

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Université Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de de Biochimie et  
Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences biologiques

**Spécialité :** Biochimie appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Contribution à l'étude phytochimique et évaluation des propriétés  
médicinales du giroflier (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry)**

---

Présenté par : BOUFAGHES Rahma  
ZOUAK Hadjer

Le 26/06/2022

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** BOUCHOUKH Imane (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1 :** NECIB Youcef (Pr - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** CHIBANI Salih (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire 2021 – 2022**

## Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à **Dr Bouchoukh I.** (Maitre de Conférences B à l'Université Frères Mentouri, Constantine 1) qui nous a encadrées tout au long de ce mémoire. Nous vous remercions pour votre disponibilité et l'intérêt que vous avez manifesté pour ce travail. Nous vous remercions pour vos orientations et votre enthousiasme. Nous avons pris un grand plaisir à travailler avec vous.

Nous adressons notre reconnaissance au **Pr NECIB Y.** (Professeur à l'Université Frères Mentouri, Constantine 1) pour avoir bien voulu examiner notre travail.

Un grand Merci au **Dr Chibani S.** pour son aide à la réalisation de ce mémoire ainsi que pour sa participation au jury d'évaluation.

Nos vifs remerciements vont également à l'équipe du laboratoire de recherche de Biochimie et le laboratoire Analyse-Qualité du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBT) de nous avoir donné l'opportunité d'effectuer un stage pratique.

Nous voudrions exprimer nos remerciements à tous les enseignants du département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire Appliqué qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite dans nos études universitaires. Merci à tous ceux et celles qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

*Nous remercions Dieu tout-puissant d'avoir réalisée à Accomplir ce travail ce travail.*

*Je dédie ce travail :*

*A ma chère mère*

*A celui qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point de te remercier comme il se doit.*

*A mon cher père*

*Pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'accordé.*

*A ma sœur et mes frères*

*A tout ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité*

*A mes amis qui ont toujours encouragé*

*A tous mes professeur spécialement mon encadreur M<sup>me</sup> BOUCHOUKH.I de tous ses efforts, merci beaucoup*

*Et n'oublie pas ma binôme Hadjer pour son soutien moral et sa patience tout au long du ce travail.*

*Rahma*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude :*

*A l'âme de ma grande sœur **Feriel** qui m'a aidée et encouragée à avancer dans mes études.*

*A mon très cher **père**, qui a lutté et sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite.*

*A ma très précieuse, chaleureuse et aimable **mère**, qui m'a étreint de tendresse et d'affection et qui a constitué la première école de mon existence.*

*A mes deux frères **Khaled** et **Chafik**.*

*A mes chères sœurs **Kenza**, **Nassima**, **Nardjess** et surtout **Imane**.*

*A mes neveux et mes nièces surtout **Abderrahmane** et **Besmala**.*

*A mes amies ma chère **Lilia** et les autres, qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné.*

*Sans oublier ma chère binôme **Rahma** sa patience et sa compréhension et pour tous ces efforts à la réalisation de ce modeste travail,*

*Que ce travail soit l'expression de ma grande affection et un témoignage de mon attachement et de mon grand profond amour.*

**“Hadjer”**

## Résumé

Notre travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait hydrométhanolique des boutons floraux du giroflier ( *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry). Notre plante représente l'une des sources les plus riches de composés phénoliques tels que l'eugénol.

Une extraction des composés phénolique a été réalisée, suivie par un criblage phytochimique qui a mis en évidence la présence des flavonoïdes, tanins, saponosides, stérol, stéroïdes, triterpènes et anthocyanes.

Une séparation chromatographique sur couche mince (CCM) a donné un chromatogramme avec des spots à différents rapport frontaux.

Des tests de l'activité antioxydante ont été réalisés *in-vitro* (DPPH, ABTS, FRAP et Phénantroline). Les résultats montrent une importante inhibition des radicaux libres.

**Mots clés:** *Syzygium aromaticum*- Activité Antioxydante- Criblage phytochimique- CCM, Polyphenols.

## Abstract

Our work focuses on the phytochemical study and the evaluation of the antioxidant activity of the hydromethanolic extract of clove flower buds (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry). Our plant represents one of the richest sources of phenolic compounds such as eugenol.

An extraction of phenolic compounds was carried out, followed by phytochemical screening which revealed the presence of flavonoids, tannins, saponins, sterols, steroids, triterpenes, anthocyanins.

Thin layer chromatographic (TLC) separation gave a chromatogram with spots at different face ratios.

Antioxidant activity tests were carried out in vitro (DPPH, ABTS, FRAP and Phenanthroline). The results show significant inhibition of free radicals.

**Keywords:** *Syzygium aromaticum*- Antioxidant activity- Phytochemical screening- TLC, Polyphenols.

## ملخص

يركز عملنا على دراسة الكيمياء النباتية و تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الميثانولي من براعم زهرة القرنفل (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry). يمثل نباتنا أحد أغنى مصادر المركبات مثل الأوجينول  
تم إجراء استخلاص للمركبات الفينولية ، تلاها فحص كيميائي نباتي أظهر وجود مركبات الفلافونويد ، العفص ،  
الصابونين ، الستيرويدات ، المنشطات ، الترايترينينات ، الأنثوسيانين.  
TLC أسفر الفصل الكروماتوغرافي للطبقة الرقيقة عن مخطط كروماتوغرافي مع بقع بنسب مختلفة وجهاً لوجه  
تم إجراء اختبارات نشاط مضادات الأكسدة في المختبر (Phenanthroline و FRAP و ABTS و DPPH)  
أظهرت النتائج تشبيهاً كبيراً للجذور الحرة.

**الكلمات المفتاحية:** *Syzygium aromaticum* - نشاط مضادات الأكسدة - الفحص الكيميائي النباتي - CCM

متعدد الفينول.

# Sommaire

**Remerciements**

**Dédicace**

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction .....01**

**Partie bibliographique .....03**

**Chapitre 1 : Description de la plante .....04**

1. Généralités .....04

2. Position systématique de giroflier ..... 04

3. Caractéristique botanique .....05

4. Répartition géographique .....06

5. La Culture du Giroflier .....07

5.1. Ecologie .....07

5.2. Techniques de culture .....08

5.3. La récolte .....08

6. Composition chimique .....09

7. Vertus médicinaux .....10

8. Effets indésirables du « *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry » .....11

**Chapitre 2 : Métabolisme secondaire ..... 12**

1. Généralité sur le métabolisme secondaire .....12



2. Les composés phénoliques .....	12
2.1. Définition .....	12
2.2. Intérêts et rôles des composés phénoliques .....	12
2.3. Classification des composés phénoliques .....	13
2.3.1 Les tanins.....	13
a- Les tanins non-hydrolysables .....	13
b- Tanins hydrolysables .....	14
2.3.2. Les flavonoïdes .....	14
3. Les terpènes .....	16
4. Les saponosides .....	19
5. Les stérols .....	19
6. Les huiles essentielles .....	19
6.1. Définition .....	19
6.2. Localisation .....	20
6.3. Composition Chimique des huiles essentielles .....	20
6.4. Propriété physique des huiles essentielles .....	21
6.5. Domaine d'utilisation des huiles essentielles .....	21
<b>Chapitre 3 : Activités antioxydante.....</b>	<b>22</b>
1. Activité antioxydante.....	22
1.1. Les radicaux libres .....	22
1.2. Stress oxydatif... .....	22
1.3. Les systèmes antioxydantes .....	22
1.3.1. Les types d'antioxydants .....	22
1.3.2. Intérêt des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif .....	23

<b>Partie expérimentale</b> .....	<b>24</b>
<b>Chapitre 1 : Matériel et méthodes</b> .....	<b>25</b>
1. Le matériel végétale .....	26
2. Etude phytochimique .....	26
2.1. Extraction .....	26
2.1.1. Macération (Extraction solide-liquide) .....	26
2.1.2. Evaporation .....	27
2. Criblage phytochimique .....	28
2.1. Détection des Flavonoïdes .....	28
2.2. Détection des Tanins .....	28
2.3. Détection des Stérols, Stéroïdes et Triterpènes .....	28
2.4. Détection des alcaloïdes .....	29
2.5. Détection des saponosides .....	29
2.6. Détection des anthocyanes .....	30
3. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	30
3.1. Appareillage .....	30
3.2. Principe .....	32
3.3. Mode d'opérateur .....	33
4. Etude des activité antioxydante .....	34
4. 1. Préparation des différentes concentrations des extraits foliaires .....	34
4. 2. Le test de piégeage du radical d'ABTS ( ABTS scavenging activity) .....	35
4. 3. Le test de l'activité de Phénanthroline ( Phen assay ) .....	37
4.4. Le test de piégeage du radical DPPH .....	39
4. 5. Le test du pouvoir réducteur FRAP (Reducing power) .....	41

<b>Chapitre 2 : Résultats et Discussion</b> .....	<b>43</b>
1. Criblage phytochimique .....	<b>44</b>
2. Chromatographie sur couche mince .....	<b>48</b>
3. Evaluation de l'activité antioxydante .....	<b>51</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>59</b>
<b>Références</b> .....	<b>61</b>

## Liste des abréviations

---

### Liste des abréviations:

**°C** : Degré celsius.

**µl** : Microlitre.

**µg** : Microgramme.

**nm** : Nanomètre.

**µm** : Micromètre.

**M** : Molaire.

**mg/ml** : Milligramme par millilitre.

**Rf** : Rapport frontal.

**UV** : Ultra-Violet.

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince.

**ABTS** : Sel d'aluminium de l'acide 2,2- azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

**DPPH** : 2,2'-diphényl-1-picryl-hydrazyl.

**FRAP** : Ferric Reducing Antioxidant Power.

**BHT** : Butylhydroxytoluène.

**BHA** : Butylhydroxyanisole.

**A<sub>0.5</sub>** : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

**IC<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibition à 50% (Inhibitory Concentration of 50 %).

**HCl** : Acide chlorhydrique.

**FeCl<sub>3</sub>** : trichlorure de fer.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide Sulfurique.

**TCA** : Acide trichloroacétique

**NaOH** : hydroxyde Sodium.

**MeOH** : Méthanol.

**K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>**: Le persulfate de potassium.

## Liste des abréviations

---

**Fe<sup>2+</sup>**: Fer ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>**: Fer ferrique

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>**: Ferricyanure de potassium

**K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]**: Ferrocyanure de potassium

# Liste des figures

---

## Liste des figures:

<b>Figure 01 :</b> Arbre giroflier ( <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry).....	<b>05</b>
<b>Figure 02 :</b> Les boutons de clou de girofle secs .....	<b>06</b>
<b>Figure 03 :</b> Boutons floraux et fleurs de giroflier .....	<b>06</b>
<b>Figure 04:</b> Aire de culture de giroflier à Madagascar Superficie et production des zones productrices .....	<b>07</b>
<b>Figure 05:</b> Clous roses après récolte et clous secs .....	<b>09</b>
<b>Figure 06:</b> Composé majeur de l'huile essentielle des clous de girofle .....	<b>10</b>
<b>Figure 08:</b> Structure chimique des tanins non-hydrolysables .....	<b>14</b>
<b>Figure 07:</b> Tisane clou de girofle .....	<b>14</b>
<b>Figure 09:</b> Structure générale du noyau des flavonoïdes .....	<b>15</b>
<b>Figure 10:</b> Exemples de flavonoïdes .....	<b>15</b>
<b>Figure 11:</b> Structure des monoterpènes .....	<b>16</b>
<b>Figure 12:</b> Structures des sesquiterpènes .....	<b>17</b>
<b>Figure 13:</b> Structure des diterpènes .....	<b>18</b>
<b>Figure 14:</b> stucture des triterpènes .....	<b>18</b>
<b>Figure 15:</b> Clous de giroflier .....	<b>26</b>
<b>Figure 16:</b> Evaporateur rotatif .....	<b>27</b>
<b>Figure 17:</b> Extrait brut de la plantes ( <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry).....	<b>27</b>
<b>Figure 18:</b> la cuve chromatographique .....	<b>31</b>
<b>Figure 19:</b> Papier Whatman .....	<b>31</b>
<b>Figure 20:</b> L'échantillon .....	<b>32</b>

## Liste des figures

---

<b>Figure 21:</b> Des solvants organique .....	32
<b>Figure 22:</b> La migration .....	34
<b>Figure 23:</b> Préparation des différentes dilutions de nos extraits .....	35
<b>Figure 24:</b> Réaction du test ABTS .....	36
<b>Figure 25:</b> le réactif ABTS <sup>+</sup> .....	36
<b>Figure 26:</b> Formation du complexe Fe <sup>2+</sup> -phenanthroline .....	37
<b>Figure 27:</b> L'étuve .....	38
<b>Figure 28:</b> spectrophotométrie .....	38
<b>Figure 29:</b> Réaction du test DPPH .....	39
<b>Figure 30:</b> Microplaque à 96 puits .....	40
<b>Figure 31:</b> Spectrophotomètre .....	41
<b>Figure 32:</b> Matériel utiliser .....	41
<b>Figure 33:</b> Révélation de la CCM sous lampe UV (254 nm) .....	42
<b>Figure 34:</b> Révélation de la CCM sous la Lampe UV (365 nm) .....	48
<b>Figure 35:</b> Révélation de la CCM par vanilin .....	48
<b>Figure 36:</b> Microplaque de test du radical ABTS (coloration bleu) .....	49
<b>Figure 37:</b> Pourcentage d'inhibition de radicale ABTS <sup>+</sup> par extrait méthanol à 70% .....	50
<b>Figure 38:</b> Microplaque de test du l'activité phénanthroline (coloration jaune-orange) .....	51
<b>Figure 39:</b> Pourcentage d'inhibition de phénanthroline par extrait méthanol à 70% .....	52
<b>Figure 40:</b> Résultats du DPPH sur microplaque .....	53
<b>Figure 41:</b> Pourcentage d'inhibition de DPPH par extrait méthanol à 70% .....	54
<b>Figure 42:</b> Résultats du FRAP sur microplaque .....	54

