



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La  
Recherche Scientifique

Université Frères Mentouri 1  
Constantine  
Faculté des Sciences de la vie

جامعة الإخوة منتوري 1، قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

N° ...../SNV/2015

Département : Biologie et Ecologie Végétale

Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie et physiologie végétale

Option : Métabolisme secondaire et Molécules bioactive

Intitulé :

Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude  
des caractères

Physico-chimique de l'huile essentielle du clou de girofle

*Syzygium aromaticum* L.

Présenté et Soutenu par :

-ATMANI Hanane

-BAIRA Kaouther

Jury d'évaluation:

Présidente : <sup>Melle</sup> CHAIB Ghania MCB à l'université des Frères Mentouri 1

Examinatrice: <sup>Mme</sup> KARA Karima MAA à l'université des Frères Mentouri 1

Directrice : <sup>Mme</sup> GHORIBI Nedjoua MAA à l'université des Frères Mentouri 1

Année Universitaire  
2014-2015

## **Remerciements**

*Tout d'abord, nous remercions **Dieu** de nous avoir accordé la force et la patience afin de réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier **Mme GHORIBI Nedjoua** Maitre assistant Classe 'A' à l'Université des frères Mentouri de Constantine 1, de nous avoir guidé dans ce travail, et qui a su nous faire confiance et nous a toujours encouragé et conseillé.*

*Nous tenons à remercier également tous les membres du jury, **Mlle CHAIB Ghania** maitre de conférence classe 'B' et **Mme kara karima** Maitre assistant Classe 'A' à l'Université des frères Mentouri de Constantine 1 pour avoir accepté d'évaluer notre travail.*

*Un très grand merci à **Mme ABDELAZIZ Wided** maitre assistant classe 'B' à l'Université des frères Mentouri de Constantine 1 pour sa disponibilité, ses conseils et son aide dans la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également **Melle RYM** qui a fait de son mieux pour nous aider à réaliser nos tests au niveau du Laboratoire de Chromatographie.*

*Nos vifs remerciements vont également au **Pr AITKAKI ZAHIA** de nous avoir donné l'opportunité d'effectuer un stage pratique au niveau du laboratoire de bactériologie médicale au CHU Constantine.*

*Merci à tous ceux et celles qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à toute ma famille qui m'a toujours soutenue*

*A mes amis*

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer*

*Hanane*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A MES PARENTS et Grands parents,*

*En reconnaissance des sacrifices qu'ils se sont imposés pour ma réussite  
dans les études.*

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde affection.*

*A mes oncles et tantes surtout ESMA et WATFA,*

*Pour tout le soutien matériel et moral qu'elles ne cessent de m'apporter.*

*A eux, j'exprime ici toute ma gratitude et ma franche reconnaissance.*

*A ma petite sœur, et mes amis*

*Pour tous les soutiens et encouragements qu'ils apportent.*

*Je dédie ce mémoire,*

*à tous ceux et toutes celles  
qui m'ont accompagné et soutenu de loin et de près  
durant cette année de formation*

*Kaouther*

## Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µl: microlitre

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC: American Type Collection Culture

BCC : bouillon cœur cervelle

CCM: chromatographie sur couche mince

CLHP: chromatographie liquide à haute performance

CMI : concentration minimale inhibitrice

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CPG/FID : chromatographie en phase gazeuse à détecteur à flamme d'ionisation

DO : densité optique

GC/MS: Gas chromatograph/ mass spectrometer

HE: huiles essentielle

HK : hecktoen

IR : indice de réfraction

MH: milieu de Mueller Hinton

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1</b> : Différentes formules des mono terpènes.....                                  | 9  |
| <b>Tableau 2</b> : Différents types de molécules qui composent les huiles essentielles.....     | 17 |
| <b>Tableau 3</b> : Principaux constituants biochimique de l'huile essentielle du giroflier..... | 39 |
| <b>Tableau 4</b> : Les souches bactériennes utilisées.....                                      | 45 |
| <b>Tableau 5</b> : La souche fongique utilisé.....  | 46 |
| <b>Tableau 6</b> : Caractéristiques organoleptiques.....  | 49 |
| <b>Tableau 7</b> : Résultat du rendement.....   | 49 |
| <b>Tableau 8</b> : Résultat de la densité.....  | 50 |
| <b>Tableau 9</b> : Résultat du pH.....  | 51 |
| <b>Tableau 10</b> : Résultat de l'indice de réfraction .....                                    | 51 |
| <b>Tableau 11</b> : Résultats de l'aromatogramme .....  | 54 |

## Liste Des Figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure1</b> : Arbre de giroflier .....   | 3  |
| <b>Figure2</b> : Structure du Giroflier.....  | 3  |
| <b>Figure 3</b> : Fleur de giroflier.....   | 3  |
| <b>Figure 4</b> : Aire de culture de giroflier à Madagascar.....  | 4  |
| <b>Figure 5</b> : Les produits issus du giroflier.....  | 11 |
| <b>Figure 6</b> : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielle.....   | 14 |
| <b>Figure7</b> : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.....   | 18 |
| <b>Figure 8</b> : Entraînement à la vapeur d'eau .....  | 19 |
| <b>Figure9</b> : L'hydro diffusion.....   | 20 |
| <b>Figure10</b> : Les différents types d'extraction par solvants volatils.....  | 21 |
| <b>Figure11</b> : L'hydro distillation .....  | 22 |
| <b>Figure12</b> : Extraction par micro-ondes et hydro distillation traditionnelle.....                                      | 23 |
| <b>Figure13</b> : Différentes morphologies des bactéries .....  | 29 |
| <b>Figure14</b> : Schéma de la paroi des bactéries à gram négatif .....   | 30 |
| <b>Figure15</b> : Schéma de la paroi des bactéries à gram positive .....  | 30 |
| <b>Figure16</b> : Mode d'action des antibiotiques.....  | 32 |
| <b>Figure17</b> : Aromatogramme .....   | 34 |
| <b>Figure18</b> : Schéma d'un couplage d'un chromatographe à tube capillaire à un spectromètre de masse <sup>20</sup> ..... | 37 |
| <b>Figure19</b> : Schéma d'un appareil de chromatographie gazeuse.....  | 38 |
| <b>Figure 20</b> : Clou de girofle .....  | 39 |
| <b>Figure 21</b> : Broyage des clous de girofle .....   | 39 |
| <b>Figure22</b> : Appareil Clavenger .....  | 39 |
| <b>Figure23</b> : Le procédé de re-largage adopté .....   | 40 |
| <b>Figure24</b> : Four Chromatographique .....  | 44 |
| <b>Figure25</b> : Micro-ordinateur menu d'un logiciel .....   | 44 |
| <b>Figure26</b> : Gazes Vecteurs .....  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure27</b> : Ensemencement .....                       | 47 |
| <b>Figure28</b> : Dépôt des disques .....                   | 47 |
| <b>Figure 29</b> : Mesure des halos d'inhibition .....      | 48 |
| <b>Figure30</b> : chromatogramme obtenu lors de la CPG..... | 52 |



## 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* L. est réalisée par la méthode d'hydro distillation. Le test de mise en évidence de son pouvoir antimicrobien est réalisé sur cinq souches bactériennes (*Klebsilla pneumonie*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter sp*, *Staphylococcus aureus*) et sur une souche fongique (*Candida albicans*).

Les résultats montrent que l'huile essentielle du clou de girofle possède une forte activité antibactérienne représentée avec des diamètres d'inhibition variant entre 7,5 mm et 13 mm pour les souches bactériennes et avec un diamètre de 13,5mm 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 conformes aux normes AFNOR.

**Mots clés:** *Syzygium aromaticum* L., huile essentielle, activité antibactérienne, activité antifongique, inhibition, analyse CPG

## **Abstract:**

Biological control by essential oil of Clove *Syzygium aromaticum* L. Essential oils have important antimicrobial activities and can replace with success antibiotics which show their inefficiency against resistant microorganisms. In this study we have tested the antimicrobial activities of EOs Cloves on five strains (*Klebsilla pneumonie*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ,*Acinetobacter sp*, *Staphylococcus aureus* ) add to this antifungal activity was tested on *Candida albicans* , and the study of several proprieties physico-chemical of essential oil extract including GC analysis.

After result obtained we found that the revenue of essential oil is 3.5% this value is acceptable. The results of analyses physicochemical of essential oil were adapted to the norm (AFNOR). Activity antimicrobial is very important especially on *E.coli* 12.5mm and *c Staphylococcus aureus* by 13.5mm and a large inhibition on *Candida albicans*.

**Key Words:** essential oil, GC analysis, antimicrobial activities, physico-chemical analyses, *Syzygium aromaticum* L.

## الملخص

يركز عملنا على دراسة و تحديد النشاطية ضد ميكروبية للزيوت الطيارة لنبات *Syzygium aromaticum* L. و المعروف بالقرنفل مع دراسة الخصائص الفيزيوكيميائية للزيت المستخلص باستعمال عدة تقنيات منها كروماتوغرافيا الطور الغازي CPG .

تمت الدراسة على 5 أنواع البكتيريا *Proteus mirabilis* , *Klebsilla pneumonie* , *Pseudomonas* , *Escherichia coli* , *Acinetobacter sp* , *Staphylococcus aureus aeruginioa* و نوع واحد من الفطر : *Candida albicans*

النتائج المتحصل عليها توضح أن الزيوت الطيارة لأعواد القرنفل تمتلك فعالية بيولوجية قوية ضد البكتيريا حيث كان معدل التثبيط يتراوح بين 7.5 مم و 13 مم أما بالنسبة للفطر كان معدل تثبيطه 13.5 مم.

المردود المتحصل عليه من خلال استخلاص الزيوت الأساسية يقدر بـ 3.5 % رغم ضعف هذه النتيجة إلا أنها كانت حسنة مقارنة مع النتائج المتحصل عليها من قبل دراسات أخرى. أما بالنسبة للتحليل الفيزيوكيميائية و تقنية ال CPG على الزيوت الطيارة لقد أعطت نتائج مطابقة للمعايير الدولية (AFNOR) .

**كلمات مفتاحية :** أعواد القرنفل - الزيوت الطيارة - الفعالية البيولوجية - تقنية ال CPG

Depuis la nuit des temps, pour calmer ses maux, l'homme s'est depuis toujours servi des plantes, il ya 200 ans encore, les moyens thérapeutiques naturels étaient les seules remèdes dont disposait l'humanité. Les plantes médicinales comme les autres remèdes thérapeutiques et l'étiologie ont toujours été intégrés à la culture d'une époque, ou d'une civilisation donnée: l'histoire officielle de la phytothérapie prend ses racines il y a plusieurs millénaires.

Si on définit la phytothérapie d'un point de vue étymologique, le terme "phyto" provient du grec ancien avec le terme plus précis "*phyton*" et signifie "végétal". La phytothérapie est donc la "thérapie par le végétal" dans un but préventif ou curatif - mais également esthétique.

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. On y trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles. La nature de la fonction chimique du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de leurs activités biologiques.

Ainsi, les individus de cette famille possèdent des phénols constitués d'hydrates de carbone aromatiques. Ce type de phénol donne des propriétés antiseptiques à la plante afin de se défendre contre les infections bactériennes. De plus, la forme aromatique concède des odeurs et des goûts particuliers aux Lamiacées, l'une des raisons pour laquelle ces plantes sont souvent utilisées comme épice dans les cuisines. Elles sont très accessibles à la population générale, donc de production abordable pour les communautés locales.

Un immense gisement de molécules actives d'origine végétale se retrouve dans la nature; dans le monde entier, on continue aujourd'hui à rechercher ces plantes susceptibles d'être utilisées comme base de nouveaux traitements ouvrant des perspectives extrêmement prometteuses pour l'industrie du médicament

Dans notre étude nous avons choisi d'utiliser une plante connue par ses effets bénéfiques qui est nommée **Giroflier**; son bouton floral (clou de girofle) possède une odeur

caractéristique et à saveur chaude et piquante. La plante renferme 15 à 20% d'HE extraite à partir des boutons floraux du giroflier. L'essence renferme 85 à 93 % en volume **d'eugénol** libre et combinés. Notre travail consiste à extraire l'huile essentielle de cette espèce afin de tester son activité antimicrobienne.

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans le processus de stress oxydatif et la lutte contre les maladies infectieuses. Mais la découverte des antioxydants synthétiques et des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire. Cette recherche de ressources thérapeutiques végétales a toujours intéressé l'homme qui n'a jamais cessé de se soigner par les plantes qui étaient autrefois les seules sources de guérison de ses maladies.

# **Chapitre I**

## **Revue Bibliographique**

## *Partie I: Description de la plante*

### **I-1-Caractéristiques botaniques :**

Le giroflier est un grand arbre au tronc gris clair de 12 à 15 mètres de hauteur pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de haut (figure1) Il présente un port érigé et pyramidal [30].Son feuillage est aromatique, coriace, persistant vert sombre et vernissé au revers plus clair. Ses feuilles sont opposées, entières, elliptiques, d'environ 10-12 cm à nervure médian marquée et parsemées de glandes sur le revers.



Figure1 : Arbre de giroflier

Les fleurs sont disposées en cymes terminales (figure 2) de 25 fleurs environ, formant 3 fourches (figure3) .Elle se présente sous la forme d'un long pédoncule, petite fleur à l'extrémité des rameaux, à 4 pétales (blanc-rosé) pompon Duveteux d'étamines blanches saillantes, les fleurs à 4 pétales blanc rosé sont caractérisées par leurs **sépales** rouges persistants.



Figure 2 : Structure du Giroflier



Figure 3: Fleur de giroflier

Ce sont les boutons floraux cueillis avant épanouissement que l'on appelle les clous de girofle et l'huile essentielle qui est utilisés pour leurs vertus thérapeutiques ; Les fruits du giroflier sont des baies pourpres comestibles. [26]

La récolte des clous de girofle se fait au moment où ils contiennent le plus d'essence (lorsqu'ils sont roses et les pétales pas encore ouverts). Ces clous sont récoltés, après 6 à 8 ans de culture de l'arbre, 2 fois par an. Ce sont des boutons auxquels on ôte le pédicelle manuellement et que l'on met sécher au soleil jusqu'à ce qu'ils deviennent brun rouge. Boutons floraux appelés « clous ».

Les racines, les rameaux, les feuilles les fleurs et les fruits contiennent tous une HE dont la composition diffère. Par exemple l'HE des feuilles contient seulement 2 à 3 % d'eugénol. L'huile essentielle de girofle provient de la distillation des boutons de giroflier traités à la vapeur[21]

## I-2 Répartition géographique :

Originaire de Madagascar, la Réunion, les Antilles, le giroflier est également cultivé en Indonésie et en Tanzanie. Les clous de girofle américains sont réputés être de qualité inférieure à cause de leur plus faible teneur en huile essentielle.[1]

La superficie couverte par les girofliers à Madagascar s'élève à environ 37 000 hectares, superficie variant sensiblement d'une année à l'autre

Les tonnes produites et la superficie couverte par les girofliers dans chaque zone productrice sont résumées dans la figure ci-dessous.

