essentielles

La synthèse des HE est liée à des cellules spécialisées, rarement isolées (feuilles de *Laurier*, *Gingembre*), le plus souvent regroupées en poches (**Rutacées**, **Myrtacées**) ou en canaux sécréteurs (**Apiacées**, **Astracées**), l'excrétion de l'huile essentielle dans la cavité des poches ou canaux est réalisée par exocytose (**Myrtacées**) ou lyse des cellules bordant la cavité (**Rutacées**) (Guignard.1996). Les cellules sécrétrices sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante ce qui facilite leur émission. En effet, lorsque la température est assez élevée, les essences traversent la paroi cellulaire et la cuticule sous forme de vapeur vers l'extérieur d'où le dégagement des parfums des fleurs, plusieurs catégories de tissus producteurs et sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe. Chez la plupart des plantes, les huiles essentielles sont synthétisées dans des trichomes glandulaires spéciaux (poils) à la surface des feuilles. Leur forme est variable et souvent caractéristique d'une famille. (Brunton, 1999)

I.5. Rôle des huiles essentielles

Les huiles essentielles émises par les plantes sous formes de vapeur ont des fonctions multiples dans la nature. En effets ; expérimentalement il a été établi qu'elles interviennent dans les interactions 'végétaux animaux'. (Brunton, 1997)

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. (Randrianarivelo,R 2010).

Les travaux de Croteau en 1977 puis ceux de Croteau et Hooper en 1978 ont montré que, bien qu'étant des produits du métabolisme secondaire, les composants volatils auraient en fait un rôle mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante.

Certains terpènes jouent un rôle important et varié dans la relation des plantes avec leur environnement (Mahmout, 1992). Pour certains auteurs, les huiles essentielles constitueraient « les déchets » du métabolisme cellulaire de la plante (Salle, 1991). Pour d'autres, elles serviraient à attirer les insectes pour permettre la fécondation ou alors à les éloigner de la

plante. L'attrait des insectes pour les plantes à fleurs en vue de la pollinisation est également crédité aux huiles essentielles que ces plantes contiennent. Les huiles essentielles constitueraient enfin un moyen de défense de la plante vis-à-vis des prédateurs tels que les microorganismes (bactéries et champignons) et les herbivores. Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant que substances antibactérienne, antiviral, antifongique, insecticide et aussi contre les herbivores en réduisant leur appétit pour une telle plante. Elles peuvent attirer aussi des insectes en favorisant la dispersion de pollens et graines, ou au contraire repousser d'autres indésirables. (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008)

I.6. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles grasses. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau (AFSSAPS, 2008). Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées : ex : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclérée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée. (Lobstein A, 2013).

Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15). (AFSSAPS, 2008).

I.7. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité due à leur composition généralement complexes et le rondement de la plante d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différentes facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante. (Benini, 2007)

I.7.1. Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Bruneton, 1999). L'influence du stade végétatif, l'organe de la plante, l'hybridation, les facteurs de mutation. La polyplôidie. Et le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques » sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent sur la composition et le rendement des huiles essentielles. (Anton et Lobstein, 2005)

I.7.2. Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles.

La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée. Il n'y a pas eu mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Mohammedi, 2010), les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques d'extraction influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (Aprotosoiaie et *al.* 2010).

I.8. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée (I.Laib, 2011). La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées. (M.C. Pibiri, 2006).

Certains auteurs se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. (Maihebiau.P, 1994)

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande. (Maihebiau.P, 1994)

CHAPITRE II :
PRESENTATION DE L'ESPACE
*GIROFLIER *Syzygium**
aromaticum

I. Giroflier (*Syzygium aromaticum*)

II.1. Historique

Depuis des décennies, le clou de girofle est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales, il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique locale. (Kozam,1977; ohkubo et Shibata, 1997)

Autrefois on soignait les maux de dents en mâchant un ou deux clous de girofle. Aujourd'hui les techniques se sont améliorées: par le mélange d'oxyde de Zinc et d'eugénol on obtient un ciment utilise en tant que matériau de restauration temporaire permettant à la fois un excellent scellement et une anesthésie de la pulpe dentaire. Qui plus est, ce ciment est en générale très bien toléré par les patients. L'eugénol est aussi utilisé pour soulager la douleur associée à la pose de prothèses dentaires. (Garibaldi et al, 1995)

II.2. Origine

Le Giroflier est un arbre tropical appartenant à la grande famille des *Myrtacées*, originaire d'Indonésie, dans la partie sud des Philippines et les îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du sud, principalement dans des pays tropicaux. (Eric Penot et al, 2014)

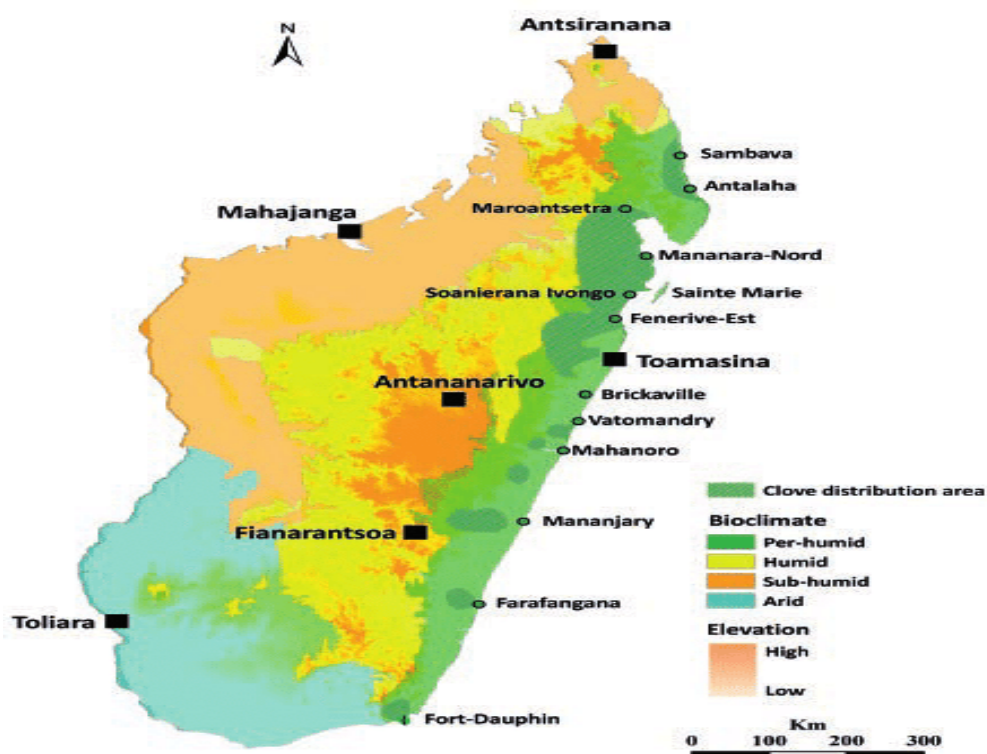


Figure 01 : répartition de clou de girofle à Madagascar. (Danthul, 2014)

II.3. Culture et récolte

Le moment le plus favorable à la récolte est déterminé par la couleur rosé du clou de girofle. Cueillis trop tôt, les clous n'auront pas la teneur suffisante en essence, et trop tard, les fleurs seront épanouies (sans pétales). Etant donné que les clous n'arrivent pas, à maturité de façon simultanée (les branches basses fleurissent plus tôt que les branches hautes), il faut procéder à plusieurs passages pour un même arbre. (BOIS D, 1999)



Figure02 : Arbre de giroflier. (et. Dintzer. Tree.fr)

Le giroflier donne des clous à partir de la 5^{ème} année. Autour de la 8^{ème} année, la récolte est exploitable, mais le giroflier n'atteindra sa pleine production qu'à 20 ans. Un giroflier peut produire pendant 75 à 80 années, et ces vieux arbres peuvent donner 50kg de clous frais par an. (RANOARISOA KM, 2012)

Le moment de la récolte est très important car cueillis trop tôt les clous n'auront pas synthétisé la totalité de leurs composants, et cueillis trop tard ils perdront leurs pétales. (BARBELET S, 2015)