## Liste des figures

---

**Figure 43:** Pourcentage d'inhibition de FRAP par extrait méthanol à 70% .....55

**Figure 44:** Pourcentage d'inhibition de FRAP par extrait méthanol à 70% .....56



## Liste des tableaux

---

### Liste des tableaux:

<b>Tableau 1:</b> Résultats des tests phytochimiques réalisés sur la poudre de <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry.....	44
<b>Tableau 2:</b> Les valeurs de rapport frontal ( $R_{f1}$ ) .....	49
<b>Tableau 3:</b> Les valeurs de rapport frontal ( $R_{f2}$ ) .....	49
<b>Tableau 4:</b> Pourcentage d'inhibition de ABTS par extrait hydrométhanolique de clou de girofle .....	51
<b>Tableau 5:</b> Pourcentage d'inhibition de phénanthroline par extrait hydrométhanolique de clou de girofle .....	52
<b>Tableau 6:</b> Pourcentage d'inhibition de DPPH par extrait hydrométhanolique de clou de girofle .....	54
<b>Tableau 7:</b> Pourcentage d'inhibition de FRAP par extrait hydrométhanolique de clou de girofle.....	56

# Introduction

# Introduction

---

## Introduction:

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés. **(Toure, 2014)**

Élément culturel important, les plantes ont été utilisées pendant des siècles dans la médecine traditionnelle et la pharmacopée qui demeurent la principale source pour se soigner les populations. **(Jeanne et al., 2011)**

Dans le monde, les plantes ont toujours été utilisées comme médicaments. Ces derniers à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Un grand nombre d'espèces sont utilisées pour la production des essences végétales et autres extraits aromatiques destinés essentiellement à l'industrie pharmaceutique et cosmétique. **(Orman, 2012)**

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur la répartition des plantes médicinales et sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une zone ou d'un pays, puis par des études phytochimiques et pharmacologiques. **(Muanda, 2010)**

Les épices comme le clou de girofle, l'origan, la menthe, le thym et la cannelle ont été utilisées pendant des siècles comme conservateurs alimentaires et comme plantes médicinales principalement en raison de leurs activités antioxydants. De nos jours, de nombreux rapports confirment les propriétés antibactériennes, antivirales et anticancérigènes des plantes à épices. **(Diego, 2014)**

Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'activité antioxydante d'une plante connue par ses effets bénéfiques, c'est le giroflier (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry). L'objectif de notre étude est :

- L'extraction des composés phénoliques du l'extrait hydrométhanolique de *Syzygium aromaticum*.
- Un criblage phytochimique des différents composés phénoliques.
- La séparation par une chromatographie sur couche mince.
- L'évaluation de l'activité antioxydants d'extrait de girofle.

# Introduction

---

Notre mémoire est organisé comme suit:

La premier partie est consacrée aux données bibliographiques, divisée en deux chapitres:

Le premier chapitre présente le girofler (aspect botanique, composition chimique et intérêts sur santé .....). Le deuxième chapitre décrit les principaux métabolites sécrétés par les végétaux.

La deuxième partie concerne la partie expérimentale commençant par les matériels et les méthodes suivies par les résultats, leur interprétation et leur discussion. Enfin, une conclusion générale qui tire l'essentiel de cette étude.

# Partie bibliographique

## Partie bibliographique:

### Chapitre 1: Description de la plante

#### 1. Généralités

La famille des Myrtacées regroupe plus de 3000 espèces sur l' « ancien » et le «nouveau » continent, pour la grande majorité tropicales, et toutes aromatiques.

En effet, une des caractéristiques des Myrtacées est la présence de poches glandulaires à essence. Cette famille englobe le genre très répandu de l'eucalyptus, mais aussi le niaouli, le tea tree, le piment de la Jamaïque, le myrte et bien sûr **le giroflier**.

Le genre *Syzygium* est caractérisé par le développement initial de deux cotylédons non soudés. Les cotylédons sont les feuilles embryonnaires de la plante, contenant des substances nutritives pour permettre son développement. Une autre spécificité propre à ce genre est l'inflorescence en cyme terminale. (Barbelet, 2015)

#### 2. Position systématique de giroflier: (Barbelet, 2015)

<b>Règne :</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous-règne :</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Embranchement :</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe :</b>	<i>Magnoliophytina</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Myrtales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Myrtaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Syzygium</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Syzygium Aromaticum</i>

### 3. Caractéristique botanique:

Le giroflier est un arbre de la famille des Myrtacées, qui pousse uniquement dans les pays tropicaux .C'est un arbre de forme pyramidale ou conique. Et qui peut vivre jusqu'à 150 ans.

Le giroflier est un grand arbre au tronc gris clair de hauteur pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de haut. Elancé ; très touffu, à feuilles persistantes, coriaces, opposées, entières et atténuées à la base. (Medfouni et Hafsi, 2017)



**Figure 01:** Arbre giroflier (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry) (Site 4).

L'arbre fleurit très irrégulièrement et les fleurs sont disposées en cymes corymbiformes terminales de 25 fleurs environ, formant 3 fourche.

Les boutons floraux brun foncé à allure de <<clou>>, de 12 à 17 mm de long, possèdent un calice inférieur (hypanthe) pouvant atteindre 4 mm d'épaisseur, surmonté par 4 lobes coriaces et divergents constitués par les 4 sépales charnus, étalés en croix. Les 4 pétales non étalés, plus clairs, de couleur brun nombreuses étamines recourbées et un style court dressé sur un disque nectarifère à la base. Le tube réceptaculaire formant l'ovaire infère biloculaire est un peu anguleux, ride et renferme de nombreuses graines.



**Figure 02 :** Les boutons de clou de girofle secs (Site 5).



**Figure 03 :** Boutons floraux et fleurs de giroflier (Site 6).

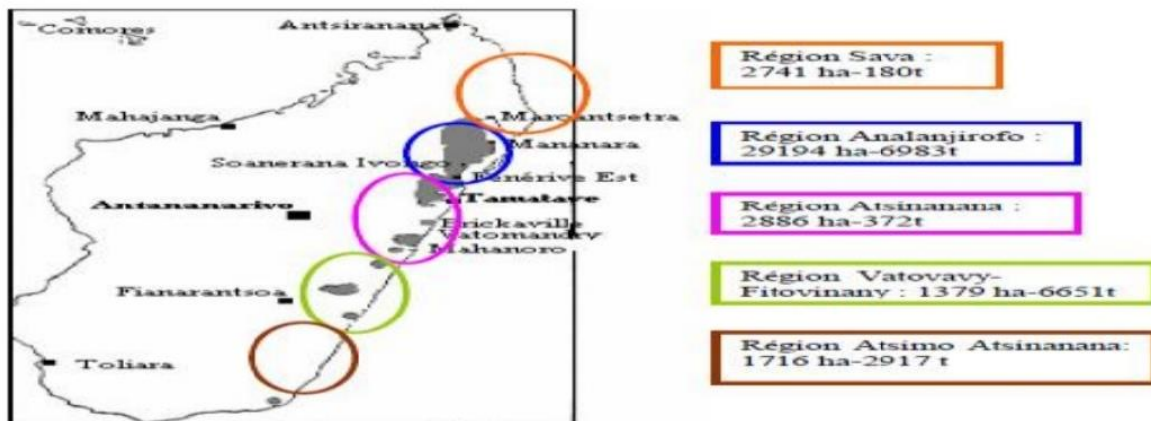
#### 4. Répartition géographiques:

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.

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. (Atmani et Baira, 2015)





**Figure 04:** Aire de culture de giroflier à Madagascar Superficie et production des zones productrices. (Atmani et Baira, 2015)

## 5. La Culture du Giroflier:

### 5.1. Ecologie:

Le giroflier, comme beaucoup d'autres plantes de la famille des Myrtacées, est habitué aux climats tropicaux humides sans saison sèche marquée. Cet arbre nécessite beaucoup d'ensoleillement, car sans soleil il ne donnera pas de clou. Cependant, il faut légèrement ombrager les jeunes plants durant les premiers mois. Il a également besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 mètres.

Les climats côtiers semblent favoriser son développement. Bien qu'il ait besoin d'une humidité atmosphérique de 80%, l'eau stagnante est nuisible aux racines. Il se développe bien sur les terrains qui s'écoulent bien, et sur les pentes basses des collines. En revanche, les sols très argileux et sableux ne lui conviennent pas bien que peu exigeant quant à la qualité des sols, le giroflier a dans l'idéal besoin d'un sol volcanique (ou sédimentaire), au bord de mer (surtout pour l'altitude), avec une forte pluviométrie bien répartie sur l'année, et un ensoleillement plus marqué à l'apparition des inflorescences.

**5.2. Techniques de culture:**

Il existe deux types de techniques de culture du giroflier :

**- Transplantation des sauvageons:**

Il s'agit de la méthode ancestrale pour cultiver le giroflier. Cette technique consiste à transplanter les jeunes sauvageons trouvés sous les arbres des plantations, afin qu'ils aient plus d'espace pour grandir. C'est une opération rapide qui permettrait de développer des arbres plus fructifères que les arbres cultivés en pépinière.

Cependant le taux de mortalité des sauvageons est élevé et ils ont une croissance lente. La technique de culture la plus utilisée à ce jour est celle des semis.

**- La multiplication par semis:**

La difficulté de cette technique est due au fait que la faculté germinative des graines est courte. En effet, les antofles doivent être semés très frais, c'est-à-dire dans les deux semaines après la récolte. Seuls les antofles qui sont de couleur rouge violacé sont utilisés pour la mise en terre dans des conditions optimales de température et d'humidité. Deux à trois semaines plus tard, la germination commence. Lorsque les jeunes plants atteignent 1 m de hauteur c'est-à-dire environ après 10 à 14 mois de pépinière, ils sont transplantés. L'ombrage est indispensable dans les premiers temps, puis une fois la plantation à demeure effectuée, l'exposition en plein soleil est nécessaire.

**5.3. La récolte:**

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



**Figure 05:** Clous roses après récolte et clous secs (Site7).

Le giroflier donne des clous à partir de la 5<sup>ème</sup> année. Autour de la 8<sup>ème</sup> année, la récolte est exploitable, mais le giroflier n'atteindra sa pleine production qu'à 20 ans. Un giroflier peut produire pendant 75 à 80 années, et ces vieux arbres peuvent donner 50 kg de clous frais par an. Cependant, la production de l'arbre n'est pas régulière d'années en années. Il existe un caractère cyclique dans les récoltes : tous les 5 ans il y a un pic de production. La période de récolte diffère selon les zones de production. A Madagascar, en général, les clous sont récoltés d'octobre à janvier, quand ils sont bien roses et qu'ils contiennent le maximum d'essence.

La cueillette se fait à la main, puis les clous sont séparés des griffes. Les clous roses sont séchés pour permettre leur conservation : 35 kg de clous frais donnent 10 kg de clous secs. Ils seront alors prêts pour la distillation. (Rajonera, 2017)

## 6. Composition chimique:

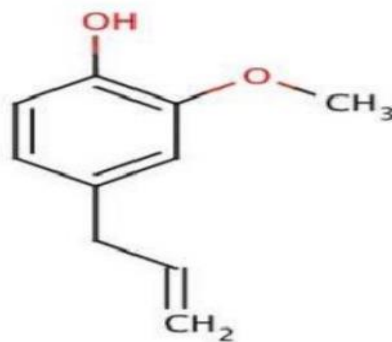
Le clou de girofle est très riche en substances bioactive telle que:

- **L'huile essentielle** (20%): HE contenant d'eugénol (85-95% de l'huile de clou de girofle), acétate d'eugénol (5 à 10%), alpha- et bêta caryophyllène (5 à 12%) et un dérivé cétonique.
- **Autres constituant:** Flavonoïdes (environ 0,4%), tannins (environ 12%), acide phénolique, stérols, tri terpène et des chromos. (Amrane et Dib, 2021)

Khan et al. (2008) ont signalé une très forte proportion en eugénol dans l'huile essentielle extraite de *Syzygium aromaticum* ((L.) Merr. & L.M.Perry) de l'Inde. Politeo et al. (2010) ont

identifié dans l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* de Croatie, une très forte proportion d'eugénol (80,5%) comme composé volatil dominant.

Burt (2007), dans ses études sur les huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antibactériennes puissantes, a investigué la composition chimique de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et a trouvé comme composés majoritaires l'eugénol (75-85%) et l'acétate d'eugénol (8-15%). (Abed-Négo et Faton, 2012)



**Figure 06:** L'eugénol (composé majeur de l'huile essentielle des clous de girofle).

## 7. 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, calmer les maux d'estomac, le vomissement, la fièvre et la diarrhée. Il serait aussi efficace dans le traitement de l'hyperglycémie. (Amrane et Dib, 2021)



**Figure 07:** Tisane clou de girofle (Site 8).

### **8. Effets indésirables du « *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry»:**

L'usage abusif du clou de girofle peut devenir toxique (100g de clous de girofle en une fois est mentionné toxique).