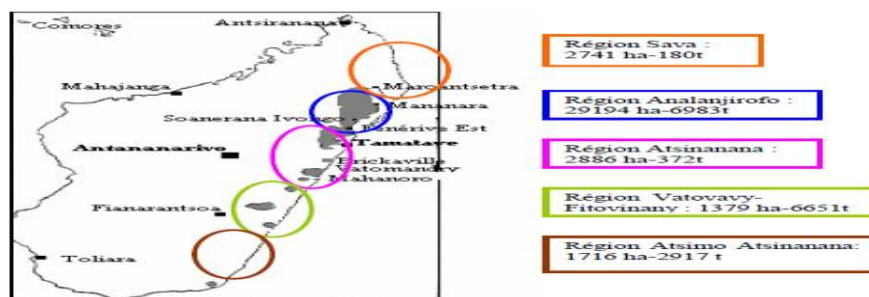


Figure 4 : Aire de culture de giroflier à Madagascar  
Superficie et production des zones productrices



### **I-3 La culture:**

Le giroflier est surtout cultivé pour ses "clous" qui servent d'aromates dans l'alimentation d'un grand nombre du pays. On cultive également le giroflier pour ses feuilles dont on extrait une essence très riche en eugénol. Accessoirement, on utilise les fruits de giroflier ou antofles pour la confiserie.

L'eugénol sert à fabriquer la vanilline artificielle. Les essences de clous, de griffes, défeuilles, de branches et d'antofles servent également en pharmacie pour la préparation de divers médicaments, en parfumerie, en savonnerie, pour la préparation de pâtes dentifrices pour la préparation de certaines peintures et vernis, en chirurgie (propriétés bactéricides et anesthésiant), en droguerie

### **I-4-Vertus médicinaux**

Traditionnellement, les clous de girofle étaient utilisés pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale et de la mauvaise haleine. En usage externe contre le rhumatisme, les myalgies (douleurs musculaires), la sciatique et anesthésiant local dans les soins des plaies. Par voie orale, les clous de girofle sont utilisés dans le traitement des troubles digestifs: ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion [23].

**Son HE possède de différentes caractéristiques, on cite :**

- Elle a un pouvoir Anti-infectieux ; antibactérien puissant à large spectre d'action, utile par exemple lors de colite bactérienne ; mais aussi antivirale lors par exemple d'hépatite virale antifongique, antiparasitaire. [21]
- Un pouvoir Antiseptique et antalgique dentaire : infections dentaires, odontalgie.
- Un pouvoir Anesthésique local : l'eugénol inhibe la conduction nerveuse.
- Un pouvoir Anti-inflammatoire : l'eugénol inhibe la synthèse des prostaglandines.
- Un pouvoir Stimulant général: neuro-tonique, utéro-tonique, aphrodisiaque légère : Utilisée en cas d'asthénie
- Un pouvoir Stomachique\*, antispasmodique et carminative.
- Anti-infectieux majeur, l'eugénol possède des propriétés antibactériennes et inhibitrices du transit et des sécrétions intestinales anti-agrégant plaquettaire par

l'action de l'eugénol qui inhibe la cyclo oxygénase, inhibe la synthèse de prostaglandines, notamment par la muqueuse

- Troubles digestifs : il possède des propriétés antispasmodiques (du fait de la présence d'acétyl eugénol soulageant les troubles digestifs et la toux
- Elle est employée pour cautériser la pulpe dentaire, et, combinée à l'oxyde de zinc pour former des eugénates servant de pansements dentaires provisoires ; elle entre
- Aussi dans les mixtures odontalgiques
- Stimulant physique et intellectuel

### **I-5-Autres utilisations :**

En agriculture, l'huile essentielle possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les champignons [1] effet insecticide sur les charançons nuisibles des graines en stocks

Les clous de girofle entiers, mais aussi en poudre, servent à aromatiser les conserves de légumes, le chou rouge ou la choucroute, les compotes de pommes et autres fruits. [6]

## ***Partie II : Généralités sur les métabolites secondaires***

### **II-1 Généralités :**

Une façon de comprendre la notion de métabolisme secondaire est de passer par un détour historique. Comme chacun sait, de très nombreuses plantes médicinales ou aromatiques contiennent des métabolites qui leur sont très spécifiques et à des teneurs parfois extrêmement élevées [6]

Devant la quantité et la diversité des molécules caractérisées, s'est rapidement posée la question de leur rôle biologique éventuel ?

Dans la mesure où ces molécules ne sont retrouvées que chez quelques espèces uniquement, on a d'abord pensé qu'elles ne pouvaient avoir aucun rôle réellement important en comparaison des métabolites universellement représentés comme les glucides, les protéines, les lipides ou les acides nucléiques et dont les fonctions biologiques commençaient déjà à être solidement établies. Une opposition s'est ainsi dessinée entre :

- d'un côté le métabolisme primaire, désignant un métabolisme à la fois universel et participant aux fonctions cellulaires,
- et de l'autre le métabolisme secondaire, désignant un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante.

Les métabolites secondaires impliqués étroitement dans ces stratégies [3]

**a) dissuader les prédateurs :**

- les odeurs repoussent les herbivores.
- les plantes toxiques 'éduquent les herbivores à les éviter' pour ne pas être broutées.

**b) attirer les pollinisateurs :**

Les couleurs et les odeurs attirent les insectes. Par exemple, certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.

**c) décourager la compétition vis-à-vis d'autres espèces :**

Certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes, c'est le cas du noyer qui produit de la *juglone* qui inhibe la croissance des autres plantes dans un rayon de 8 m autour du tronc. Ce phénomène est appelé *l'allélopathie*.

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les **alcaloïdes**
- Les **composés terpéniques**
- Les **composés phénoliques**

**II-2 les Alcaloïdes :**

## II-1-1-Définition

Ce sont des produits azotés basiques, d'origine naturelle dont l'atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et dont l'activité pharmacologique est significative.

Les pseudo-alcaloïdes ne sont pas des dérivés des acides aminés. On les nomme alors alcaloïdes terpéniques et les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Les alcaloïdes ont, de plus, la propriété de réagir avec des sels de métaux lourds, ce qui permet leur caractérisation aisée (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardat) : [12]

Des structures de type alcaloïde existent chez les animaux provenant parfois de la transformation d'alcaloïdes trouvés dans le régime alimentaire : les alcaloïdes pyrrolizidiniques proviennent de plantes consommées par les insectes.

Ce sont des bases qui donnent des sels bien cristallisés avec les acides. Ces sels sont solubles dans l'eau mais insolubles les solvants organiques.

Les alcaloïdes bases sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques.

Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...). [6]

- Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine).
- Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine)

## II-3 Les composés Terpéniques :

### II-3-1-Définition :

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles.

L'étude de leur métabolisme connaît un regain d'intérêt par suite du développement des méthodes. Analytiques auxquelles est venu s'ajouter l'outil moléculaire Les études sur les

différentes voies de biosynthèse des terpènes ont donné lieu à plusieurs revues Bibliographiques

Par contre, on possède peu d'informations sur la compartimentation cellulaire et les régulations des systèmes mis en jeu. [15]

Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) reconnue par Wallach dès 1887. Cet Isoprène est à la base du concept de la "règle isoprénique"

Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle, désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel on les désigne également. [6]

**Tableau1** : différentes formules des mono terpènes

| <b><u>Mono terpènes Formule générale</u></b> |                                 |
|--|---------------------------------|
| Limonène                                     | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> |
| Pinène                                       | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> |
| Sabinene                                     | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> |
| Myrcène                                      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> |
| γ-Terpinène                                  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> |
| para-Cymène                                  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> |

## **II-4 Les composés phénoliques :**

### **II-4-1-Définition :**

Les Polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzoïque auquel est directement lié un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. Les composés phénoliques sont synthétisés à partir de métabolites primaires via deux voies : la voie de l'acide shikimique et la voie des poly-acétates. Les phénols furent les premiers agents antiseptiques et désinfectants largement utilisés [26]

De nombreuses études *in vitro* menées sur les composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variables. En effet certains quinones présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas vis à vis des bactéries à Gram négatif. Les acides-phénols ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes.[34]

Des récentes études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes [20] : inhibitions de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et de la germination des spores d'*Aspergillus niger*. Pour l'activité antibactérienne on note qu'ils sont plus efficaces contre les Gram positifs

Les flavonoïdes avec leur différentes classes dont les plus importantes sont : les flavones, flavonols, flavonones, flavonones 3-oles, flavanes-3,4 dioles, et les anthocyanidines ; ont un grand potentiel antibactérien :

- en se complexant avec des composants des parois avec inhibition de la croissance microbienne ;
- **en perturbant leurs métabolismes énergétiques**

**D'autre part, les tanins sont largement connus par leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes grâce à leur pouvoir à former des complexes stables avec les protéines et en les précipitant [3] Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport [16]**

Les phénols sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires ; ils sont solubles dans les solutions d'hydroxyde de sodium et de carbonate de sodium.

Les acides –phénols sont solubilisés par les hydrogencarbonates ; ils sont extractibles dans les milieux organiques légèrement acides.

Les formes hétérosidiques de ces composés phénoliques solubles dans l'eau.

Tous ces composés sont instables. Tous les phénols sont facilement oxydables surtout en milieu alcalin. [28]

## II-5 Les huiles essentielles :

### II-5-1-Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydro distillation ou par expression mécanique [9].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.[41]

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 entraînement 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 [34]

Les huiles essentielles (figure5) 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 [06]



Figure 5 : Les produits issus du giroflier

## **II-5-2 Les plantes aromatiques :**

Les plantes aromatiques sont, par définition, des plantes dont les tissus sécrètent suffisamment d'essence pour que celle-ci puisse être extraite distillée. Elles contiennent les molécules aromatiques ou odorantes dans un ou plusieurs de ses organes producteur : feuille, fleurs, fruits, graines, écorces, racines ... Tout plante à odeur n'est pas toujours une plante aromatique : le tilleul est un arbre odorant mais il n'existe pas d'huile essentielle de tilleul.[24]

## **II-5-3 Essence :**

L'huile essentielle est donc l'essence distillée .C'est le résultat de la distillation à la vapeur d'eau des plantes ou arbres aromatiques pour un extraire l'essence. Une essence et une huile essentielle sont deux substance différentes tant en nature qu'en composition, notamment en raison des modifications biochimiques que subit l'essence au cours de sa distillation.[39]

Toutefois dans l'usage courant le terme «essence» est souvent utilisé pour parler d'une huile essentielle.

L'essence c'est une la substance aromatique naturelle que sécrète la plante danses organes producteurs. Pour être exacte, on parle d'essence de citron et non d'huile essentielle de citron, car elle n'a pas été distillée.

## **II-5-4 Hydrolat aromatique**

L'hydrolat est l'eau distillée que l'on sépare de l'huile essentielle à la sortie de l'alambic, elle est plus ou moins aromatisée selon les plantes distillées car elle se charge de molécules aromatiques au cours de la distillation [35]. Les hydrolats contiennent sous forme naturellement dissoute certains composés aromatiques des huiles essentielles (moins de 5%).

On trouve beaucoup les acides dans les hydrolats car ils sont hydrosolubles.Ce sont des composés très actifs et efficaces même à l'état de traces (anti-inflammatoire) [42].



## **II-5-5 Répartition et localisation des huiles essentielles :**

On rencontre les huiles essentielles dans divers familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et forment dans le cytoplasme de cellules spécialisée.

### **II-5-5-1 Répartition :**

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y aurait 17500 espèces aromatiques.

Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent l'huile essentielle sont réparties dans un nombre limite de familles, EX: Lauraceae (laurier), Rutaceae (citron) Myrtaceae (Girofle) [42] .

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemple : dans les sommités fleuries (menthe, lavande) les feuilles (eucalyptus, laurier) les rhizomes(Gingembre) les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (vétiver), les graines (muscades), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (cannelier). [36]

### **II-5-5-2 Localisation :**

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux (figure6) leur synthèse et accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante exactement aux :

- Tissus ou cellules sécréteurs externe : épiderme
  - Cellules épidermiques sécrétrices : les cellules de l'épiderme sécrètent des essences ex : épiderme à papilles des pétales de rose.
  - Poils sécréteurs : responsable du parfum de certaines plantes.
- Tissus ou cellules sécréteurs internes :

- Les cellules isolées internes : se différencient à partir des cellules parenchymateuses, elle s'en distingue par leur taille très importante et leur paroi cellulosique légèrement épaisse

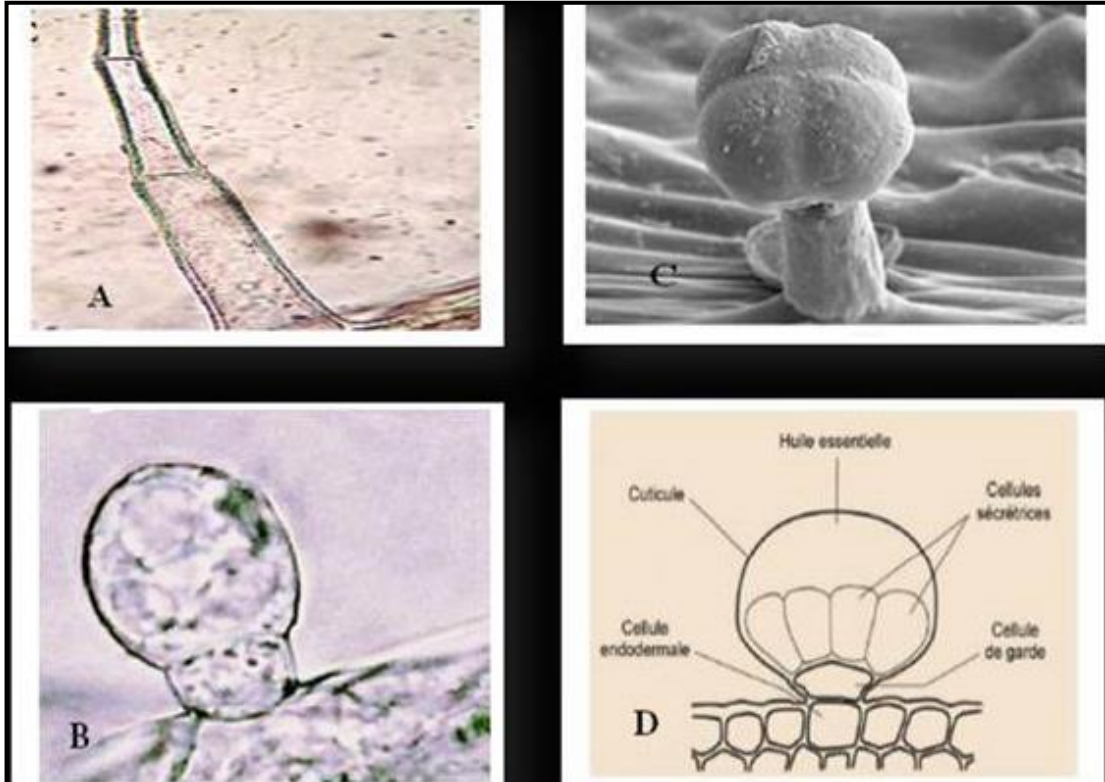


Figure6 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielle

Les poches et canaux sécréteurs :

- Les poches sécrétrices 2 type selon leur mode de formation :

Les **poches schizogène** : une cellule parenchymateuse se divise selon deux plans perpendiculaires ; les quatre cellules obtenues aménagent entre elles une petite lacune ; puis elles se divisent selon un plan radial ; on obtient ainsi une lacune bordée par plusieurs cellules sécrétrices. [36]

**Ex** : poches sécrétrices des Myrtaceae comme l'Eucalyptus et le Giroflier

Les **poches schizolysigènes** : le procédé de formation de ces poches est identique au précédent. Mais une fois la lacune formée, les cellules subissent des divisions tangentiellles, on obtient autour de la lacune plusieurs assises de cellules disposées en file radiale

**Ex** : Rutaceae, abondantes dans le zeste de citron

## II-6 Les Propriétés des huiles essentielles

### II-6-1 Les Propriétés biologiques :

La diversité des constituants présents dans les huiles essentielles entraîne des Activités [28] :

- **propriété de diurèse** : faisant fonctionner les quatre grands émonctoires (peau avec Ses trois glandes, reins, poumons et intestins) et facilitant le drainage des déchets et des Résidus hormonaux solubles et insolubles vers leurs émonctoires.