II.4. Le stockage

Les clous et les griffes doivent être séchés avant d'être stockés. Ce stockage permet la vente de la récolte tout au long de l'année. En ce qui concerne les feuilles, une fois récoltées elles sont immédiatement distillées. (BARBELET S, 2015)

II.5. Utilisations des produits du giroflier

Syzygium aromaticum est un anesthésiant local, notamment pour les douleurs dentaires. Il soulage les douleurs musculaires, les rhumatismes et il a des propriétés anti-inflammatoires, redonne de l'énergie et permet de lutter contre la fatigue. C'est également un antidépresseur. Le clou de girofle est connu dans les écrits ayurvédiques, où il est utilisé contre les douleurs, la sciatique, les problèmes rhumatologiques, comme antibactérien et antifongique et anesthésiant local dans le soin des plaies et dans les odontalgies. (BARBELET S, 2015)

II.6. Clou de girofle

II.6.1. Classification (Sophie B 2015)

Règne	plantae
Classe	Angiosperme
Sous-classe	Tiporées
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i>



figure03 : clou de girofle. (www.gestel.li)

II.6.2. Origine

Le clou de girofle provient d'une plante appelée giroflier (*Syzygium aromaticum*). Chaque bouton floral de cette plante est un clou de girofle (Sophie Barbelet, 2015)

La principale production de giroflier provient de l'Indonésie, mais les clous de girofle utilisés pour l'alimentation viennent en majorité de Madagascar, ceux de l'Indonésie étant utilisés pour faire des cigarettes, appelées «kreteks». (Mathieu Deshaies, 2013).

II.6.3. Description

L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales. Ils sont cueillis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée, puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante. Les clous de girofle sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, pendant trois jours,

avant de procéder à l'égriffage pour éliminer les pédicelles ou griffes. Au cours du séchage, clous et griffes perdent entre 67 et 72 % d'eau. (Richard H., Loo A. 1992)



Figure 4 : les feuilles et les fleurs du giroflier et quelques boutons floraux. (Bruneton, 1999).

Comme le nom de clou l'indique, le bouton floral comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthe, longue de 10 à 12 mm pour un diamètre de 2 à 3 mm et une tête globuleuse d'un diamètre de 4 à 6 mm, entourée par les quatre lobes divergents des sépales et constituée des 47 quatre pétales imbriqués qui enferment de très nombreuses étamines recourbées (Figure n°35). La poudre des clous de girofle peut être caractérisée par des fragments de parenchyme renfermant de grandes poches sécrétrices, de nombreux grains de pollen triangulaires à 3 pores dans les angles. (Bruneton, 1999).

II.6.4. Propriétés de clou de girofle

II.6.4.1. Activité antibactérienne

Le girofle est composé de plus de 15% d'huile essentielle et de 70 à 90% d'eugénol, composé antibactérien, antiseptique et antifongique. Il y a, également, entre 9 et 15% d'acétate d'eugénol, qui possède également des propriétés antibactériennes (Rakotoatimanana B.V. et al, 1999)

II.6.4.2. Activité antifongique

L'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes, comme le *Candidat albicans*, le *cryptococcus*

néoformés ou *l'Aspergillus fumigatus*. Elle a été particulièrement efficace sur un modèle expérimental de vaginite murine sur un modèle animal. (Goetz et al, 2012)

II.6.4.3. Activité antivirale

L'huile essentielle de *S.aromaticum* a un effet inhibiteur sur : herps simplex virus, elle exerce aussi des effets sur les virus plusieurs niveaux : sur la fusion des cellules virales, anti-HCV protéase dans le traitement de l'hépatite virale, inhibition de la synthèse de l'ADN viral. (Goetz et al, 2012).

II.6.4.4. Activité anti inflammatoire

Cette l'huile provoque une réduction de l'inflammation (induite par injection de carragénine au niveau de la patte du rat), inhibition des prostaglandines, leucotriène, du chimiotactisme des leucocytes ainsi une inhibition de la synthèse des radicaux libres par les leucocytes. (Goetz et al, 2012)

II.6.4.5. Anti cancérigène

L'huile essentielle de clou de girofle a été étudiée comme un agent potentiel anti cancérigène. (Zheng et al, 1992).

II.6.4.6. Activité insecticide

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles sont efficaces contre les ravageurs des cultures. Parmi eux, des tests ont mis en évidence l'efficacité par fumigation des essences du cumin, de l'anicontré, de l'origan et *d'Eucalyptus camaldulensis*. (Tuni et Sahinkaya, 1998). (Lee et al, 1997)

II.6.4.7. Soin buccale

L'HE élimine les sarcomes épidermoïdes des gingivo maxillaires, les métastases intra maxillaires, les sarcomes, les tumeurs bénignes et les ostéites des maxillaires. (Morin et al, 1983)

CHAPITRE III :
MONDE MICROBIEN ET LES
PROPRETE DE CLOU DE GIROFLE
Syzygium aromaticum

III. Souches bactériennes

III. 1. La morphologie et la structure

On peut distinguer trois formes caractéristiques : les sphériques, les allongées et les spiralées (figure 5) La position des bactéries les unes par rapport aux autres est également une caractéristique distinctive importante. (B. Y. K. Sruthi et al, 2014)

- Les bactéries allongées (bacilles) peuvent varier en longueur et en épaisseur Elles forment également des chaînes.
- Les bactéries spiralées (spirilles) peuvent également varier en longueur et en La taille des coques varie entre 0,4 et 1,5 mm (1 mm = 0,001 mm).
- La longueur des bacilles peut varier entre 1 et 10 mm, même si quelques espèces sont plus grandes ou plus petites.

III.2. *Escherichia coli* (T Escherichia ; 1885)

Bacille a gram négatif ; elle provoque des infections urinaire ; génitales ; hépatobiliaires ou digestives méningites chez les nourrissons, infection alimentaires, manifestation intestinales telles que des diarrhées variables selon la souche en cause : diarrhées des voyageurs ou turista grève destruction des globules rouge et lésions rénales Due a la souche sécrétant une puissante toxine appelée toxine Véro vomissement. (M.hakki et all, 2012)

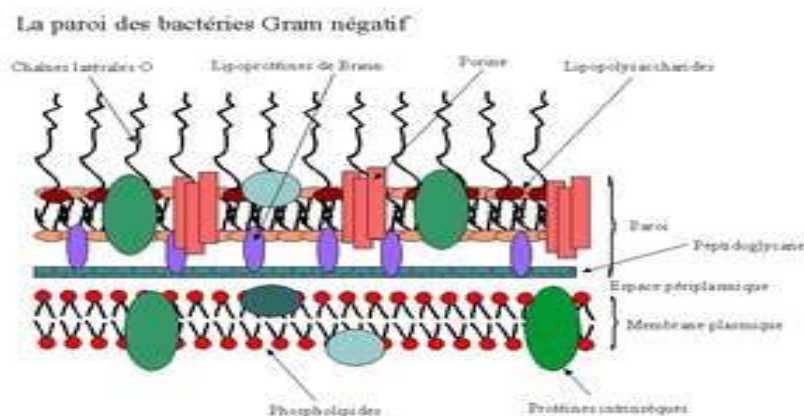


Figure 5 : les parois des bactéries Gram négatif.

III.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Il s'agit d'un petit bacille gram positif ; Cette bactérie préfère les milieux humides et on la trouve quelquefois au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur, de l'oreille externe et du tube digestif chez l'individu sain. Ce sont essentiellement les individus qui ont reçu des antibiotiques. (Binachi, 2004)

Les infections sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiale. Ce terme concerne tout ce qui est relatif aux hôpitaux. Plus généralement, il est employé pour une maladie contractée lors d'une hospitalisation. (Davet P, 1997)

III.4. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. Il fait partie des germes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. On le retrouve aussi bien dans les milieux communautaires qu'hospitaliers, il est au deuxième rang des infections nosocomiales derrière *Escherichia coli* et au deuxième des intoxications alimentaires après les salmonelles. Il intéresse un très grand nombre de sites infectieux et peut être isolé au laboratoire dans tous les types de prélèvements. On le retrouve dans des infections aussi bien locales qu'invasives dont l'issue clinique. (Guillaume VIEU, 2014).

III.5. Souche fongique

III.5.1. *Candida albicans*

Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique les candidoses sont une cause importante de morbidité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse.