L'utilisation de l'huile essentielle de girofle sous forme concentrée, irrite les tissus, aussi une réaction allergique est signalée chez les sujets exposés régulièrement aux fleurs du giroflier ou ayant au préalable une dermatite au niveau de l'extrémité des doigts. L'huile essentielle doit être évitée pendant la grossesse et chez l'enfant de moins de 6 ans. (Amrane et Dib, 2021)

## Chapitre 2: Métabolisme secondaire

### 1. Généralité sur les métabolites secondaires:

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. (Krief, 2003)

### 2. Les Composés phénoliques:

#### 2. 1. Définition:

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. (Boizot et Charpentier, 2006)

La plupart des composés phénoliques sont issus de deux acides aminés essentiels : la phénylalanine et dans une moindre mesure la tyrosine (surtout impliquée chez les monocotylédones). Ces acides aminés sont synthétisés à partir de la voie de l'acide shikimique. Les précurseurs sont des sucres issus du cycle des pentoses et du cycle de Calvin. (Royer, 2013)

#### 2. 2. Intérêts et rôles des composés phénoliques:

Les polyphénols sont parmi les métabolites qui possèdent des capacités antioxydantes importantes. Cette activité est due à leurs propriétés redox leur permettant d'adsorber et de neutraliser les radicaux libres et de piéger les espèces réactives d'oxygènes. En plus de ces activités antioxydantes, les polyphénols ont un grand pouvoir chélateur des ions métalliques (surtout les cations de fer et de cuivre) et ces capacités sont liées aux structures de ces

molécules. Grâce à ces activités, les composés phénoliques ont plusieurs rôles vitaux chez les plantes. Les acides phénoliques, par exemple, sont inclus dans plusieurs processus nécessaires pour la vie des plantes tels que la biosynthèse. De même, ces composés phénoliques interviennent dans la structure des parois puisqu'ils sont des polymères de lignines. Parmi les fonctions principales composés phénoliques, la pigmentation des plantes qui présentent une vaste gamme de couleurs qui varient du jaune (chalcone, aurone et flavone), à l'orangé (caroténoïdes), au rouge, au vert, et au bleu], ces couleurs ont un grand rôle chez la plante puisqu'elle permet d'attirer les insectes qui apportent le pollen déclenchant ainsi la fécondation et la reproduction chez les plantes. En outre certains composés phénoliques protègent les plantes contre les attaques des agents pathogènes tels que les insectes, les champignons et les bactéries. Les flavonoïdes permettent la protection des plantes contre les radiations ultraviolettes ainsi que les agents pathogènes et les herbivores. (Rejeb, 2008)

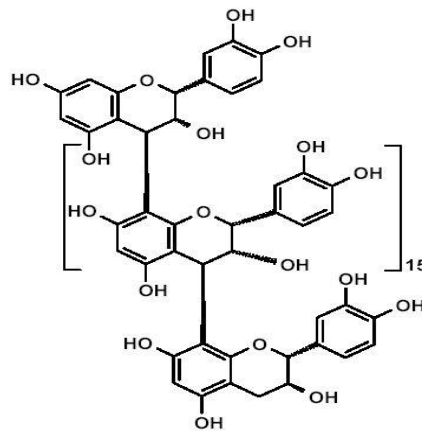
### **2.3. Classification des composés phénoliques:**

#### **2.3.1. Les tanins:**

La définition classique des tannins est : « composés phénolique hydrosolubles ayant une masse moléculaire compris entre 500 et 3000 qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. (Talbi, 2014)

#### **a- Les tanins non-hydrolysables = Proanthocyanidines:**

Ces polymères de 2 à 7 résidus flavan-3-ols reliés par des liaisons C-C non-hydrolysables sont des composés phagodétendants capables de faire précipiter les protéines. Cette propriété provoque une baisse d'appétence chez le bétail et surtout une diminution de la digestibilité des protéines. La précipitation par les tanins des enzymes secrétées par les champignons phytopathogènes nécrotrophes est une propriété qui peut contribuer à la résistance chez certaines plantes. La synthèse des tanins est dans certains cas induite par la perception de stress et médiée par des mécanismes de signalisation impliquant l'acide jasmonique et/ou l'éthylène. (Antoine, 2009)



**Figure 08:** Structure chimique des tanins non-hydrolysables. (Antoine, 2009)

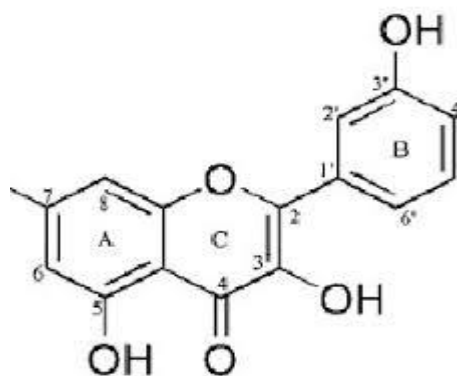
### **b- Tanins hydrolysables: gallotanins et ellagitanins:**

Ces composés phénoliques présentent des propriétés semblables à celles des proanthocyanidines **mais ce ne sont pas des flavonoïdes**. Il s'agit d'esters d'acide gallique ou d'acide élagique (dérivé du shikimate) et de glucose. On retrouve des gallotanins accumulés dans certaines galles de végétaux qui étaient utilisées pour la fabrication d'encre. Les tanins libérés dans le vin par les tonneaux de chênes sont des ellagitanins, contrairement à ceux apportés par la peau des baies de raisin qui sont des tanins non-hydrolysables. (Antoine, 2009)

### **2.3.2. Les flavonoïdes:**

Les flavonoïdes représentent la majorité des composés phénoliques qui sont caractérisés par leur faible poids moléculaire. En effet, plus de 4000 flavonoïdes sont responsables de la pigmentation des plantes, comme les anthocyanosides donnant la coloration rouge ou bleu ainsi que les chalcones, les aurones et les flavonols qui ont la couleur jaune. (Rejeb, 2008)



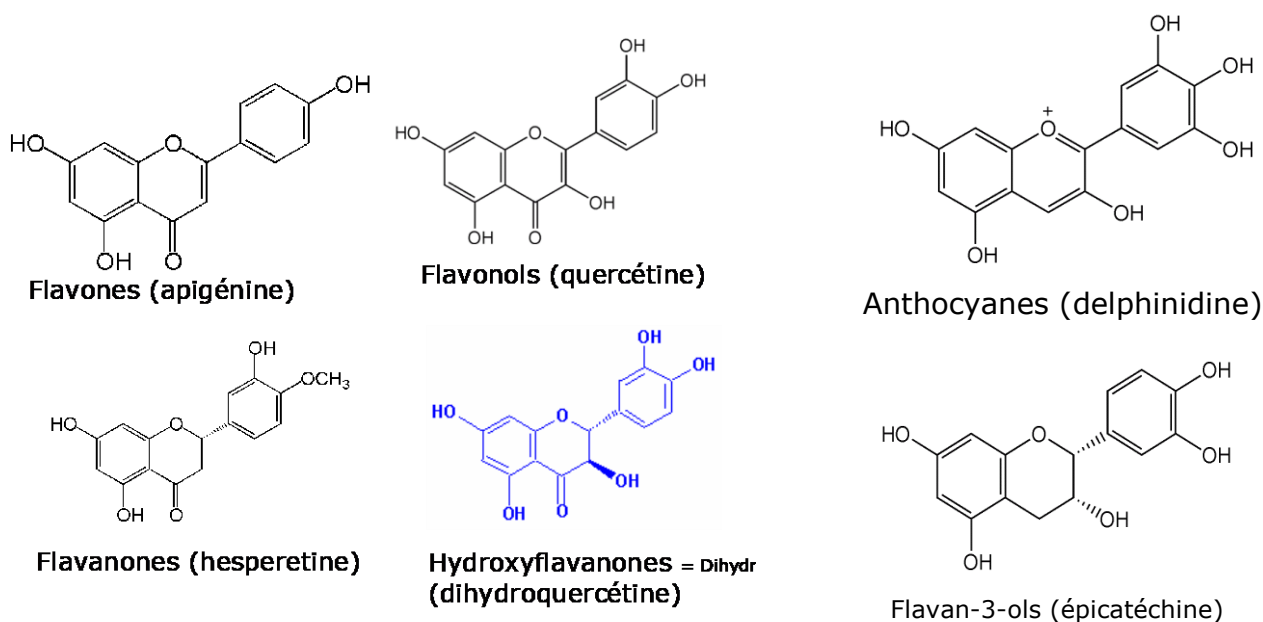


**Figure 09:** Structure générale du noyau des flavonoïdes (Site 2).

Les principales catégories de flavonoïdes sont définies par :

1/ la présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule. Les flavones, flavonols et dérivés présentent une double liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés

2/ la présence de fonctions cétones, alcools et méthoxy. (Antoine, 2009)



**Figure 10:** Exemples de flavonoïdes. (Antoine, 2009)

### 3. Les terpènes:

Les terpènes constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organique des végétaux, avec près de 15.000 structures moléculaires connues. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui les composent ainsi que dans les divers modes d'assemblage, on distingue :

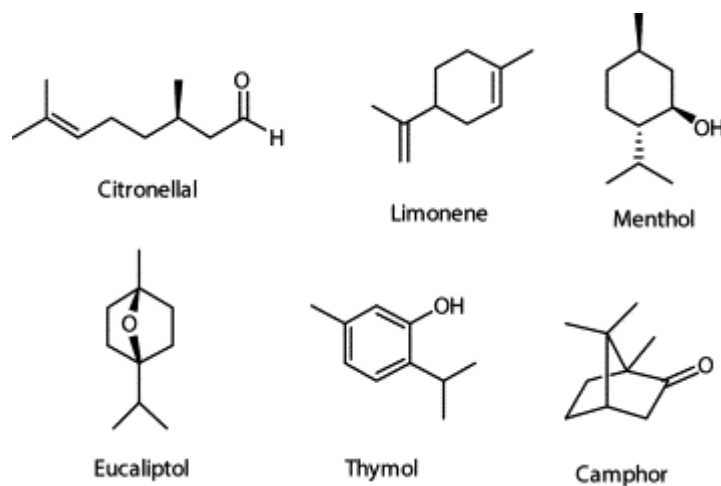
- Les mono terpènes à 10 atomes de carbone.
- Les sesquiterpènes à 15 atomes de carbone.
- Les diterpènes à 20 atomes de carbone.
- Les triterpènes à 30 atomes de carbone et les tétraterpènes à 40 atomes de carbone. (Nouri et Regad, 2021)

#### Les grands groupes de terpènes: (Merghem, 2009)

- **Monoterpènes:**

Ce sont des produits généralement odorants obtenus par entraînement à la vapeur d'eau des végétaux entiers ou d'organes de végétaux.

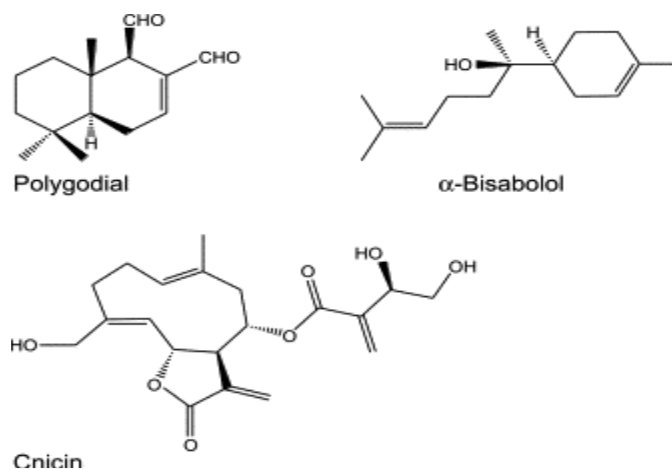
Beaucoup de monoterpènes réguliers (C<sub>10</sub>) se trouvent sous formes cyclisées. Ils constituent une part importante des huiles essentielles.



**Figure 11** : Structure des monoterpènes (Site 1).

- **Sesquiterpènes :**

Ce sont des hydrocarbures de formule  $C_{15}H_{24}$  ( $n=3$ ), soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes vrais (en  $C_{10}H_{16}$ ).

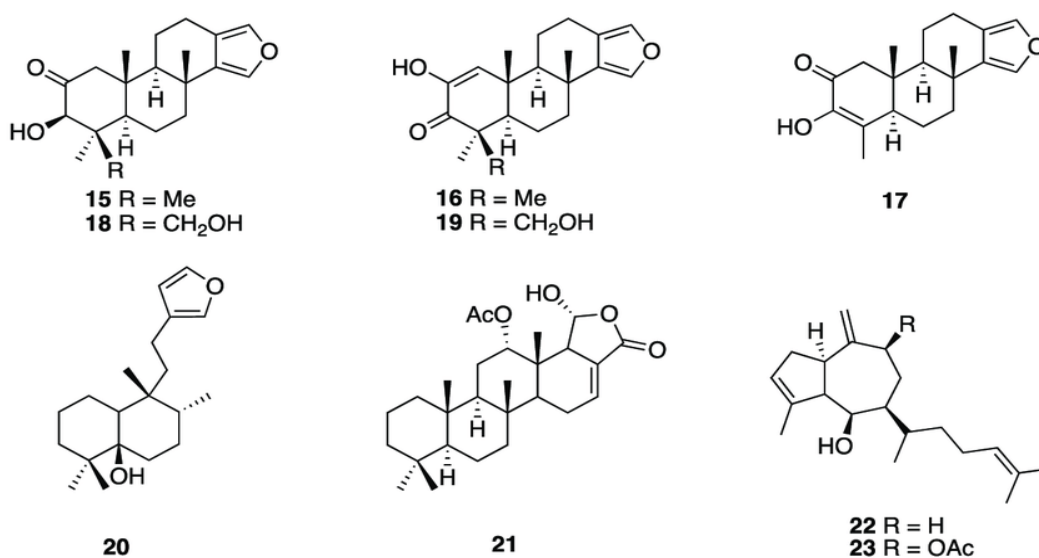


**Figure 12:** Structures des sesquiterpènes (Site 1).

- **Diterpènes :**

Ce sont des dérivés des hydrocarbures en  $C_{20}H_{32}$  ( $n=4$ ).

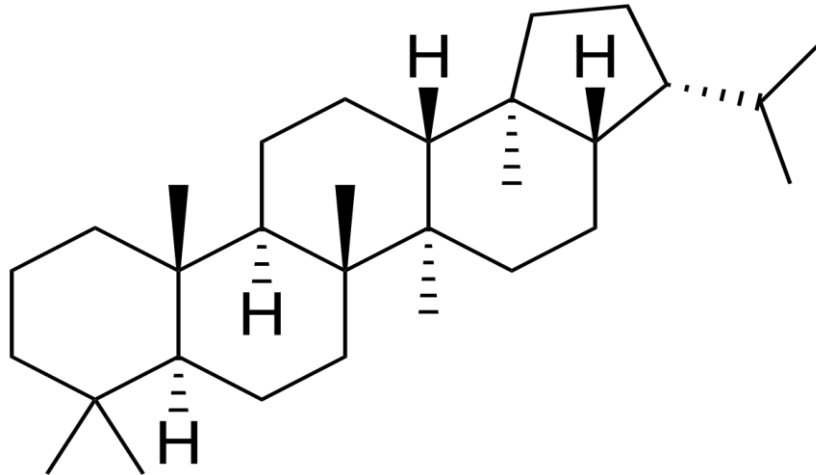
Exemple: le phytol, la vitamine A, les acides résiniques des conifères, les gibbérellines.



**Figure 13 :** Structure des diterpènes (Site 2).

- **Triterpènes:**

Ces composés en  $C_{30}$  ( $n=6$ ) sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre (phytosterols), estérifiés, ou sous forme hétérosidiques (saponosides).



**Figure 14:** Structure des triterpènes (Site 3).

- **Tetraterpènes (caroténoïdes):**

Sont substances colorées en jaune, orange ou rouge auxquelles de nombreuses fleurs et fruits doivent leurs couleurs.

