

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Etude des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle
de la plante *Syzygium aromaticum***

Présenté par : BOUZAA Fatma

Remis le 22/06/2022

ZID Hanadi

HARIZA Esma

Jury d'évaluation :

Encadreur : Dr. ZITOUNI Hind (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Dr. GHORRI Sanaa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Dr. MEZIANI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021 - 2022

Remerciements

Nous remercions tous d'abord, Allah de nous avoir donné la santé, la volonté, le courage et la foi pour pouvoir atteindre nos objectifs et surmonter les moments difficiles.

Nous tenons à adresser notre profonde gratitude à notre promotrice

***Dr. ZITOUNI Hind** qui nous a apporté son aide, et qui nous a orienté tout au long de ce travail.*

*Nous tenons à remercier **Dr. GHORRI Sanaa** qui nous fait l'honneur de juger ce travail et **Dr. MEZIANI Meriem** pour le temps qu'elle consacre à ce mémoire.*

Nous remercions aussi l'ensemble des enseignants du département de Microbiologie et ceux de la formation Mycologie et biotechnologie fongique.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Hanadi, Esma et Fatma

Dédicaces

Je dédie ce travail à Ma famille BOUZAA

Vous êtes les plus chers à mon cœur

*A ma chère mère **soumia:***

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

*A mon cher père **omar:***

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

A mes chères sœurs et mon frère : Izdihar, Rokaya et mouhamed el yazide.

A Mon cher fiancé pour son soutien, ses encouragements et sa confiance.

A mes grands-mères, grands-pères, mes oncles et tantes et leurs enfants.

A toutes ma grande famille et tous mes amis

Sans oublier mes chères amies Esmâ et Hanadi qui ont partagé avec moi les moments difficiles, pour leur soutien moral et leur patience tout au long de ce travail.

FATMA

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser

Ce travail et avec un énorme plaisir, et c'est avec un cœur ouvert une immense joie, que je dédie mon travail

A mes parents

A la mémoire de ma chère mère, l'âme pure qui n'a jamais quitté mon cœur

A toute ma famille qui m'a toujours soutenue grands ou petits

Spécialement :

A ma très chère grand-mère qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études et ses prières sont le secret de ma réussite. La lumière de ma vie, que dieu prolonge sa vie

A mes deux chères tantes et leurs enfants pour leur soutien permanent et leur fidélité, que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A mes oncles que dieu les protège

A mon fiancé pour son soutien et ses encouragements

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

A tous ceux qui m'ont soutenu

Sans oublier mes chères amies Esma et Fatma qui ont partagé avec moi les moments difficiles, pour leur soutien moral et leur patience tout au long de ce travail.

HANADI

Dédicaces

A mes chères parents Nora et Hamza qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager durant ces années d'études par leurs prières et leur sacrifices. Que Dieu les protège.

Un grand merci à mon cher frère Charef Eddine et sa femme Yasmine pour leurs soutien et leur amour.

A mon petit cher frère Imed Eddine que Dieu le protège.

A ma chère sœur Safwa et son mari Yahya. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mon adorable petite sœur Ayat Erahmane qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A mes oncles et tantes que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leur amour et leurs encouragements.

A mon cher fiancé Taki Eddine pour ses encouragements, sa patience et son soutien.

Sans oublier mes chères amies Fatima et Hanadi qui ont partagé avec moi les moments difficiles et pour leurs soutien moral et leurs patience tout au long de ce travail.

ESMA

Table des matières

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les huiles essentielles

1. Généralités sur les huiles essentielles.....	3
1.1.Définition selon la commission de la pharmacopée européenne (2008).....	3
1.2. Définition selon AFNOR ISO 9235	3
2. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante.....	3
3. Les propriétés physico-chimique.....	4
4. La composition chimique.....	5
4.1. Terpénoïdes.....	5
4.2. Composés aromatiques (phénoliques).....	5
4.3. Autres composés	5
5. La classification des huiles essentielles.....	5
6. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	6
6.1.Hydro distillation.....	6
6.2.Entrainement à la vapeur d'eau.....	7
6.3.Extraction par micro-ondes.....	8
6.4.Expression à froid.....	8
6.5.Extraction par solvants organiques.....	8
7. Le rôle physiologique des huiles essentielles.....	9
8. La toxicité des huiles essentielles.....	9
8.1.Toxicité aigüe.....	9
8.2.Toxicité chronique.....	9
8.3.Toxicité dermique.....	10

Chapitre 2 : le clou de girofle

1. 1. Généralités sur le Giroflier (<i>Syzygium aromaticum</i>)	11
2. Historique.....	11
3. Origine/Répartition géographique.....	12
4. Systématique de clou de girofle	12
5. Chimique de clou de girofle	13
6. Culture et récolte de clou de girofle	13
6.1. Agro-écologie.....	13
6.2. La récolte.....	14
6.3. Saveur et arôme.....	14
7. Description de l'arbre.....	14
7.1.Allure-générale.....	14
7.2 .Racine.....	14
7.3.Le tronc.....	15
7.4.Les feuilles.....	15
7.5.Inflorescence	15
7.6.Fruits.....	17
8.Conclusion relative de la culture de clou de girofle.....	17
9.la toxicité de clou de girofle	17

Chapitre 3 : Activités des huiles de clou de girofle

1. Les propriétés du clou de girofle.....	18
1.1.Activité antibactérienne	18
1.2.Activité antifongique	18
1.3.Activité antivirale.....	19
1.4.Activité anti-inflammatoire et analgésique	19
1.5.Activité anticancéreuse	20
2. Mode d'action d'HE de clou de girofle (eugénol).....	20
3. Les différentes applications de l'huile essentielle de clou de girofle.....	20
3.1.Soin buccal	20
3.2.Traitement des mycoses.....	21
3.3.Mycose de l'ongle.....	21

3.4. En cas de fatigue physique, non liée à une maladie	22
3.5. Propriétés anti oxydantes et blanchissantes.....	22

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	23
2. Souches microbiennes utilisées.....	23
3. Méthodes.....	24
3.1. Hydro-distillation.....	24
3.2. La conservation de l'huile essentielle	25
4. Analyses de l'huile essentielle.....	25
4.1. Le rendement	25
4.2. La mesure du pH	26
5. Evaluation des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle étudiée.....	26
5.1. Ré-isolément des souches bactériennes.....	26
5.2. Préparation de l'inoculum.....	26
5.3. Préparation de l'eau physiologique.....	26
5.4. Les milieux de culture utilisés	26
5.5. La dilution des huiles de clou de girofle	27
5.6. L'ensemencement.....	27
5.7. Dépôt des disques.....	28
5.8. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode contact direct en milieu gélosé	28
5.9. L'incubation.....	29

Résultats et discussion

I. Description de l'huile essentielle de clou de girofle	30
1. Les caractéristiques organoleptiques.....	30
2. Les analyses de l'huile essentielle	30
2.1. Le rendement.....	30
2.2. Le pH	31
3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	32
3.1. Aspect macroscopique et microscopique des souches bactériennes utilisées.....	32
3.2. L'activité antibactérienne.....	33

4. Evaluation de l'activité antifongique.....	37
4.1. Aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques utilisées.....	37
4.2. L'activité antifongique.....	38

Conclusion générale

Conclusion.....	42
------------------------	-----------

Références bibliographiques.....	43
---	-----------

Annexes

Résumé en Français

Résumé en Anglais

Résumé en Arabe

La liste des figures

Figure 1 : Schéma d'un montage d'hydro distillation.....	7
Figure 2 : Carte géographique des principaux producteurs de clou de girofle du monde.....	12
Figure 3 : Boutons de clou de girofle.....	12
Figure 4: Principaux constituants d'huile de <i>S.aromaticum</i>	13
Figure 5 : Allure d'un giroflier.....	14
Figure 6 : Feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleur verte.....	15
Figure 7 : Branche de giroflier portant les clous en inflorescence terminale	16
Figure 8 : Boutons floraux et fleurs de giroflier.....	16
Figure 9 : Matière végétale de clou de girofle.....	23
Figure 10 : Etapes de préparation de l'échantillon et d'extraction de l'huile essentielle (Photos réelles).....	25
Figure 11 : Préparation des différentes dilutions de l'huile essentielle.....	27
Figure 12 : Ensemencement par écouvillon.....	28
Figure 13 : Dépôt des disques imbibés.....	28
Figure 14 : Résultat de l'aromatogramme des souches microbiennes testées (photos réelles) La 1 ^{ère} colonne pour les dilutions (1/2, 1/4, 1/6) et la deuxième colonne pour les dilutions (1/8,1/10,1/12 ,1/14,1/16).....	36
Figure 15 : Résultat de l'aromatogramme des souches fongiques testées (photos réelles) La 1 ^{ère} colonne pour les dilutions (1/2, 1/4, 1/6) et la deuxième colonne pour les dilutions (1/8,1/10,1/12 ,1/14,1/16).....	39

Liste des tableaux

Tableau01 :Classification scientifique de plante <i>Syzygium aromaticum</i> (Sophie, 2015).....	12
Tableau 02 : Dénomination internationales de <i>Syzygium aromaticum</i>	13
Tableau 03 : L'action anti virale de l'eugénol.....	19
Tableau 04 : Les souches bactériennes testées.....	24
Tableau 05 : caractéristiques organoleptiques.....	30
Tableau 06 : Résultat du rendement.....	30
Tableau 07 : Résultat de pH.....	31
Tableau 08 : Observation macroscopique et microscopique des souches bactériennes.....	32
Tableau 09 : Résultats de l'aromatogramme.....	34
Tableau 10 : Les résultats précis des dilutions utilisées.....	35
Tableau 11 : Observation macroscopique et microscopique des souches fongiques.....	37
Tableau 12 : Résultats de l'aromatogramme.....	38
Tableau 13 : Les résultats précis de la dilution de l'aromatogramme.....	38

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

µl : microlitre

g : gramme

% : pourcentage

HE : Huile essentielle

HV : Huile Végétale

C : carbone

°C : degré Celsius

T° : température

h : heure

mn : minute

mm : millimètre

GN : gélose nutritive

DMSO : Diméthylsulfoxyde

SM : Solution mère

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées dans le traitement des pathologies et sont devenues l'une des principales voies d'accès aux soins. En effet, la composition des plantes constitue un réservoir inépuisé de nouveaux métabolites secondaires. Par ailleurs, les plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE)

Les huiles essentielles sont des produits de composition complexe, renfermant des produits volatils contenus dans les végétaux et obtenues à partir d'une matière première végétale : fleur, feuille, bois, racine, écorce, fruit, ou autre ; soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par extraction mécanique. Le principal procédé d'extraction est la distillation à la vapeur d'eau. (Chagra, 2019).

Les huiles essentielles ont de nombreuses applications en thérapeutique, en cosmétique en agro alimentaire ... De plus le potentiel d'utilisation des huiles essentielles et de leurs constituants comme fongicides est renforcé par leur biodégradabilité (Macias *et al.*, 1997) (Cowan, 1999).

L'eugénol est le principal constituant de l'huile essentielle de clous de girofle (78%) (Dzamic *et al.*, 2009). ces derniers sont des boutons floraux secs du giroflier (*Syzygium aromaticum* (L.) récoltés avant leur épanouissement ; ils possèdent, entre autres, des propriétés acaricides (Fichi *et al.*, 2007), antifongiques, antibactériennes, antivirales et anesthésiques (Chaieb *et al.*, 2007)(Lee *et al.*, 2009). Ils sont aussi largement utilisés comme agent de saveur dans de nombreux produits alimentaires (Lawless, 2002).