III.6. Activité antibactérienne des huiles essentielles

L'activité antibactérienne s'exerce de 2 manières différentes :

- Activité létale bactéricide : elle rend perméable la membrane du micro-organisme, provoquant une fuite d'ion K^+ , ce qui implique la perte de l'osmose de la cellule suivi de la mort du micro-organisme.
- Activité inhibitrice ou bactériostatique : empêche la croissance du micro-organisme. (BELOUD A., 2003)

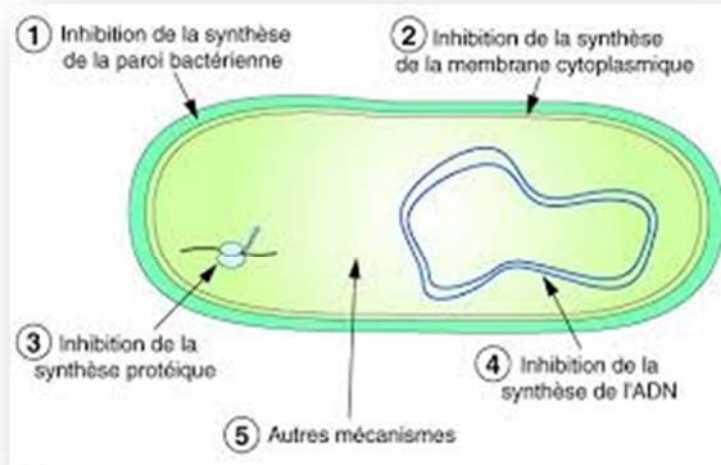


Figure 6: Mode d'action des antibiotiques.

III.7. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques ont été mis en évidence par de nombreux auteurs, et cela contre les moisissures allergisantes.

Des travaux similaires ont été réalisés et ont démontré que les huiles essentielles du clou de girofle présentent une activité antifongique « in vitro ». (Danielle.C, 2011)

PARTIE II :
PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE I :
MATERIELS ET
METHODES

I. Matériels et méthodes

I.1. Objectif

La présente étude vise à :

- Réaliser l'extraction de l'huile de : *Syzygium aromaticum* (clous de girofle) par la méthode d'hydrodistillation.
- Calculer le rendement de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*.
- Evaluer l'activité antibactérienne de cette huile essentielle à différentes concentrations sur trois germes pathogènes *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*.
- Evaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle du clou de girofle sur l'espèce *Candida albicans*.
- Evaluer l'activité antioxydante du clou de girofle.

I.2. Présentation du lieu de l'étude expérimentale

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie et de microbiologie à l'Université Saad Dahleb BLIDA.

I.3. Matériel et méthode expérimentale

I.3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal constitué de clou de girofle *Syzygium aromaticum* est importé de l'Indonésie et est disponible dans le marché tout au long de l'année, pour son importance dans la tradition culinaire algérienne ainsi que son utilisation dans la médecine traditionnelle



Figure 7 : boutons de clou de girofle *Syzygium aromaticum* (Originale).

I.3.2. Matériel microbien

Les trois souches bactériennes choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections. Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Mouhamed Boudiaf de BOUIRA. Ces souches bactériennes cliniques sont représentées par : *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus*.

Le choix des souches à tester est basé sur le caractère pathogénique, sur les études déjà réalisées et sur leur disponibilité au niveau du laboratoire.

Pour la souche fongique *Candida albicans*, nous a été fournie par le laboratoire de parasitologie de l'hôpital CHU Mustapha bacha à Alger.

I.3.3. Milieux de culture

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation des milieux suivants : la gélose Mueller Hinton (MH), milieu hecktoen (HK), les bouillons nutritifs (BN).

La culture de la souche fongique est cependant réalisée sur les deux milieux OGA et SABOURAUD.

La composition chimique de ces différents milieux de culture se trouve en annexe.

I.4. Méthode expérimentale

I.4.1. Extraction de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* par hydrodistillation

Le moyen le plus approprié pour extraire l'huile essentielle est la distillation à la vapeur d'eau, produite par un générateur, traverse la plante, chargée des précieuses molécules, elle est ensuite ramenée à l'état liquide par réfrigération. Le mélange d'eau et l'huile essentielle est recueilli dans un Erlenmeyer ou il va subir un relargage, une décantation et un séchage.

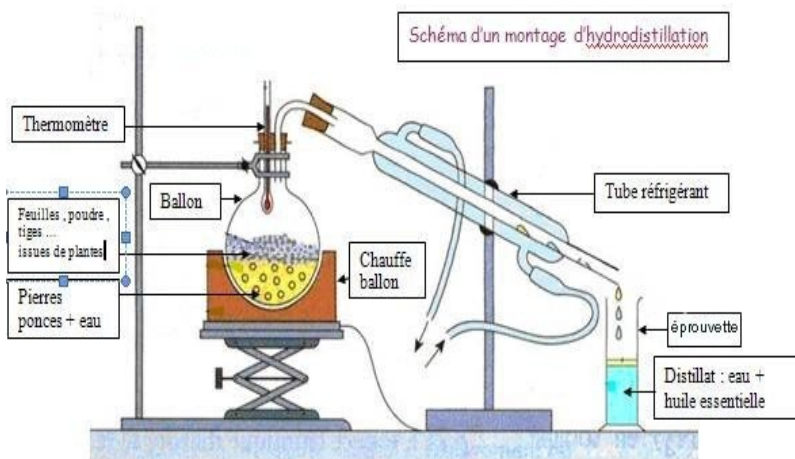


Figure 8 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation.

I.4.1.1. chauffage

L'opération a consisté à introduire 500 g de masse végétale séchée et broyée dans un ballon Bicol de 1000mL en verre, à laquelle on a ajouté une quantité suffisante d'eau distillée environ 500mL sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements lors de l'ébullition. On ajoute dans le bouilleur, quelques grains de pierre ponce pour éviter toute formation de la mousse. Après la fermeture du montage et mise en marche de chauffe ballon, nous réglons la température à 100°C, en s'assurant que cette dernière est maintenue dans la vapeur condensée en tête de colonne et au fond du bouilleur grâce à un thermomètre. Cette opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.

Il est en général formé de 2 liquides non miscibles encore appelés phase, la phase aqueuse, la plus abondante, est constituée d'eau dans laquelle sont dissoute très peu d'espèces odorantes, la phase organique représentée essentiellement par l'huile essentielle qui est constituée des espèces odorantes.

I.4.1.2. Relargage

La phase organique contient les plus grandes parties des composés odorants et la phase aqueuse en contient un peu moins. Afin de récupérer les molécules odorantes dissoutes dans le distillat, on réalise un relargage.

Pour cela, on utilise un sel afin de récupérer cette huile, c'est le chlorure de sodium NaCl. Par la suite, le mélange est placé sous un agitateur jusqu'à dissolution. La solubilité de

l'huile essentielle du clou de girofle étant moins importante dans l'eau salée que dans l'eau, l'ajout du chlorure de sodium favorise la séparation des 2 phases.

I.4.1.3. Décantation

Le mélange précédant est laissé reposer, pendant quelque minutes, la phase organique, à densité faible, surnagera sur la phase aqueuse, cette dernière est recueillie en premier dans un bêcher, pour pouvoir ensuite récupérer l'huile dans un autre bêcher.

I.4.1.4. Séchage et filtration

Dans le but d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été entraînée avec la phase organique lors de la décantation, on procède à un séchage au moyen du sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 . Ensuite, pour séparer l'huile de ce dernier, on réalise une filtration par papier filtre. L'huile est ainsi conservée à une température allant de 0 à 6 °C dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement pour éviter toute dégradation aussi, cette huile est à l'abri de la lumière pour éviter toute volatilisation.



a. Broyage 500g bouton de clou de girofle



b. ballon contient 500ml H_2O distillée et 500g clou de girofle



Figure 9 : les étapes de l'hydrodistillation (originale).

I.5. Détermination du taux d'humidité du matériel végétal

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais.

On met 5 g du boutons de CG ans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé L'ensemble est placé dans une étuve réglée entre 100 et 105°C durant 2 heures. Après avoir obtenu un poids constant, on calcule le pourcentage d'eau contenue dans la poudre par la formule :

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

$$H\% = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100.$$

H(%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

m_0 : Masse de l'échantillon prise en g.

m_1 : Masse de l'échantillon après séchage en g.