On trouve les caroténoïdes, soit sous forme d'hydrocarbures (lycopène, carotène), soit à l'état de dérivés hydroxylés (xanthophylle,) ou de dérivés cétoniques (Canthaxanthine). Lycopène (tomate: *Lycopersicum esculentum*); zeaxanthine (maïs: *Zea mays*), violaxanthine (Violette) et enfin la cricétine (Safran).

- **Polyterpènes (caoutchouc naturel):**

Les polyisoprénoïdes présentent une structure linéaire.

Les gommes les plus exploitées sont celles d'*Hevea brasiliensis* (Euphorbiacées) et du *Gutta percha* (Sapatacées).

#### **4. Les saponosides:**

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs, en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés aussi par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques, notamment des propriétés immunes modulatrices, immun adjuvante, cytotoxique, anti tumorale et hypocholestérolémiant. **(Benyerbah et Aliguechi, 2021)**

#### **5. Les stérols:**

Les stérols sont des alcools comportant le noyau stérane, et qui ont les caractères de solubilité des lipides avec certaine hydrophilie due à leur groupement alcool.

Les stérols sont naturellement présents en petites quantités dans de nombreux fruits légumes, fruits secs et huiles végétales. Ce sont des éléments essentiels des membranes cellulaires végétales. **(Medfouni et Hafsi, 2017)**

#### **6. Les huiles essentielles:**

##### **6.1. Définition:**

Les huiles essentielles sont des produits odorants et volatils du métabolisme secondaire des plantes, ont une large application dans la médecine populaire, l'aromatisation et la conservation des aliments ainsi que dans les industries des parfums. **(Kalemba et Kunicka, 2003)**

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique. **(Kalemba et Kunicka, 2003)** Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits. **(Toure, 2014)**

## 6.2. Localisation:

Les Huiles essentielles se rencontrent dans tous le règne végétal, cependant elles sont Particulièrement abondantes chez certaines familles des plantes aromatiques : lamiacées, rutacées, ombellifères, myrtacées, astéracées.

Les Huiles essentielles peuvent être extraites de tous les organes de la plantes mais de déférant concentration donc il y à l'organe le plus concentré qui des feuilles de eucalyptus, les fruits de poivre ....

Les Huile essentielles sont élaborées au sein du cytoplasme de certaines cellules, elles s'en séparent par synérèse « séparation d'un liquide de son gel » sous formes de petites gouttelettes qui confluent en plage plus ou moins étendues.

Elles sont stockées dans les structures cellulaires spécialisés c'est les cellules à Huile essentielles cellules à poils sécréteurs (comme dans la menthe) canaux sécréteur". (Nouri et Regad, 2021)

## 6.3. Composition Chimique des huiles essentielles:

Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles ont été décrites. Elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. (Toure, 2014)

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: Les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phenylpropane. (Chagra, 2019)

## 6.4. Propriété physique des huiles essentielles:

- Liquides à température ambiante.
- Les Huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes et entraînables à la vapeur d'eau, et très odorantes l'examen olfactif.
- Très rarement est incolore ou colorée en jaune.
- Huile essentielle sont des liquides d'odeur et de saveur généralement fort.

- Huile Essentielle sont peu miscibles à l'eau, voire non miscibles ; en revanche, elles sont généralement assez solubles dans les solvants organiques. (Nouri et Regad, 2021)

### **6.5. Domaine d'utilisation des huiles essentielles:**

Aujourd'hui les Huiles essentielles ont une application très variées dans la vie courante. Elles trouvent des emplois dans nombre de domaines d'utilisation industrielle, pharmaceutique, cosmétiques parfumerie, agro-alimentaires, la médecine ..... (Nouri et Regad, 2021)

## Chapitre 3: Activités antioxydante

### 1. Activité antioxydante:

#### 1.1. Les radicaux libres:

Les radicaux libre sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié cette propriété rend ces élément très réactif du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules (**Dacosta, 2003**). Leur durée de vie est très courte allant de quelques millisecondes à nanosecondes, ils peuvent entraîner des lésions tissulaires en captant des électrons d'une molécule stable pour essayer d'appairer leurs propres électrons, laissant ainsi la molécule originale dans un état instable. (**Filane et Toumi, 2012**)

#### 1.2. Stress oxydatif:

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. (**Chapelle, 2007**). Ce déséquilibre conduit à des dommages potentiels des lipides, des protéines et de l'ADN. (**Anderson, 1997**)

Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. (**Chapelle, 2007**)

#### 1.3. Les systèmes antioxydants:

Les antioxydants sont définis par Halliwell (1999) comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

##### 1.3.1. Les types d'antioxydants:

Il existe plusieurs types et sources d'antioxydants :

- **Endogène :**

Les systèmes de défense enzymatiques des radicaux libres => Superoxyde dismutases => Catalases => Glutathion peroxydases.



- **Exogène:**

=> Les polyphénols => Les vitamines => Les oligoéléments. (Belkamla et al., 2021)

- **Les antioxydantes synthétiques:**

Les antioxydantes synthétiques vus leur efficacité et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Parmi les : le butylhydroxyanisole (BHA), le tertiarybutylhydroquinone (TBHQ), le 2, 4, 5-trihydroxybutyrophenone (THBP), le gallate de propyle (PG), le gallate d'octyle (OG) et le 4-hexylresorcinol (4HR). (Bader et Bounouiga, 2021)

### **1.3.2. Intérêt des antioxydantes dans la lutte contre le stress oxydatif:**

La production de radicaux libres est compensée par leur élimination grâce aux capacités antioxydantes de l'organisme. Chez tout individu, il existe, en permanence un équilibre entre les dégâts causés par les molécules oxydantes et leur réparation. Si celui-ci est rompu, le stress oxydatif apparaît. Il semble donc intéressant de soutenir les défenses antioxydantes de l'organisme pour éviter cette rupture. Les défenses exogènes semblent les plus faciles à conforter puisqu'elles pourraient être renforcées par des apports de compléments alimentaires. (Pastre, 2005)

# Partie expérimentale

# **Chapitre 1**

## **Matériel et méthodes**

## Chapitre 1: Matériel et méthodes

### 1. Le matériel végétal:

Le matériel végétale utilisées se trouve dans le marché, sous forme des boutons floraux du géroflier séchés (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry) et acheté du marché.



**Figure 15:** Clous de giroflier.

### 2. Etude phytochimique:

#### 2.1. Extraction:

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie Appliqué de l'Université Frères Mentouri, Constantine 1.

##### 2.1.2. Macération (Extraction solide-liquide):

La macération est une méthode consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant, pour en extraire les principes actif.

On utilise 100g de poudre végétal séchée et broyé dans un bécher contenant une solution hydrométhanolique à 70%, sous l'agitation mécanique (ou magnétique). L'opération a été répétée quatre fois, à température ambiante (pour conserver l'intégrité des molécules), jusqu'à l'épuisement des substances naturelles. La solution obtenue est filtrée sur papier wattman après chaque opération.

### 2.1.2. Evaporation:

Cette étape a été réalisée au niveau de laboratoire N°15 de bloc de science d'Université Frères Mentouri 1, à partir d'un évaporateur rotatif sous pression réduite. On obtient un extrait méthanolique (une pâte) puis on ajoute un solvant pour obtenir une phase liquide.



**Figure 16:** Evaporateur rotatif.



**Figure 17:** Extrait brut de la plantes (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry).

L'extrait est conservé dans un flacon et nous la mettons au réfrigérateur à température 4C°.

### 2. Criblage phytochimique:

Cette partie de travail a été réalisée au niveau de laboratoire de recherche de Biochimie Appliqué de l'Université Frères Mentouri, Constantine.

Le criblage phytochimique permet d'obtenir la mise en évidence des différents métabolites secondaires dans un matériel végétal, notamment les Flavonoïdes, les Tanins, les Alcaloïdes, les Saponosides, les Stérol, les Triterpènes, les Stéroïdes, les Anthcyanes.

#### 2.1. Détection des Flavonoïdes: (Test de Wilstater)

Se réalise à partir de 10 ml d'extrait hydro-méthanolique repartit dans 2 tubes, le 1<sup>er</sup> servant de témoin, le 2<sup>ème</sup> on est ajouté trois gouttes de HCl concentré en présence de trois ou quatre tournures de magnésium.

La présence de flavonoïdes est confirmée par le changement de coloration (Rouge ou Orange).

#### 2.2. Détection des Tanins:

On prend trois tubes, dans chaque tubes on met 10 ml d'extrait hydro-méthanolique :

**Tube n°1:** Témoins.

**Tube n°2:** Addition de quatre à cinq gouttes de gélatine 1% (1g de gélatine + 100ml d'eau distillée).

La précipitation signifie la présence des tanins.

**Tube n°3:** Addition de quatre à cinq gouttes de FeCl<sub>3</sub> 1% dans le méthanol.

La couleur vire au bleu noire en présence de tanins gallique et au brun verdâtre en présence de tanins catéchique.

#### 2.3. Détection des Stérols, Stéroïdes et Triterpènes:

Dissoudre l'extrait hydrométhanolique dans 10 ml de chloroforme, Puis filtrer. Répartir le filtrat dans quatre tubes à essai, Le 4<sup>ème</sup> Tube servira de témoin.

## Matériel et méthodes

---

**Tube n°1:** Test de Salkowski: ajouté 1 à 2ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Acide Sulfurique), Le changement de coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement est noté le changement graduel de coloration: une coloration rouge indique la présence de stérols insaturés.

**Tube n°2:** Teste de Libermann-Burschard: Additionner trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Le changement de coloration est observé pendant une heure, Une coloration bleu-vert indique la présence de stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpènes.

**Tube n°3:** Test de Badjet-Kedde: additionner quelque grain d'acide Picrique. L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes lactoniques.

### 2.4. Détection des alcaloïdes:

Pour faire les tests d'identification rapide des Alcaloïdes on peut préparer un extrait selon le procédé suivant:

Dans un tube à essai, on introduit 200 mg d'extrait hydrométhanolique avec 10 ml d'acide sulfurique. On agite 2 min et on filtre, après on partage le filtrat entre trois tubes et on ajoute respectivement au :

**Tube n°1:** Quelques gouttes de réactif Dragendorff.

**Tube n°2:** Quelques gouttes de réactif Mayer.

**Tube n°3:** Reste comme témoin.

### 2.5. Détection des saponosides:

0.5 g de poudre végétale est introduit dans des tubes avec 25 ml d'eau distillée puis chauffe le mélange au bain marie à 85°C pendant 20 min, après on agite vigoureusement en position horizontale pendant 15 seconde environ portoir.

Pour l'identification rapide d'un organe saponosides, suffit de mettre en évidence leur pouvoir aphrogène en observant la mousse très fine qui se forme après une simple agitation et sa persistance au moins 10 min. on compare les hauteurs des mousses :

## Matériel et méthodes

---

- Pas de mousses : test négatif.
- Mousse moins de 1 cm : test faiblement positif.
- Mousse de 1 à 2 cm : test positif.
- Mousse plus de 2 cm : test très positif.

### 2.6. Détection des anthocyanes:

On prend 2 tubes dans lesquelles on met 10 ml d'extrait hydrométhanolique chacun :

**Tube n°1:** On ajoute 5 gouttes d'HCl.

**Tube n°2:** On ajoute 5 gouttes d' NaOH.

Coloration rouge pour **Tube n°1** et bleu violacé pour le **Tube n°2** indique la présence d'anthocynes.

### 3. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Cette partie de travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Biochimie du CRBt (Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine).

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange. Cette technique a été réalisée pour visualiser la séparation des molécules des deux extraits.

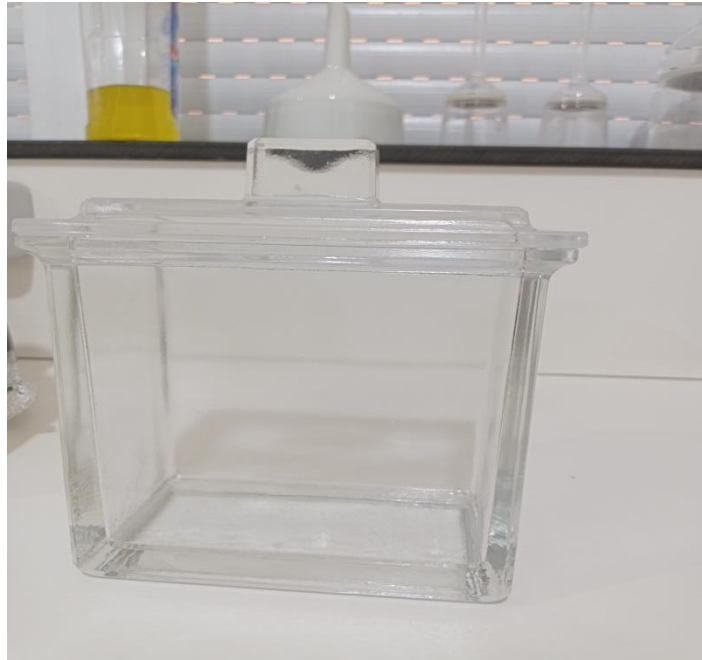
Elle repose principalement sur des phénomènes d'absorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse semi-rigide de matière plastique ou aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et celle du solvant.

#### 3.1. Appareillage:

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- La cuve chromatographique : un récipient habituelle en verre, de forme variable, fermé par couvercle étanche.





**Figure 18 :** La cuve chromatographique.

- La phase stationnaire : une couche d'environ  $0.25 \mu\text{m}$  de gel de silice ou d'un autre absorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté l'amidon ou un polymère organique.