Les scientifiques ne cessent de rechercher des alternatives à l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique humaine. En effet, l'usage excessif de ces molécules à grande échelle a participé à l'émergence de souches résistantes voir multi résistantes aux antibiotiques.

Par ailleurs, plusieurs produits chimiques synthétiques sont utilisés comme agents de traitement du sol, mais, ces produits ont plusieurs effets secondaires négatifs, et les difficultés rencontrées dans l'utilisation de fongicides synthétiques ont encouragé la recherche d'autres moyens plus efficaces et moins polluants (Wilson *et al.*, 1993).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui vise à évaluer l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle de clous de girofle sur des bactéries pathogènes pour l'homme et sur des champignons néfastes pour le sol.

Ce mémoire a comme principaux objectifs:

- Etude bibliographique sur les huiles essentielles et leurs applications.
- Extraction de l'huile essentielle de clous de girofle par hydro distillation.
- Analyse de l'huile essentielle obtenue en comparaison aux normes AFNOR.
- Evaluation du potentiel antimicrobien de l'extrait obtenu sur des souches bactériennes et fongiques.

Revue
Bibliographique

1. Généralités sur les huiles essentielles

L'hydro-distillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales, les métabolites secondaires sont extraits des plantes par un entrainement à la vapeur d'eau. Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Pibiri, 2006).

Les huiles essentielles peuvent aussi être obtenues par expression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Georgetti *et al.*, 2003).

1.1. Définition selon la commission de la pharmacopée européenne (2008)

Les huiles essentielles sont considérées comme des préparations à base de plantes. Ce sont des « produits odorants, généralement de composition complexe, obtenus à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entrainement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement de composition » (Pharmacopée européenne, 2008).

1.2. Définition selon AFNOR ISO 9235

L'AFNOR a définie l'huile essentielle comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques » (AFNOR, 2000).

2. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles n'existent quasiment, que chez les végétaux supérieurs (Brunetton, 1999). Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique (Degryse *et al.*, 2008). Selon Lawrence, il y aurait 17 500 espèces aromatiques.

Elles sont localisées dans le cytoplasme de certaines cellules végétales sécrétrices qui se situent dans un ou plusieurs organes de la plante (**Brunetton, 1999**), à savoir :

- **Fleurs** : oranger, rose, lavande, le bouton floral (girofle).
- **Feuilles** : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge...
- **Fruits** : fenouil, anis, épicarpes des Citrus...
- **Tiges** : citronnelles ...
- **Racines** : gingembre, vétiver, iris...
- **Graines** : noix de muscade, coriandre...
- **Bois et écorces** : cannelle, santal, bois de rose...

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiquement spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, on trouve par exemple (**Brunetton, 1999**) :

- **Les cellules à huiles essentielles** : chez les **Lauracées** et les **Zingiberacées**.
- **Les poils sécréteurs** : chez les **Lamiacées**.
- **Les poches sécrétrices** : chez les **Myrtacées** et les **Rutacées**.
- **Les canaux sécréteurs** : chez les **Apiacées** et les **Astéracées**.

3. Les propriétés physico-chimiques

- Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse et al., 2008**).
- Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante, exposées à l'air.
- les huiles essentielles se volatilisent.
- Elles ne sont que très rarement colorées.
- Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de sassafras, de girofle et de cannelle.
- Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (**Brunetton, 1999**), (**Rhayour, 2002**), (**Desmares et al., 2008**), (**Bouguerra, 2012**).
- Les huiles essentielles sont très sensibles à l'oxydation, à la lumière et à la chaleur (**Brunetton, 1999**), (**Bouchamel et al, 2020**).

- Elles ne rancissent pas et sont très peu solubles dans l'eau, mais solubles dans l'alcool et les solvants organiques (chloroforme, le benzène, l'éther de pétrole)
- Elles peuvent prendre une couleur jaune pâle, bleue claire mais, sont généralement incolores (**Deschepper, 2017**), (**Belkhiri, 2020**).

4. La composition chimique

Les HEs sont constituées principalement de composés odorants divisés en deux groupes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**El haib, 2011**).

4.1. Terpénoïdes

Ensemble de substances issues de l'isoprène (C₅H₈). Elles peuvent présenter une ou plusieurs fonctions chimiques : alcool, acide, aldéhyde, cétone... (**Gavira, 2015**). Les HEs ne contiennent que les terpènes les plus volatils, dont la masse moléculaire est peu élevée comme les mono et sesquiterpènes (**Malecky, 2008**), (**Belkhiri, 2020**).

4.2. Composés aromatiques (phénoliques)

Les composés phénoliques dérivés du phénylpropane (C₆-C₃), sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Souvent, ce sont des allyles, des propénylnénols et parfois des aldéhydes, on peut aussi retrouver des composés en C₆_C₁ comme la vanilline de la Vanille (**Atmani et al., 2015**).

4.3. Autres composés

Ensemble de produits résultants de la dégradation d'acide gras ceux issus de la dégradation de terpènes, des homologues de phénylpropanes, des composés azotés ou soufrés, des hydrocarbures saturés, des hétérosides de substances volatiles... (**Bruneton, 2009**), (**Belkhiri, 2020**).

5. La 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 plusieurs groupes :

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

6. 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, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction, il existe de nombreuses méthodes d'extraction :

- Entraînement à la vapeur d'eau
- L'expression à froid
- Extraction par solvants
- Hydro distillation
- Extraction par micro-ondes

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quel que 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, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation.

6.1. Hydro distillation

C'est la technique la plus simple et la plus répandue. Elle consiste à immerger la matière première directement dans l'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition. L'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les vapeurs formées sont condensées par un système de réfrigération par courant d'eau.

Lors de la distillation des HES, plusieurs phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production de ces essences végétales (**Hajji, 2012**) (**Figure 1**).

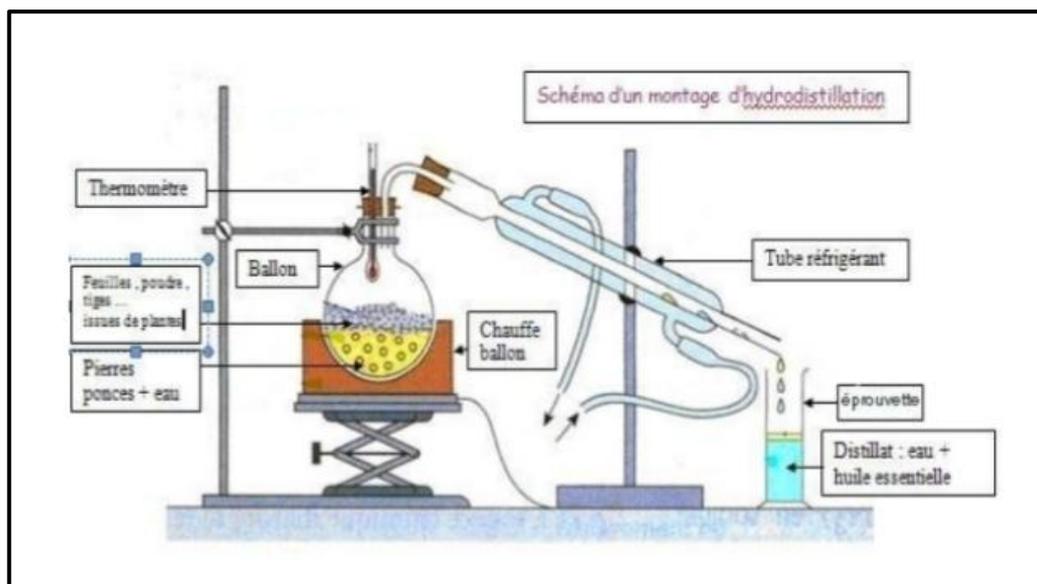


Figure 1 : Schéma d'un montage d'hydro-distillation (Anonyme 1)

Les expérimentations conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées, cette différence est fortement liée à la localisation des systèmes d'élaboration ou de stockage des HE qui sont soit à la surface ou à l'intérieur des tissus de la plante. De ce fait, ces structures ont une influence sur le déroulement de l'hydro-distillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mise en jeu, et par conséquent sur la durée de l'opération d'extraction.

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule sont rapidement rompues lors de l'ébullition, les composés volatils sont immédiatement évaporés. Lorsque les HE sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur pour qu'elles puissent s'évaporer comme dans les sécrétions superficielles.

6.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, la plante est traversée par un courant de vapeur d'eau qui va tirer les substances volatiles hydrophobes. Après condensation, la séparation se fait par décantation. Cette méthode apporte une amélioration à la qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques.

6.3. Extraction par micro-ondes

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur à micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les parties du végétal les plus riches en eau, comme les vacuoles, absorbent les ondes puis les convertissent en chaleur, engendrant une augmentation rapide et soudaine de la température au sein de ces structures. Ces dernières éclatent sous la pression régnant dans l'extracteur, libérant ainsi les molécules olfactives. Puis les vapeurs d'eau entraînent l'HE. Un système de refroidissement à l'extérieur du four à micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal. Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction, les rendements en huiles essentielles obtenus sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydro-distillation (**Grunwald, 2006**).

6.4. Expression à froid

Ce mode d'obtention particulier est réalisé uniquement pour les fruits de la famille botanique des *Rutaceae* (citron, orange, bergamote, mandarine, etc.). C'est une méthode simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches oléifères localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu (**Elhaib, 2011**). L'huile essentielle est séparée du jus de fruit par un procédé mécanique de décantation à froid. De nos jours, l'expression mécanique reste le procédé le plus simple et le seul ne modifiant pas le produit obtenu. Ainsi, l'HE recueillie porte le nom d'essence. Le produit obtenu ne subissant pas de modifications, les essences obtenues par extraction mécanique possèdent une activité thérapeutique nettement supérieure à celle des HE produites par d'autres procédés. En effet, contrairement aux HE uniquement constituées de molécules volatiles, les essences, quant à elles, renferment des composés non volatils comme des flavonoïdes ou encore des stéroïdes (**Lacoste, 2014**).

6.5. Extraction par solvants organiques

Cette forme d'extraction est couramment employée pour l'industrie des arômes, mais doit impérativement être proscrite pour un usage thérapeutique, excepté si le seul solvant est l'alcool pur (Jorite, 2015).

L'extraction proprement dite est généralement précédée d'une division de la drogue: contusion des organes frais, hachage des drogues herbacées, concassage des racines et

rhizomes, réduction en copeaux des bois (**Wicht, 2001**). Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne la concrète: mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction de la concrète avec l'alcool conduit à l'absolue (**Chabrier, 2010**). Cette technique est utilisée avec les plantes dont l'extraction d'huiles essentielles grâce à l'hydro-distillation est inefficace: c'est le cas du jasmin, de certaines roses, du narcisse, du néroli du mimosa (**Jammaledine, 2010**).

7. Le rôle physiologique des huiles essentielles

Le rôle biologique des huiles essentielles dans la plante n'est pas bien défini, il est vraisemblable qu'elles aient un rôle écologique (**Dorosso, 2002**). Elles permettent entre autre à la plante de se défendre contre les agressions extérieures. Elles ont des propriétés attractives ou répulsives vis-à-vis des prédateurs (herbivores, insectes...).

Par leurs odeurs, ils interviennent dans la pollinisation. Ainsi, par leur pouvoir antiseptique protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et parasites du sol (**Dorosso, 2002**), (**Kaloustian, 2012**).