- **propriétés spasmolytiques et sédatives** : de très nombreuses drogues à huiles essentielles (badiane, menthe, verveine,...) sont efficaces pour diminuer ou supprimer les Spasmes gastro-intestinaux.

- **propriétés irritantes** : augmentent les mouvements de l'épithélium cilié au niveau de l'arbre bronchique et l'élimination rénale d'eau par effet local directe

### **II-6-2 Propriétés physiques des huiles essentielles :**

En ce qui concerne les propriétés physique, les HE forment un groupe très homogène; les principales caractéristiques sont :

- Les HE sont liquides à température ambiante.
- Sont volatils contrairement aux huiles fixes ; d'où leur extraction est faite par la vapeur d'eau.
- Sont rarement colorées.
- Ont une Odeur aromatique.
- Ont une densité inférieure à celle de l'eau sauf les essences de Cannelle, Safran, Camomille, Girofle.
- Leur indice de réfraction est élevé.
- Ils Sont Insolubles ou peu solubles dans l'eau.
- Sont Solubles dans les huiles fixes, l'eau les alcools et solvants organiques apolaires.
- Leur volatilité augmente avec la chaleur.
- Leur consistance est huileuse mais non grasse.

### **II-7-Composition chimique des huiles essentielles:**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui appartiennent à 2 groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes [41] :

a- Dérivés terpéniques

b- Les composés phénoliques aromatiques dérivés du phényl propane (C6\_C3)

c-Composés d'origine diverses

**a) Les dérivés terpéniques :**

Les composés de type terpénique sont largement rencontrés dans les huiles essentielles. Bien que les hydrocarbures terpéniques aient des structures très diverses, ils sont formés d'un multiple pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ou appelé encore **Isoprène**.

Les terpènes le plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée telles que les mono et les sesquiterpènes [6]

**b) Les composés phénoliques :**

Les composés phénoliques dérivés du phénylpropane (C6-C3) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Souvent, ils sont des allyles, des propénylnénols et parfois des aldéhydes, on peut également retrouver des composés en C6\_C1 comme la vanilline de la Vanille [35]

**c) Composés d'origine diverses :**

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles, ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits, selon leurs origines biosynthétiques [43] :

**Composés issus de la dégradation d'acides gras :**

La formation d'acide an C9 ou C 12 et ultérieurement des alcools d'aldéhydes et

De faible masse moléculaire

**Composés issus de la dégradation de terpènes:**

Les irones cétones en C14 sont des produits de dégradation caractéristique [6]

**Tableau2 :** Différents types de molécules qui composent les huiles essentielles.

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b><u>diterpènes</u></b> |  |
| Phytol                   | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              |
| <b><u>Alcools</u></b>    |  |
| Géranol                  | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> OH             |
| Linalool                 | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> OH             |
| <b><u>Aldéhydes</u></b>  |  |
| Citral                   | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              |
| Cuminicaldéhyde          | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O              |
| <b><u>Cetones</u></b>    |  |
| Camphor                  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              |
| Carvone                  | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              |
| <b><u>Phenols</u></b>    |  |
| Thymol                   | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              |
| Eugénol                  | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> |
| <b><u>Oxides</u></b>     |  |
| 1, 8-Cineol              | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              |
| Linalool                 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              |

## II-8 Classification des huiles essentielles

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromatogramme, les huiles essentielles sont classées en groupe [34]

- ❖ Les huiles majeures.
- ❖ Les huiles médiums.
- ❖ Les huiles terrains.

### II-8-1 Les méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, de caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction.[22] Les principales méthodes d'extraction sont[43] :

- La distillation à vapeur saturée
- Entraînement à la vapeur d'eau

- L'hydro diffusion
- L'expression à froid
- Extraction par solvants
- Hydro distillation
- Extraction par les corps gras
- Extraction par micro- ondes

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quelque soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle [21], puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est explicité dans la (figure 7).

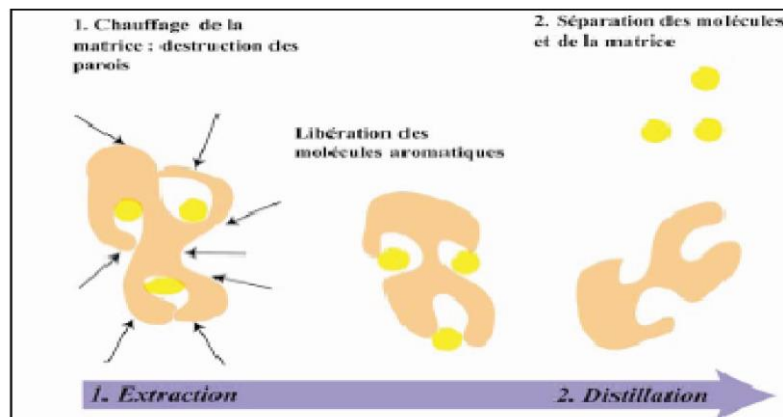


Figure7 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle

### II-8-1-1 Entraînement à la vapeur d'eau :

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. [17]

Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau (Figure 8). Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation.

En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux:

- ❖ au niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent.
- ❖ au niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau.

Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydro distillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydro diffusion. [41]

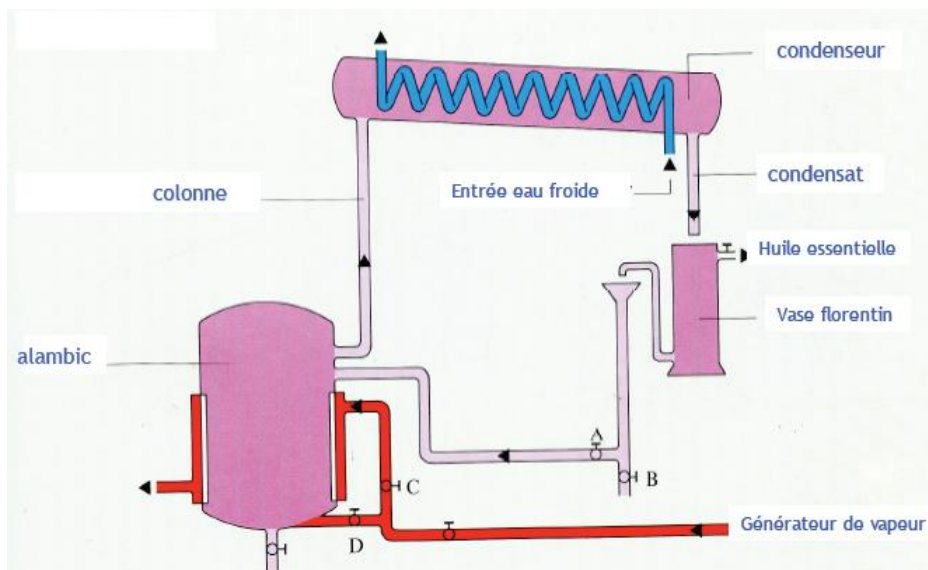


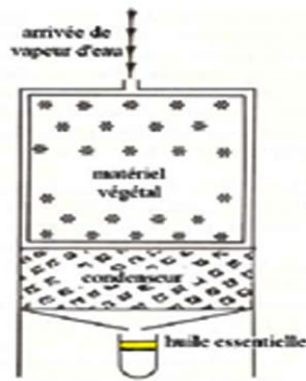
Figure 8 : Entraînement à la vapeur d'eau

### II-8-1-2 L'hydro diffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale (figure. 9), du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant [37]

L'avantage de cette Technique se traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie.





**Hydrodiffusion**

Figure9 : Procédé d'hydrodiffusion

### **II-8-1-3 La distillation à vapeur saturée :**

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées. [17]

### **II-8-1-4 L'expression à froid :**

L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange (figure), la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. [7]

D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau. [42]

### **II-8-1-5 Extraction par solvants :**

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu.

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite (figure.10), sera éliminé par distillation sous pression réduite.(figure10)

L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool [20]. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants.

Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure. [17]

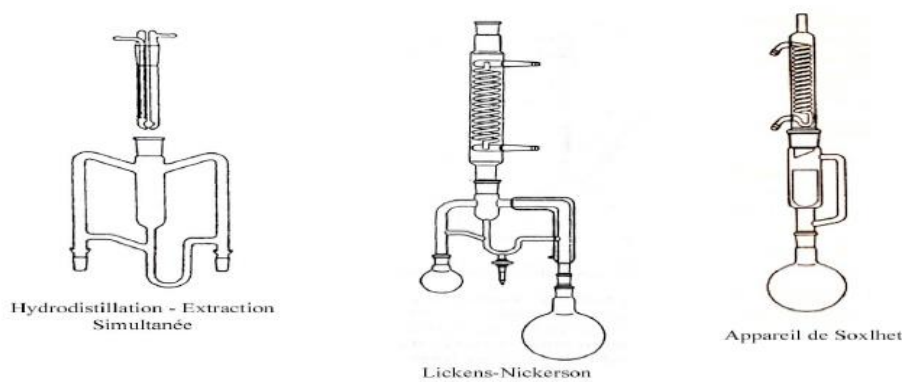


Figure10: Les différents types d'extraction par solvants volatils.

### II-8-1-6 Hydro distillation :

Le principe de l'hydro distillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible (figure 11).

Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, [37] c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux.

Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation [17].

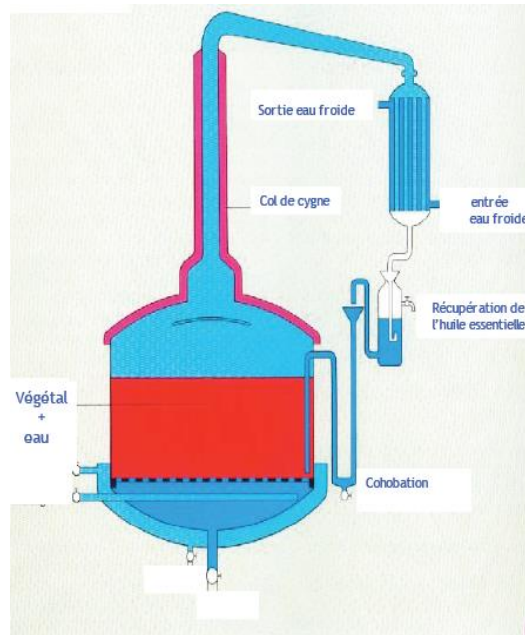


Figure 11 : Procédé de l'hydro distillation

### II-8-1-7 Extraction par les corps gras :

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la lipo-solubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras.

Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite.

Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras.[20]

### II-8-1-8 Extraction par micro- ondes :

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelée (Vacuum Microwave HydroDistillation)

(VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes

D'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences.[37]

Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction (figure12), l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition.

Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants: rapidité, économie du temps d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvant résiduel. [17,18]

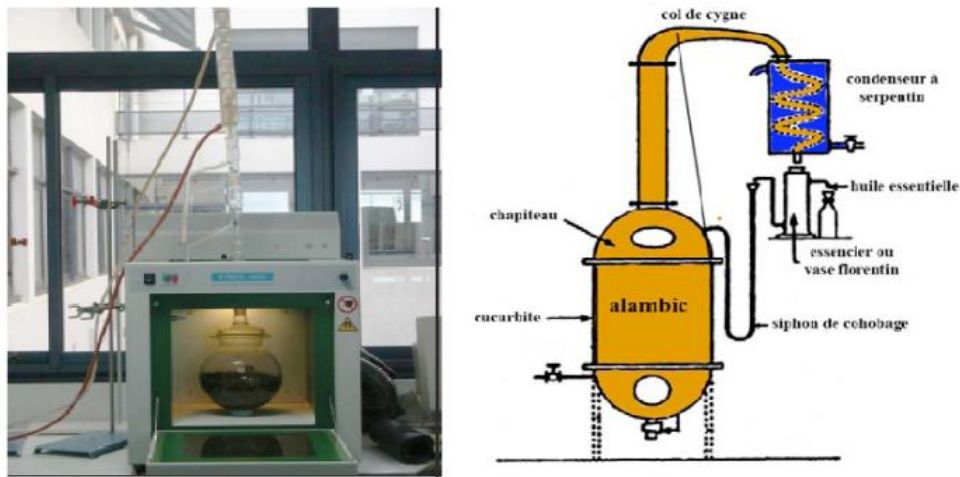


Figure12: Extraction par micro- ondes et hydro distillation traditionnelle.