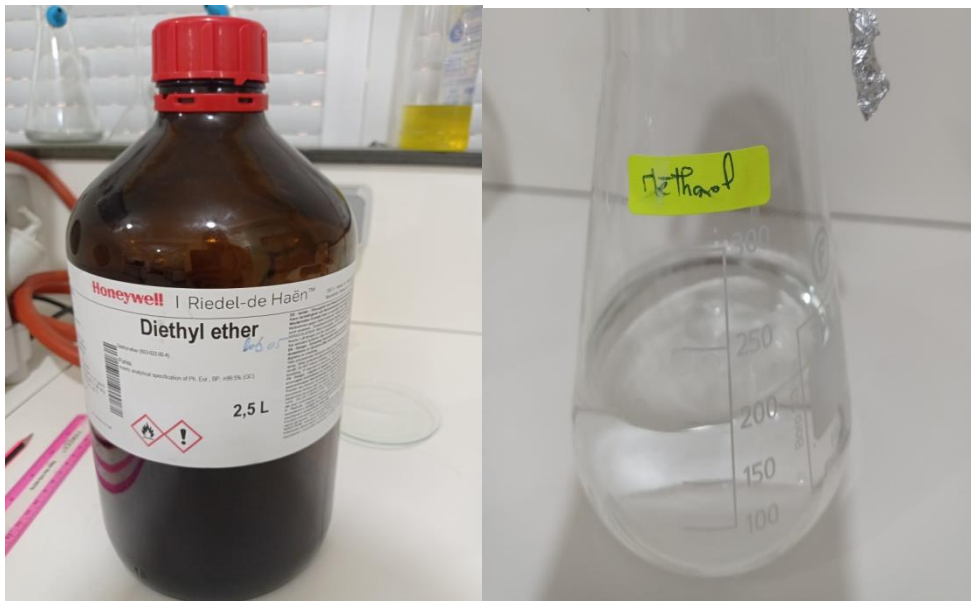
**Figure 19 :** Papier Whatman.

- L'échantillon : environ un microlitre ( $\mu\text{l}$ ) de solution diluée (2 à 5%) du mélange à analyser, déposer en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.



**Figure 20:** L'échantillon.

- L'éluant: un solvant pur ou mélange, il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.



**Figure 21 :** Des solvants organiques.

### 3.2. Principe :

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette

## Matériel et méthodes

---

vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et d'autre part de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'absorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapide que les composants polaires.

### 3.3. Mode d'opérateur:

#### Préparation de la phase mobile:

La phase mobile est constituée par mélange des solvants organique. L'éluant commence avec des solvants peu polaire puis poursuivie par des solvants plus polaires.

Nous avons choisis les deux systèmes éluant suivants :

**Diethyl ether** (10; V).

**Diethyl ether / MeOH** (9.5/0.5; V/V).

#### Protocole expérimental :

- Préparer l'échantillon qui est l'extrait hydrométhanolique de plante *Syzyguim aromaticum* dilué à 5%.
- Marquer la ligne de dépôt avec un crayon à 2 cm du bord inférieur de la plaque, en veillant à ne pas toucher le gel avec les mains.
- Déposer deux gouttes de 2  $\mu$ l de l'échantillon sur la ligne de dépôt à l'aide d'une pipette pasteur.
- Mélange les solvants d'éluant et les verser dans la cuve.
- Placer la plaque CCM dans la cuve puis la fermer par un couvercle pour éviter l'évaporation du solvant et laisser migrer.
- A la fin de migration, marquer le front de migration à l'aide d'un crayon.
- La révélation:

## Matériel et méthodes

---

- Sous lampe UV: permet de mettre en évidence sous forme de taches des substances qui absorbent les UV à 254 nm et à 365 nm.
- Par des produits chimiques: on utilise le vanilin, pour rendre les taches visibles.

- Marquer les spots.

- Calculer le Rf de chaque spot. Le Rf calculé selon l'équation suivante :

$$Rf = \frac{d}{D}$$

d : la distance parcourue par la molécule.

D : la distance parcourue par la phase mobile (front du solvant).



**Figure 22:** La migration.

### **4. Etude des activités antioxydante:**

Cette étape a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie du CRBt (Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine).

#### **4.1. Préparation des différentes concentrations des extraits foliaires:**

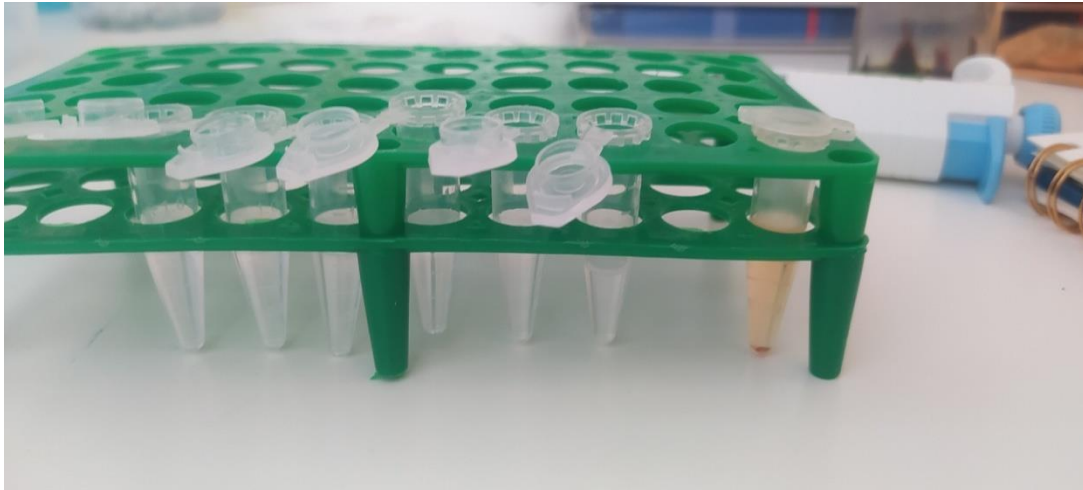
Pour évaluer l'activité et le pouvoir antioxydant d'un extrait, il faut tout d'abord le préparer sous forme de plusieurs dilutions d'une solution mère. On commence en général par une solution mère de 4 mg d'extrait dissout dans 1 ml de méthanol dans un tube eppendorf et

## Matériel et méthodes

---

on réalise sept dilutions dans d'autres tubes contenant chacun 0,5 ml de méthanol en ajoutant 0,5 ml de la solution d'avant. De cette façon on a une dilution de  $\frac{1}{2}$  à chaque fois (**Figure 23**).

Un blanc est toujours préparé et testé, il contient tous les réactifs sauf l'extrait.



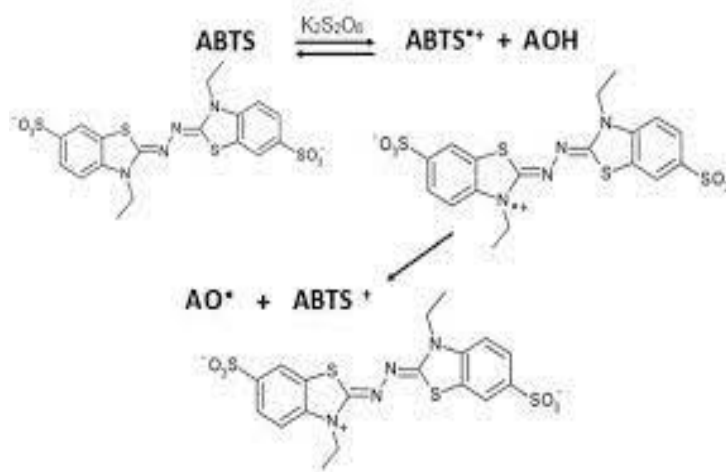
**Figure 23** : Préparation des différentes dilutions de nos extraits.

On a utilisée quatre méthodes :

### **4.2. Le test de piégeage du radical d'ABTS (ABTS scavenging activity) :**

#### **Principe :**

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2-azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Au cours de ce test, le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ( $ABTS^{\bullet+}$ ) de couleur sombre (vert bleu) en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation  $ABTS^+$ , ce qui entraîne la décoloration de la solution.



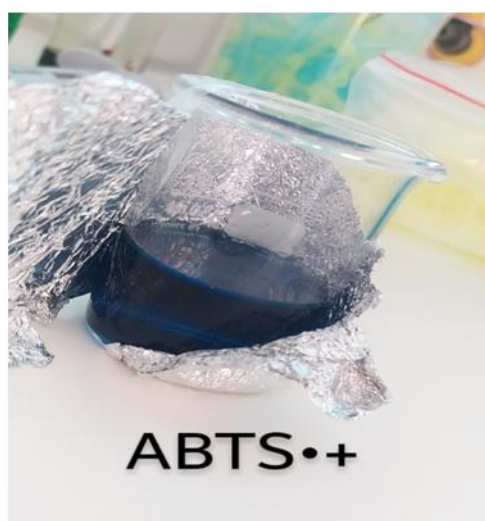
**Figure 24 :** Réaction du test ABTS.

### Mode opératoire :

Le radical  $ABTS^{\bullet+}$  est produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (7mM) et une solution de potassium ( $K_2S_2O_8$ , 2,45mM).

Ce mélange est agité pendant 16h à l'obscurité puis dilué par l'éthanol jusqu'à obtenir une absorbance à 734 nm de  $0,700 \pm 0,02$ . Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 160  $\mu$ l d' $ABTS^{\bullet+}$  a été ajouté à 40  $\mu$ l de l'extrait dilué dans le méthanol à plusieurs concentrations.

Le mélange a été maintenu à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734 nm après 10 min d'incubation.



**Figure 25:** Le réactif  $ABTS^{\bullet+}$ .

## Matériel et méthodes

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

Les résultats sont évalués par le calcul de la valeur  $IC_{50}$  qui correspond à la concentration de l'extrait qui cause 50% d'inhibition.

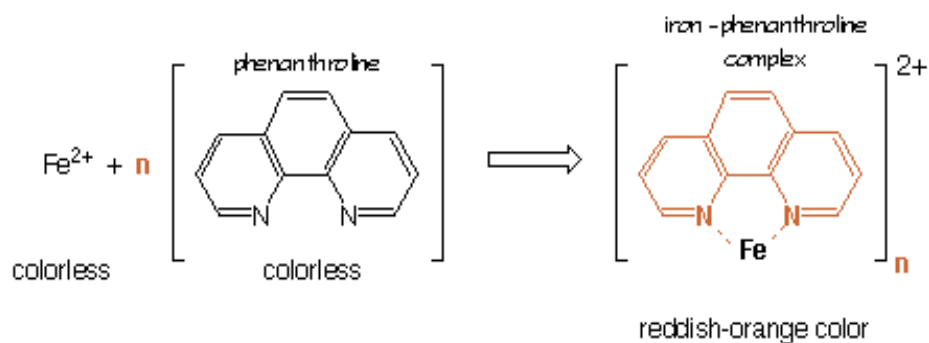
Le BHA (Butylhydroxyanisole) et le BHT (Butylhydroxytoluène) sont utilisés comme standards.

### 4.3. Le test de l'activité de Phénanthroline (Phen assay):

#### Principe :

Cette technique est basée sur la formation du complexe  $Fe^{2+}$ -phénanthroline rouge-orangé à la suite d'une réaction d'oxydoréduction. Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm (Adhikamsetty *et al.* 2008).

Seul le fer ferreux  $Fe^{2+}$  forme un complexe stable avec l'orthophénanthroline et donne une couleur orangée (Figure 26). On nomme ce complexe ferroïne et il se quantifie photométriquement à une longueur d'onde de 510 nm.



**Figure 26 :** Formation du complexe  $Fe^{2+}$ -phénanthroline.



## Matériel et méthodes

---

### Mode opératoire :

Sur microplaque à 96 puits, des extraits de différentes concentration, de volume de 10  $\mu$ l ont été ajoutés à une solution de : 50  $\mu$ l  $\text{FeCl}_3$  ( 0.2 %), 30  $\mu$ l Phenanthroline ( 0.5 %) et 110  $\mu$ l de méthanol. Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 20 min à l'étuve à température de 30°C.



**Figure 27** : L'étuve.

L'absorbance a été déterminée à 510 nm.



**Figure 28** : Spectrophotométrie.



## Matériel et méthodes

---

Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

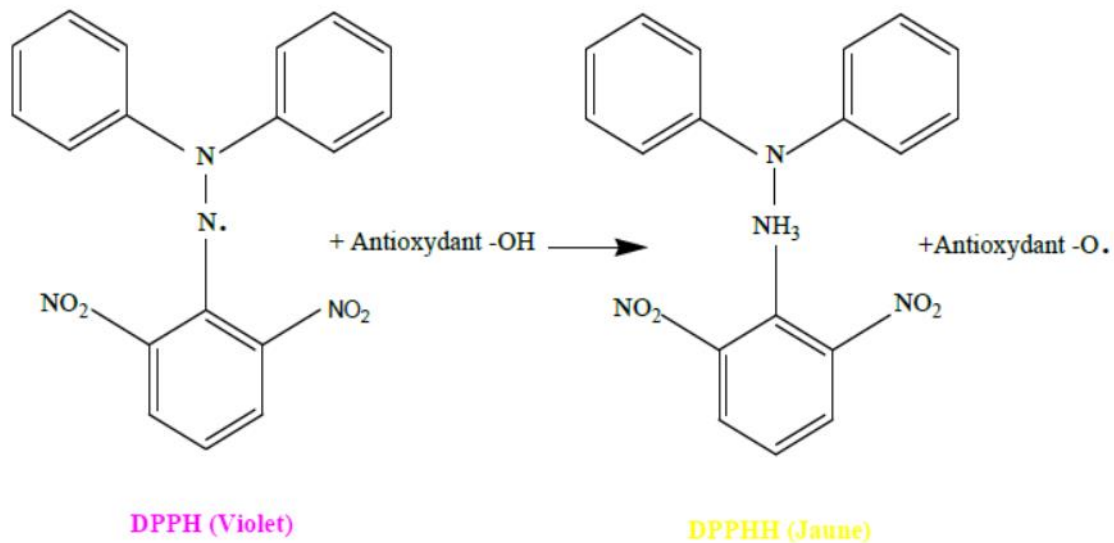
Le BHA (Butylhydroxyanisole) et le BHT (Butylhydroxytoluène) sont utilisés comme standards.

### 4.4. Le test de piégeage du radical DPPH :

#### Principe:

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH) (**Brand-William et al. 1995**).

Le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picryl-hydrazyl) est stable à température ordinaire et présente une couleur rose-violacée bien caractéristique. Les antioxydants présents dans l'extrait préparé le réduisent, ce qui entraîne une décoloration jaune, facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm, et par conséquent une diminution de l'absorbance.



**Figure 29** : Réaction du test DPPH.

#### Mode opératoire:

Une quantité de 4 mg du radical DPPH est dissoute dans un volume de 100 ml de méthanol, la solution est gardée à +4 °C à l'abri de la lumière.