8. La toxicité des huiles essentielles

8.1. Toxicité aigüe

En général les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale faible ou très faible. Ainsi, Eucalyptus, Girofle. Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo qui peuvent provoquer des convulsions (**Patricia, 2005**).

8.2. 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 éventuels 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 (**Patricia, 2005**).

8.3. Toxicité dermique

L'application locale de certaines huiles essentielles peut être responsable d'éventuelles toxicités telles que le pouvoir irritant (Moutarde, Thym), sensibilisant (Saussurea) ou photo toxique (Angélique, Bergamote) (**Patricia, 2005**).

1. Généralités sur le Giroflier (*Syzygium aromaticum*)

Selon le dictionnaire latin-français Gaffiot, 1934 le nom d'épices dérive du latin *species*, terme qui désignait dans la Rome antique un objet, une denrée mais aussi des épices. *Species* est transformé au Moyen Âge, au milieu du 12^{ème} siècle, en « épice » (Cahuzac-Picaud, 2012).

Les épices sont traditionnellement utilisées depuis l'Antiquité pour la conservation des produits alimentaires car elles ont des propriétés antiseptiques et désinfectantes (De, Krishna De, et Banerjee, 1999). *Syzygium aromaticum* est une épice utilisée depuis longtemps par les guérisseurs traditionnels ayurvédiques de l'Inde (Saeed et Tariq, 2008) pour soigner les affections respiratoires et digestives (Aggarwal et Shishodia, 2006). Elles sont aussi considérées comme une source riche en composés antimicrobiens bioactifs (Menghani *et al*, 2014).

La recherche dans divers domaines teste les effets des épices sur la santé humaine à titre d'exemple le clou de girofle (Kumar *et al.*, 2014).

2. Historique

Depuis des décennies, le clou de girofle est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales, il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique locale. Il tue également les germes de la bouche en particulier (kozam, 1977),(Ohkubo *et al.*,1997). Autour du 16^{ème} siècle, les Portugais ont brisé l'arabe monopole du commerce des épices en mer (François, 1936). Au début du 17^{ème} siècle, la direction hollandaise enlève des girofliers de toutes les îles sauf *Amboina anterne*, afin d'en augmenter le prix (Charles, 2013). Jusqu'au 18^{ème} siècle où le contrôle sur la production était encore plus drastique pour maintenir artificiellement les prix (Razafimamonjison *et al.*, 2014).

La Compagnie Française des Indes missionna-t-elle Pierre Poivre pour aller chercher ce fameux clou de girofle. Lors d'un premier voyage, il transporta clandestinement quelques plants de muscadier de Timor à l'île de France, sans résultat (Ranoarisoa, 2012).

En 1773, il réussit à obtenir quelques plants des épices séquestrées par les hollandais qui furent plantés dans l'île de la Réunion (Mazerolles, 2008).

3. Origine (Répartition géographique)

Le Giroffier est un arbre tropicale appartenant à la grande famille des myrtacées, originaire d'Indonésie, dans la partie sud des philippines et les îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du sud, principalement dans des pays tropicaux (Eric Penot *et al.*, 2014) . (Figure 2)

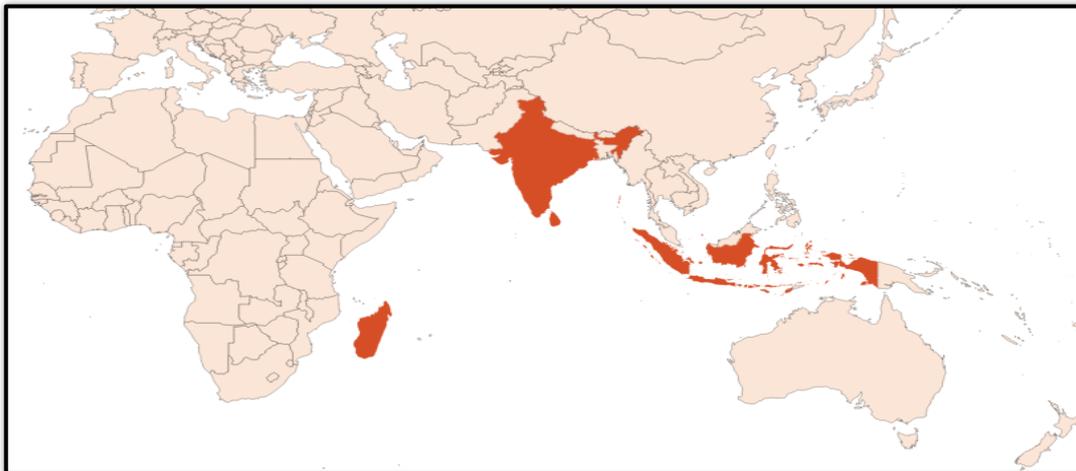


Figure 2 : Carte géographique des principaux producteurs de clou de girofle du monde (Anonyme 2)

4. La classification



Figure 3 : Boutons de clou de girofle (Anonyme 3)

Tableau 1 : Classification scientifique de plante *Syzygium aromaticum* (Sophie, 2015).

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

Tableau 2 : Dénomination internationale de *Syzygium aromaticum*
(Haddouche *et al.*, 2018)

Nom Commun	Giroflier,Laung
Nom Français	Clou de girofle, arbre au clou
Nom Anglais	Clove,buds
Nom Arabe	Kourounfoul(القرنفل)

5. Chimie de *Syzygium aromaticum*

Syzygium aromaticum représente l'une des principales sources végétales de composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamique et hydroxyphényl propènes, ainsi que les terpénoïdes (Bao *et al.*, 2012),(Cortés-Rojas *et al.*, 2014).

L'eugénol (1) est le composé principalement responsable de l'arôme du clou de girofle et constitue 72 à 90% de l'huile essentielle de girofle (Kamatou *et al.*, 2012). Les autres constituants courants de l'huile essentielle comprennent l'acétate d'eugényle (2), le β -caryophyllène (3), le salicylate de méthyle (4), le pinène (5), la vanilline (6) et l' α -humulène (7) (Kuete, 2017). (Figure 4)

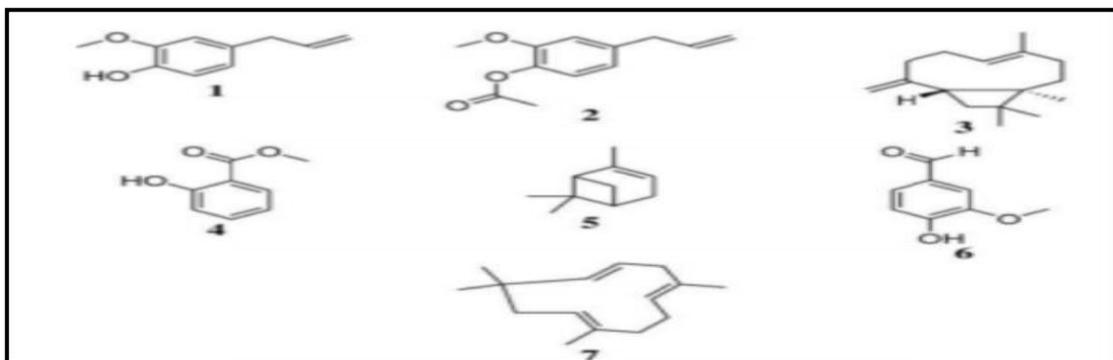


Figure 4 : Principaux constituants de l'huile de *S. aromaticum* (Jirovetz *et al.*, 2006)

6. Culture et récolte du giroflier

6.1. Agro-écologie

Le giroflier, comme beaucoup d'autres de la famille des Myrtacées, est habitué aux climats tropicaux. Il a également besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 mètres (Lim, 2014).

6.2. La récolte

Le moment le plus favorable à la récolte est déterminé par la couleur rosé du clou de girofle. Le giroflier donne des clous à partir de la 5^{ème} année et est récolté une à deux fois par an (Mazerolles, 2008).

6.3. Saveurs et Arome

Les clous de girofle ont un arôme chaud, épicé, poivré, piquant (Gupata *et al.*, 2015) fruité, et laisse une sensation d'engourdissement dans la bouche (Charles, 2013).

7. Description de l'arbre

C'est à Antonio Pigafetta, un membre de l'expédition de Magellan, à qui serait due la première description de l'arbre producteur, observé en 1521, aux îles Moluques (Jeanguyot, 2004).

7.1. Allure générale

Il s'agit d'un ligneux de 6 à 12 m de haut, qui peut vivre jusqu'à 150 ans. C'est un arbre sempervirent, de forme pyramidale ou conique, qui possède un tronc principal de forme oblique. De nos jours, il ressemble souvent à un arbuste car il est régulièrement taillé pour faciliter la cueillette. (Figure 5)



Figure 5 : Allure d'un giroflier (Sophie, 2015).

7.2. Racines

Bien que le pivot puisse atteindre 2 à 3 mètres de profondeur, la majorité des racines est peu développée et reste superficielle (à 60 cm du sol). Le faible ancrage dans le sol explique la faible résistance de cet arbre aux cyclones. Bien qu'il soit cultivé sur place, il est originaire des îles Moluques, zone géographique ne présentant pas de risque cyclonique. Les

racines superficielles forment un chevelu utilisant facilement les matières minérales du sol (Anonyme 4).

7.3. Le tronc

D'allure oblique, il est en fait divisé en deux parties à la base, ce qui lui donne sa forme caractéristique de pyramide. Il est recouvert, ainsi que tous les rameaux, d'une écorce lisse et de couleur gris clair. Le bois des branches est dur mais fragile. Une fois les branches sectionnées ou cassées, elles bifurquent, ce qui donne un aspect buissonnant à l'arbre. Chaque rameau porte à son extrémité un bouquet de 4 à 10 feuilles avec un bourgeon terminal (Anonyme 4)

7.4. Les feuilles

Les feuilles sont persistantes et coriaces. Elles sont positionnées de manière opposée sur le rameau, et leur limbe, simple, fait environ 10 cm de long pour 3cm de large, ce qui leur confère une forme ovale voire lancéolée. Le pétiole portant le limbe mesure entre 0,5 et 1cm de long. Les nervures sont nombreuses mais ne se voient pas beaucoup et la marge de la feuille est lisse (Sophie, 2015) (Figure 6).



Figure 6 : Feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleur verte (Sophie, 2015)

7.5. L'inflorescence

Les fleurs sont disposées en cyme, de 3 à 20 fleurs blanches, hautement aromatiques. La corolle est composée de 4 pétales caducs cohérents, qui alternent avec les sépales. Les pétales tombent à l'ouverture de la fleur. Les sépales forment un calice gamosépale à quatre divisions triangulaires, d'abord vert puis rougeâtre, que l'on qualifie d'hypanthe.

Le réceptacle floral est presque cylindrique, voire un peu angulaire. Il porte un ovaire infère, biloculaire, chaque loge contenant une vingtaine d'ovules. Au dessus, le style est bref et se termine en stigmate bilobé. En ce qui concerne l'androcée, les étamines sont nombreuses et regroupées en 4 faisceaux.

Ce qui est communément appelé « clou de girofle » correspond à la fleur à l'état de bouton non épanoui, comprenant le calice et la corolle (**Boullard, 2001**) (**Figure 7**).



Figure 7 : Branche de giroflier portant les clous en inflorescence terminale
(**Sophie, 2015**)

Quant aux « griffes de girofles », moins estimées, ce sont en fait les pédicelles floraux. Ils sont nommés « griffes » car ces pédicelles se terminent par une série de petites bractées en forme de griffe (**Figure 8**).