I.6. Calcul du rendement

Le rendement en l'huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter. Le rendement est calculé comme suit :

$$RHE = (M1 / M0) \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle des clous de girofle

M1 : Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme

M0 : Masse des clous de girofle broyés en gramme.

I.7. Analyse physico-chimique des huiles essentielles

I.7.1. Les propriétés physiques

I.7.1.1. la densité

La densité d'une huile est définie comme étant le rapport de la masse de l'huile sur celle de l'eau dans un volume déterminé à une température donnée.

Le principe est basé sur le mesurage de la masse à la température demandée, d'un volume de corps gras contenu dans un bicher préalablement étalonné à la même température par apport à l'eau.

$$D = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

m₀ : la masse, en gramme du bicher vide.

m₁ : la masse, en gramme du bicher, remplie de l'eau distillée.

m₂ : la masse, en gramme du bicher, remplie de l'huile.

D : la valeur de la densité relative selon les normes.

I.7.1.2. Indice de réfraction

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée ; passant de l'air dans huile essentielle maintenue à une température constante

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses ; plus la lumière n'est ralentie ; plus la matière a un indice de réfraction élevé.

L'indice de réfraction de L'huile essentielle est généralement élevé, il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1.33556 ; et de l'huile d'olive à 20°C = 1.4684 ceci montre leur richesse en composants qui devient la lumière polarisée

L'appareil employé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre.

Mode opératoire

- L'instrument est réglé à une température ambiante;
- Verser une goutte d'H.E sur la surface du prisme;
- Fermer le couvercle du prisme, assurer que le film d'H.E ne contient pas de bulles d'air, puis pointer le réfractomètre en direction d'une source lumineuse;

Quand il y a du liquide sur le prisme, le champ est divisé en une partie claire et une partie sombre. Le point auquel la ligne de démarcation entre ces deux parties traverse

- l'échelle verticale donne la mesure. On peut ajuster la ligne sur l'échelle verticale à l'aide de vis située au-dessus ou au-dessous de la boîte contenant le prisme;
- Lire avec précision la valeur affichée.

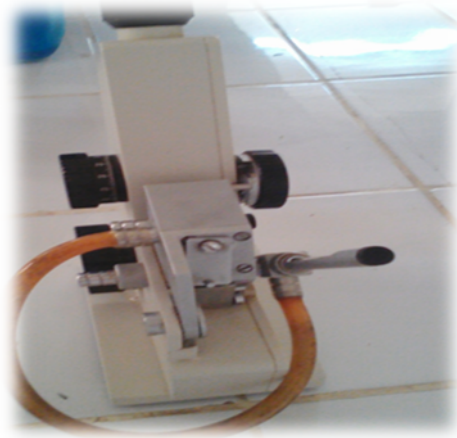


Figure 10 : Réfractomètre.

I.7.2. Propriétés chimiques

I.7.2.1. La mesure de pH

Le pH l'abréviation du potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions Hydrogènes (H^+) (appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution.

Il s'agit d'un coefficient Permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre: elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7.

La mesure de pH se fait par un papier pH.



Figure 11 : Papier pH.

I.8. Analyse de la composition chimique d'huile essentielle par CPG

Notre échantillon d'H.E a été analysé par chromatographie en phase gazeuse, cette technique est très utilisée dans l'analyse qualitative de l'H.E. L'analyse de la composition chimique d'H.E a été faite au niveau de laboratoire de biochimie et de microbiologie.

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002.

- Le gaz vecteur est l'azote N_2 d'un débit de 1ml/min
- La colonne utilisée est une colonne capillaire de type silice fondue de type DB-5 de 30mm de longueur et de 0.25mm de diamètre intérieur et d'une épaisseur de la phase stationnaire : 0.25 μ m.
- La programmation de la température de la colonne est comme suit : la température d'injection dans le four s'élève par palier jusqu'à 270°
- Le détecteur est de type FID, et est réglé à une température 250°
- L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés.
- Le temps de sortie de chaque pic, dit temps de rétention caractérise qualitativement la substance concernée. L'air limité par ces pics permet de mesurer la concentration de chaque composé séparé.



Figure 12 : chromatographie en CPG.

I.9. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* L.

Les tests de l'activité antibactérienne sont réalisés en deux étapes au niveau du Laboratoire de Bactériologie au CHU de Bouira.

I.9.1. Choix des souches

Les premiers tests de l'activité antimicrobienne sont réalisés au niveau du Laboratoire de Bactériologie à l'hôpital de Bouira.

Les bactéries utilisées sont des isolats cliniques, bactéries isolées à partir de divers prélèvements de malades: coproculture, urine, abcès, pus, hémoculture, plaie, liquide céphalo-rachidien (LCR), sonde vésicale et urinaire :

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

Tableau 1: Les souches bactériennes utilisées lors de notre expérimentation.

Souches bactériennes	Milieus de culture
<i>Escherichia coli</i>	HK
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HK
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose au chocolat

HK : milieu hecktoen

Tableau 2 : La souche fongique utilisée.

Souche fongique	Milieu de culture
<i>Candida albicans</i>	Milieu OGA, milieu SABOURAUD

Ces bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides, selon les espèces.

I.9.2. Milieu de culture

Les milieux de culture utilisés sont des milieux d'isolement, sélectifs ou d'enrichissement pour chaque groupe bactérien.

- Milieu Hektoen pour *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*.
- Gélose au chocolat pour les espèces exigeantes telles que les Staphylocoques.
- Bouillon cœur cervelle, qui est un milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes utilisées.
- Enfin, Gélose Muller – Hinton, utilisée pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

I.9.3. Les étapes de l'activité antibactérienne

I.9.3.1. Le ré-isolement des souches bactériennes

- A l'aide d'une pipette pasteur ou anse de platine on prend une colonie, et on le met dans le BCC.
- Mettre dans l'étuve pour incubation pendant 24h à 37°C.

I.9.3.2. Préparation de l'inoculum

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes on a préparé des suspensions pour chaque espèce étudiée. A l'aide d'une pipette pasteur, on prélève deux ou trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérilisée. L'enrichissement est de 2 à 3 heures.

I.9.3.3. L'ensemencement

Sur des boîtes contenant le milieu gélosé d'une épaisseur de 2 mm bien sèches, on introduit de 3 à 5 ml de l'inoculum, on obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe (Figure 13).



Figure 13 : L'ensemencement des souches bactériennes (original).

I.9.3.4. Préparation des disques d'aromatogramme

Les disques sont fabriqués à partir de papier Watman n°3 avec un diamètre de 5.5 mm, l'huile essentielle est diluée dans l'éthanol, on a préparés trois concentration de notre l'huile essentiel :

Concentration1 25% : 250 ul de l'huile essentiel ajouté à 750 ul d'éthanol = 25 ug/ml

Concentration2 50% : 500 ul de l'uile essentiel ajouté à 500 ul d'éthanol= 50 ug/ml

Concentration3 75% : 750 ul de l'huile essentiel ajouté à 250 ul d'éthanol= 75 ug/ml

On prépare un disque qui contient seulement l'éthanol, c'est un témoin. Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques imbibés de chaque extrait sont disposés sur la surface de la gélose pendant ½ h dans une étuve réglée à une température de 37°C.



Figure 14 : Dépôt des disques.

I.9.3.5. Incubation et lecture

Pendant 18 à 24 heures à 37°C, pour toutes les boîtes, et à température ambiante (température de la chambre). Les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition. (Figure 15).



Figure 15 : Mesure des halos d'inhibition.

I.9.4. Evaluation de l'activité antifongique

En ce qui concerne le champignon, des suspensions de cellules fongiques de *C. albicans* est préparée à partir de cultures pures et jeunes, dans de l'eau physiologique stérile. Ces suspensions servent à ensemercer la gélose Sabouraud (levure). Des disques de papiers chromatographiques de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de gélose ensemercée après avoir été chargé de 5 µl d'huile essentielle diluée.

D'autres disques, chargés de 5 µl d'éthanol sont utilisés comme témoins. Des disques d'antifongiques ont été également utilisés dans ce test comme témoins positifs.