## Matériel et méthodes

---

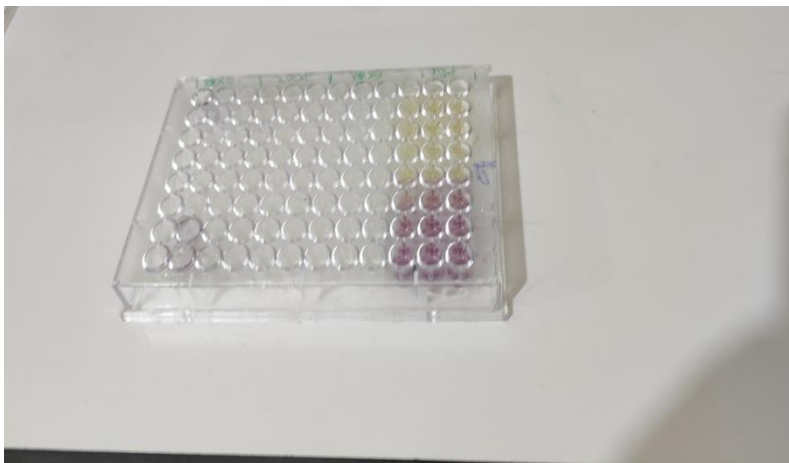
Sur une microplaque à 96 puits, une solution de 160  $\mu\text{l}$  du DPPH• a été mélangé avec 40  $\mu\text{l}$  de l'extrait préparé à plusieurs concentrations (dilution dans le méthanol). Le mélange a été maintenu à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

Les résultats sont évalués par le calcul de la valeur  $\text{IC}_{50}$  qui correspond à la concentration de l'extrait qui cause 50% d'inhibition.

Le BHA (Butylhydroxyanisole) et le BHT (Butylhydroxytoluène) sont utilisés comme standards.



**Figure 30 :** Microplaque à 96 puits.

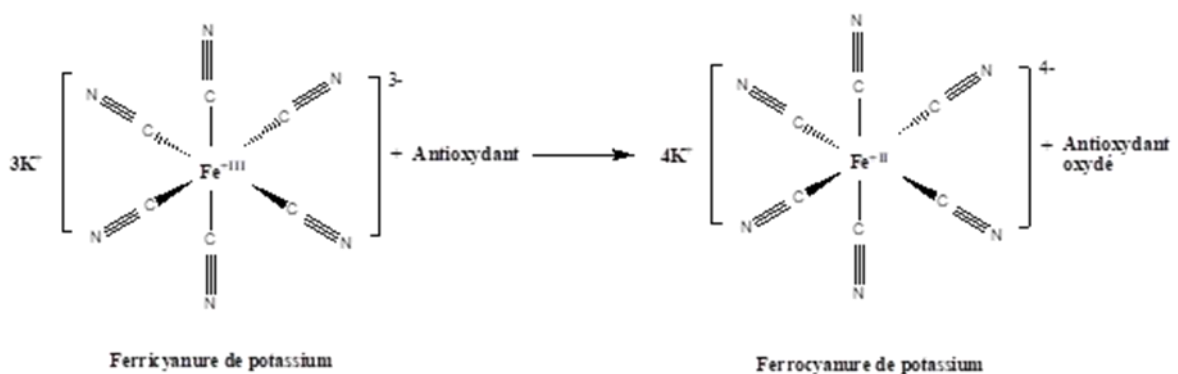


**Figure 31** : Spectrophotomètre.

### 4.5. Le test du pouvoir réducteur FRAP (Reducing power):

#### Principe:

Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons (**Figure 32**), basée sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) et la formation de ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ).



**Figure 32** : Réaction du test FRAP.

#### Mode opératoire:

Sur une microplaque à 96 puits, 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 40  $\mu\text{l}$  d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50  $\mu\text{l}$  d'une solution

## Matériel et méthodes

---

de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50  $\mu$ l de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, 40  $\mu$ l d'eau distillée et 10  $\mu$ l d'une solution aqueuse de chlorure ferrique  $FeCl_3$  à 0,1% sont additionnés.



**Figure 33 :** Matériel utiliser.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}(\mu\text{g/ml})$  correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

Les antioxydants standards utilisés dans ce test sont l'acide ascorbique, l'acide tannique et  $\alpha$ -Tocophérol.

# Chapitre 2 :

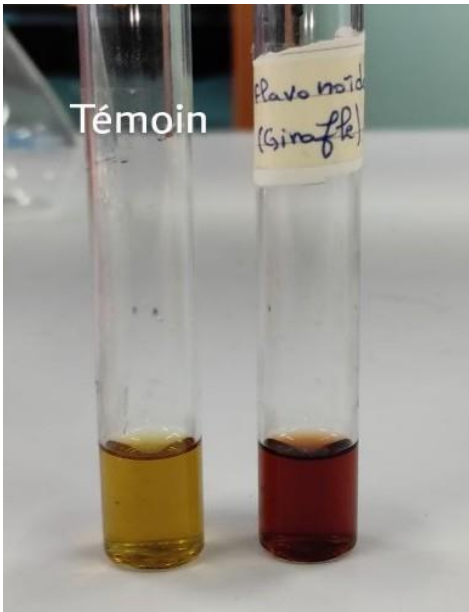
# Résultats et Discussion

## Chapitre 2: Résultats et Discussion


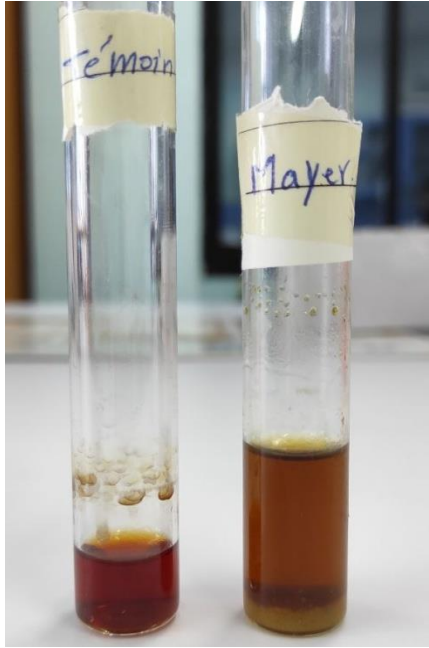
### 1. Criblage phytochimiques:

Les tests phytochimiques nous ont permis de détecter la présence ou l'absence des groupes phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins) existants dans les échantillons choisis, par des réactions de précipitation ou de coloration, avec utilisation de réactifs spécifiques. Les tests qui se produisent sont classés de: positif (+) ou négatif (-). Les résultats des tests phytochimiques d'extrait de girofle sont représentés dans le tableau 1.

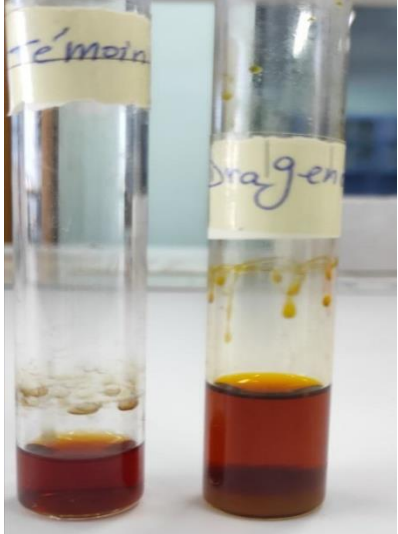
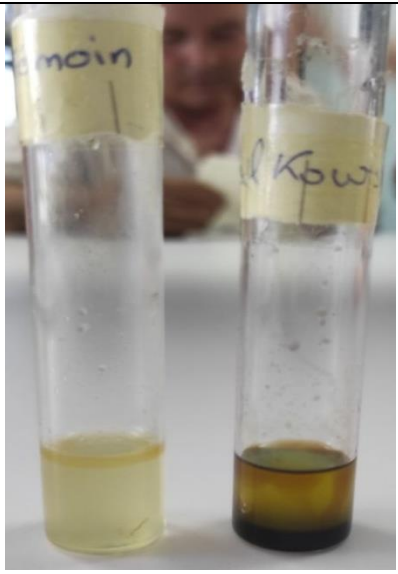
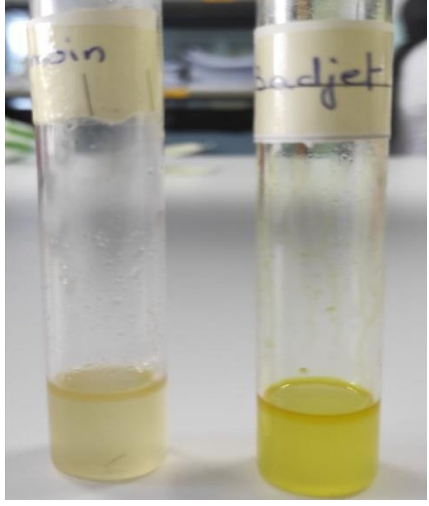
**Tableau 1:** Résultats des tests phytochimiques réalisés sur la poudre de *Syzygium aromaticum*.

Métabolites secondaires	Remarque	Résultats	Photos des résultats (témoins et résultats)
Flavonoïdes	Apparition d'une couleur rouge (riche en flavones).	+++	

## Résultats et Discussion

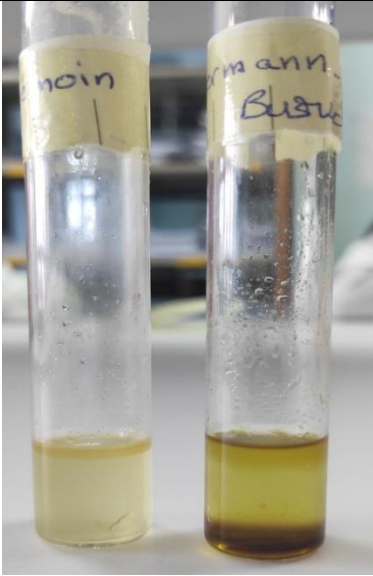

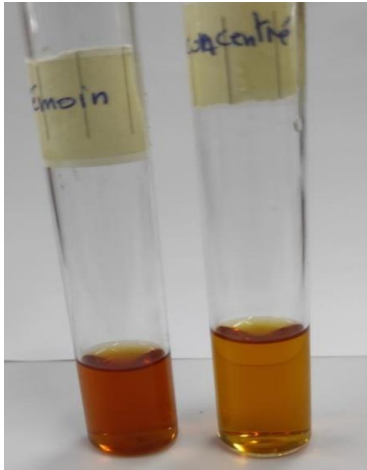
Tanins	Apparition d'un précipité blanc lors de l'ajout de la gélatine.	++ (Tanins Galliques)	
	Le $\text{FeCl}_3$ confirme la présence des tanins galliques après le virage de la couleur bleu-noire.		
Alcaloïdes	Apparition d'un précipité blanc (Mayer).	+	


## Résultats et Discussion

	<p>Apparition d'un précipité Orange ce qui confirme la présence des alcaloïdes (Drengandoff).</p>		
Stérols	<p>Une coloration rouge indique la présence de stérols (Test de Salkowski).</p>	+	
Stéroïdes	<p>Apparition d'une coloration orange due aux stéroïdes lactoniques (Test de Badjet-kedde).</p>	+	



## Résultats et Discussion

Triterpenes	Apparition d'une coloration rouge qui confirme la présence de triterpenes (Test de Libermann-Burschard).	+	
Saponosides	Apparition d'une mousse de cm.	+	
Anthocyanes	Une coloration Rouge (ajoute d'acide HCl concentré).	+	

<p>Une coloration bleue due à la présence des anthocyanes (ajoute du base NaOH).</p>	+	
--------------------------------------------------------------------------------------	---	-------------------------------------------------------------------------------------

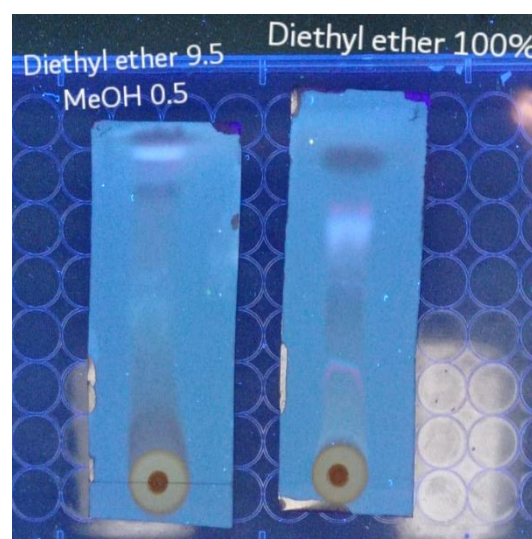
### 2. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince a été réalisée par l'utilisation des deux systèmes de solvants suivants: Diethyl ether (10 ; V) et Diethyl ether/ MeOH (9.5/0.5 ; V/V), qui donne une bonne séparation sous forme des spots visibles sous UV à 254 nm – 365 nm.

Les figures ci-dessous représentent le chromatogramme obtenu:

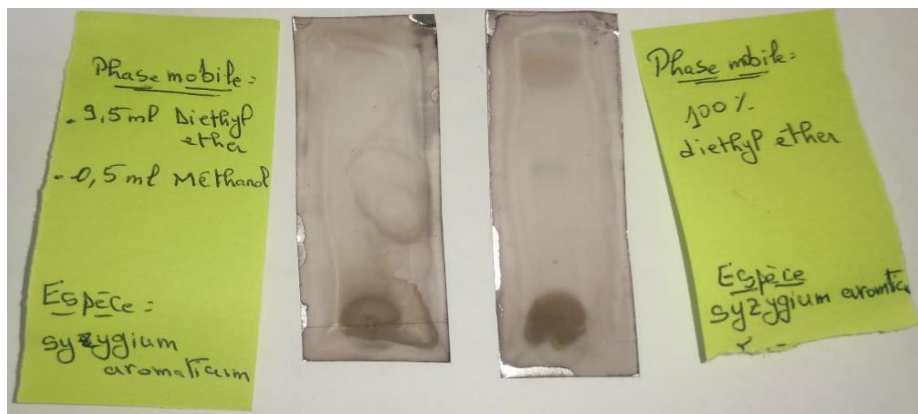


**Figure 34:** Révélation de la CCM sous lampe UV (254 nm).



**Figure 35:** Révélation de la CCM sous Lampe UV (365 nm).

## Résultats et Discussion



**Figure 36:** Révélation de la CCM par vaniline.

Les spots et leur rapport frontaux sont montrés dans le tableau ci-dessous :

**Phase mobiles n°1:** Diethyl ether (10 ; V)

**Tableau 2 :** Les valeurs de rapport frontal ( $R_{f1}$ ).

Spots révélés	Rf
Spot 1	0.57
Spot 2	0.67
Spot 3	0.75
Spot 4	0.85

**Phase mobile n°2:** Diethyl ether/ MeOH (9.5/0.5; V/V)

**Tableau 3:** Les valeurs de rapport frontal ( $R_{f2}$ ).

Spots révélés	Rf
Spot 1	0.77
Spot 2	0.87
Spot 3	0.92

## Résultats et Discussion

---

Nos résultats de CCM visuel et sous UV est une analyse quantitative permet l'identification rapide les composés et les métabolites secondaire: c'est qualitative

D'après nos résultats de criblage et de chromatographie sur couche mince (CCM) ont montré que notre extrait hydrométhanolique est consisté de plusieurs métabolites secondaires, ce qui a déjà été prouvé dans plusieurs travaux sur la plante de clou de girofle.