Figure 8 : Boutons floraux et fleurs de giroflier. (Sophie, 2015)

7.6. Les fruits

Les fruits sont nommés « anthofles » dans le commerce. Ce sont des petites baies elliptiques : environ 2,5cm de long pour 1cm de large. Ils sont de couleur pourpre, généralement uniloculaire, et ont une ou parfois deux graines à enveloppe rouge (Heywood, 1996), (Ramarijaona, 1985), (Faucon, 2012).

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

8. Conclusion relative de la culture de clou de girofle

Bien qu'originaires des îles Moluques, le giroflier a su trouver sa place dans d'autres régions comme Madagascar et Zanzibar ..., où le climat reste similaire à celui d'origine. Les techniques de culture restent artisanales et demandent beaucoup de main d'œuvre.

En effet, tant pour la récolte que pour le tri des clous, griffes, feuilles ou fruits, il s'agit d'un travail minutieux qui se fait à la main. Cela permet d'obtenir des produits de qualité, sans pesticides ni autres produits chimiques, idéaux pour la fabrication des huiles essentielles. Le giroflier est un arbre qui continue, de par sa production, à faire vivre une large partie des populations des régions de production (Vitaspice, 2009).

9. La toxicité du clou de girofle

L'usage abusif du clou de girofle peut devenir toxique. De grandes quantités doivent être évitées pendant la grossesse. Le clou de girofle peut être irritant pour les voies gastro-intestinales et devrait être évité chez des personnes ayant des ulcères gastriques ou le syndrome du colon irritable. Dans les surdoses, les clous de girofle peuvent causer des nausées, des vomissements, des diarrhées et de fortes hémorragies digestives (Dernani *et al.*, 2018).

1. Les propriétés du clou de girofle

1.1. Activité antibactérienne

Le girofle est composé de 70 % à 90 % d'eugénol et de plus de 15 % d'huile essentielle. Il est composé antiseptique, antibactérien, antifongique et possédant entre 9 à 15 % d'acétate d'eugénol, qui se caractérise par des propriétés antibactériennes (**Rakotoatimanana et al., 1999**).

Les solutions ayant de hautes concentrations en eugénol ont un effet bactéricide du au groupement phénol (**Dobler et al., 2020**). L'eugénol provoque une lyse bactérienne chez plusieurs souches. Elle est plus importante pour les bactéries à Gram négatif. Le groupe hydroxyle du phénol interagit avec la membrane cellulaire provoquant une fuite des composés cytoplasmiques. Cette réaction induit aussi une modification de structure des acides gras et des phospholipides et une perturbation de la synthèse du matériel génétique. Comme pour les composés phénoliques, le site d'action des terpènes est la membrane cellulaire. Ils la traversent par diffusion provoquant un gonflement et une inhibition des enzymes respiratoires.

Chez *Escherichia coli* surtout la présence de l'eugénol dans le cytoplasme bactérien augmente la concentration des acides gras saturés et baisse celle des acides gras insaturés. Il se produit alors une altération de la morphologie bactérienne. L'eugénol inhibe l'action de plusieurs protéines ou composés bactériens. On cite des facteurs de virulence comme la pyocine, la violacéine, l'elastase (**Bouacida, 2021**).

1.2. Activité antifongique

L'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes, comme 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 (**Goetz et al., 2010**), (**Adli, 2015**).

Candida albicans est l'agent pathogène causal le plus fréquemment isolé de la candidose. L'eugénol (le principal composant phénolique de l'huile essentielle de clou de girofle) possède une activité antifongique importante pendant le temps d'adhérence initial et selon la concentration de ce monoterpène. Ce mono terpène a donc un potentiel thérapeutique important pour les infections à candidose (**Belarmino et al., 2016**).

Trichophyton rubrum est un agent mondial responsable des cas chroniques de dermatophytose qui présentent des taux élevés de résistance aux médicaments antifongiques.

L'eugénol agit sur la membrane cellulaire par un mécanisme qui semble impliquer l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol. La teneur inférieure en ergostérol interfère avec l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane cellulaire (Oliveira *et al.*, 2013).

1.3. Activité antivirale

L'huile essentielle de *S.aromaticum* a un effet inhibiteur sur : Herpes simplex virus, elle exerce des effets à plusieurs niveaux : sur la fusion des cellules virales, anti-HCV protéase dans le traitement de l'hépatite virale, inhibition de la synthèse de l'ADN viral (Goetz *et al.*, 2010). L'eugénol est utilisé pour traiter les infections au HSV-1. Il inhibe aussi les virus influenza et les virus non enveloppés tels que le poliovirus, le virus coxsackie b1 et l'adénovirus de type 3 (Tariq *et al.*, 2019).

L'eugénol ou ses dérivés inhibent la croissance de plusieurs lignées cellulaires transformées par infection virale comme le montre le **tableau 2** (Tariq *et al.*, 2019) (Da Silva *et al.*, 2020).

Tableau 3 : L'action anti virale de l'eugénol (Bouacida, 2021).

Composé chimique	Lignées cellulaires	Virus	Efficacité
Méthyl eugénol	Vero cells	HSV-1	91,5 % de la culture
Eugénol	Vero cells	HSV-1	IC50 >10000 µg/mL
Méthyl eugénol	Vero cells	HSV-2	IC50 = 74,33 µg/mL
Eugénol	RC-37 cells	HSV-1	IC50 = 35 µg/mL
Eugénol	RC-37 cells	HSV-1	IC50 = 25,6 µg/mL

1.4. Activité anti-inflammatoire et analgésique

Les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques de l'eugénol sont dû à l'action sur des récepteurs et sur les antigènes responsables de l'inflammation. Pour le volet anti-inflammatoire, l'eugénol agit directement en détruisant les germes pathogènes, il agit sur les cytokines et les cellules immunitaires en modifiant la réaction inflammatoire ce qui diminue indirectement la douleur. Aussi l'eugénol agit sur les récepteurs cellulaires et nerveux ce qui diminue directement la douleur (Bouacida, 2021).

1.5. Activité anti-cancéreuse

L'huile Essentielle de clous de girofle a été étudiée comme un agent potentiel anti-cancérogène (**Zheng *et al.*, 1992**).

Une étude a identifié que l'eugénol a une activité anti-proliférative et anti-métastatique contre les cellules cancéreuses du sein triple négatives et HER2 positives; dans les deux cas. Les mêmes auteurs ont identifié que le composé a augmenté l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose dans les cellules cancéreuses, tels que la caspase 3, la caspase 7, et caspase 9. D'autre part, une autre étude a montré que le traitement combiné de l'eugénol et du 5- fluorouracile présentaient une activité cytotoxique contre les lignées cellulaires HeLa, induisant leur apoptose (**L. Diniz do Nascimento *et al.*, 2020**).

2. Mode d'action d'HE de clou de girofle (eugénol)

L'eugénol représente la proportion majoritaire de l'huile de clou de girofle (95%), il est métabolisé par les reins et/ou le foie et les métabolites retrouvés dans l'urine sont des sulfates et des glucuronides (**Guénette *et al.*, 2006**). Son mécanisme d'action n'est pas encore tout à fait élucidé. Il agirait sur plusieurs récepteurs, dont les récepteurs GABA (acide gamma amino butyrique), les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartic acid), les canaux à Na⁺ et les récepteurs TRPV1 (Transient Potential Receptor Vanilloid type 1) (**Ohkubo *et al.*, 1997**)(**Adli, 2015**).

3. Les différentes applications de l'huile essentielle de clou de girofle

3.1. Soin buccal

L'huile essentielle de clou de girofle élimine les métastases intra maxillaires, les tumeurs bénignes, les sarcomes épidermes des gingivo maxillaires, les ostéites des maxillaires et les sarcomes (**Morin *et al.*, 1983**).

L'intérêt de l'HE de Clou de girofle en cas de problèmes dentaires repose sur la combinaison de propriétés antibactériennes et anesthésiantes. Au niveau de la flore buccale, elle agit préférentiellement sur *Streptococcus mutans*, responsable de la plaque dentaire et des caries, quand l'eugénol et le β -caryophyllène procurent un effet anesthésiant local sur la gencive ou la dent (**Lobstein *et al.*, 2017**).

- Les recommandations officielles de l'Agence européenne des médicaments (EMA) sont les suivantes :

- inflammations mineures de la bouche et de la gorge (aphtes, gingivites), en bain de bouche (1-5 % d'HE) plusieurs fois par jour et uniquement chez les adultes ;
- douleurs causées par les caries dentaires, en application aussi précise que possible sur la partie atteinte en évitant les gencives, d'un morceau de coton imbibé de l'HE pure ou d'une solution à au moins 50 %, ou d'un coton-tige imbibé d'un gel à 20 % ; répétez après 20 minutes, puis toutes les deux heures si nécessaire.

D'autres sources mentionnent la possibilité d'utiliser l'HE pure, appliquée avec soin à l'aide d'un coton-tige, en cas d'aphtes, d'alvéolites ou autres sources de douleurs dentaires. Par ailleurs, des mélanges aromatiques renfermant de l'HE de Clou de girofle ou de l'eugénoï existent sous forme de gels gingivaux et peuvent être utilisés pour calmer les poussées dentaires du nourrisson à partir de 6 mois, en massant les gencives, à raison d'une goutte dans 15 ml d'huile végétale (HV) alimentaire (Merill *et al.*, 2011),(Lobstein *et al.*, 2017).

3.2. Traitement des mycoses

Pour se rapprocher d'avantage de l'excellence, abordons à présent ses propriétés antifongiques sur bon nombres de germes, et en particulier sur Candida, germe que l'on retrouve fréquemment lors de mycoses cutanées ou vaginales.

Il a été démontré un effet antimicrobien synergique avec le thymol : cela signifie que dans le cas d'infections sévères ou récidivantes, telles que des candidoses vaginales, il sera pertinent d'associer l'huile essentielle de clou de girofle avec d'autres huiles essentielles à Thymol, comme par exemple le Thym à Thymol, la sarriette des montagnes, ou encore le thym à feuille de sarriette. Ceci dit, ces huiles sont très irritantes, et potentiellement toxiques ; il serait donc hasardeux de les utiliser en automédication sans les conseils et le suivi d'un pharmacien ou d'un médecin spécialisé en aromathérapie.

3.3. Mycose de l'ongle

En application locale, sur l'ongle infecté, 3 fois par jour, en association avec du tea tree, le tout dilué à 50% dans une huile végétale (5% de Clou de girofle et 45% de tea tree). A l'instar des traitements allopathiques, ce traitement peut durer au-delà de 3 semaines, il faut de la patience.

3.4. En cas de fatigue physique, non liée à une maladie

L'huile essentielle agira alors comme un stimulant, la personne ressentira moins la fatigue, sera plus éveillée, plus volontaire. Mais attention, chez des personnes, nerveusement fatiguée, mais devant contenir leur énergie tout au long de la journée, cette huile essentielle ne conviendra pas : il faudra se tourner d'avantage vers des huiles essentielles apaisantes (endurance, effet anti fatigue).

Pour cela, mélanger les HE suivantes : Clou de girofle, Romarin officinal à cinéole, Menthe poivrée et Orange douce. Inhaler ce mélange pendant au moins une minute avant l'effort.

3.5. Propriétés anti oxydantes et blanchissantes

L'eugénol confère à l'huile essentielle de clou de girofle un fort pouvoir anti oxydant 3 fois plus important que les produits standards, ce qui explique d'ailleurs en partie l'effet anti fatigue vu précédemment (limitation du stress oxydatif lors d'un effort ou d'un stress).