L'incubation des champignons se fait à une température de 30°C pendant 72 heures alors que celle des levures se fait à 37°C pendant 48 heures.

Chapitre II :
RESULTATS ET
DISCUSSION

II. Résultats et discussion

II.1. Description de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* obtenue

II.1.1. Le taux d'humidité

Après 2 heures de séchage, le poids se fixe à 4.7022 g pour le clou de girofle. Les valeurs prises sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 3 : Résultat du taux d'humidité d'HE de l'espèce *Syzygium aromaticum*.

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	maximum
Taux d'humidité (%)	6.3	5	13

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 %.(Khoukhi et Benadji ,2013).

Les résultats d'analyse de notre échantillon ont révélé que la teneur de l'humidité présente dans notre plante, ceci influe négativement sur leur bonne conservation, sur la durée d'extraction et donc sur le rendement.

II.1.2. Le rendement

Le rendement de l'H E extraite par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire à partir des grains de Clous de girofle est mentionné dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Résultat du rendement d'HE de l'espèce *Syzygium aromaticum*

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	maximum
Rendement (%)	3.4	5	8

Ce faible rendement qui est de 3,4 est probablement dû à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et pour la simplicité de notre dispositif d'hydrodistillation. On peut dire qu'en termes de quantité, malgré que ce pourcentage semble inférieur par rapport aux normes AFNOR, ce rendement reste dans la pratique satisfaisant pour mener bien à une telle étude.

En termes de valeurs, le rendement en H.E. de Clous de Girofle est significativement ($P < 5\%$) meilleur par rapport aux rendements obtenus en H.E par Adli, (2015) qui a obtenu un

rendement égale à 0.84%. Selon certains auteurs, la composition chimique et le rendement en H.E. varient suivant diverses conditions :

La méthode employée, les parties végétales utilisées et les produits et réactifs utilisés pendant l'extraction, l'environnement, le génotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte de cette plante, le degré de séchage, les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, présence de parasites, de virus et mauvaises herbes (Naili,2013).

II.2. Analyses physico-chimiques

II.2.1. Etude des propriétés organoleptiques

Les résultats mentionnés dans le tableau 5, montrent une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des boutons de clous de girofle avec les normes d'AFNOR.

Tableau 5 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de l'espèce *Syzygium aromaticum*.

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR	Liquide mobile		Epicée
	Limpide parfois	Jaune très claire	(caractéristique de
	Légèrement visqueux		l'eugénol)
HE étudiée	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Epicée

Selon ces résultats obtenus, On remarque que notre huile essentielle obtenu par hydrodistillation présente plusieurs caractéristiques à savoir : l'aspect, la couleur et l'odeur qui sont identiques à celles décrites par les normes d'AFNOR.

II.2.2. Les propriétés physiques

II.2.2.1. La densité

Le distillat obtenu est une émulsion (gouttelettes en suspension), la densité obtenu est égale à 1.015 (Tableau 6) ci-dessous. Cela se justifie par deux arguments bien distincts :

- Soit La solubilité dans l'eau de huile essentielle de clou de girofle est faible du fait qu'il y a des phases différentes ; Soit les densités de l'eau et de l'huile essentielle sont très voisines qui est égale à 1 ainsi il n'y a donc pas vraiment de phase qui surnage.

Tableau 6 : Résultat de la densité de l'HE de l'espèce *Syzygium aromaticum*

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	maximum
La densité (g/cm ³)	1.015	1.042	1.054

II.2.2.2. Indice de réfraction

Le résultat de l'Indice de réfraction mentionné dans le (Tableau 7), est conforme avec les normes AFNOR généralement utilisé pour l'identification. Il est considéré comme un critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers.

Tableau 7 : Résultat de l'indice de réfraction

	Huile étudié	Norme AFNOR	
		Minimum	maximum
Indice de réfraction	1.5346	1.5280	1.5346

Dans ce contexte, chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considères comme acceptable.

Dans ce cas, on peut considérer que notre HE de *Syzygium aromaticum* est pur.

II.2.3. Les propriétés chimiques

II.2.3.1. Le pH

Les résultats consignés dans le tableau 8, notre pH =06.82. C'est un pH légèrement acide; ceci est dû à la composition chimique des HE de *Syzygium aromaticum* qui se considère comme donneur des H⁺.

Tableau 8 : Résultat du pH d'HE de *Syzygium aromaticum*

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		minimum	maximum
Ph	06.82	5.5	7

II.3. L'analyse chimique de l'huile essentielle par CPG

Le tableau 9 représente les principaux composés identifiés de l'huile essentielle de clou de girofle :

Tableau 9 : Composition chimique de l'huile essentielle du Clou de girofle.

Constituants	Temps de rétention	Pourcentages%
	Min	
Eugénol	[44,23-45,28]	84.01
α - pinène	14 ,23	0.84
camphène	15 ,10	0.103
sabinène	16 ,66	0.025
β -pinène	16 ,85	0.044
myricene	17 ,82	0.18
limonène	20 ,02	0.16
cinéule	20 ,54	0.054
γ -terpinene	22 ,45	0.068
linalool	25 ,41	0.63
camphre	28 ,56	0.35
α -téropéneol	32 ,15	0.31
β -caryophyllène	48 ,25	0.67
acétate d'eugényle	55 ,46	13.01

Les résultats de l'analyse par Chromatographie gazeuse de la composition chimique de l'HE (du clou de girofle) sont présentés dans le tableau 9 qui met en relief le temps de rétention, l'identification des différents composants et leur teneur. 14 composés sont identifiés. Les composés majoritaires de l'HE du clou de girofle sont : L'eugénol (84.01%), acétate d'eugényle (13.01%), l'ensemble de ces constituants égale (97.02%), suivis par d'autres molécules à faibles teneurs.

Les composés majoritaires de notre huile de clou de girofle ont été identifiés et comparé à un profil de référence de pharmacopée européenne 6.0.01/2008 : eugénol (75-88%), β -caryophyllène (5-14%), acétate d'eugényle (4-15%).

Selon Peter et Marius (2007), Le girofle est composé de plus de 15% d'huile essentielle et de 70 à 90% d'eugénol, composé antibactérien, antiseptique et antifongique. Il y a, également, entre 9 et 15% d'acétate d'eugénol, entre 5 et 12% de bêta-caryophyllène et 2% d'acide oléanique. D'autres composés sont aussi présents, en plus petites quantités, comme le caryophyllène oxyde, l'alpha-humulène et le copaène (moins de 1%). On trouve, enfin, des traces de furfural et de vanilline.

Nos résultats concernant le profil chimique de l'huile de CG sont proches avec ceux obtenus par Barbele (2015) qui montrent que les essences de CG sont caractérisées par des concentrations élevées en eugénol, en β -caryophyllène et d'acétate d'Eugényle avec des pourcentages respectifs de 80.0%, 7.0% et 10.6%.

Selon une étude réalisée par Fayemiwo et ses collaborateurs en 2014, l'huile essentielle de CG contient 28 composés avec l'eugénol comme composé majoritaire à 80.95%, suivie par eugényl acétate avec 5.01%, le β -caryophyllène qui affiche 3.14%, puis le Myrcène avec 1.84% et enfin, l' α -terpinène à 1.65%. Nos résultats convergent avec les résultats obtenus par les différents travaux de nombreux auteurs qui montrent que cette huile est formée essentiellement d'eugénol, d'acétate-d'eugényle et du β -caryophyllène.

II.4. Activité anti microbienne

II.4.1. Activité anti bactérienne

Cette étude est basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition de l'extrait du *Syzygium aromaticum* obtenus dont on a mesuré avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'extérieur de la boîte de pétri fermée.

Le Classement des bactéries se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante.

La souche ayant un diamètre :

- $D < 8\text{mm}$: Souches résistante (-).
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$: Souches sensible (+).
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$: Souches très sensible (++)
- $D > 20\text{mm}$: Souches extrêmes sensible (+++)

Les résultats du pouvoir anti bactérien de l'HE de *Syzygium aromaticum* sur les souches étudiées sont représentés dans le (tableau10) :

Tableau 10: Résultats de l'antibiogramme de l'HEC sur les trois souches bactériennes.