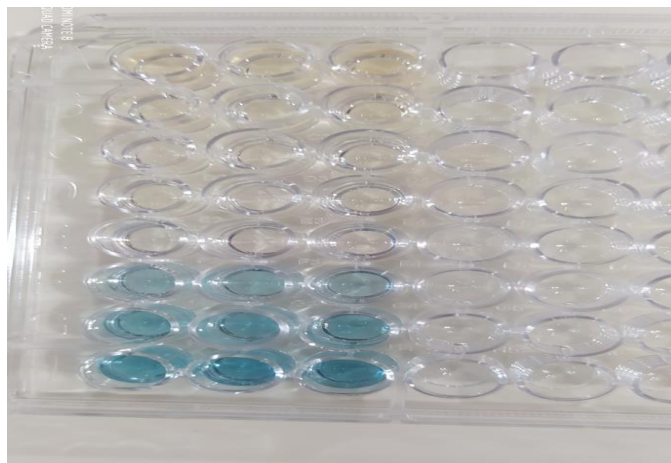
### 3. Evaluation de l'activité antioxydante:

#### 3.1. Le test de piégeage du radical d'ABTS (ABTS scavenging activity):

Selon les chercheurs, le test ABTS utiliser pour mesurer la capacité antioxydant totale dans les substances pures, dans les liquides organiques et dans les matières végétales.

Par une spectrophotométrie à 734 nm, on a été mesuré l'absorbance. À partir des valeurs obtenues, on a été calculé le pourcentage d'inhibition qui permet de tracer la courbe des variations de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait.

Les résultats obtenus dans le tableau et la figure suivants:



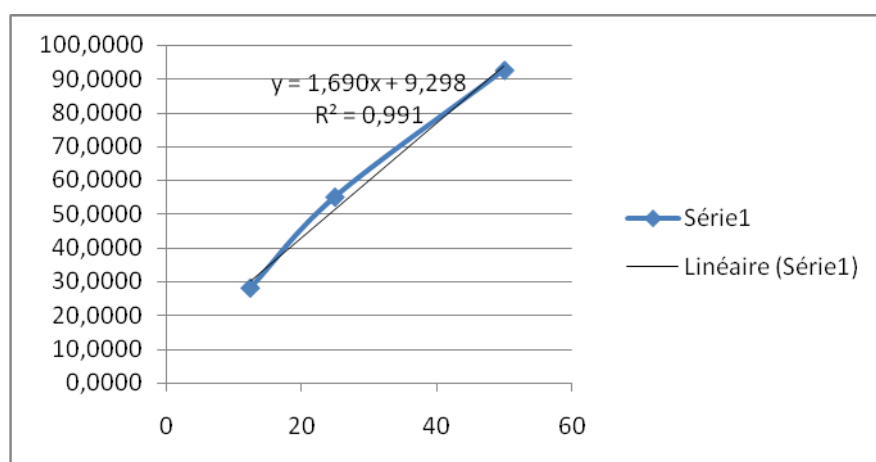
**Figure 37 :** Microplaque de test du radical ABTS (coloration bleu).

**Tableau 4 :** Pourcentage d'inhibition de ABTS par extrait hydrométhanolique de clou de girofle.

## Résultats et Discussion

Extracts	% Inhibition in ABTS assay							
	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	IC <sub>50</sub> µg/mL
<b>1</b>	26.46±3.13	52.82±1.99	90.97±3.23	92.03±0.97	92.77±0.24	93.15±0.32	93.68±0.24	25.19±1.37
BHT	±	±	49.22±0.75	59.22±0.59	78.55±3.43	90.36±0.00	92.18±1.27	<b>1.59±0.03</b>
BHA	±	±	83.42±4.09	93.52±0.09	93.58±0.09	93.63±0.16	93.63±0.95	<b>1.03±0.00</b>

Pour montrer l'activité antioxydant d'extrait de clou de girofle, nous avons déterminé graphiquement l'IC<sub>50</sub> à partir de la courbe suivante :



**Figure 38** : Pourcentage d'inhibition de radicaux ABTS\*+ par extrait méthanolique du girofle.

Les résultats obtenus qui sont représentés dans les figures de l'activité antiradicalaire de *Syzygium aromaticum* montrent un IC<sub>50</sub> = 25.19±1.37 µg/ml qui est supérieur à celle des standards, BHT = 1.59±0.03 µg/ml et BHA = 1.03±0.00 µg/ml. (Tableau 4)

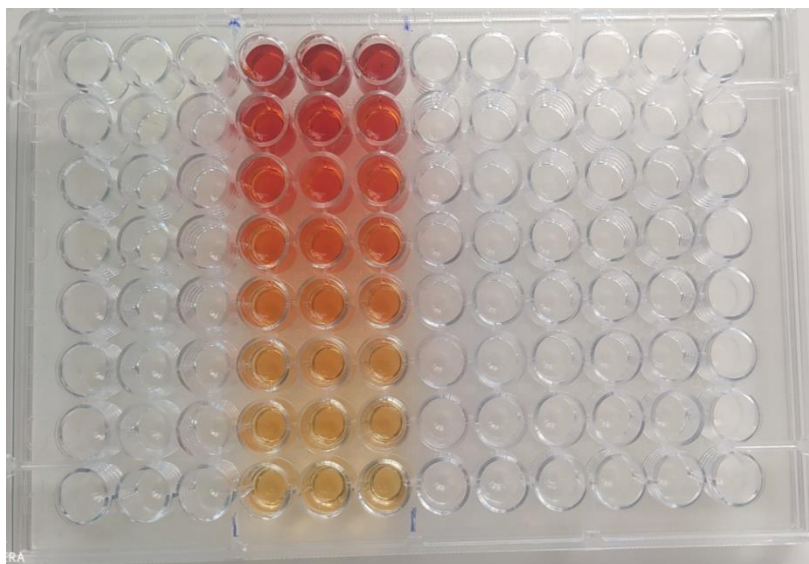
Selon les résultats trouvés, notre extrait hydrométhanolique du clou de girofle a un pouvoir antioxydant à partir de leur IC<sub>50</sub> qui est énorme. Cette valeur est inférieure à celle trouvée par (Wettséghe M, 2002), (Mathews S, 2006) d'ordre 44.78 ± 0.65.

### 3.2. Le test de l'activité de Phénanthroline (Phen assay):

## Résultats et Discussion

Après l'incubation, nous avons mesuré l'absorbance par une spectrophotométrie à 510 nm qui donne des valeurs permet de calculer à titre de  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

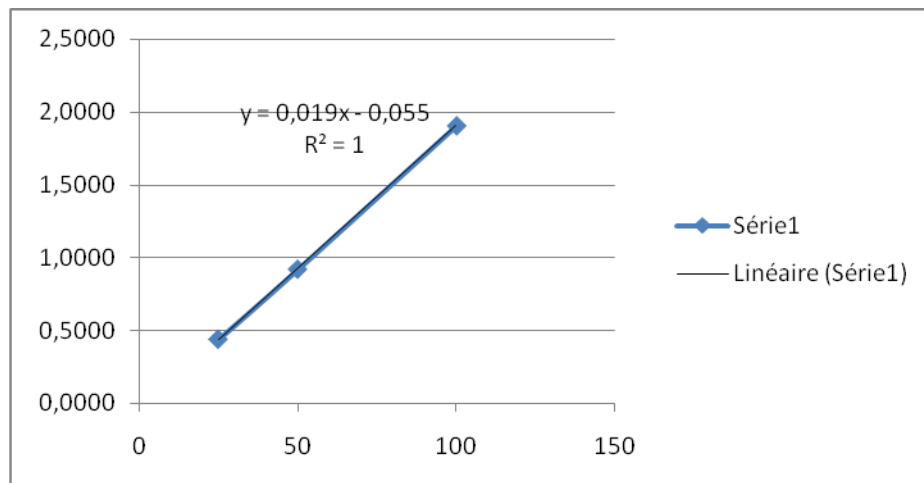
Nos résultats représentent dans les figures suivantes:



**Figure 39** : Microplaque de test de l'activité phénanthroline (coloration jaune-orange).

**Tableau 5** : Pourcentage d'inhibition de phénanthroline par extrait hydrométhanolique de clou de girofle.

Extracts	% Inhibition in Phenanthroline assay							
	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$	$A_{0,50}$ $\mu\text{g/mL}$
<b>1</b>	0.34±0.01	0.41±0.03	0.83±0.08	1.66±0.22	2.94±0.16	3.83±0.02	4.07±0.08	30.85±1.73
BHT	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	±	±	<b>2,24±0,17</b>
BHA	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	±	±	<b>0,93±0,07</b>



**Figure 40** : Pourcentage d'inhibition de phénanthroline par extrait méthanolique du girofle.

L'extrait hydrométhanolique du clou de girofle a présenté respectivement de  $A_{0,5}$  de  $30,85 \pm 1,73 \mu\text{g/mL}$  qui est inférieur par rapport BHT ( $2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ ) et par rapport BHA ( $0,93 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ ).

Donc cet extrait hydrométhanolique a une activité antioxydant modéré.

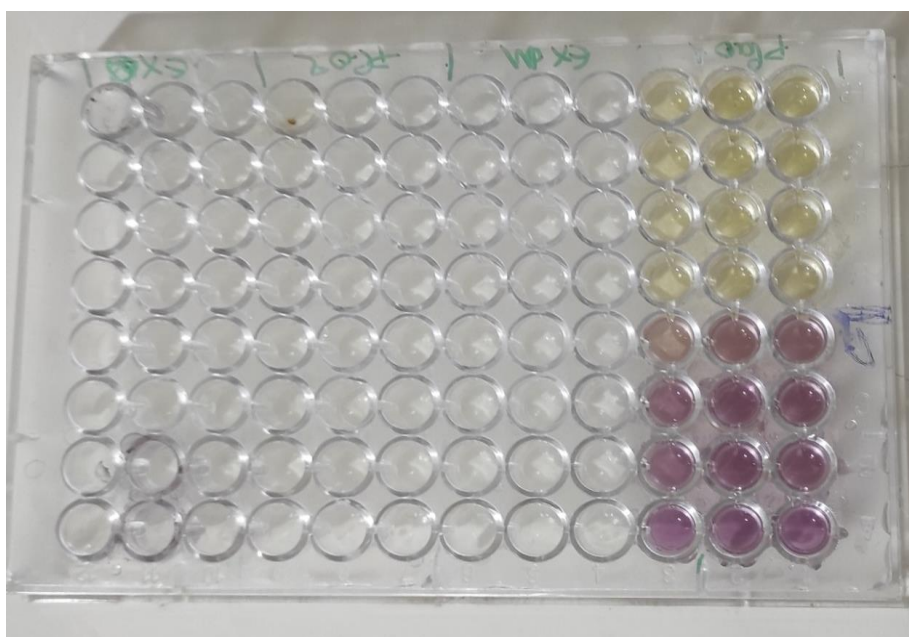
### 3.3. Le test de piégeage du radical DPPH:

Le test DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisé dans l'analyse de l'activité antioxydante.

En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité a produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule.



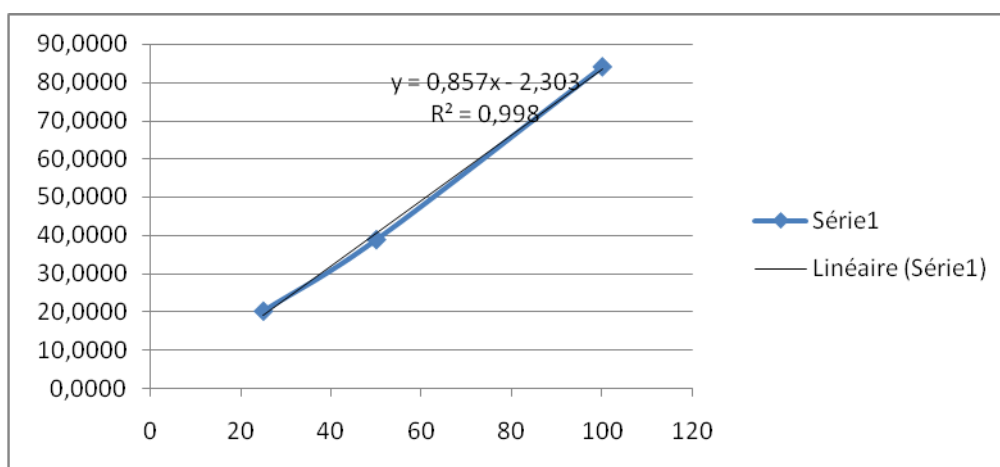
## Résultats et Discussion



**Figure 41** : Résultats du DPPH sur microplaque.

**Tableau 6**: Pourcentage d'inhibition de DPPH par extrait hydrométhanolique de clou de girofle.

Extracts	% Inhibition in DPPH assay							
	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	IC <sub>50</sub> µg/mL
1	17.48±3.20	19.87±1.78	39.84±1.23	85.46±1.29	85.63±0.79	85.74±1.80	86.68±2.66	55.34±5.92
BHT	47,77±1,22	56,93±1,84	72,83±1,23	78,46±1,01	79,48±0,31	79,48±0,31	80,10±0,66	22,32±0,02
BHA	22,21±1,24	31,73±1,22	54.89±3,60	67.60±1,13	76.77±0,54	78.67±1,31	79,01±0,89	6,82±0,49