## II-8-2 Toxicité des huiles essentielles:

### ➤ Toxicité aigüe :

En général les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale faible ou très faible ; Anis, Eucalyptus, Girofle. Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo peuvent provoquer des convulsions. [19]

### ➤ Toxicité chronique :

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue, au moins en ce qui concerne leur utilisation dans le cadre de pratique comme l'aromathérapie et ce quelle que soit la voie d'administration : les éventuelles effets secondaires ne sont que rarement signalés, on dispose par contre de beaucoup de données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi [19]

➤ **Toxicité dermiques :**

L'application locales de certaines huiles essentielle peuvent être responsable d'éventuelles toxicité tel que le pouvoir irritant (Moutarde, Thym) ; sensibilisant (Saussurea) ou photo toxique (Angélique, Bergamote)[19]

### II-8-3 Les critères de qualité des huiles essentielles

Des critères de qualité stricts doivent guider l'achat de l'huile essentielle utilisée pour la sante [27]

➤ **La certification botanique** l'appellation de la plante doit préciser le genre l'espèce la sous espèce Le cultivar afin d'éliminer le risque d'erreur issu de noms vernaculaires locaux

➤ **L'origine géographique** le nom du pays ou d'une région apporte de précisions intéressantes sur le biotope facteur environnementaux de la plante aromatique et déterminera une composition biochimique particulière

➤ **Le stade de développement botanique** les caractéristiques de la composition biochimique d'huile essentielle dépendent parfois du stade de développement végétal moment de la cueillette avant pendant ou après la floraison

➤ **L'organe distille** la composition biochimique des huiles essentielle varie en fonction de la partie ou l'organe de la plante distillée l'écorce de cannelle de Ceylan ne contient pas la même essence que les feuille du même arbre

➤ **Le mode d'extraction** expression a froid hydro distillation par entrainement à la vapeur d'eau influence aussi la composition de l'huile essentielle.

➤ **Le chemotype** l'analyse chromatographique en phase gazeuse couplée a la spectrométrie de masse apportera les précisions fondamentales quant aux molécules particulières et spécifiques rencontrées dans les huiles essentielles [40]

### **II-8-3-1 Identification de la plante :**

La plante aromatique servant à extraire une huile essentielle devra être parfaitement définie.

Une mauvaise dénomination ou une dénomination non précise est source de confusion et toxicité des huiles essentielles. Il est donc indispensable de suivre la dénomination scientifique. [10]

#### **Les principales familles sont :**

- les Lauracées représentées par les cannelles, lauriers, ravensares...,
- les Lamiacées composées des lavandes, thym, menthes, basilics, romarins...,
- les Myrtacées composées des eucalyptus, girofliers, mélaleuques (niaouli), Tea tree ; giroflier...

### **II-8-3-2 Famille des myrtacées :**

La famille des Myrtacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend plus de trois mille espèces réparties en 48 à 134 genres environ. Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques, des zones tempérées, subtropicales à tropicales, poussant principalement en Australie et en Amérique tropicale.

Eucalyptus (près de 600 espèces) ; Eugenia (400 espèces) ; Syzygium (300 espèces d'Australie et d'Asie).

#### **II-8-3-2-1 Systématique de la plante :**

|                      |  |
|----------------------|--|
| Sous royaume :       | Trachéophytes                                |
| Embranchement :      | Spermatophytes                               |
| Sous embranchement : | Angiospermes                                 |
| Classe :             | Dicotylédones                                |
| Famille :            | Myrtaceae                                    |
| Genre :              | <i>Syzygium</i>                              |
| Espèce :             | <i>Syzygium aromaticum</i> L. Merril & Perry |

### **II-8-3-2-2 Le clou de girofle : *Syzygium aromaticum* L.**

Il s'agit du boutons floraux sont récoltés une à deux fois par an, avant l'épanouissement, lorsque les sépales deviennent rouge vif, on les sèche au soleil jusqu'à obtenir une coloration brune.

Si les clous de girofle sont maigres, légers et ridés, c'est qu'ils doivent avoir été partiellement Épuisés par la distillation. L'examen microscopique permettra également de s'assurer si les glandes oléifères sont pleines ou vides d'huile essentielle

Un clou de girofle de **qualité supérieure**, à l'état de **matière première** doit avoir les caractéristiques suivantes :

- ❖ **Présence de la tête du clou (forme de dôme)**
- ❖ **Sec**
- ❖ **De grande taille**
- ❖ **Couleur rouge brune**

Un lot de qualité supérieure est composé de clous de girofle de qualité supérieure (dont les caractéristiques sont précisées ci-dessus) et des caractéristiques suivantes :

- ❖ **Absence de matières étrangères**
- ❖ **Absence d'impuretés végétales (griffes, feuilles, fruit...)**
- ❖ **Absence de clous fermentés (appelés *khoker*)**

L'huile essentielle se présente sous la forme d'un liquide huileux De couleur jaune fonçant au brun à la lumière. ; Elle est obtenue par hydro distillation

L'huile essentielle des clous de girofle contient principalement de l'eugénol, de 75 à 85 %, de l'acétate d'eugénol ,4 à10 %, du  $\beta$ -caryophyllène, de 7 à 10 % et de faibles quantités d'autres produits (dont un peu de vanilline).

### **II-8-3-2-3 Le principe actif Eugénol :**

L'eugénol est le composant principal de l'essence de clou de girofle, *Eugénol* ou 4-allyl-2-méthoxyphénol , liquide pratiquement incolore, brunissant à l'air à une formule brute  $C_{10}H_{12}O_2$ , est une molécule possédant un cycle aromatique, ce qui est caractéristique des

composés d'origine naturelle. C'est pourquoi cette molécule peut être obtenue au moyen d'extraction à partir d'huile essentielle de clou de girofle

### **II-8-3-2 Garanties de l'extraction d'une huile essentielle :**

La distillation est un procédé délicat exigeant patience et expérience. Les distillateurs étant payés au kilogramme d'huile essentielle, il est tentant pour certains de distiller à haute pression pour diminuer la durée de distillation, ou encore de stopper la distillation au bout de 30 minutes. [42]

### **II-8-3-1 La qualité de l'huile essentielle dépend directement :**

- **De la nature de l'eau** : on préférera une eau de source peu ou pas calcaire permettant d'obtenir un produit de meilleure qualité et d'éviter un détartrage annuel complet ou encore l'utilisation de détartrant chimique dans l'eau d'entraînement
- **Du matériau de l'alambic** : il en existe en fer, en cuivre et en inox. On le choisira de préférence en inox car les alambics en fer s'altèrent lors de la distillation de cyprès et des oxydes sont probablement formés dans des alambics en cuivre ou en fer ;
- **De la pression** : elle sera basse, idéalement inférieure à 0,05 bar afin de ne pas risquer de suroxydation des molécules ; Une distillation sous basse pression est inévitablement plus longue.
- **De la durée de la distillation** qui doit être longue afin d'obtenir les molécules aromatiques peu volatiles, apparaissant seulement après de nombreuses heures de distillation. [13]

### **II-4-9 Précautions d'emploi :**

- Ne jamais appliquer une huile essentielle pure sur la peau les muqueuses ou autour des yeux.
- Ne jamais utiliser d'huile essentielle par voie orale sans l'avis d'un aromathérapeute qualifié.
- Conserver les huiles essentielles hors de portée des enfants,
- certaines des HE sont des poisons mortels en cas d'ingestion.
- En cas d'ingestion accidentelle, prendre 1 à 10 cuillerées d'huile végétale. Consultez un médecin [9]



## **Partie III : Généralités sur le monde microbien**

### **III-1Généralités :**

Plusieurs chercheurs suspectaient l'existence des êtres vivants invisibles provoquaient les maladies. Les premières observations au microscope furent sans doute réalisées entre 1625 et 1630 sur des abeilles et des charançons par l'Italien Francesco Stelluti à l'aide d'un microscope probablement fabriqué par Galilée. Cependant la première personne qui réellement observa et décrit des microorganismes est un Hollandais, amateur de microscope [29 ; 30]

#### **III-1-1 Action des microorganismes sur les maladies :**

L'infection engendrée est la conséquence du développement, d'un microorganisme pathogène dans un organisme sain : bactérie, parasite, [30] virus ou autres. Elle résulte de la rupture d'équilibre qui existe entre le germe et l'homme (hôte). Ce déséquilibre provient donc soit d'une diminution des défenses du sujet (congénitale ou acquise), soit d'un accroissement de virulence de germes.

Les bactéries pathogènes sont transmises à l'hôte de diverses façons :

- 1- ingestion d'eau ou d'aliments contaminées (voies digestives).
- 2- inhalations d'aérosols ou des particules associés à des bactéries (voies respiratoires).
- 3- inoculation cutanées par contact direct ou indirect (voies cutanées).
- 4- inoculation muqueuse directe par la salive ou la sécrétion sexuelle
- 5- inoculation transcutanées par les insectes (*Yersinia pestis*, *Rickettsia*, *Borrelia* ...).par traumatismes ou manipulation iatrogènes [26]

#### **III-1-2 Définitions des bactéries :**

##### **III-1-2-1 La morphologie et la structure:**

On peut distinguer trois formes caractéristiques : les sphériques, les allongées et les spiralées (figure 13) La position des bactéries les unes par rapport aux autres est également une caractéristique distinctive importante [43].

- ❖ 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.

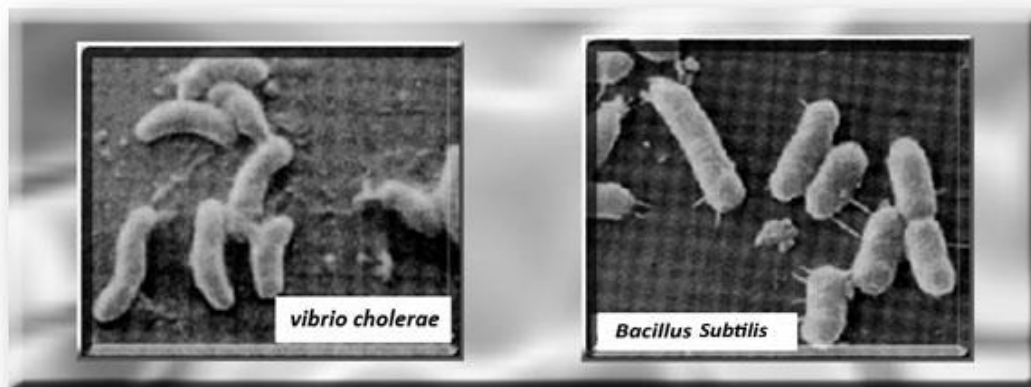
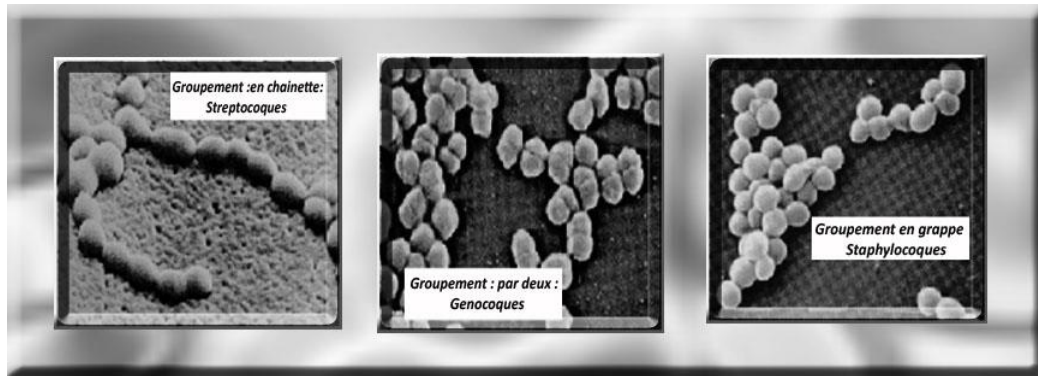


Figure13 : Différentes morphologies des bactéries

### III-1-2-2 pouvoir pathogène :

La plupart des bactéries étudiées ont un pouvoir pathogène naturel et sont résistantes naturellement à certains antibiotiques.

#### III-1-2-2-1 Bactéries Gram négatif

Les bactéries Gram négatifs ont adopté une solution différente pour protéger leur Membrane cytoplasmique (figure14), ils fabriquent une structure particulière, la membrane externe, située à l'extérieur de la muréine

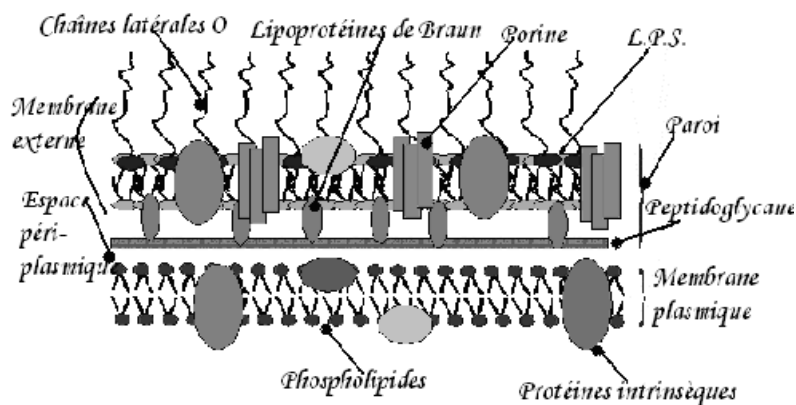


Figure14 : Schéma de la paroi des bactéries à gram négatif

- **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 [44 ]

- **Proteus sp :**

Les *Proteus sp* sont des bacilles à Gram négatif, répandues dans la nature et elles sont isolées l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques. Chez l'homme, les infections les plus fréquentes concernent l'appareil urinaire [30].

Les *Proteus* sp. sont également responsables d'infections diverses : infections cutanées, infections de l'œil, infections de l'oreille... et, plus rarement [44], de septicémies et de méningites particulièrement graves chez les nourrissons. Leur rôle dans des gastro-entérites infantiles et dans des gastro-entérites succédant à l'ingestion d'aliments contaminés a été évoqué.