Souche bactérienne	Gram	Diamètre Mm	Sensible	Résistante
<i>E.coli</i>	-	12.5-13-13,5	+++	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	/	/	R
<i>Staphilococcus aureus</i>	+	13.5-13,72-14	+	/

Tableau 11: Résultats de disque d'éthanol sur les trois souches

Souche bactérienne	Gram	Diamètre Mm	Sensible	Résistante
<i>E.coli</i>	-	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	/	/	/
<i>Staphilococcus aureus</i>	+	/	/	/

L'Huile essentielle du clou de girofle à des concentrations graduées présente un effet positif c'est-à-dire sensible sur les souches bactériennes : *E. coli* et *Staphylococcus aureus*; par contre, sur *Pseudomonas aeruginosa* s'est montrée résistante.

En comparant les résultats des disques, il est clair que les bactéries à gram positif ont des zones d'inhibition plus grandes que celles des bactéries à gram négatif pour l'huile essentielle.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 correspond au plus grand diamètre d'inhibition, alors que *Pseudomonas* n'a marqué aucune inhibition, ainsi, cette souche est très résistante à notre HE.

La concentration de l'huile essentielle a une relation avec les zones d'inhibitions. Ainsi, plus la concentration est élevée, plus la zone d'inhibition est grande.

Les résultats de disque d'éthanol n'a montré aucun effet antibactérienne sur les trois souches bactérienne du fait que il y'a absence des zones d'inhibitions.

De nombreuses études, ont démontré que les H.E. de Clou de Girofle sont fortement antibactérienne. Cette activité pourrait être attribuée à son composé majoritaire qui est "l'eugénol". Les travaux de Valero et Giner en 2006, ont prouvé que l'eugénol parmi d'autres composés a provoqué l'inhibition de la croissance des bactéries.

Par ailleurs, l'étude de Rhayour (2016), a montré que l'HE de girofle exerce son activité bactéricide principalement grâce à son constituant majoritaire qui est l'eugénol qui appartient à la famille des phénols. Il semble donc que l'activité bactéricide des HE débiterait par une fixation de ces molécules sur les membranes bactériennes provoquant des altérations de structure et de perméabilité, conduisant à la perte de constituants cellulaires due à une lyse importante des cellules bactériennes.

II.4.2. Activité anti fongique

L'activité antifongique à été expérimenté sur une souche de *candida albicans*, cette dernière très sensible à notre huile essentielle. Car elle présent un grand halo d'inhibition

Tableau 12 : les résultats de l'activité antifongique.

Souche fongique	Diamètre	Résultat
<i>Candida albicans</i>	16.5	+++

Tableau 13 : les résultats de témoin sur la souche fongique.

Souche fongique	Diamètre	Résultat
<i>Candida albicans</i>	/	/

On a pu démontrer que l'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre le pathogène fongique opportuniste, ceci est identique aux travaux d'Eugénia et ces collaborateurs (2009) sur le *Candida albicans* et d'autres pathogènes fongiques.

D'autres travaux, ont montré que l'HE du clou de girofle, ainsi, l'Eugénol montre une grande activité fongicide contre *Candida albicans*.

A la lumière de tous ces travaux et recherches, l'extrait des « clous de girofle » présente un large spectre d'activité antimicrobienne d'où l'importance de cette huile comme étant un conservateur, antiseptique très efficace pour empêcher le développement microbien surtout quand il s'agit de protéger la santé vis-à-vis de la présence des pathogènes.

CONCLUSION

CONCLUSION

A la lumière des résultats obtenus, concernant l'évaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et l'activité antioxydante du clou de girofle *Syzygium aromaticum*. Révèle que son l'huile essentiel est très efficace ou plus de l'intérêt que porte cette espèce végétale aux traditions a et médicinales

Description de l'huile essentiel de *Syzygium aromaticum* obtenus après extraction montre un taux d'humidité de 6.3% qui conforme aux normes AFNOR.

Concernant le rendement de cette huile essentiel, ce dernière est faible et est de 3.4%, ceci est du à une perte d'huile dans la phase aqueuse car notre dispositif d'hydrodistillation est simple, cependant ce résultat reste conforme aux normes AFNOR.

L'étude des propriétés organoleptiques content que notre huile essentielle présente un aspect liquide mobile limpide de couleur jaune claire avec une odeur épicée. Ces résultats restent conformes avec les normes AFNOR.

Par ailleurs, l'étude les propriétés physique d'huile essentielle du clou de girofle essentiellement représente par la densité et l'indice de réfraction montre que pour le paramètre de densité notre huile affiche un taux de 1.015(g/cm³).

L'indice de réfraction de cette huile, est de 1.5346 qui sont conforme aux normes AFNOR.

D'autre part, les propriétés chimique sont représentés par un seul paramètre, qui est le pH, il est de 6.82 pour notre huile essentiel, presque basique, ceci est relatif à la composition biochimique de notre huile essentiel.

Les résultats relatifs à l'analyse chimique, de notre huile essentielle par CPG identifient 14 composés.

Les composés majoritaire de cette huile sont essentiellement représentés par l'eugénol avec un taux de 84.01% suivi par l'acétate d'eugényle avec 13.01%. Ces deux constituants représentent 97.02% suivi par d'autres molécules dont les teneurs sont faibles.

L'étude de l'activité antimicrobienne est représentée par l'activité antibactérienne et l'activité antifongique.

Pour l'activité antibactérienne, notre huile essentiel s'avère efficace aux trois concentrations déférents à savoir 25%, 50%, est 75%, ainsi, ou constate un effet positif sur *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. Par contre *Pseudomonas aeuroguinosa*, s'avère résistante à notre huile.

Concernant l'activité antifongique, l'espèce *Candida albicans*, se montre très sensible à notre huile essentielle.

De ce fait, l'extrait de clou de girofle présente un large spectre d'activité antimicrobienne d'où l'importance de cette huile essentielle de l'utiliser comme un conservateur, antiseptique très efficace pour empêcher le développement microbien pour préserver la santé.

De ce fait, l'huile essentielle de clou de girofle testée peut être utilisée en tant que un antibactérien et antifongique dans les industries alimentaires, cosmétique et pharmaceutique.

La continuité de ce travail s'avère primordial et plusieurs axes de recherche sont ouverts. En perspectives, il serait donc intéressant de mener une étude plus approfondie sur la plante (clou de girofle. Ainsi que la détermination de l'activité antioxydante par d'autres méthodes et l'étude d'autres méthodes d'activités biologiques attribuées à cette plante. Aussi faire des essais dans le domaine pharmaceutique pour savoir l'utilité de ces huiles essentielles.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A

1. Adli Djallal Eddine Houari., 2015. Effets prophylactique de l'administration d'un extrait de *Syzygium aromaticum* (Clou de girofle) chez les rats wistar en croissance intoxiqués au plomb et au manganèse. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de Biologie ,114 p.
2. AFNOR (Association Française de Normalisation)., 2000. Recueil des normes françaises 'huiles essentielles'. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris.
3. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Mai 2008.
4. Anton, R. et Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec.doc. Paris ; 522p.
5. Anonym2002:http://www.lyceepmftunis.com/dscp/bdi/dscp/sciences/phys/accueil/physique/Luisada/2nde7/chimie/corrige_huile_essentielle.pdf.

B

6. Baaliouamer A., 1987. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles de Citrus provenant de la station de Boufarik. Thèse doctorat d'Etat Es-science. Phys., U.S.T.H.B., 143p.
7. Bakkali, Averbek, Averbek & Idaomar., 2008. Biological effects of essential oils – A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), p. 446-475.
8. Barbalet S., 2015. Le giroflier : historique, description et utilisations de la plantes et de son huile essentielle. Mémoire de fin d'étude Pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de LORRAINE.
9. Bellamine, Kawtar., 2017. La Phytothérapie clinique dans les affections dermatologiques, Université MOUHAMMED RABAT.