**Figure 42** : Pourcentage d'inhibition de DPPH par extrait méthanolique du girofle.



## Résultats et Discussion

---

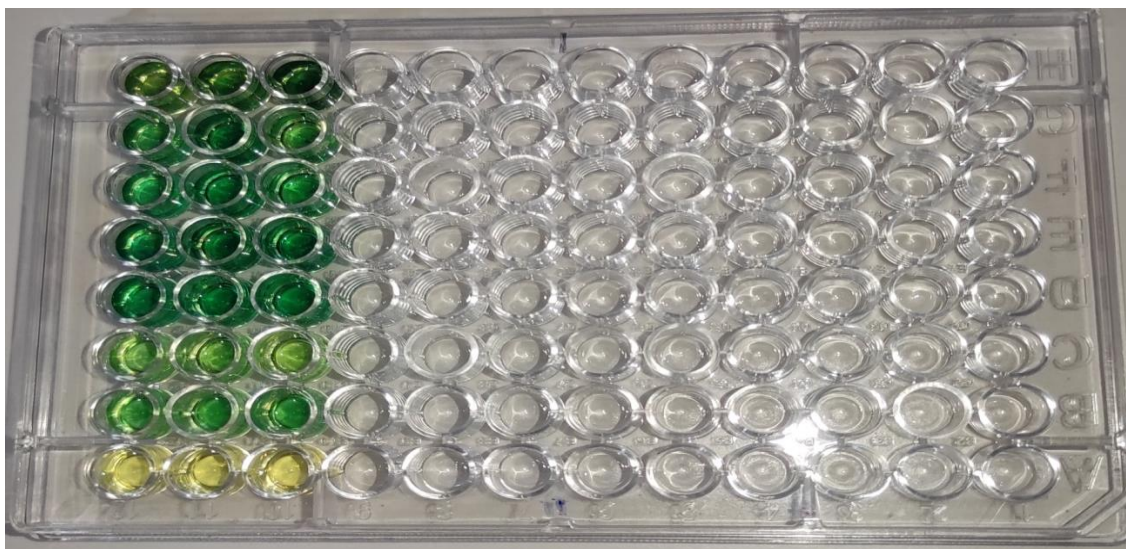
Les résultats du test DPPH sont exprimés en  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  C'est la concentration inhibitrice médiane.

L'extrait 1 a une  $IC_{50}$  ( $55.34 \pm 5.92 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) qui est plus forte que celle de BHA ( $6,82 \pm 0,49$ ) et BHT ( $22,32 \pm 0,02$ ).

Les résultats de l'activité anti radicalaire ont montré que les extraits de clou de girofle présentant une forte activité anti radicalaire avec une valeur  $IC_{50}$  d'extraits sont supérieurs à valeur de BHT.

### 3.4. Test du pouvoir réducteur: FRAP

C'est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux. La présence du réducteur dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $\text{Fe}_3^+$  complexe ferricyanide à la forme ferreuse par conséquent,  $\text{Fe}_2^+$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel a 700nm. En d'autres termes, le système  $\text{FeCl}_3 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent a la réaction redox (Bougandoura et Baendaimerad, 2013) .

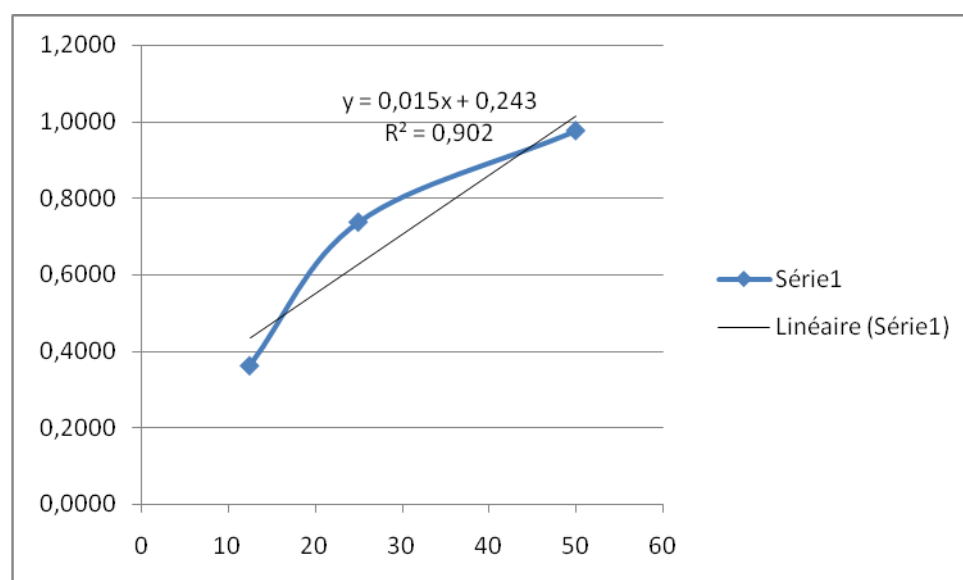


**Figure 43 :** Résultats du FRAP sur microplaque.

## Résultats et Discussion

**Tableau 7:** Pourcentage d'inhibition de FRAP par extrait hydrométhanolique de clou de girofle.

Extrait	% Inhibition in FRAP assay							
	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	<b>A0.50 µg/mL</b>
<b>1</b>	0.47±0.02	0.67±0.07	1.04±0.08	1.06±0.05	1.19±0.00	1.36±0.12	1.36±0.12	<b>15.30±2.12</b>
<b>Acide ascorbique</b>	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,44±0,21	1,37±0,20	<b>6,77±1,15</b>
<b>Acide tannique</b>	0,28±0,02	0,78±0,06	1,02±0,07	1,24±0,18	0,86±0,6	1,01±0,21	1,02±0,13	<b>5,39±0,91</b>
<b>α-Tocophérol</b>	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	<b>34,93±2,38</b>



**Figure 44:** Pourcentage d'inhibition de FRAP par extrait méthanol à 70%.

Les résultats du pouvoir réducteur sont exprimés en  $A_{0.50}$ . C'est la concentration de substrat à une absorbance de 0.50.

$A_{0.50}$  d'acide tannique c'est la plus faible ( $5,39 \pm 0,91$ ) par rapport al' acide ascorbique sa valeur ( $6,77 \pm 1,15$ ) puis celle d'extrait 1 ( $15,30 \pm 2,12$ ).

$A_{0.50}$  d'α-Tocophérol est la plus élevé ( $34,93 \pm 2,38$ ).

## Résultats et Discussion

---

Les tests d'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait hydrométhanolique de *Syzygium aromaticum* ont été réalisés in vitro, selon plusieurs méthodes via l'ajout de réactifs oxido-réductions des radicaux libre.

Comme nos résultats de cette étude ont montré que les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* possèdent une assez bonne activité antioxydante selon les tests que nous avons fait comme: DPPH, ABTS, FRAP et Phénanthroline.

Nous avons eu des résultats similaires de **(Oiszowy, 2016)** qui l'indiquent que les huiles essentielles présentent une activité antioxydante variable, cependant, toutes sont capables de neutraliser les radicaux libres, de réduire les ions cuivriques ou ferriques et de protéger ou de retarder le processus d'oxydation des lipides.

**conclusion**

## Conclusion :

Pendant longtemps, les plantes médicinales furent le principal recours de l'Homme pour la fabrication de remèdes pharmaceutiques. En effet, les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans le système de soins traditionnels et dans les différentes industries : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique

Globalement l'espèce *Syzygium aromaticum* contient des molécules très intéressantes qui peuvent être considéré comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employés pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies tel que le cancer et les maladies cardiovasculaire.

Les tests de criblage phytochimiques montrent que cette plante est riche en composés phénoliques essentiellement les flavonoïdes, les tanins...

Les résultats de la chromatographie sur couche mince (C.C.M) confirment la richesse de l'extrait méthanolique en composés phénoliques.

Les tests de l'activité antioxydante montrent le potentiel des boutons floraux du giroflier en termes d'inhibition des radicaux libres.

L'ensemble de ces résultats obtenus permis de conclure que cette espèce est une source de molécules bioactifs, qui possèdent un pouvoir pharmacologique pour des applications thérapeutiques.

Enfin, comme perspective, nous recommandons une culture des plantes médicinales et pour permettre à la population d'avoir des médicaments et des denrées alimentaires moins chers et d'éviter la disparition de certains espèces intéressantes.

**Références**

**bibliographiques**

## ***Références bibliographiques:***

**Abed-Négo Y.E., et Faton. N. (2012).** Etude comparée de la conservation du poisson chinchard (*Trachurus trachurus*) fumé à l'aide des huiles essentielles de *Ocimum gratissimum* de pimenta racemosa et de *syzygium aromaticum* au Bénin. Diplôme de master d'ingénieur de conception en technologie alimentaire. Université d'Abomey calavi à Bénin. P-29,30.

**Amrane .K., et Dib .L. (2021).** Etude de l'activité antioxydante et dosage des composés phénoliques des extraits d'épices et du thé vert. Diplôme de Master en Agro-alimentaire et control de qualité. Université Mouloud MAMMARI de Tizi -Ouzou. P-6,7.

**Anderson. T.J. (1997).** Oxidative stress, endothelial function and coronary ather osclerosis. *Cardiologia*. 42:701-714.

**Antoine. G. (2009).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Support de cours sur le métabolisme secondaire (Equipe pédagogique Physiologie Végétale).

**Atmani .H., et Baira .K. (2015).** Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères physico-chimique d'huile essential clou de girofle *syzygium aromaticum*.L. Diplôme de master de biologie et physiologie végétale. Université de frères Mentouri Constantine. P-16,17.

**Bader K. M., et Bounouiga.M. (2021).** Etude phytochimique et activité antioxydante d'une plante médicinale Algérienne du genre *Hedera* (Araliaceae). Diplôme de master de Biochimie Appliqué. Université de frères Mentouri Constantine. P-31.

**Barbelet. S. (2015).** Le girofler : Historique, Description et Utilisation de la plante et de son huile essentielle. Thèse de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. P-22,23.

**Belkamla.Ch. Boudarbala.R., Benlatreche.K. (2021).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante, antidiabétique et anti-inflammatoire de l'espèce *Ceratonia siliqua* L. (Elkharoub). Diplôme de master de biologie et physiologie végétale. Université de frères Mentouri Constantine. P- 40.

**Benyerbah.A. et Aliguechi. A. (2021).** Extraction des métabolites secondaires bioactifs de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé. Diplôme de Master de Mycologie et Biotechnologie Fongique. Université des Frères Mentouri Constantine. P-11.

**Boizot.N et Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques.

**Bougandoura. N et Baendaimerad. N (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de satureja calamintha ssp.Nepeta (L.). Université Abou Baker belkaid Algérie. P- 14,19.

**Chagra .K. (2019).** Etude les propriétés physico-chimiques et biologique de clou du girofle (*Syzygium aromaticum* (L)). Diplôme de Master de Génie chimique. Université Mohamed Khider de Biskra. P-11.

**Dacosta .Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed .Yves Dacosta, Paris, P.317.

**Diego. F. (2014).** Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. Journal Trop Biomed 4(2): 90-96.

**Filane. E., et Toumi. H. (2012).** Rôle des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'exercice physique sur le métabolisme osseux. Revue de rhumatisme. P-79 : 387-392.

**Haleng. J., Pincemail. J., Defraigne. J. O., C. Charlier. C., Chapelle. J. P. (2007).** Le stress oxydant. Revue médicale N° 62 : 10 : 628-638.

**Jeanne. M-R., Odile.G N-O., Patrick.V D. (2011) .** Plantes médicinales et pratiques médicales au Burkina Faso : cas des *Sanan*. BOIS ET FORÊTS DES TROPIQUES, N° 307 (1)



**Krief .S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse de docteur du muséum national d'histoire naturelle. Université d'ouganda. P-17.

**Kalembe. D., et Kunicka. A. (2003).** Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Journal of Current Medicinal Chemistry, Vol 10. P-813.

**Medfouni.R., et Hafsi.N. (2017).** Contribution à l'étude phytochimique et les activités biologique d'une plante médicinale *Syzygium aromaticum*. Diplôme de master de biochimie appliquée. Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi. P-2, 3, 10.

**Merghem. R. (2009).** Eléments de Biochimie Végétale. P-137,140, 141, 142,143.

**Muanda F.N. (2010).** Identification de polyphénols, Evaluation de leur activité.

**Nouri. R., et Regad .Z. (2021).** Synthèse des travaux phytochimiques chez l'option métabolisme secondaire et molécules bioactives (2011-2016) partie II. Diplôme de Master de Biologie et Physiologie de la Reproduction. Université des Frères Mentouri Constantine. P-11,12.

**Orman. F.D. (2012).** Etude Ethnobotanique Des Plantes Medicinales Dans La Province De Settat (Maroc). Journal of Forestry Faculty 12 (2): 192-208.

**Pastre J. O. C. (2005).** Thèse de doctorat sur : Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Université de Paul-Sabatier de Toulouse.

**Rejeb .I. (2008).** Etude de l'effet d'irradiation sur les polyphénols curcumine. Diplôme national d'ingénieur en biologie industrielle. Université du 7 Novembre à Carthage. P-5.

**Rajonera .T E. (2017).** .....titre..... . Diplôme de master en science de la vie. Université d'Antananarivo Madagascar. P-8, 9,10.

**Royer .M. (2013).** Etude de relation entre croissance, Concentrations et métabolites en primaires et secondaires et disponibilité en ressource chez la tomate avec ou sans Bioagresseurs. Thèse de docteur en sciences agronomiques. Université de lorraine. P-12.

**Talbi .M. (2014).** Dosage des phylophénols de la plante d'armtemisia campestrise.L par chromatographie HPLC.mise en évidence de l'activité biologique. Diplôme de magister de chimie moléculaire et biomoléculaire. Université Ahmed Benbella Oran. P-10.

**Toure.D. (2014).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côté d'Ivoire. Thèse de Doctorat en Biochimie. Université Félix Houphouët-Boigny. P- 2, 7,9.

**Sites Web :**

**Site 1 :** sciencedirect.com

**Site 2 :** researchgate.net

**Site 3 :** fr.wikipédia.org

**Site 4 :** pinterest.com

**Site 5 :** doctissimo.fr

**Site 6 :** gralon.net

**Site 7 :** forets-biodiv.org

**Site 8 :** epices.com