- ***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.[13]

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. [30]

- ***Acinetobacter* :**

Les *Acinetobacter* sont des bacilles immobiles, souvent groupés en diplobacilles courts, aérobies stricts, oxydase négatif, habituellement saprophytes. Ils jouent un rôle d'opportuniste mineur en milieu hospitalier. Ces espèces jouent un rôle important dans les infections nosocomiales et sont volontiers multi-résistantes aux antibiotiques (résistance naturelle et acquise), ce qui en rend le traitement difficile.[44]

### **III-1-2-2-2 Bactéries Gram positif**

Les bactéries Gram positif protègent leur membrane avec une paroi épaisse, le composant majeur de la paroi est polymère complexe de sucres et d'acides aminés, appelé muréine ou peptidoglycane (figure15)

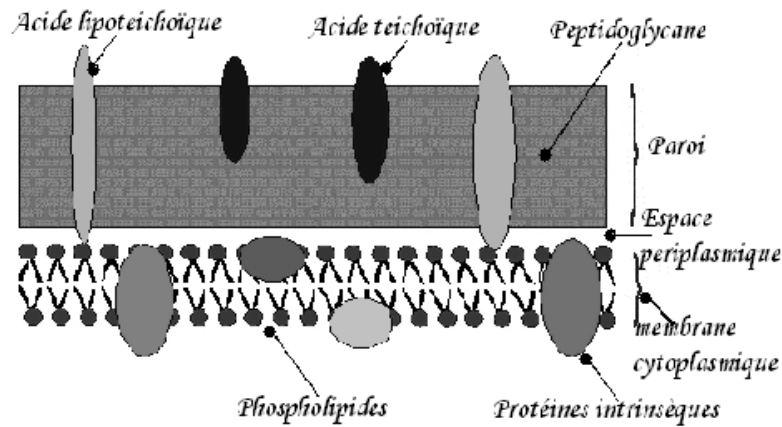


Figure15 : Schéma de la paroi des bactéries à gram positive

- ***Staphylococcus aureus* (rosenbach 1884)**

Ce sont des coques gram positif arrondis d'environ 1µm de diamètre immobiles dépourvus de spores et de capsules responsable de septicémie , infection alimentaire et entérocolites aiguë ; inflammation locales et infection cutané muqueuse ,panaris abcès du poumon ,entérites ,inflammation de épithélium vulvo-vaginal.

- ***Streptocoque***

Ce sont des cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïde provoquent de très nombreuses infections dont font partie les maladies suivantes : angine bactérienne, infections cutanées , infections des voies respiratoires comme les pneumopathies, certaines méningites, des infections généralisées. Les streptocoques sont généralement sensibles aux antibiotiques, dont les plus utilisés à son encontre sont les pénicillines.

### III -1-2-2-3 Les levures :

- ***Candida albicans* (berkhout 1923)**

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.

Les candidoses orale et œsophagienne sont fréquentes chez le patient atteint de sida ; lorsque candida s'infiltré dans le flux sanguin , l'infection devient systémique et on parle alors de candidemie.

### **III- 4 Mode d'action des huiles essentielle**

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé Compte tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action [25], impliquant différentes cibles cellulaires

Le mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire, d'une manière générale, leur action se déroule en trois phases [29] :

- attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie

### **III-5 Activités biologiques des huiles essentielles**

#### **III-5-1 Activité anti microbienne :**

L'activité antimicrobienne est souvent considérée comme caractéristique des huiles essentielles sur des sites précis (Figure 16).

Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes pour déterminer en général, Les propriétés médicinales et en particulier les propriétés antimicrobiennes. Récemment ont isolé une quinoline alcaloïdique qui manifeste une activité antimicrobienne localisé [10].

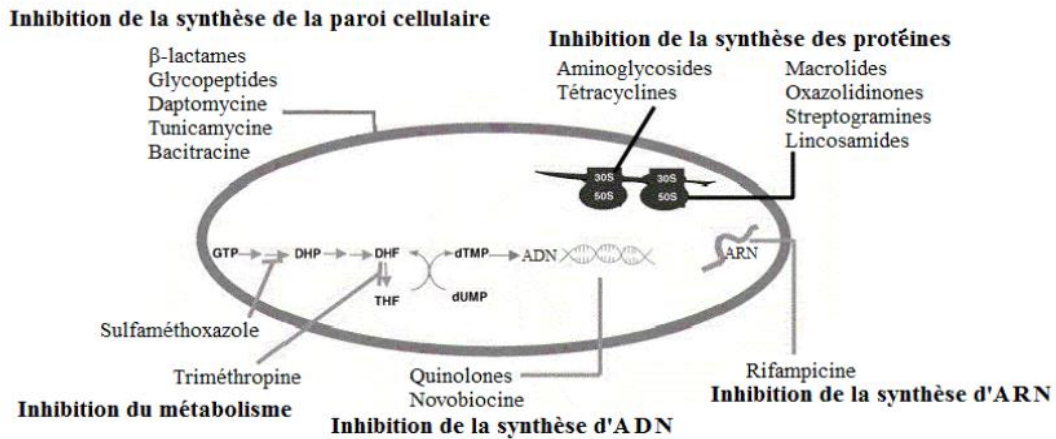


Figure16: Mode d'action des antibiotiques DHP: dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate

### III-5-2 L'activité antibactérienne des huiles essentielles :

L'activité antibactérienne s'exerce de 2 manières différentes [36] :

- ❖ 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

Exemple : Le staphylocoque doré est sensible à l'huile essentielle du Thym, Origan, Sarriette

### III-5-3 Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des HEs des plantes aromatiques à été mis en évidence par de nombreux auteurs, et cela contre les moisissures allergisantes [29]

Des travaux similaires ont été réalisés et ont démontré que les HEs de thym, de la sarriette et du **clou de girofle** présentent une activité antifongique « *in vitro* ».

### III-6 Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne in vitro d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. [40]

#### III-6-1 Technique en milieu solide (Aromatogramme)

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques.(figure17) [6].

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des H.E testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [36] Il s'agit d'une Méthode en milieu gélosé à l'agar1 réalisée dans une boîte de Pétri.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d' H.E.

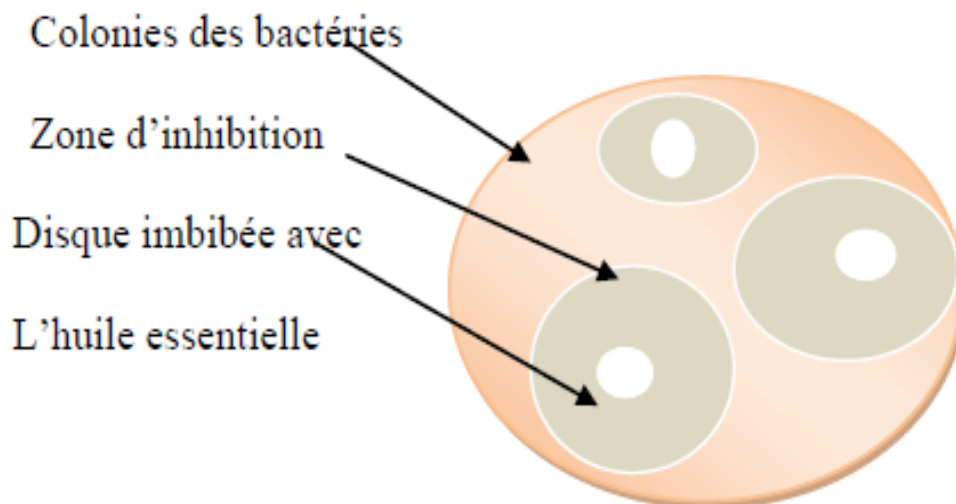


Figure17 : L'Aromatogramme



### **III-6-2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution)**

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI) habituellement exprimée en mg/ml ou mg/litre

#### **III-6-2-1 La dilution en bouillon**

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide.

La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum. L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses.[16]

#### **III-2-2La dilution en gélose**

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte [16]

### ***Partie VI : Méthodes d'identification des composés des huiles essentielle***

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures Physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur Sont aussi des paramètres importants [40]

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître la composition chimique d'une manière très exacte.

## VI-1 Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence

L'appareillage CPG/SM (Figure 18) permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un

ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui Permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG [29]

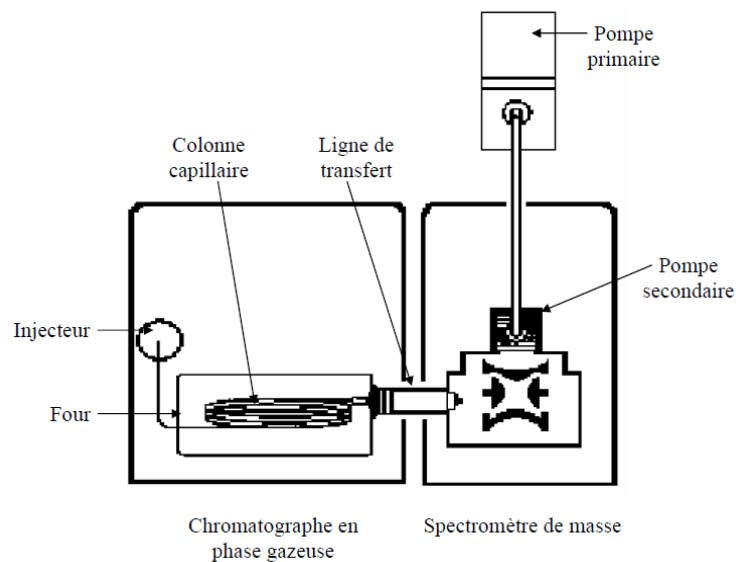


Figure18 : Schéma d'un couplage d'un chromatographe à tube capillaire à un spectromètre de masse

## VI-2 Chromatographie en phase gazeuse(CPG)

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative. L'échantillon est injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de Gaz inerte qui sert de phase mobile (Figure 19). La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile est une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte [4]

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé [35]

Les appareils à chromatographie gazeuse sont principalement composés :

- d'un four
- d'un système d'injection, permettant d'introduire et de vaporiser notre échantillon
- d'une colonne de séparation
- d'un système de détection

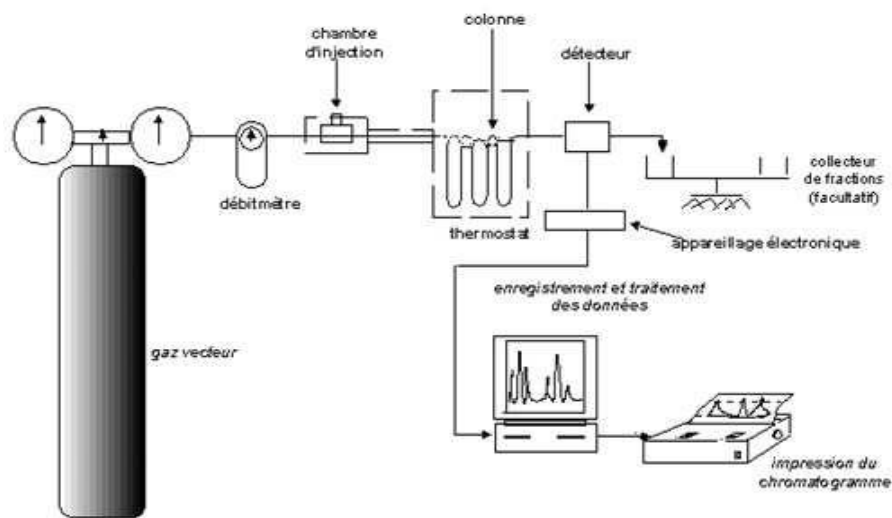


Figure19 : Schéma d'un appareil de chromatographie gazeuse

# Chapitre II

# Matériels et Méthodes

## I-Choix du matériel végétal :

La plante utilisée dans ce travail se trouve sur le marché tout au long de l'année, pour son importance majeure et son usage quotidien dans la cuisine Algérienne ou en médecine traditionnelle.

*Syzygium aromaticum* L. ou giroflier c'est un arbre de la famille des Myrtacées, les boutons floraux sont récoltés une à deux fois par an, avant l'épanouissement, lorsque les sépales deviennent rouge vif, on les sèche au soleil jusqu'à obtenir une coloration brune. Les boutons floraux des clous de girofle se trouvent sous forme séchée. On observe (Figure 20) sur le bouton floral quatre sépales épais et les quatre pétales imbriqués enfermant les étamines, le pied contient les ovaires et des poches sécrétrices d'huile « essentielle »



Figure 20: Clou de girofle

L'huile essentielle se présente sous la forme d'un liquide huileux de couleur jaune fonçant au brun à la lumière. ; Elle est obtenue par hydro distillation et contient principalement de l'eugénol, de 75 à 85 %, de l'acétate d'eugényle, 4 à 10 %, du  $\beta$ -caryophyllène, de 7 à 10 % et de faibles quantités d'autres produits (dont un peu de vanilline)

**Tableau3** : Principaux constituants biochimique de l'huile essentielle giroflier

| Composés               | Famille | %            |
|------------------------|---------|--------------|
| Eugénol                | phénols | <b>82.27</b> |
| Béta-caryophyllène     |         | 3.99         |
| Alpha-humulène         |         | 0.48         |
| Acétate d'eugényle     | Phénols | <b>12.07</b> |
| Oxyde de caryophyllène |         | 0.33         |
| Total                  |         | 99.14        |

## II- La méthode adoptée :

## II-1 Protocole d'extraction des huiles essentielles :

L'hydro distillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante.

L'opération a consisté à introduire 50 g de masse végétale séchée et broyé (Figure 21) dans un ballon Bicol de 1000mL en verre (Figure 22), on a ajoutée une quantité suffisante d'eau distillée environ 500mL sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition.



Figure 21 : Broyage des clous de girofle



Figure 22: Appareil Clevenger

- ❖ Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon.
- ❖ Les vapeurs chargées d'huile essentielle sont passés à travers le tube vertical puis dans le serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation.
- ❖ Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée
- ❖ L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition

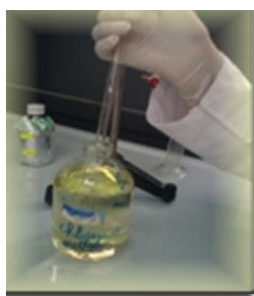
Il est en général formé de 2 liquides non miscibles encore appelés phase, la phase aqueuse, la plus abondante, est constituée d'eau dans laquelle sont dissoute très peu d'espèces odorantes, la phase organique (l'huile essentielle) est constituée des espèces odorantes.

## II-2 Relargage

La phase organique contient la plus grande partie des composés odorants et la phase aqueuse, en contient un peu moins. Afin de récupérer cette quantité un procédé bien précis est utilisé, il consiste à :

Traiter l'huile par un déshydratant, le chlorure de sodium NaCl (Figure B), mettre le mélange par la suite sur un agitateur (Figure C) jusqu'à la 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.

Notre huile essentielle est très soluble dans le dichlorométhane, c'est pourquoi dans une ampoule à décanter on a versé 15ml du dichlorométhane (Figure A) et agiter en effectuant, de temps à autre, un dégazage et on a laissé décanter afin de récupérer à la fin **l'huile essentielle**.



(A) : ajout du dichlorométhane



(B): mesure de NaCl



(C): agitation

Figure 23 : Le procédé de re-largage adopté

### II-3 La conservation de l'huile essentielle :

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables, après l'extraction l'HE avait été conservée dans des flacons en verre opaques bien scellé de manière à les protéger de la lumière, il faut également éviter le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée des flacons), par la suite il faudra garder les flacons à une température basse entre (4 -5 C°).