Ce pouvoir antioxydant limiterait l'hyperpigmentation de la peau ou l'apparition de tâches de vieillesse.

Il a aussi été observé in Vitro, que l'huile essentielle de clou de girofle agit sur les fibroblastes, augmente la synthèse du collagène et diminue légèrement l'activité des tyrosinases : tout cela pourrait contribuer à limiter l'altération et le vieillissement de la peau.

Le clou de girofle représenterait donc un bon candidat pour des soins anti-âge ou blanchissants de la peau : son pouvoir fortement irritant (et son odeur) nécessite cependant l'utilisation de teneurs très faibles, et en cas de doute, mieux vaudra s'abstenir pour un usage purement cosmétique.

Matériel et Méthodes

Le travail expérimental relatif à ce mémoire de Master a été effectué au niveau des laboratoires de biologie végétale (N°2) et de microbiologie (N°14) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Ce travail a pour objectifs :

- Extraction des huiles essentielles de clou de girofle.
- Calcul du rendement en huile essentielle du giroflier.
- Mise en évidence des activités antibactérienne et antifongique.
- Détermination de la CMI pour chaque souche.

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé comme matière première est représenté par le clou de girofle, une plante disponible dans le marché tout au long de l'année. Il a été fourni par un Herboriste dans la région de Chelghoum Laid durant le mois de Mars.

Le matériel végétal utilisé est représenté par la photo ci-dessous, avec les caractéristiques suivantes :

- Couleur : Marron
- Odeur : Forte



Figure 9 : Matière végétale de clou de girofle (Anonyme 5)

2. Souches microbiennes utilisées

Dans ce travail une collection de 8 souches microbiennes est utilisée au total : 5 souches bactériennes ATCC (American Type Culture Collection), et 3 souches fongiques. L'ensemble des souches a été fourni par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité microbienne (La MyBAM) avec les détails représentés ci-dessous.

Tableau 4 : Les souches bactériennes tests

Espèce	N°ATCC	Gram	Famille
<i>E.coli</i>	25922	Gram -	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>S.aureus</i>	25923	Gram+	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>P.aeruginosa</i>	27853	Gram-	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	Gram+	<i>Bacillaceae</i>
<i>Enterococcus sp</i>	Clinique	Gram-	<i>Enterobacteriaceae</i>

-Les trois souches fongiques à savoir : *Aspergillus niger*, *Fusarium sp*, *Aspergillus fumigatus* ont été isolées à partir d'un sol et fournies par Dr.GHORRI Sanaa, pour laquelle nos remerciements les plus sincères sont adressés.

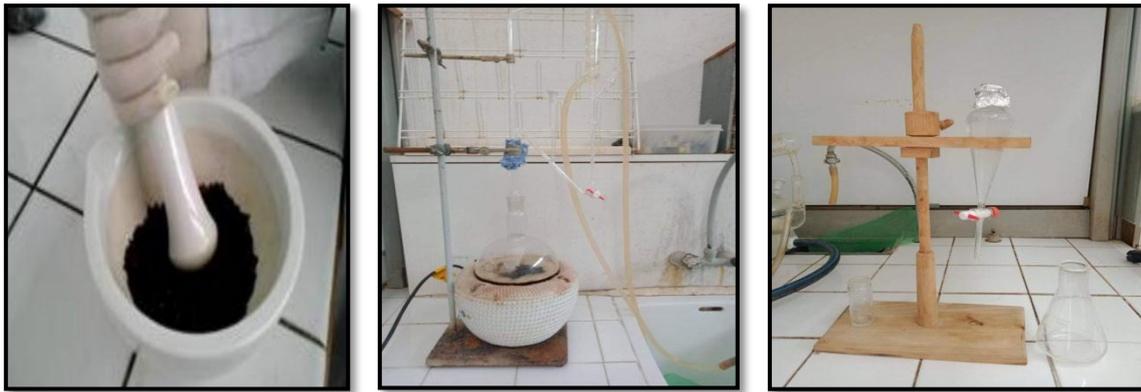
3. Méthodes

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter ; la principale méthode d'extraction est l'hydro- distillation.

3.1. Hydro-distillation

➤ Protocole expérimental

1. Peser 100 g de masse végétale préalablement broyée ;
2. Introduire les 100g dans un ballon de 2L ;
3. Rajouter 1L d'eau distillée ;
4. Porter le mélange à l'ébullition à l'aide d'un chauffe ballon (2heures);
5. Ajouter une cuillère de chlorure de sodium (NaCl) ;
6. Agiter jusqu'à dissolution complète ;
7. Laisser décompter dans un ampoule de décomptage.



a). Broyage

b). Hydrodistillation

c). Décomptation

Figure 10 : Etapes de préparation de l'échantillon et d'extraction de l'huile essentielle (Photos réelles)

-Le broyage des boutons de clou de girofle permet de faciliter l'extraction d'HE et le fonctionnement du Clevenger.

-L'immersion du matériel végétal directement dans un ballon rempli d'eau distillée placé sur une source de chaleur, permet d'obtenir un distillat (l'huile et la phase aqueuse).

-La séparation des essences de l'eau avec une méthode très simple, qui consiste à laisser décanter le distillat, ce qui provoque de dépôt de l'HE sous l'effet de différence des densités. L'HE est ainsi séparée de la phase aqueuse et récupérée à l'aide d'une micropipette.

3.2. La conservation de l'huile essentielle

-La conservation de l'huile exige certaines précautions indispensables après l'extraction.

-l'HE est conservée dans des flacons en verre opaques bien scellés 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 faut conserver les flacons à basse température entre (4 - 5 °C).

4. Analyses de l'huile essentielle

4.1. Le rendement

Selon la norme AFNOR (1986). Le rendement en huiles essentielles (R%) est le rapport entre la masse des huiles essentielles obtenues après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est représenté par la formule suivante :

$$R\% = (M'/M).100$$

R% : le rendement de l'huile essentielle en pourcentage

M' : la masse de l'huile essentielle obtenue en g

M : la masse du clou de girofle en g

4.2. La mesure du pH

Le pH, l'abréviation du potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions Hydrogènes (H⁺) (appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre: elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7.

5. Evaluation des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle étudiée

5.1. Ré-isolement des souches bactériennes

- A l'aide d'une anse de platine, prélever une ose à partir de la colonie et réaliser un ensemencement en stries dans une boîte à pétri avec gélose nutritive.
- Incuber les boîtes pendant 24h à 37 °C.

5.2. Préparation de l'inoculum

Préparer 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 9 ml d'eau physiologique stérile. Agiter au vortex pendant quelques secondes.

5.3. Préparation de l'eau physiologique

- Verser 500 ml d'eau distillée dans une fiole de 1L
- A l'aide d'une balance, peser 9g de NaCl et les ajouter à travers un entonnoir
- Agiter à l'aide d'un agitateur magnétique puis compléter le volume avec l'eau distillé jusqu'au trait de la fiole.
- Réaliser la stérilisation dans des tubes bien fermés à l'autoclave pendant 2 heures.

5.4. Les milieux de culture utilisés

- Gélose Muller – Hinton
- Milieu Sabuoraud (**annexe 1**)

5.5. La dilution des huiles de clou de girofle

Une série de dilution de l'huile essentielle de clou de girofle dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) a été réalisée en débutant par la suspension mère jusqu'à la dilution 1/16, dans des Eppendorf en plastique stériles.

- Le premier contient 500 μ l d'huile essentielle et 500 μ l de DMSO.
- 500 μ l de la première dilution sont transférées dans le deuxième Eppendorf (1/2) auquel on rajoute 500 μ l de DMSO, puis agiter.
- Des dilutions à 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12, 1/14, 1/16 sont préparés de la même manière.
- Laisser deux témoin l'un positif (l'huile essentielle pure) et l'autre négatif (le DMSO pure).

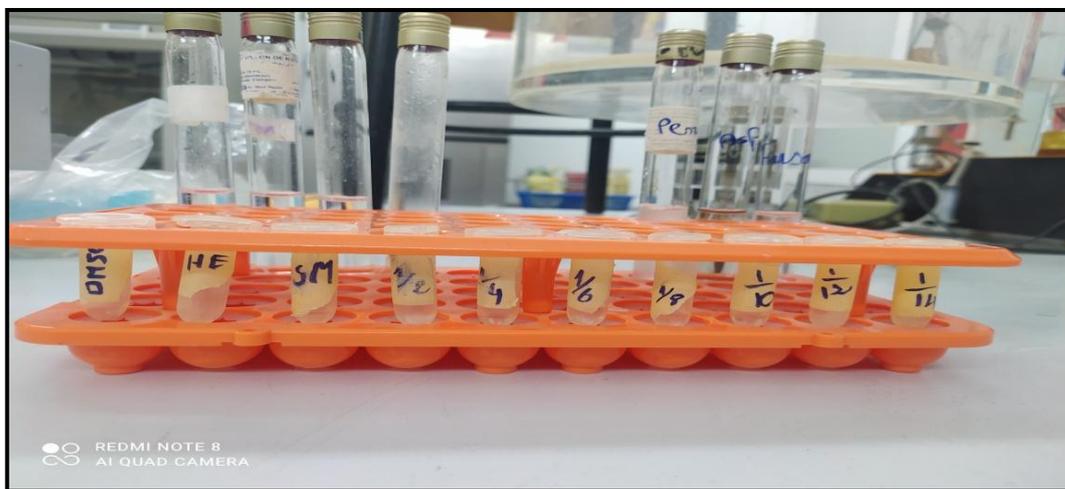


Figure 11 : Préparation des différentes dilutions de l'huile essentielle

5.6. L'ensemencement

- Le milieu de culture utilisé est Muller-Hinton (MH), qui est le milieu le plus employé pour les testes de sensibilité aux agents antimicrobiens.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).
- L'essorer en le passant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haute en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération trois fois, en tournant la boîte de pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

-Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

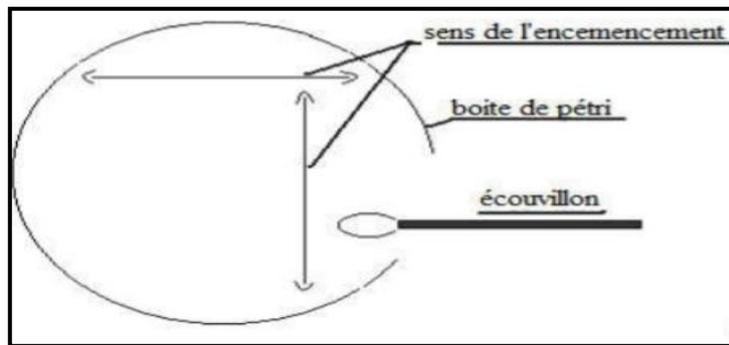


Figure 12 : Ensemencement par écouvillon (Haddouche, 2018).

5.7. Dépôt des disques

Les disques de papier Watman n°1 stérile, imbibés avec une micropipette d'une quantité d'HE à tester (10µl). A l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen on dépose les disques sur la surface de la gélose dans des conditions stériles, puis laisser pendant 2 heures dans le réfrigérateur que les composés puissent diffuser.



Figure 13 : Dépôt des disques imbibés (photo réelle)

5.8. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode contact direct en milieu gélosé

La détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosée. En bactériologie médicale, les souches bactériennes sont caractérisées par rapport à leur résistance ou à leur sensibilité aux antibiotiques par le biais de

deux valeurs : le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique ou d'extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI n'est souvent pas bactéricide car les cellules de l'inoculum sont capables de se développer sur milieu exempt du composé inhibiteur. La CMI est la plus faible concentration requise pour l'inhibition complète de l'organisme test en 24 ou 48 heures d'incubation (**fernandez et chemat, 2012**).