10. Beloud, A., 2003. Plante médicinales d'Algérie. Offices des publications universitaires, p. 144-145.
11. Benini, C., 2007. Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Thèse de doctorat. Université Gembloux, 109p.
12. Berger, M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition Clinique et Métabolisme, 20, p.48-53.
13. Binachi., 2004: Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of thymus vulgaris L J. Essent Oil Res 16(1),p 69-70.
14. Bois, D., 1999, Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges : histoire utilisation, culture. Ed. CME, Paris, Vol.3.
15. Bousbia, nabil., 2011. Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Ecole national d'agronomie El harach Alger (LINA).p 3-5.
16. Brahmi, F., 2016. Etude phytochimique et activités biologiques de quelque espèces du genre Mentha : cas de M.spicata L., M.puleguim L. et M.rotundifolia L. huds. Thèse doctorat, Université Abderrahmane Mira Bejaia, p31-32.
17. Bruneton J., 1997. Elément de phytochimie et de pharmacologie. Ed lavoisier, Tech. Et Doc., Paris, p 405-426.
18. Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

C

19. Catty, S., 2001. Hydrosols, the next aromatherapy. Healing Arts Press. Rochester. 290p.
20. Croteau, R. & Hooper, C. L., 1978. Metabolism of monoterpenes: Acetylation of menthol by a soluble enzyme preparation from peppermint (*Mentha piperita*) leaves. Plant Physiol 61, p 737-742.

D

21. Danielle, C., 2011. Fiche Technique Bactériologie : Entérobactérie cloacale. Laboratoire de Bactériologie Hygiène Toulouse. p1-2.

22. Davet, P. Rouxel .F., 1997. Détection et isolement des champignons du sol, Paris. 147p.
23. Durvelle, J., 1930. Fabrication des essences et des parfums. Ed. Desforges, Girardot et Cie, 807 p.

E

24. Eric Penot et *al.*, 2014. Le giroflier à Madagascar : une « success story »... à l'avenir incertain, Bois et Forêts des Tropique, 35p.
25. Eugénia Pinto. Luís Vale-Silva. Carlos Cavaleiro. Lígia Salgueiro., 2009 : Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.

F

26. Fayemiwo, K.A . Adeleke, M.A. Okoro, O.P. Awojide, S.H. Awoniyi, I.O., 2014. Larvicidal Efficacies and Chemical Composition of Essential Oils of Pinus.

G

27. Goetz P and le Jeune R., 2010. *Syzygium Aromaticum L, Merr and Perry (Myrtaceae)* giroflier, phytothérapie, p 37-43.
28. Griveau, J. F. Le Lanou, D., 1995. Radicaux libres et spermatozoïdes humains, physiologie et physiopathologie. *Andrologie*, 5, p 369-381.
29. Guignard J.L., 1996. Biochimie végétale .Ed Masson, Paris, 255p.
30. Guillaume VIEU., 2014. Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants, Université Toulouse, 107p.
31. Gulcin, I. Elmastas, M. Aboul-Eneim, HY., 2012. antioxydant activity of clove oil- A powerful antioxydant source, *Arabian J ournal of chemistry* : articl in press.
32. Gulcin, I. Sat, I. Beydemir, S. Elmastas, M. and kufrevioglu, O I., 2004. Comparison of antiuoxidant activity of clove buds ans lavender (*Lavandulastoechas L*), *Food chimestry* 87 : p 393-400.

H

33. Hakki, Alma.Murat. Siegfrie. and Hubert Kollmansberger. Chemical composition and content of essential oil from th Bud of cultivated Turkish clove (*syzygium aromaticum* L)

K

34. Khoukhi, N. Benadji ,H., 2013. « L'extraction et la caractérisation de l'huile essentiel de THYM (*Thymus vulgaris*) de Miliana et l'étude de l'activité antibactérienne »; thèse de doctorant; université de Khemis Miliana.

L

35. Laib,I., 2011. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de magister en Sciences Alimentaires. Université Mentouri Constantine.
36. Lamaty et al., 1997. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. Journal of chemistry of naturel compound. Vol15, P429.
37. Laurent Julia., 2017. Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine, Université PAUL SABATIER TOULOUSE III, TOULOUSE.
38. Lobstein, A., 2013. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques 2013; 52 (525) :p 18-21.
39. Leucotrichus Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'études médicales Spécialisées (DEMS) en Botanique médicale et Cryptogamie.

M

40. Mahmoud., 1992. Contribution à l'étude de quelques aromates et condiments utilisés au Tchad. Thèse de Doctorat: Université des sciences et techniques de Languedoc, Montpellier II.
41. Maihebiau, P., 1994. La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. 635p.
42. Marchand, Jacques., 2019. Utilisation de l'aromathérapie dans le traitement du stress et de l'insomnie, Université de LORRAINE, P 11-12.
43. Mathieu Deshaies., 2013. Le clou de girofle à la rescousse, 165 Boulevard Springer, 14p.
44. Mayer, Florence., 2012. Utilisation thérapeutique des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite, Université de LORRAINE.
45. Mohammad. et *al.*,2009. Essential oil content and heavy metals composition of thymus vulgaris cultivated in various climatic regions of Jordan. p 10-15.
46. Morin,J. Malhuret, R. and Basted, P., 1983. Aromathérapie, Exemple de la réalisation pratique de l'utilisation des huiles essentielles en thérapeutique, ISSN 0992-9406
47. M.C. Pibiri., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Lausanne,Canada. 2006,

N

48. Naili,N. Kesraoui., 2013. Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus*
49. -Ntezurubanza, L.,2000. Les huiles essentielles du Rwanda, Ed. Laseve, Québec Canada. P88.

P

50. Pauli, A., 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J Aromather.* 11, p 126- 133.
51. Pascal Danthu. et *al.*.,2014. The clove tree of Madagascar : a success story with an unpredictable future, BOIS ET FORÊTS DES TROPIQUES.

52. Peter, Marius Veth. Matthew, Spriggs., 2007. *The Archaeology of the Aru Islands, Eastern Indonesia*, Terra Australis.
53. Price, L. Price, S., 2004. Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy. Churchill Livingstone. 294 p.

R

54. Rakotoatimanana, B.V. et al., 1999. « Contribution à l'optimisation d'une unité de production d'huiles essentielles », mémoire de fin d'études, Département Génie Chimique, Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo ESPA, Université d'Antananarivo.
55. Randrianarivelo, R., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *Cinnamosma fragrans* ». alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse de doctorat université des sciences de la vie en biochimie fondamentale et appliquée, d'Antananarivo.
56. Rannoarisoa, K.M., 2012. Evolution historique et état des lieux de la filière girofle à Madagascar. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome. Antananarivo : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques.
57. Richard, H. Loo, A., 1992. Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. In Richard H (Coordonnateur) Epice et Aromates. Tec et Doc - Lavoisier, Paris.

S

58. Salle., 1991. Les huiles essentielles, synthèse d'arômes et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, Paris.
59. Small, E and Calting, P. M., 2000. Les cultures médicinales Canadiennes, Presses scientifiques de VNRC, Ottawa, Canada, 281p.
60. Sophie, Barbelet., 2015. le giroflier : historique, description et utilisation de la plante et de ses huiles essentielles. Vol5. P 22-26.

Z

61. Zheng, G.Q. Kenny, P.M and Lam K.T., 1992. Sesquiterpens from clove (*Eugenita caryophyllata*) as potentiel anticarcinogenic agent, J.Nat.Prod, vol 55. p 999-1003.