### II-4 Obtention de l'Eugénol :

La suite de notre travail consistait à extraire l'eugénol qui est peu soluble dans l'eau, alors on ajoute le chlorure de méthylène. La phase organique a été séchée avec le sulfate de sodium anhydre.

Pour séparer l'eugénol de l'acétyl-eugénol. On extrait la solution de chlorure de méthylène (dichlorométhane) avec le NaOH ceci provoque une réaction acide/base, l'eugénol passe en phase aqueuse.

L'acétyl-eugénol et d'autres produits contenus dans le clou de girofle se retrouve dans la phase organique. Cette dernière a été séchée sur sulfate de sodium anhydre.

### **III- Les analyses de l'huile essentielle :**

#### **III-1 L'analyse physique**

##### **III-1-1 Le 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 :

$$RHE = M'/M.100$$

*RHE* : rendement en huile essentielle des clous de girofle ;

*M'* : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme ;

*M* : masse des clous de girofle broyés en gramme.

##### **III-1-2 La mesure de pH :**

Le pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions Hydrogènes (H<sup>+</sup>) (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

##### **III-1-3 La mesure de la densité**



La densité (la masse volumique) est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume. C'est le rapport entre un certain volume de l'huile essentielle et la masse de ce même volume ; la densité est ainsi obtenue par  $g/cm^3$ .

### **III-1-4 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 l'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 est ralentie ; plus la matière a un indice de réfraction élevé

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé, il est supérieur à ceux de l'eau à  $20^\circ = 1.33556$  ; et de l'huile d'olive à  $20^\circ = 1.4684$  ceci montre leur richesse en composants qui dévient la lumière polarisée

L'appareil employé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre, qui est un instrument optique servant à déterminer une substance c'est à dire la mesure de la déviation de la lumière en traversant la substance.

## **III-2 L'analyse chimique :**

### **III-2-1 Chromatographie en phase gazeuse**

La détermination de la composition chimique de notre huile essentielle a été faite par chromatographie en phase gazeuse :

- Le gaz vecteur est l'azote  $N_2$  d'un débit de  $0.3\text{ml/min}$  (Figure 27)
- La colonne utilisée est une colonne capillaire de type CP-Chirasil-Dex CB fused silica WCOT, de  $25\text{m}$  de longueur et de  $0.25\text{mm}$  de diamètre intérieur et d'une épaisseur de la phase stationnaire :  $0.25\mu\text{m}$ .
- La programmation de la température de la colonne est comme suit : la température d'injection dans le four (figure 25) s'élève par paliers jusqu'à  $270^\circ$
- Le détecteur est de type FID, et est de température égale à  $250^\circ$

- L'appareil est piloté par un ordinateur (Figure.26) menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une de banque de donné 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.



Figure24 : Four Chromatographique



Figure25 : Micro-ordinateur muni d'un logiciel



Figure 26 : Gazes Vecteurs

## VI- Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* L. :

Les tests de l'activité antibactérienne ont été réalisés en deux étapes au niveau du Laboratoire de Bactériologie au CHU de Constantine puis au niveau du laboratoire de notre faculté à l'Université des frères Mentouri Constantine1

### VI-1 Choix des souches :

Les premiers tests de l'activité antimicrobienne ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Bactériologie au CHU de Constantine.

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* ATCC 25911, *Acinitobacter* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* 5244, *Staphylococcus aureus* 29213 ATCC, et en fin un champignon amené du laboratoire de parasitologie du CHU constantine *Candida albicans*.

Tableau 4 : Les souches bactériennes utilisées

| <i>Souches bactériennes</i>             | <b>Milieux de culture</b> |
|---|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25911      | HK                        |
| <i>Acinitobacter</i> SP                 | HK                        |
| <i>Proteus mirabilis</i> 5244           | HK                        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | HK                        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 29213 ATCC | Gélose au chocolat        |

HK : milieu hecktoen

Tableau 5 : La souche fongique utilisée

| <i>Souche fongique</i>  | <i>Milieu de culture</i>     |
|-------------------------|------------------------------|
| <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.

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

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

### **VI-1-1 Les étapes de l'activité antibactérienne et antifongique :**

#### **VI-1-1 1-Activité antibactérienne :**

##### **VI-1-1 1- a le ré-isolement des souches bactériennes :**

- ❖ A l'aide d'une pipette pasteur ou anse de platine on prend un morceau de la culture ; et on le met dans le BCC.
- ❖ Mettre dans l'étuve pendant 24h à 37°.

##### **VI-1-1 1-b préparation de l'inoculum :**

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes on a préparé des suspensions pour chaque espèce. 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 dure pendant 2 à 3 heures.

### VI-1-1 1-c. L'ensemencement:

Sur des boites contenant le milieu gélosé d'une épaisseur de 2 mm bien sèches, on introduit 3 à 5 ml de l'inoculum, on obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe (Figure .28).



Figure 27 :L'ensemencement des boites

### VI-1-1 1- d. 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 (Figure 28)

Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques imbibés de chaque extrait sont disposés sur la surface de la gélose pendant ½h dans l'étuve.



Figure 28 : Dépôt des disques

### VI-1-1-1 e- 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 30).



Figure29 : Mesure des halos d'inhibition

### VI-1-1 -2- Activité antifongique :

En ce qui concerne le champignon, des suspensions de cellules fongiques (*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 ensemençée après avoir été chargé de 5  $\mu$ l d'huile essentielle diluée.

D'autres disques, chargés de 5  $\mu$ l 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 III

# Résultats et Discussions

### III. 1- Description de l'huile essentielle obtenue :

#### III.1.1- Caractéristiques organoleptiques :

Le (Tableau6) nous montre une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des clous de girofle avec les normes d'AFNOR.

**Tableau 6 : Caractéristiques organoleptiques**

|                           | <b>Aspect</b>                                       | <b>Couleur</b>   | <b>Odeur</b>                        |
|---------------------------|---|------------------|-------------------------------------|
| Norme AFNOR               | Liquide mobile limpide parfois, légèrement visqueux | Jaune très clair | Epicée caractéristique de l'eugénol |
| Huile Essentielle Etudiée | Liquide mobile limpide                              | Jaune clair      | Epicée                              |

On remarque que notre huile essentielle obtenu en utilisant la technique d'hydrodistillation présente selon le (tableau.6) plusieurs caractéristiques : l'aspect, la couleur et l'odeur sont les mêmes décrits par les normes d'AFNOR.

### III. 2-Les analyses de l'huile essentielle

#### III.2.1.Le rendement :

Le rendement de l'H E extraite par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire à partir des Clous de girofle est :

Tableau 7 : Résultat du rendement

|               | <b>Huile étudié</b> | <b>Norme AFNOR</b> |                |
|---------------|---------------------|--------------------|----------------|
|               |                     | <b>Minimum</b>     | <b>maximum</b> |
| Rendement (%) | 3.5                 | 5                  | 8              |



Cette faiblesse de rendement est probablement due à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et la simplicité de notre dispositif d'hydro distillation. On peut dire qu'en terme de quantité et, malgré que ce pourcentage semble inférieur mais dans la pratique reste 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 Andrea [47] qui a eu 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 [42].

### III-2-2 La densité :

Le distillat obtenu est une émulsion (gouttelettes en suspension), la densité obtenu est égale à 1.015 (Tableau 8) Cela se justifie à l'aide de deux arguments :

- ❖ La solubilité dans l'eau de huile essentielle de clou de girofle est faible il y a donc des phases différentes ; les densités de l'eau et de l'huile essentielle sont très voisines égale à 1 il n'y a donc pas vraiment de phase qui surnage [48].

Tableau 8: Résultat de la densité

|                                 | Huile étudié | Norme AFNOR |         |
|---------------------------------|--------------|-------------|---------|
|                                 |              | minimum     | maximum |
| La densité (g/cm <sup>3</sup> ) | 1.015        | 1.054       | 1.042   |

**III-2-3Le pH :**

Selon les analyses, notre pH =06.82 c'est pH presque basique; ceci est due à la composition chimique des HES qui se considère comme donneur des H<sup>+</sup>. (Tableau 9)

Tableau 9 : Résultat du pH

|    | Huile étudié | Norme AFNOR |         |
|----|--------------|-------------|---------|
|    |              | minimum     | maximum |
| pH | 06.82        | 5.5         | 7       |

**III-2-4 Indice de réfraction :**

Indice de réfraction selon notre (Tableau 10), est conforme avec les normes AFNOR généralement utilisé pour l'identification et comme un critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers.

Tableau 10 : Résultat de l'indice de réfraction

|                      | Huile étudié | Norme AFNOR |         |
|----------------------|--------------|-------------|---------|
|                      |              | minimum     | maximum |
| Indice de réfraction | 1.5346       | 1.5346      | 1.5280  |

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 considérés comme acceptable dans ce cas, on peut considérer que notre HE est pure.

**III- 3 L'obtention de l'eugénol :**

L'eugénol est obtenu après le relargage, il est dissous dans la phase aqueuse après l'ajout du solvant. A température ordinaire l'eugénol est à l'état liquide sa température est comprise entre la température de fusion (-9°C) et la température d'ébullition (252-253°C).

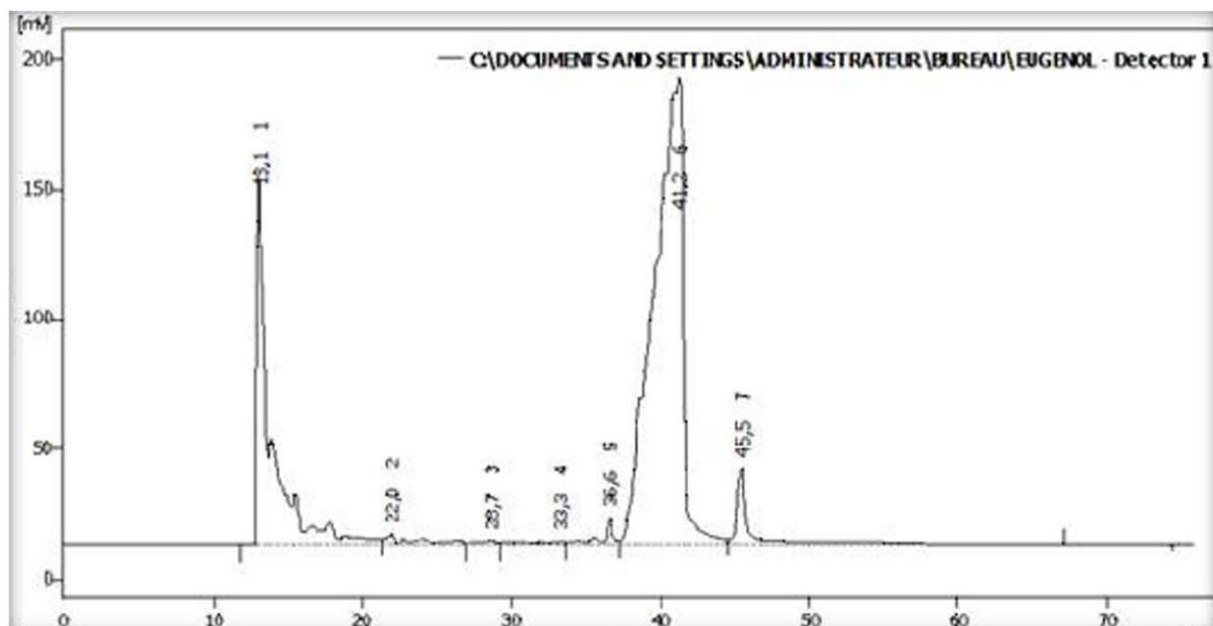
L'eugénol est moins volatil que l'eau, car sa température d'ébullition est largement supérieure à celle de l'eau à la même pression.

L'eugénol étant peu soluble dans l'eau, et la densité de l'eugénol étant quasiment égale à 1, on peut prévoir que le mélange eugénol/eau aura l'aspect d'une émulsion, c'est à dire se

présentera sous forme de gouttelettes en suspension dans l'eau. On peut donc prévoir que l'eugénol est sous forme d'une multitude de phases.

### III-3.1. L'analyse chimique de l'huile essentielle par CPG :

L'utilisation de cette technique a permis de mettre en évidence la présence du principal composé des HE des clous de girofle qui est « L'eugénol » (Figure 30)



Atmani - Baira

Figure 30 : chromatogramme obtenu lors de la CPG

Le pic d'eugénol apparaît après la 37<sup>ème</sup> minute à la température 254° ; ce ci confirme que sa température d'ébullition est environ 252-254° du coup il s'évapore et est détecté par le détecteur FID (à ionisation de flamme).

On a trouvé dans plusieurs références [43] que la température d'ébullition de l'eugénol est à 254° l'eugénol est le composé majoritaire. [44]

- ❖ La composition des huiles essentielles sont sujettes à plusieurs facteurs de variabilité :
- ❖ Facteurs externes et internes à la plante. Pour une espèce donnée la proportion des différents

- ❖ La température, l'humidité relative
- ❖ La durée totale de l'insolation et le régime des vents exercent aussi une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologique

## **VI-Activité anti microbienne :**

### **VI -1 Activité anti bactérienne :**

Cette étude est basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition des l'extraits obtenus mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'extérieur de la boîte 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 bactérienne HE sur les souches étudiées sont représentés dans le (tableau11) :

Tableau 11: Résultats de l'aromatogramme

| Souche bactérienne                                    | Gram | Diamètre mm | sensible | résistante |
|---|------|-------------|----------|------------|
| <i>E. COLI</i><br>ATCC 25921                          | -    | 12.5        | +++      | /          |
| <i>Pseudomonas</i><br><i>aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | -    | /           | /        | <b>R</b>   |
| <i>Klebsiella</i><br>ATCC                             | -    | 10.7        | ++       | /          |
| <i>Acinitobacter</i><br>ATCC 1688                     | -    | 8.5         | ++       | /          |
| <i>Proteus mirabilis</i><br>5244                      | -    | 8.5         | ++       | /          |
| <i>Staph aureus</i><br>ATCC29213                      | +    | 13.5        | +        | /          |

L'Huile essentielle du clou de girofle présente un effet positif (sensible) sur les souches bactériennes : *E. COLI* ; *Klebsiella.sp* ; *Acinitobacter.sp* ; *Staphylococcus aureus* ; *Proteus mirabilis* sauf sur *pseudomonas aeruginosa* qui 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 les huiles essentielles, *S. aureus* ATCC 25923 correspond au plus grand diamètre d'inhibition, *Pseudomonas* n'a marqué aucune inhibition cette souche est très résistante à notre HE.

De récentes études, ont démontré que les H.E. des 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. [45]

Selon l'étude de Rhayour [45] qui a montré que l'HE de girofle exerce son activité bactéricide principalement grâce à son constituant majoritaire qui est l'eugenol qui

appartient à la famille des phénols. Il semble donc que l'activité bactéricide des HE débuterait 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.