Pour déterminer les CMI des huiles essentielles vis-à-vis des souches sensibles, nous avons utilisé la méthode de contact direct en milieu gélosé.

Les disques des huiles essentielles sont déposés dans des boîtes de pétri afin d'effectuer une gamme de concentration de 10µl pour chaque disque dans la gélose Muller-Hinton pour les bactéries, la gélose Sabouraud dextrose pour les champignons avec chaque concentration son équivalent en DMSO.

Les boîtes préparées sont ensuite refroidies pendant 2h.

5.9. L'incubation

La durée d'incubation est de 24 h à 37°C pour les bactéries, 3 à 5 jours à 29°C pour les champignons. La lecture des résultats se fait par l'observation de la présence ou l'absence de la croissance microbienne.

Résultats et discussion

I. Description de l'huile essentielle de clou de girofle

1. Les caractéristiques organoleptiques

Le tableau ci dessous (**Tableau 4**) représente une comparaison entre les caractéristiques de l'huile essentielle extraite pour cette étude avec les normes AFNOR.

Tableau 5 : caractéristiques organoleptiques

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR	Liquide, mobile limpide, parfois légèrement visqueux	Jaune très clair	Epicée (caractéristique de l'eugénol)
Huile Essentielle étudiée	Liquide, mobile, limpide, visqueux après le temps	Jaune clair	Forte odeur épicée et tonifiée

2. Les analyses de l'huile essentielle

2.1. Le rendement

Le rendement de l'HE extraite par hydro distillation à l'échelle de laboratoire à partir des clous de girofle est exposé ci-dessous.

Tableau 6 : Résultat du rendement

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	Maximum
Rendement (%)	3,67%	5	8

D'après (**le tableau 6**), il s'avère que le rendement en HE extraite par l'hydro-distillation à l'échelle du laboratoire à partir des clous de girofle est de 3,67%. Ce résultat coïncide presque avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont procédé par la même technique d'hydro-distillation. D'autres auteurs ont enregistré un rendement significativement plus élevé, en effet dans son étude, **Andrea (2004)** a obtenu un résultat de (14 à 20 %) en utilisant la même technique d'hydro-distillation.

Cette petite différence 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.

Les différences dans les rendements en huile essentielle dépendent de plusieurs facteurs à savoir : l'espèce, la période de récolte, les pratiques culturales, la technique d'extraction (Marzouki *et al.*, 2009)(Olle *et al.*, 2010), les facteurs climatiques (chaleur, froid), la géographie (altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil), et la nature des plantes aromatiques (Descamps-Marie, 2008).

La séparation de l'huile essentielle après sa distillation est déterminée dans une large mesure par son degré de solubilité dans l'eau. C'est ce que nous avons remarqué durant l'étape de récupération de l'huile essentielle à partir de l'hydrolysat, ce dernier contient toujours des gouttelettes que nous n'avons pas pu récupérer. Ceci peut expliquer la faible valeur en rendement obtenue dans notre étude.

D'après (Lagunez Rivera, 2006), les gouttelettes d'huile essentielle qui restent dans l'hydrolysat peuvent avoir plusieurs origines, une fraction de l'huile distillée est dissoute dans l'eau et une autre est émulsionnée dans l'eau. La séparation de l'huile essentielle après condensation est en fait l'étape déterminante pour recueillir le maximum d'huile essentielle.

Il est intéressant de trouver d'autres méthodes pour extraire le maximum d'huile essentielle ou de suivre l'hydro-distillation par une extraction liquide-liquide à l'aide des solvants organiques de l'hydrolysat.

Le pourcentage obtenu semble inférieur mais dans la pratique reste suffisant pour mener cette étude.

2.2. Le pH

Selon cette étude, le pH= 6,79. C'est un pH pratiquement basique ; ceci est dû à la composition chimique des huiles essentielles. En effet, ces dernières sont considérées comme donneurs des H⁺ (tableau 7).

Tableau 07 : Résultat du pH

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	Maximum
pH	6,79	5,5	7

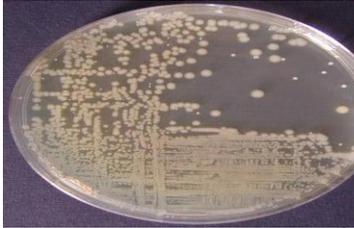
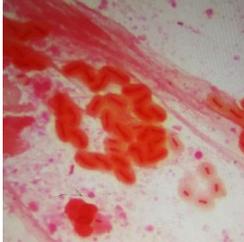
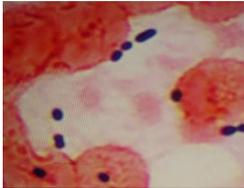
Le pH joue un rôle crucial lors des réactions. Lorsque les propriétés biochimiques stabilisantes de l'huile essentielle sont affectées. Cela affecte également l'activité antibactérienne et antifongique.

3. Evaluation de l'activité antibactérienne

3.1. Aspect macroscopique et microscopique des souches bactériennes utilisées

Les résultats sont exposés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Observation macroscopique et microscopique des souches bactériennes

Les souches	Résultat de culture	Résultat microscopique	Appréciation macroscopique	Appréciation microscopique
<i>Escherichia coli</i>			Colonies de couleur brune avec forme ronde ou ovale, à bords réguliers.	Forme en bâtonnets, sporulées, bacilles, Gram-.
<i>P. aeruginosa</i>			Colonies plates, avec couleur jaune, bords irréguliers, aspect irisé métallique.	Bacilles, Gram-, non sporulés.
<i>S. aureus</i>			Colonies souvent hémolytiques, couleur jaune orangé, forme ronde.	Coques en amas Non capsulées et non sporulées, non mobiles.
<i>Entérocooccus sp</i>			Colonies non hémolytiques.	Coque d'aspect ovoïde en courtes chaînes, non sporulées, Gram-
<i>Bacillus subtilis</i>			Couleur jaune, la forme des colonies est ronde, bords irréguliers.	Bâtonnets, mobile, Gram+, sporulés

3.2. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est effectuée par la méthode de diffusion des disques, sur un milieu gélosé solide Muller Hinton, qui permet de mesurer l'efficacité de l'extrait à inhiber la croissance microbienne *in vitro*. Ceci est possible par la mesure du diamètre des halos d'inhibition à l'extérieur de la boîte fermée. La concentration la plus faible de l'antimicrobien testé (huile essentielle), qui inhibe la croissance de la bactérie testée représente (**la CMI**).

Le classement des bactéries en sensibles ou résistantes est effectué en se basant sur les normes suivantes :

- ✓ **D<8mm** : souches résistantes (-).
- ✓ **9mm≤D≤19mm** : souches sensibles (+).
- ✓ **15mm≤D≤19mm** : souches très sensibles (++).
- ✓ **D≥20mm** : souches extrêmes sensibles (+++).

L'action de l'huile essentielle sur les microorganismes dépend d'une part, de la structure membranaire de la cellule cible, puisqu'elles possèdent un effet inhibiteur beaucoup plus sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram-.

Selon (**De Billerbeck, 2007**), l'activité des huiles devrait être liée à la composition spécifique des huiles volatiles de la plante, à la configuration structurale des composants constitutifs des huiles volatiles, à leurs groupes fonctionnels et aux interactions synergiques possibles entre les composants. Cette activité pourrait être attribuée au composé majoritaire de l'huile essentielle de *Syzugium aromaticum* qui est l'eugénol (appartenant à la classe des phénols).

L'eugénol est très actif contre les micro-organismes testés, utilisé comme agent bactéricide ou bactériostatique selon la concentration utilisée.

L'activité **létale bactéricide** rend la membrane du micro-organisme perméable, provoquant une fuite d'ion K⁺, ce qui implique la perte de l'osmose de la cellule suivi de la mort du micro-organisme.

L'activité **inhibitrice ou bactériostatique** empêche la croissance du micro-organisme (**Beloud, 2003**).

L'huile essentielle étudiée attaque la membrane bactérienne. Cette membrane est constituée de glycérophospholipides, et se divise en deux couches : une couche hydrophobe et

l'autre hydrophile. Cette membrane est semi-perméable et fait passer des molécules polaires ainsi que des gaz. Dans la situation actuelle, l'eugénol provoque une perte de cette perméabilité sélective en changeant ses propriétés physiques, grâce à une coexistence de parties hydrophiles et hydrophobes. Cette augmentation de perméabilité fera perdre à la bactérie ses constituants cellulaires.

Par ailleurs, l'huile essentielle va acidifier l'intérieur de la bactérie pour bloquer sa production d'énergie et de composantes de structure.

Enfin, si la bactérie survit, l'huile attaquera directement le matériel génétique de cette dernière.

La lecture

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour des disques. Le diamètre est mesuré à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis de l'extrait (**tableau 09**)

Tableau 09 : Résultats de l'aromatogramme

Souche microbienne	Gram	Diamètre mm	Sensible	Résistante
<i>Escherichia coli</i>	-	30mm	+++	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Abs	/	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	16mm	++	/
<i>Entérocooccus sp</i>	-	Abs	/	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	25mm	+++	/

Abs=absence de zone d'inhibition

L'effet de l'huile essentielle de clou de girofle sur les souches bactériennes : *Escherishia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* est positif (Sensibles). Par contre, *Pseudomonas aeruginosa* et *Entérocooccus sp* ont montré un effet négatif (Résistantes).

Pour *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* présence de zone d'inhibition a partir de la SM jusqu'à la dilution 1/6 et l'absence du zone d'inhibition pour les dilutions qui suivent jusqu'au 1/16.

Tableau 10 : Les résultats précis des dilutions utilisées

Les souches	SM	1/2	1/4	1/6	1/8	1/10	1/12	1/16
<i>E.coli</i>	30mm	25mm	16mm	13mm	8mm	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	25mm	18mm	15mm	12mm	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	16mm	12mm	9mm	8mm	0	0	0	0
<i>Entérocooccus sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

Pour *E.coli* présence de zone d'inhibition à partir de la SM jusqu'à la dilution 1/8 et l'absence de zone d'inhibition pour les dilutions qui suivent jusqu'au 1/16.

Pour *Enterrococcus sp* et *Pseudomonas aeruginosa* absence de zone d'inhibition dans toute la série de dilution.

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

Le disque DMSO n'a montré aucun effet antibactérien sur les 5 souches bactériennes confirmé par l'absence des zones d'inhibitions.

Dans son étude, **Rhayour (2016)**, a montré que l'huile essentielle de girofle exerce son activité bactéricide principalement grâce à son constituant majoritaire qui est l'eugénol qui appartient à la famille des phénols. Il semble donc que l'activité bactéricide des HE débute 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.

Enterrococcus sp, *Pseudomonas aeruginosa* sont des souches à Gram négatif résistantes à l'huile essentielle. Grâce à leur membrane bactérienne qui est riche en liposaccharides qui fournissent une surface hydrophile (**Shakeri et al., 2014**). Ces derniers agissent comme une barrière de pénétration qui empêche les macromolécules de pénétrer dans la cellule (**Kong et al., 2008**). En conséquence les bactéries à Gram négatif (-) sont relativement résistantes aux huiles essentielles.

Dans cette étude une activité antibactérienne importante de l'huile essentielle de clou de girofle contre *E.coli* est constatée. Ce résultat reste étonnant car, il s'agit d'une bactérie à

Gram négatif. Différentes tests d'activité antibactérienne pour cette bactérie ont été refaits pour confirmer le résultat, mais, à chaque fois le test a donné un résultat positif.