ANNEXE

ANNEXE

Composition des milieux de cultures**Muller Hinton agar :**

Infusion de viande de boeuf déshydra.....	300 g
Hydrolysate de caséine.....	17.5g
Amidon de maïs.....	5g
Agar Agar.....	13g
Eau distillée	1000 ml

Bouillon nutritif

Peptone.....	5 g
Extrait de viande.....	1 g
Extrait de levure.....	2 g
Chlorure de Sodium.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml

Gélose nutritif

Extrait de viande.....	1g/l
Extrait de levure.....	2,5g/l
Peptone.....	5g/l
Chlorure de sodium.....	5g/l
Agar.....	15g/l
PH.....	7

Milieu HEKTOEN

Protéase peptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g

Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Sels biliaires.....	9g
Citrate de fer III et d'amonium.....	1.5g
Salicine.....	2g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Fuschine acide.....	0.1g
Bleu de bromothymol.....	0.065g
Agar.....	14g
Eau distillée	1000ml

Gélose au chocolat

Peptone trypsique de caséine.....	7.5g/l
Peptone pepsique de viande.....	7.5g/l
Amidon de maïs.....	1g/l
Hydrogénophosphate de potassium.....	4g/l
Nacl.....	5g/l
Hémoglobine.....	10g/l
Agar.....	15g/l
pH.....	7.2

Milieu OGA

Extrait autolytique de levure.....	5g/l
Glucose.....	20g/l
Oxytétracycline.....	0.1g/l
Agar.....	15g/l

pH.....6.6

Milieu SABOURAUD

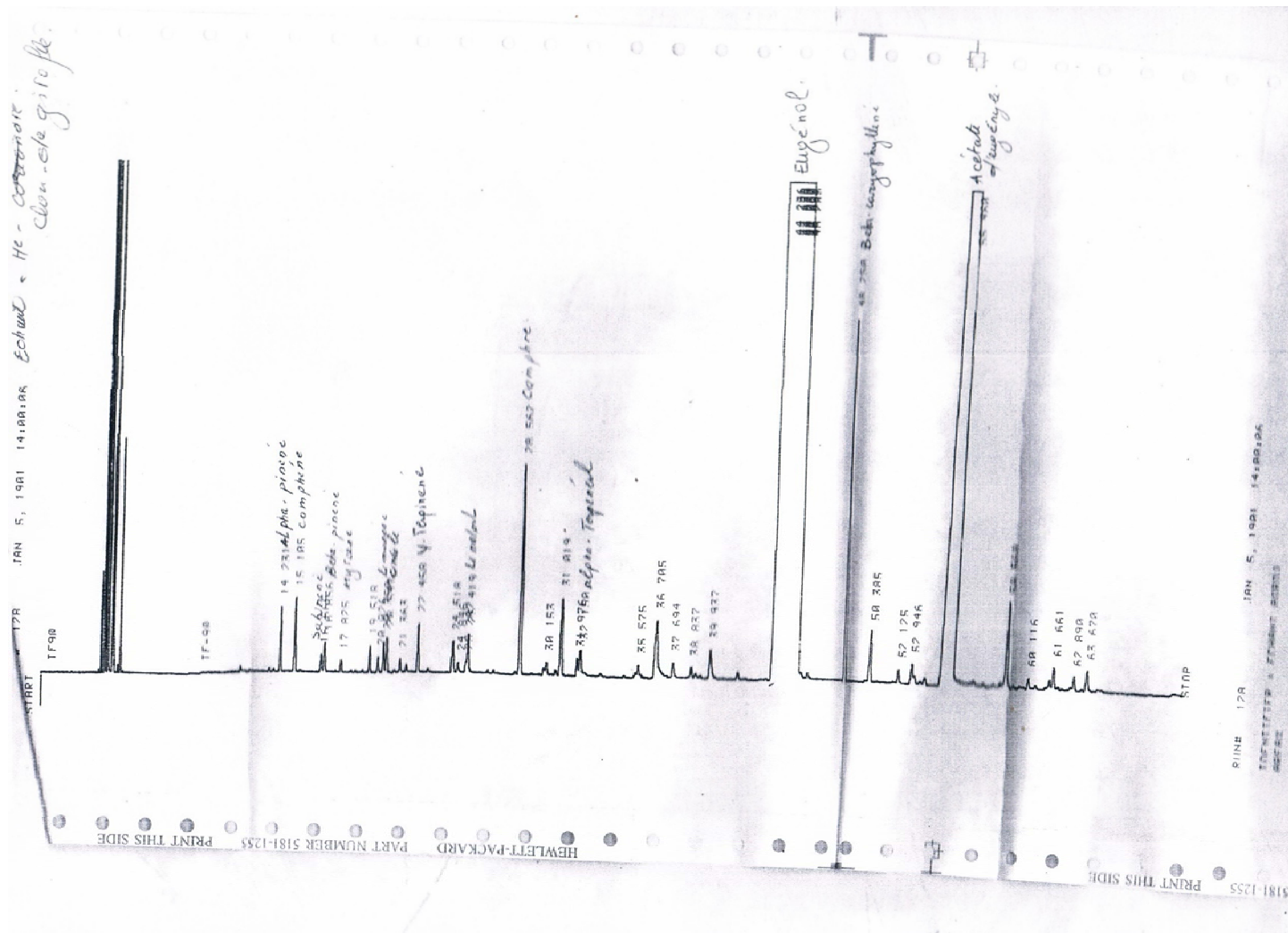
Peptone.....10g

Glucose.....20g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000ml

pH.....6



Chromatographie de clou de girofle

Calcule le rendement de l'HE

$$\text{RHE} = 17/500 = 3.4\%$$

Avec : M_1 : 17g

M_0 : 500g

Résumé

Notre travail porte sur l'étude et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* L. connue sous le nom de giroflier, ainsi l'étude de plusieurs propriétés physico-chimiques de l'extrait de l'huile essentielle y compris une analyse par GPC.

L'extraction de l'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum* est réalisée par la méthode d'hydro distillation. Le test de mise en évidence de son pouvoir antimicrobien est réalisé sur trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, et sur une souche fongique *Candida Albicans*, ainsi que une activité antioxydante de l'huile essentielle est évaluée par un test DPPH.

Les résultats montrent que l'huile essentielle du clou de girofle possède une forte activité antibactérienne représentée avec des diamètres d'inhibition variant entre 12 mm et 14 mm pour les souches bactériennes et avec un diamètre de 16,5mm pour le test sur la souche fongique. Le rendement obtenu est de 3,5% ce pourcentage malgré sa faiblesse reste meilleur que ceux obtenus par d'autres auteurs, et nos résultats des analyses physicochimiques sont conformées aux normes AFNOR.

Mots clés: *Syzygium aromaticum*, huile essentielle, activité antibactérienne, activité antifongique, activité antioxydante, CPG, DPPH.

Abstract

Our work focuses on the study and the demonstration of the antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* L. known under the name of clove, thus the study of several physico-chemical properties of the extract of the essential oil including GPC analysis.

Extraction of the essential oil of the flower buds of *Syzygium aromaticum* is carried out by the hydro-distillation method. The test for demonstrating its antimicrobial capacity is carried out on three bacterial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and on a *Candida Albicans* fungal strain, as well as an antioxidant activity of the essential oil is evaluated by an DPPH test. .

The results show that the clove essential oil has a strong antibacterial activity represented with inhibition diameters varying between 12 mm and 14 mm for the bacterial strains and with a diameter of 16.5 mm for the test on the fungal strain. . The yield obtained is 3.5% this percentage despite its weakness remains better than those obtained by other authors, and our physicochemical results are in accordance with AFNOR standards.

Key words: *Syzygium aromaticum*, essential oil, antibacterial activity, antifungal activity, antioxidant activity, GPC, DPPH.

ملخص

يركز عملنا على دراسة وشرح النشاط المضاد للميكروبات من الزيوت الأساسية Syzygium aromaticum L. المعروفة باسم القرنفل، وبالتالي دراسة العديد من الخواص الفيزيائية والكيميائية لمستخلص من الضروري النفط بما في ذلك تحليل المؤتمر الشعبي العام.

يتم استخراج الزيوت العطرية من براعم الزهور من Syzygium aromaticum بواسطة طريقة التقطير المائي. يتم إجراء اختبار لإثبات قدرتها المضادة للميكروبات على ثلاث سلالات بكتيرية: الإشريكية القولونية ، الزائفة الزنجارية ، المكورات العنقودية الذهبية ، وعلى سلالة فطرية من المبيضات البيضاء ، وكذلك نشاط مضاد للأكسدة في الزيت الأساسي يتم تقييمه بواسطة اختبار DPPH.

أظهرت النتائج أن زيت القرنفل الأساسي لديه نشاط مضاد للجراثيم قوي ممثل بأقطار تثبيط تتراوح ما بين 12 مم و 14 مم للسلاسل البكتيرية ويبلغ قطرها 16.5 مم للاختبار على السلالة الفطرية. العائد الذي تم الحصول عليه هو 3.5 ٪ هذه النسبة على الرغم من ضعفه لا يزال أفضل من تلك التي حصل عليها مؤلفون آخرون، ونتائجنا الفيزيائية والكيميائية تتفق مع معايير AFNOR .

الكلمات الأساسية: Syzygium aromaticum ، زيت أساسي ، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للفطريات ، نشاط مضاد للأكسدة ، GPC ، DPPH