#### III-4. Activité anti fongique :

| <i>Souche fongique</i>  | <i>diamètre</i> | <i>résultat</i> |
|-------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Candida albicans</i> | 16.5            | +++             |

L'activité antifongique a été expérimenté sur une souche de *candida albicans*, cette dernière très sensible à notre **huile essentielle**.

Elle a présenté un grand halo d'inhibition ; Ce résultat a été évalué également sur différents autres pathogènes fongiques incluant ceux responsables d'infections urogénitales.

On a pu démontrer que l'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes, ceci est identique aux travaux de sur le *Candida albicans*, le *Cryptococcus neoformans* ou l'*Aspergillus fumigatus*. Elle a été particulièrement efficace sur un modèle expérimental de vaginite murine sur un modèle animal. [35]

D'autres travaux, ont montré que l'HE du clou de girofle, ainsi l'Eugénol ont une grande activité fongicide contre *Candida albicans*, les *dérmophytes* et *Aspergillus* sp. comparé avec le fluconazole qui est un médicament antifongique systémique indiqué pour traiter les candidose, et selon ces travaux, l'essence du giroflier pourrait être utile dans la gestion clinique particulièrement des candidoses cutano-muqueuses, tels que la candidose vulvo-vaginale. [35]

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 générale**

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

L'objectif de notre travail consistait à étudier les caractéristiques physicochimiques et biologiques d'huile essentielle du Clou de girofle.

La valeur du rendement en huile essentielle était de 3.5% .Cette valeur est importante par rapport aux proportions acquise auparavant par les études de la même espèce.

Les différentes analyses effectués tels que la densité, l'indice de réfraction, sont conformes aux normes AFNOR.

De même que l'activité biologique de l'HE a marqué un pouvoir antibactérien très important surtout sur chez la bactérie à gram positive *Staphylococcus aureus* à la base de résultat trouvés, on peut conclure et prédire que l'huile essentielle du clou de girofle peut servir comme base de lutte biologique.

## Références bibliographiques

- [1] Alice.D ; 2011: Faisabilité de la mise en place d'une Indication Géographique Sur le Clou de girofle à Madagascar Ecole supérieure d'Agro-Développement International ISTOM ; Thèse P 65 72.
- [2] Barlier.L ; 2013/2014 : Etat des lieux de l'utilisation des huiles essentielles au CHU d'Angers université Anger UFR sciences pharmaceutique; P 8 /15.
- [3] Hanane.A ; 2013/2014 : devalopment of antibacterial structures ana s films using ground plants extracts/essential oils école polytechnique de Montréal .P 45 60.
- [4] JÉRÔME BÉRUBÉ-GAGNO 2007: Isolation et identification de composés antibiotiques des écorce 'Univéristé du Québnec à chicutimi comme exigence partielle P 27 28
- [5] Andriatsihoara.S ; 2009/2010 : Contribution à l'étude de l'huile essentielle de Gingembre en vue d'une meilleure exploitation école supérieure polytechnique d'Antananariv P23 25
- [6] Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria, J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Methode. AAPS Pharm Sci, 5 (2) : P1-5
- [7] Hosttetman K(1997). Tout savoir sur le pouvoir des plantes. Ed. Favre. S.A. Lausanne. Suisse
- [8] Marie Elisabeth Lucchesi (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23,52
- [9] Meyer B. les matières premières mondiales en compétition avec la production française et européenne. *Rivista Italiana Eppos*, numéro spécial, 1997, p.273-281.



- [10] Ntalani Tabuna H. Etude chimique des constituants volatils d'origine végétale, Valorisation de la flore aromatique tropicale, importance chimio taxonomique, Diplôme de doctorat, Université de Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc. 1998 1999 P112 143.
- [11] Patricia.B ; 2005 : l'utilisation des huiles essentielles dans les affections Inflammatoires en complément du traitement ostéopathique. Mémoire du diplôme ostéopathie animal, European School of Animal Osteopathy. p 10,15.
- [12]Weckesser *et al* ; 2007 :Screening of plant extracts for antimicrobial activity against Bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine*. ( In press ).
- [13] Binachi; 2004: Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of thymus vulgaris L J. *Essent Oil Res* 16(1),p 69-7
- [14]Jean-pierre Dedet (2006).la microbiologie de ses origines aux maladies émergents.ISBN978-26106-B, P 213 -245.
- [15] Verlet.N ;1997 : Les huiles essentielles, marchés tropicaux et méditerranéens, N°2690, 1997, p125-121
- [16] Basset F. Huile essentielle : un marché et une problématique mondiale, parfums cosmétiques, Arômes, 1995, 121, p.51-58
- [17] EI-BAHAI M., Al-HARIRU M., YART. et BAMOSA A.200. Cardiac inotropic and hypertrophic effects of *Nigella sativa*. Department of Physiology, College of Medicine, King Faisal University, PO Box 2114, Dammam, 31451, Saudi Arabia, P. 1.2.3
- [18] Mompon B ; 1994 : Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO<sub>2</sub>, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4 rencontre internationale de Nyons, , p. 149-166.
- [19] PATRICIA.B ;2005 : l'utilisation des huiles essentielles dans les affections

Inflammatoires en complément du traitement ostéopathique. Mémoire du diplôme ostéopathie animal, European School of Animal Osteopathy. p 10,11

[20] BRUNETON J, Pharmacognosie « Phytochimie Plantes » médicinales 3<sup>eme</sup> éd, Tec et Doc, Paris1999- pp 484-540 (livre)

[21] Koroch A., Ranarivelo L., Behra O., Juliani H.R., and Simon J.E.  
« Quality Attributes of Ginger and Cinnamon Essential Oils from Madagascar » in : Issues in new crops and new uses. Ed by Janick and A. Whipkey. ASHS Press, Alexandria, VA,2007 pp 338-341,

[22] MAYER B.G ; 1999 « Extraction au CO<sub>2</sub> : Nouvelles applications pour l'industrie alimentaire », Bios (Paris), vol 21, N° 3 ;, pp 47-51 ,

[23] Millenium Challenge Account (MCA) Madagascar, 2000 : «Opportunités de marché-Filière Huiles Essentielles Région Atsinana »,

[24] Ouamba J.M ; 1991 : « Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo, Extraction et analyse des huiles essentielles, Oximation des aldéhydes naturels», thèse, Sciences et techniques du Languedoc, Université Montpellier II,

[25] Vernon F. et richard H ;Juillet 1976 : « Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles », vol 2, série synthèses bibliographiques N°10, Centre de documentation internationale des industries utilisatrices de produits agricoles (C.D.I.U.P.A.),

[26] 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,

[27] AFNOR Recueil des normes françaises ; 1992 : Huiles Essentielles -Association Française de Normalisation, 4<sup>ème</sup> édition, Paris,

[28] De Billerbeck V.G., Roques C., Vanierie P. et Marquier P., 2002 : Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Revue hygiène*, 10(3):pp248- 254.

[29] Danielle.C, 2011: Fiche Technique Bacteriologie: *Enterobacter cloacae* . Laboratoire de Bactériologie Hygiène Toulouse. pp1-2.

[30] Davet P Rouxel F., 1997. Détection et isolement des champignons du sol, Paris. cedex07, p147

[31] Benkhniq L.,LahcenZ.,MohamedF;2011:Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). Barcelona. *Acta Bot. Borc* , 53 :pp191-216.

[32] Chami F., 2005. Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, p266.

[33] Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y, Belbass M. A. (2005). Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes, phytothérapie , pp147-157.

[34] Pibiri M.C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp28-52.

[35] 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

- [36] BELOUD A., 2003.Plante médicinales d'Algérie. Offices des publications universitaires, p. 144-145
- [37] Fauchère J.L. et Avril J.L., 2002.Bactériologie générale et médicale.Elleipsesédition Marketing, ISBN: 2-7298-0747-0
- [38] Yahyaoui N. Extraction ; 200 : analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Mentha Spicata L* sur *Rhyzoperlhu dominicu (F .)* (Coleoptera, Bostrychidae) et *Triboium confusm*(Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae).Thèse de Magister en sciences agronomiques, option Ecologie,INA, El-Harrach,
- [39] P. Arpino, A. Prevot, J. Serpinet, J. Tranchant, A. Vergnol, P. Witier, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson, Paris (1995)
- [40] Wright S., Keele C.A. et Neil E.1998 Physiologie appliquee a la medecine. Edition FlammarionMedecine-Sciences
- [41] MahmoudI. Nassar<sup>1\*</sup>, AhmedH. Gaara, AhmedH. El-Ghorab, Abdel-RazikH. Farrag, Hui Shen, EnamulHuq andTomJ. Mabry (Received: April 2007; Accepted October 2007) ChemiCal Constituents of Clove (*Syzygium aromaticum*, fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity
- [42] Naili.N EP Kesraoui ; 2013 Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus leucotrichus* Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'études médicales Spécialisées (DEMS) en Botanique médicale et Cryptogamie
- [43] B. Y. K. Sruthi , B. M. Gurupadayya\*, Venkata S K, T. Narendra kumar development and validation of GC for estimation of eugenol in clove extract vol 6 issue 2,2014 (academic sciences)
- [44] M.hakki Alma; Murat ertas; Siegfrie; Nitz and Hubert Kollmansberger Chemical composition and content of essential oil from th Bud of cultivated Turkish clove (*syzygium aromaticum L*)

[45] Khadija Rhayour ; Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtiliset* sur *Mycobacterium phleiet* *Mycobacterium fortuitum* Thèse Présentée en vue de l'obtention du Doctorat National

[46] anonyme 1 : <http://www.exchem.fr/eugenol.htm>

[47]anonym2:[http://www.lyceepmf-tunis.com/dscp/bdi/dscp/sciences/phys/accueil/physique/Luisada/2nde7/chimie/corrige\\_huile\\_essentielle.pdf](http://www.lyceepmf-tunis.com/dscp/bdi/dscp/sciences/phys/accueil/physique/Luisada/2nde7/chimie/corrige_huile_essentielle.pdf)

[48] anonyme3: <http://vcorbex.pagesperso-orange.fr/specialite/chimie/TP1-%20Eugenol.pdf>

[49] anonyme5:<http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/pseudomonas-aeruginosa>

[50] anonyme6: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589904>

[51]anonyme7 :[http://www.memoireonline.com/12/09/2969/m\\_Caractérisation-des-huilesessentielles-de-trois-plantes-aromatiques--Hyptis-Spicigera-Pluchea-Ov.html](http://www.memoireonline.com/12/09/2969/m_Caractérisation-des-huilesessentielles-de-trois-plantes-aromatiques--Hyptis-Spicigera-Pluchea-Ov.html)(Avril 2010)

[52] [http://www.pnae.mg/ie/cartes/atsinana/Atsinana\\_pedologie\\_rectif.jpg](http://www.pnae.mg/ie/cartes/atsinana/Atsinana_pedologie_rectif.jpg) (Février 2010)

[53] <http://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Nouvelles/fiche.aspx?doc=200541> (Décembre 2009).

## Annexe A

### PHARMACOLOGIE

**Action thermogénique** : qui produit de la chaleur.

**Algie** : en médecine, douleur physique.

**Analgésique** : en médecine, qui rend insensible à la douleur.

**Antalgique** : en pharmacologie, calmant la douleur.

**Antiarthritique** : en médecine, pour combattre l'arthrite.

**Antibactérien** : en biologie, prévenant ou combattant les bactéries, l'infection bactérienne.

**Anticancéreux** : en pharmacologie, qualifie une thérapeutique destinée à lutter contre la prolifération cancéreuse.

**Anti catarrhale** : en pharmacologie, qui prévient ou guérit le catarrhe.

**Catarrhe** : en pathologie, inflammation des muqueuses se traduisant par une hypersécrétion.

**Antiémétique** : en pharmacologie, propre à combattre les vomissements.

**Antifongique** : qui détruit les champignons ; en pharmacologie, luttant contre les infections par les champignons.

**Anti-inflammatoire** : en pharmacologie, propre à combattre l'inflammation.

**Antimicrobien** : en biologie, prévenant ou combattant l'infection microbienne.

**Antimigraigneux** : en pharmacologie, combattant la migraine, les douleurs migraigneuses.

**Antioxydant** : composé qui protège les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres. (Ces derniers sont des molécules très réactives qui seraient impliquées dans le développement des maladies cardiaques vasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement.)

**Antiparasitaire** : en pharmacologie, qualifie une substance capable de lutter contre des parasites externes ou internes.

**Antipyrétique** : en pharmacologie, réduisant la fièvre.

**Antirhumatismaux** : en pharmacologie, prévenant ou combattant les rhumatismes.

**Anti tumoral** : en pharmacologie, qui permet de lutter contre les tumeurs.

**Antiviral** : en biologie, combattant les virus.

**Bronchite** : en pathologie, inflammation des bronches, des voies aériennes des poumons.

**Cardiotonique** : en médecine, stimulant l'activité cardiaque.

**Cardiovasculaire** : en anatomie, relatif au cœur et aux vaisseaux sanguins.

**Carminative** : en médecine, aidant l'expulsion des gaz intestinaux.

**Constipation** : en médecine, fait d'avoir des difficultés à aller à la selle, à évacuer les fèces (excréments, matières fécales, résidus de la digestion).

**Dyspepsie** : en médecine, troubles de la digestion, sans lésions organiques.

**Expectorant** : qui aide à expectorer, à tousser, à cracher (sirop expectorant).

**Gastro-intestinaux** : en médecine, relatif à l'estomac et à l'intestin.

**Héparine** : en biochimie, substance anticoagulante contenue dans le foie.

**Hétéroside** : en biochimie, oside composé d'oses et de composants non glucidiques.

**Hypoglycémiant** : en médecine, se dit d'un médicament qui provoque une diminution des taux de glucose dans le sang.

**Inappétence** : (en langage recherché) manque d'appétit.

**Météorisme** : en médecine, augmentation du volume de l'abdomen des ruminants par accumulation de gaz dans le tube digestif.

**Odontalgie** : en pathologie, douleur dentaire.

**Pelvienne** : en anatomie, relative au bassin, ceinture osseuse formée du sacrum, du coccyx et des deux os iliaques, chez les mammifères.