Ce résultat n'est pas concordant avec celui de (Atmani *et al.*, 2015), qui ont remarqué que la souche à Gram négatif *E.coli* est sensible pour l'huile essentielle de clou de girofle.

Des auteurs ont rapporté que la sensibilité des bactéries est indépendante du Gram (Dorman *et al.*, 2000), et dépend plutôt des extraits utilisés

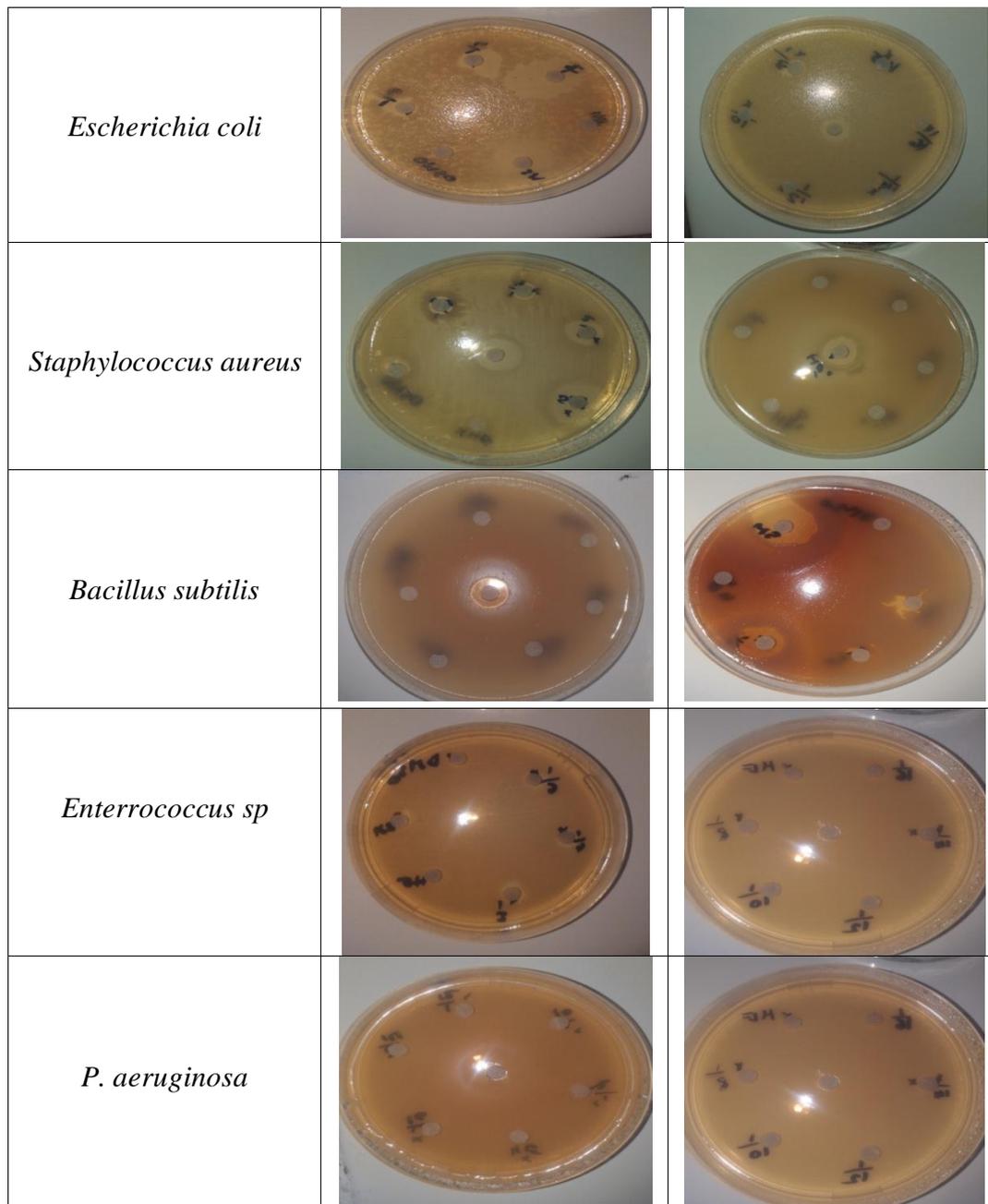
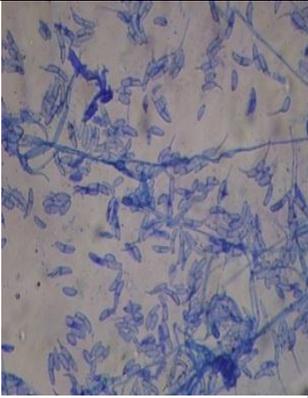
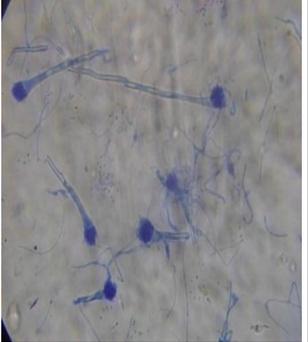
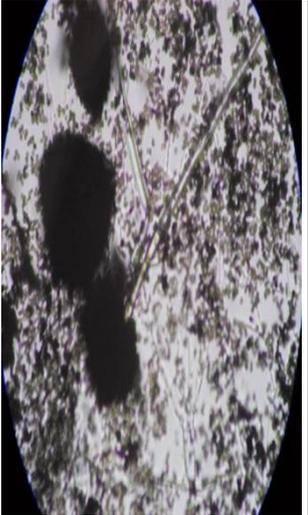


Figure 14: Résultat de l'aromatogramme des souches microbiennes testées (photos réelles)
La 1ère colonne pour les dilutions (1/2, 1/4, 1/6) et la deuxième colonne pour les dilutions (1/8,1/10,1/12 ,1/14,1/16)

4. Evaluation de l'activité antifongique

4.1. Aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques utilisées

Tableau 11 : Observation macroscopique et microscopique des souches fongiques

Les souches	Résultats de culture	Résultats microscopique	Appréciation macroscopique	Appréciation microscopique
<i>Fusarium sp.</i>			Colonies cotonneuses à laiteuses ; Couleur blanche, peuvent se teindre en rose violet ou jaune	Isolées ou accolées en paquets, courtes. Mycélium : septé. Phialides : isolées ou groupées Microconidies unicellulaires Macroconidies pluricellulaires
<i>A. fumigatus</i>			Colonies évoluant, blanches à jaunâtre	Tête : colonne compacte Vésicule : élargie en massue hémisphériques Phialides:1 série parallèle fixée sur la partie supérieure de la vésicule.
<i>A. niger</i>			Granuleuses à broussailleuses Couleur : brun foncé noirâtre	Tête sphérique incolore ou jaune près de la vésicule, lisses, paroi épaisse. Conidiospores incolores ou jaunes à brunâtres. Phialides 2 séries brunâtres. Conidies : rondes, lisses d'abord puis rugueuses, couleur brun sombre

4.2. L'activité antifongique

L'activité antifongique a été expérimentée sur des champignons du sol à savoir : *Fusarium sp* , *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*. Les résultats des diamètres d'inhibition sont exposés dans (le tableau 12). Les trois souches fongiques ont été isolées à partir d'un sol.

Tableau 12 : Résultats de l'aromatogramme

Souche fongique	Diamètre	Résultat
<i>Fusarium sp</i>	45 mm	+++
<i>A. fumigatus</i>	35 mm	+++
<i>Aspergillus niger</i>	29 mm	+++

Concernant le pouvoir antifongique, les résultats obtenus montrent que les moisissures : *Fusarium sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* sont très sensibles à l'extrait de clou de girofle. Ce résultat est décelable d'après les halos d'inhibition obtenus.

L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est très active sur l'ensemble des souches.

Tableau 13 : Les résultats précis de la dilution de l'aromatogramme.

Les souches	SM	1/2	1/4	1/6	1/8	1/10	1/12	1/14	1/16
<i>Fusarium sp</i>	45mm	40mm	16mm	14mm	0	0	0	0	0
<i>A. fumigatus</i>	35mm	30mm	15mm	8mm	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	29mm	11mm	8mm	0	0	0	0	0	0

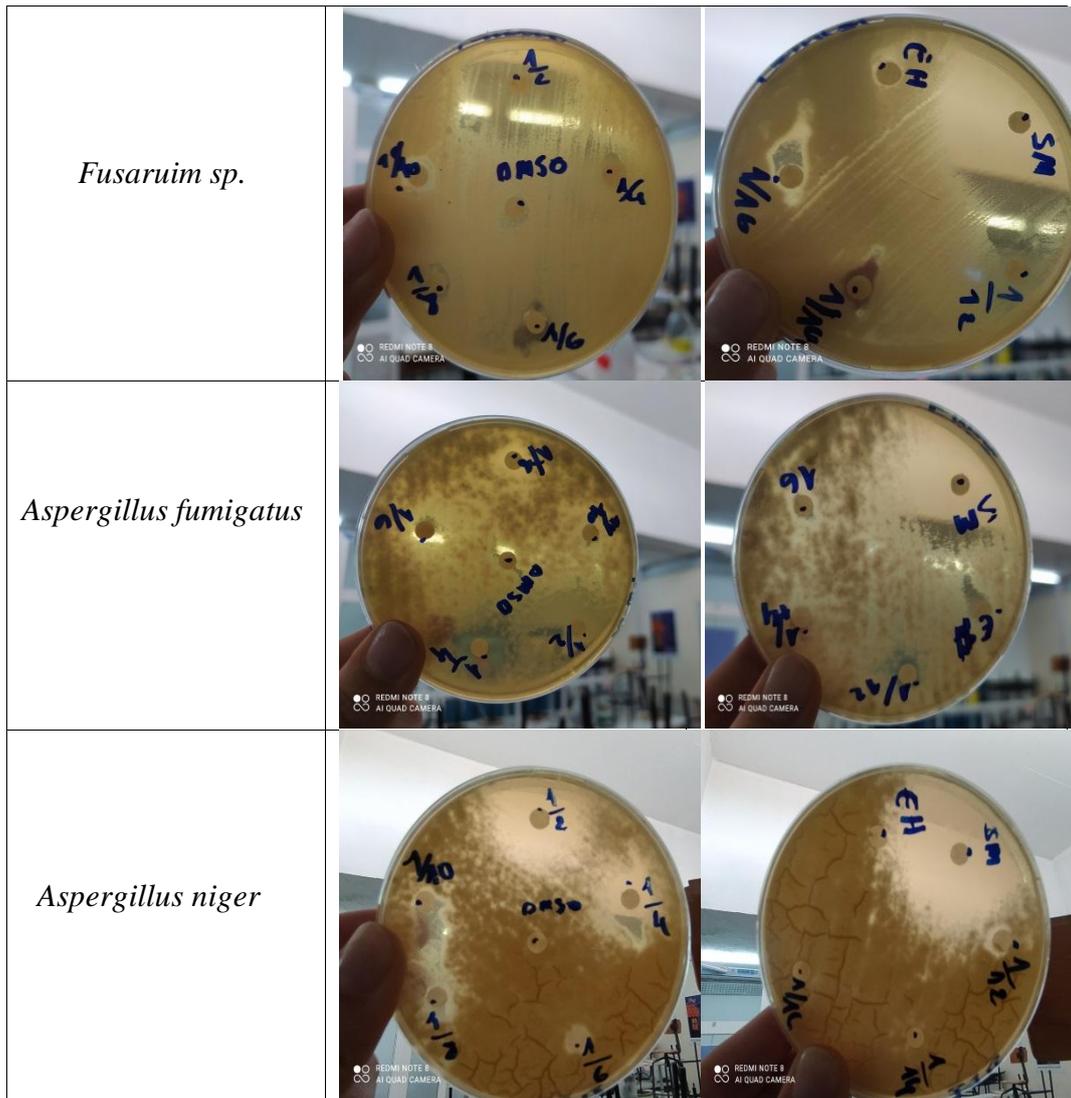


Figure15 : Résultat de l’aromatogramme des souches fongiques testées (photos réelles)
 La 1^{ère} colonne pour les dilutions (1/2, 1/4, 1/6) et la deuxième colonne pour les dilutions
 (1/8,1/10,1/12 ,1/14,1/16)

L’huile essentielle du clou de girofle à des concentrations graduées présente un effet positif c’est-à-dire très actif sur les souches fongiques étudiées : *Fusarium sp.* , *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger*.