**Rhumatisme** : en pathologie, affection aux causes multiples qui se porte sur les articulations et les os.

**Sérotonine** : en biologie, substance qui joue un rôle dans l'allergie et l'hypertension artérielle.

**Stomachique** : en anatomie, relatif à l'estomac.

## **Annexe B**

### **Indications et modes d'utilisation de l'huile essentielle de clou de girofle sur le plan physique**

Les indications ci-dessous sont listées par ordre alphabétique :

#### **Bienfaits immunitaires :**

- Convalescence, fatigue de fin d'hiver : en diffusion et en olfaction, ou diluer dans une huile végétale et masser le dos et les plantes de pieds.
- Epidémies (pour l'effet antiseptique aérien) : en diffusion (avec citron par exemple).
- Fatigue : diluer dans une huile végétale et masser les plantes de pieds, en olfaction.
- Infections (bactéries, virus, champignons) : en diffusion (avec citron par exemple), ou par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.
- Maladie tropicale (amibiase, fièvre typhoïde, etc.), paludisme : par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.
- Système immunitaire affaibli : par voie interne en consultant un thérapeute au préalable ou diluer dans une huile végétale et masser le dos et les plantes de pieds.

#### **Bienfaits digestifs :**

- Ballonnements, gaz, putréfactions et/ou fermentations intestinales : diluer avec de l'huile végétale et masser le ventre, ou par voie orale en consultant un thérapeute au préalable.
- Diarrhées infectieuses : diluer dans une huile végétale et masser l'abdomen, ou par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.
- Infections intestinales (streptocoque, staphylocoque, colibacille, candidose, helicobacter pylori, etc.) : par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.
- Inflammation de l'intestin grêle ou du colon : diluer dans une huile végétale et masser l'abdomen, ou par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.
- Spasmes intestinaux : diluer dans une huile végétale et masser l'abdomen.



- Infection ou douleur dentaire (et/ou buccale), et migraines liées aux douleurs dentaires : appliquer directement sur la zone douloureuse (avec un coton-tige) (attention : éviter les plombages, bridges ou prothèses dentaires en métal) ; appliquer une trace sur la localisation de la migraine.

#### **Bienfaits cutanés :**

- Mycose des pieds : diluer dans une huile végétale et appliquer directement sur les zones concernées.
- Parasitose cutanée : diluer dans une huile végétale et appliquer localement jusqu'à disparition de la parasitose.
- Piqûre d'insecte : appliqué pure sur la piqûre.
- Verrues : appliqué pure directement sur la verrue (veiller à ne pas appliquer sur la peau autour de la verrue).

#### **Bienfaits musculaires et articulaires :**

- Inflammations, rhumatismes, arthrites, arthroses : diluer avec de l'huile végétale et masser la partie concernée.
- Douleurs musculaires : diluer avec de l'huile végétale et masser la partie concernée.

#### **Bienfaits ORL et respiratoires :**

- Grippe : diluer dans une huile végétale et masser le dos, la colonne vertébrale et les voûtes plantaires, également par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.
- Infection ORL ou respiratoire : diluer dans une huile végétale et masser le dos la colonne vertébrale, ou par voie interne en consultant un thérapeute.
- Pharyngite : par voie interne en consultant un thérapeute.
- Rhume : diluer dans une huile végétale et masser le dos et les voûtes plantaires, ou par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.

#### **Bienfaits uro-génitaux :**

- Accouchement (favorise les contractions) : diluer dans une huile végétale et masser le bas du dos.

- Tranchées utérines (si pas d'allaitement) : diluer dans une huile végétale et masser le bas du ventre.
- Infections urinaires et génitales (cystite, maladies vénériennes, prostatite, etc.) : par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.

### **Autres bienfaits :**

- Déséquilibres endocriniens (Ovaires, hypophyse, thyroïde, surrénales) : diluer dans une huile végétale et masser le dos et les voûtes, ou par voie interne en consultant un thérapeute au préalable.

## **Propriété sur le plan psycho-émotionnel :**

### **Propriétés particulières de l'huile essentielle de clou de girofle**

- Tonifiante du système nerveux
- Stimulante générale
- Tonique sexuelle

## **Indications et modes d'utilisation de l'huile essentielle de clou de girofle sur le plan psycho-émotionnel**

Les indications ci-dessous sont listées par ordre alphabétique :

- Angoisse : en olfaction
- Asthénie physique et/ou psychique, épuisement : en olfaction
- Confiance (manque) : en olfaction
- Déprime latente, idées noires : en olfaction
- Déprime post-partum (si pas d'allaitement) : en olfaction
- Frigidité, impuissance, libido défaillante : en olfaction
- Inhibitions mentales : en olfaction
- Peurs (notamment celles liées à l'accouchement) : en olfaction
- Somnolence : en olfaction

## **Traitement**

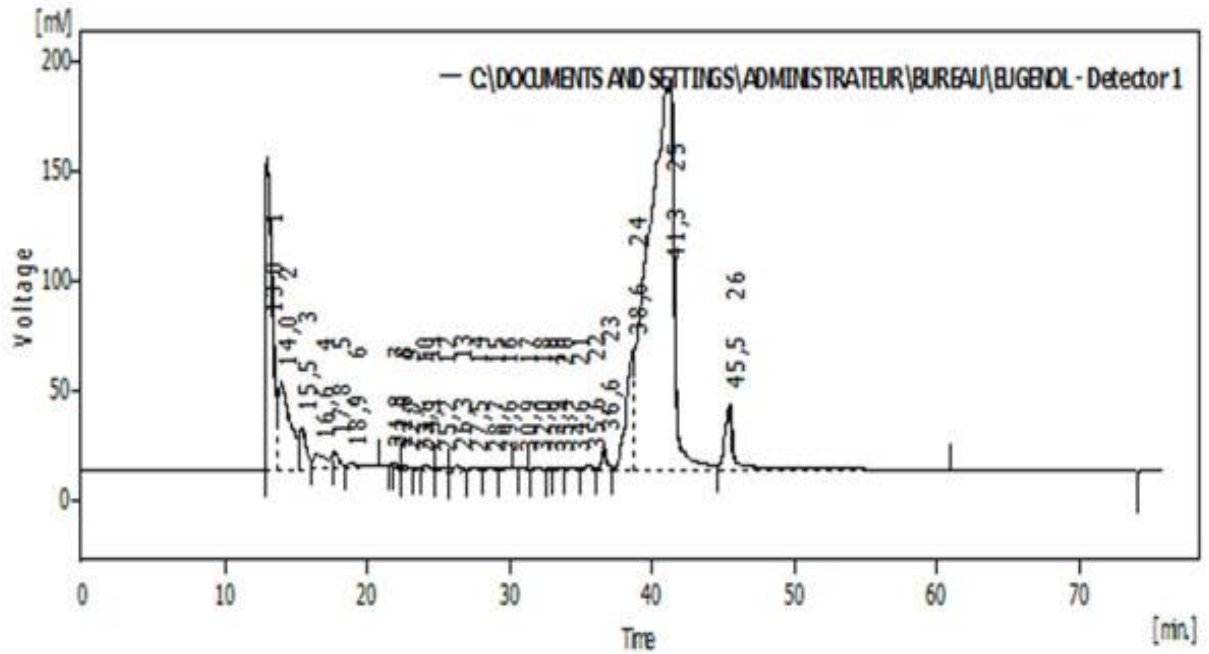
Convalescence, fatigue de fin d'hiver, fatigue, système immunitaire affaibli, ballonnements, gaz, putréfaction intestinale, fermentations intestinales, diarrhées

infectieuses, inflammation de l'intestin grêle, inflammation du colon, spasmes intestinaux, infection dentaire, douleur dentaire, migraines liées aux douleurs dentaires, mycose des pieds, parasitose cutanée, piqûre d'insecte, verrues, inflammations, rhumatismes, arthrite, arthrose, douleurs musculaires, grippe, infection ORL, infection respiratoire, rhume, accouchement, tranchées utérines, déséquilibres endocriniens.

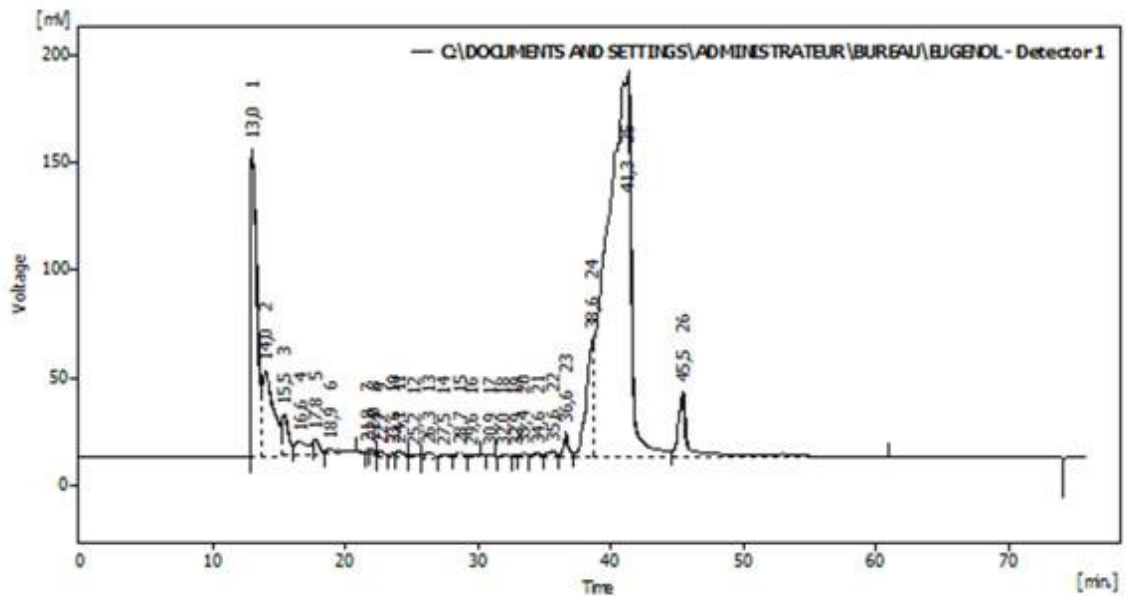
Epidémies, infections, angoisse, asthénie physique, asthénie psychique, épuisement, manque de confiance en soi, déprime latente, idées noires, déprime post-partum, frigidity, impuissance, libido défaillante, inhibitions mentales, peurs, somnolence

## Annexe C

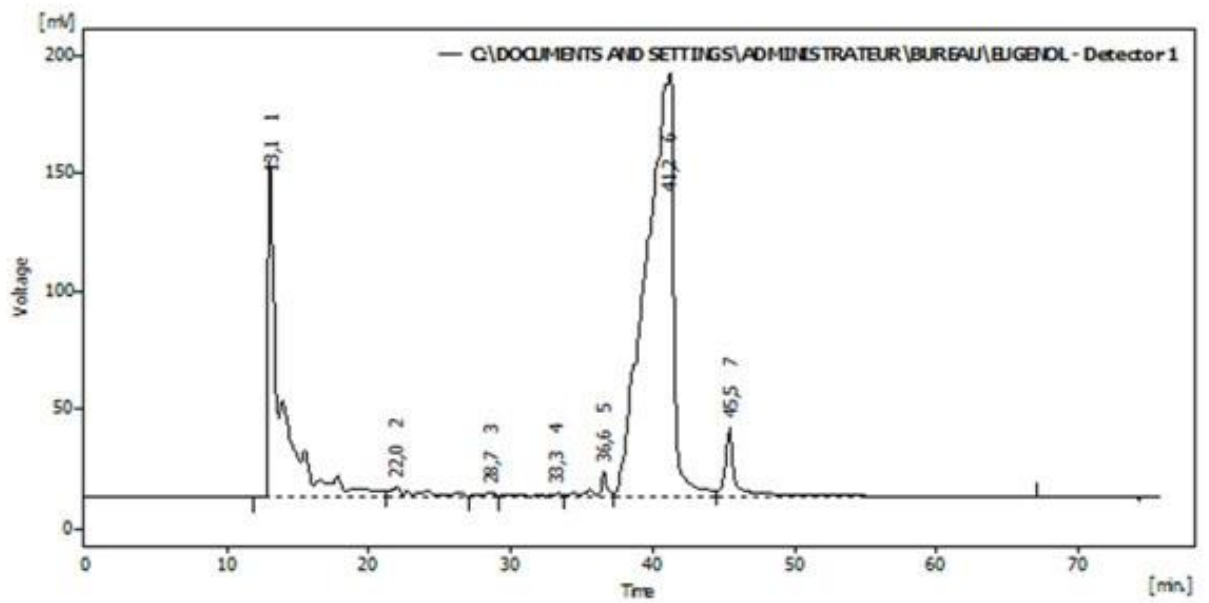
### Chromatogramme de l'huile essentielle du clou girofle



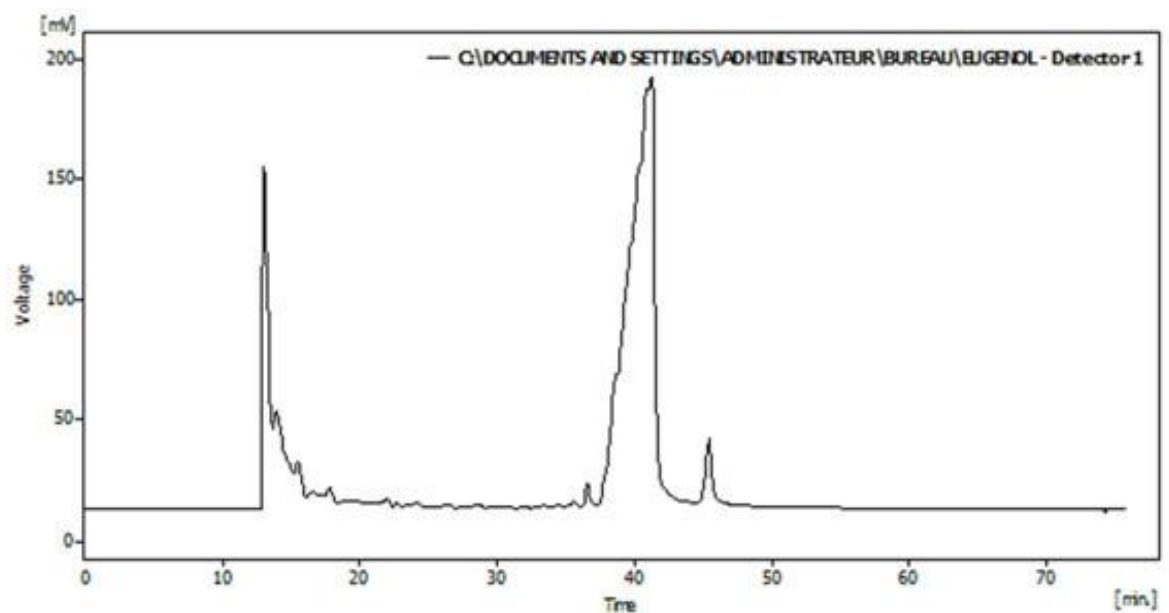
Atmani - Baira 2015



Atmani - Baira 2015



Atmani - Baira 2015



Atmani - Baira 2015