En comparant les résultats des disques, les halos d’inhibition sont clairs et plus grands pour *Fusarium sp.* , que celles des autres souches fongiques. *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger* pour l’huile essentielle.

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

Pour *Fusarium sp.*, il résulte la formation des halos d'inhibition à partir de la solution mère avec un diamètre de 45mm jusqu'à la dilution 1/6 avec un halo de 14mm. La concentration minimale inhibitrice (CMI) appartient à l'intervalle des dilutions (1/6 -1/8)

Pour *Aspergillus fumigatus*, il résulte la formation des halos d'inhibition a partir de la solution mère avec un diamètre de 35mm jusqu'à la dilution 1/6 avec un halo de 8mm. La concentration minimale inhibitrice appartient à la dilution 1/6.

Concernant *Aspergillus niger.*, il résulte la formation des halos d'inhibition a partir de la solution mère avec un diamètre de 29mm jusqu'a la dilution 1/4 avec un halo de 8mm. La concentration minimale inhibitrice appartient à la dilution 1/4.

D'autres travaux, ont montré que l'huile essentielle du clou de girofle, ainsi que, l'eugénol possèdent une grande activité fongicide contre *Aspergillus fumigatus et Fusarium sp.* (**Hmiri et al., 2011**)

Les agents antifongiques synthétiques sont appliqués à grande échelle pour empêcher la croissance mycélienne et comme alternative aux produits chimiques connus pour leurs propriétés cancérigènes, tératogénies, oncogènes et génotoxiques (**Nagendra et al., 2010**).

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (**Chami, 2005**) et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (**Nagendra et al., 2010**) (**Prasad et Kapoor, 2004**).

D'après la littérature, les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun rapport de résistance ou d'adaptation des microorganismes à cause de la diversité des composés chimiques (**Bakkali et al., 2008**).

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique de l'huile essentielle de clou de girofle. De même, nos résultats prouvent l'existence de cette activité et indiquent que l'huile essentielle du girofler ont une activité antifongique intéressante.

D'après cette étude, les résultats sont concordants avec ceux d'autres chercheurs, puisque, l'huile essentielle du clou de girofle étudiée possède une activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes testés. En effet les travaux de **Hmiri et ces collègues (2011)** sur le *Penicillium sp* et *Fusarium culmorum*, *F.oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Trichoderma sp* en sont un bon exemple.

Conclusion

Les huiles essentielles sont une source fiable et prometteuse ayant un intérêt dans divers domaines; en thérapeutique, en cosmétologie, en agriculture et en agroalimentaire. Cette efficacité doit néanmoins être prise avec précautions particulièrement, pour les dilutions réalisées pour les différentes préparations commerciales car un risque de toxicité peut être engendré.

La méthode d'hydro-distillation utilisée dans cette étude pour l'extraction de l'huile reste la plus simple et la plus fiable car, elle permet d'obtenir des résultats quantitativement (rendement en huile essentielle) et qualitativement (composition des extraits) équivalents.

D'après cette étude, le rendement en huile (3,75%) obtenu est assez satisfaisant et fait de la plante *Syzygium aromaticum* une source potentielle naturelle prometteuse pour une application éventuelle. Par ailleurs, les caractères de l'huile essentielle étudiée répondent aux critères établis par les normes AFNOR (Aspect, Couleur, pH...) ce qui rassure sur le procédé d'extraction utilisé.

D'après cette étude, l'huile essentielle du clou de girofle possède un pouvoir antimicrobien. En effet, l'extrait brut a eu un effet sur les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* avec des concentrations minimales inhibitrices variables pour chaque souche.

La bactérie *Escherichia coli* se démarque par la sensibilité la plus élevée. Cependant, une résistance est constatée pour les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*

Par ailleurs, un pouvoir antifongique remarquable est obtenu avec les champignons *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.* et *Aspergillus niger*.

Les résultats des activités obtenues démontrent que l'huile essentielle étudiée se caractérise par une plus large activité sur les champignons étudiés comparativement aux bactéries. Ces molécules peuvent donc compléter harmonieusement l'arsenal thérapeutique classique des antimicrobiens et peuvent servir comme base de lutte biologique.

Au terme de ce mémoire, la continuité de ce travail s'avère primordial et plusieurs axes de recherche sont ouverts. En perspectives, il serait donc intéressant de mener une étude plus approfondie sur la plante (clou de girofle), d'optimiser le procédé d'extraction, de tester son effet antimicrobien sur un plus large éventail de souches microbiennes et de déterminer son activité antioxydant.

Références
Bibliographiques

A

- Adli D. (2015). Effets prophylactique de l'administration d'un extrait de *Syzygium Aromaticum* (Clou de girofle) chez les rats wister en croissance intoxiqués au plomb et au manganése. Étude biochimique, histologique et neurocomportementale. Thèse de Doctorat : Biochimie, département de biologie, Université d'Oran, 16 pages.
- Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71(10), 1397-1421.
- Yashab K., Sakshi A., Abhinav S., Satyaprakash k., Garima A., Mohammad Z., Alam K.(2014). Antibacterial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) and garlic (*Allium sativum*) on different pathogenic bacteria. *Int. J. Pure App. Biosci*, 2(3), 305-311.
- Aouadhi, S. (2010). Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Mémoire de Master en toxicologie. Faculté de médecine de Tunisie.
- Atmani H., Baira K. (2015). 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*. Mémoire de Master : Biologie et Physiologie Végétal. Constantine : Université de Frères Mentouri, 71 pages.

B

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of
- Banouh, R., Azzouz, A .(2019). Evaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et l'activité antioxydante de l'huile essentielle de clou de girofle. Mémoire de fin d'études : Biochimie Appliquée. Bouira : Université akli mound oulhadj, 49 pages.
- Essential oils a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bao, L. M., Nozaki, A., Takahashi, E., Okamoto, K., Ito, H., & Hatano, T.(2012). Biological effects of essential oils.
- Belarmino de Souza,T. Oliveira Brito,K. M. et Chaves Silva,N. (2016). « New EugenolGlucoside-based Derivative Shows Fungistatic and Fungicidal Activity against

Opportunistic *Candida glabrata* », *Chem Biol Drug Des*, vol. 87, p. 83-90, doi: 10.1111/cbdd.12625.

- Benoit, G. (2015). Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de Vienne [Thèse]. Université de Poitiers faculté de médecine et de pharmacie.
- Bouacida K. (2021). Étude de l'effet de l'eugénol extrait de la plante *Syzygium aromaticum* sur le biofilm dentaire, Mémoire de Mastère : Biotechnologie végétale, Département de biologie, Université de Sfax, 64.
- Bouchemal N., Saadou I. (2020). L'activité antifongique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques. Mémoire de Master : Mycologie et Biotechnologie Fongique. Constantine, 56 Pages.
- Boullard B. (2001). Plantes médicinales du monde : Croyances et réalités. Paris : Ed. ESTEM. 511-512 Pages.
- Bhowmik, D., Kumar, K. S., Yadav, A., Srivastava, S., Paswan, S., & Dutta, A. S. (2012). Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(1), 13-23.
- Beloud, A. (2003). Plantes médicinales d'Algérie. Offices des publications universitaires, p. 144-145.
- Brunetton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris : Lavoisier-techniques et Documentation. 1120 Pages.
- Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3), 224.

C

- Cahuzac-Picaud, M. (2012). Épices, herbes et aromates: usages culinaires et recettes. *Phytothérapie*, 10(2), 109-116.
- Chabrier J-Y. (2010). Plantes Médicinales et Formes d'utilisation en phytothérapie. [Thèse] Université Henri Poincaré-Nancy.

- 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, 266p.
- Charles, D. J. (2013). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*: Springer Science & Business Media.
- Chouiteh, O. (2012). *Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhiza glabra* [thèse] Oran : Université d'Oran.
- Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(2), 90-96.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Reviews*, 12, 564-582.

D

- Da Silva, J.K.R. , Figueiredo, P.L.B. , Byler, K.J. et Setzer, W.N. (2020) , « Essential Oils as Antiviral Agents, Potential of Essential Oils to Treat SARS-CoV-2 Infection: An In-Silico Investigation », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no 10, p. 3426, mai 2020, doi:10.3390/ijms21103426.
- De Billerbeck, V.-G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
- Deans S. G. et Ritchie G. (1987). Antimicrobial properties of plant essential oils. *International journal of Food microbiology*, 5: 162-180.
- Degryse, A. C., Depla, I. et Voinier, M. A. (2008). Risque et Bénéfices possibles des huiles Essentielles. Paris: presse de l'EHESP. 87 p.
- Diniz do Nascimento, L. et al., (2020) « Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications » , *Biomolecules*, vol. 10, no 7, p. 988, juill. 2020, doi: 10.3390/biom10070988.
- Dobler, D. ; Runkel, F. et Schmidts, T. (2020). « Effect of essential oils on oral halitosis ».

- Dzamic A., M. Sokovic, M.S. Ristic, S. Grijic-Jovanovic, J. Vukojevic & P.D. Marin, (2009). Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chem. Natur. Compounds*, 45 (2), 259-261.

E

- Elhaib, A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse.

F

- Faucon M. (2012). *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription : monographies : huiles essentielles, huiles végétales, hydrolats aromatiques*. Paris : Ed. Sang de la Terre. 879 p.
- Fekih, N. (2015). *Propriétés Chimiques et Biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre Pinus poussant en Algérie* [thèse]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid.
- Fichi G., F. Giovanelli, D. Otranto & S. Perrucci, (2007). Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Exp. Parasitol.*, 115, 168-172.
- Fontanay, S., & Mougenot, M.-E. (2015). *Évaluation des Activités antibactériennes des huiles*.

G

- Georgetti, (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence methode. *AAPS pharmm Sci* 5(2) P 1-5.
- Goetz P. And Le Jeune R. (2010). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (*Myrtaceae*) Giroflier . *Phytothérapie* 8:37-43
- Guenette S.A., Beaudry F., Marire J.F. and Vochon P. (2006). Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J.V. et Pharmacol. Ther.* ; 29 :265-270.

H

- Haddouche, N. Dernani, H. (2018). Etude de l'activité antibactérienne et hémolytique de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. Mémoire de fin d'études : Physiologie cellulaire et Physiopathologie. Bouira : Université akli mound oulhadj, 55 pages.
- Hassas, T., Simoud, S. (2018). Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus sp* .Mémoire de fin d'études : Pharmacie. Tizi-ouzou : Université de mouloud Mammeri ,106 pages.
- Heywood VH. (1996). Les plantes à fleurs : 306 familles de la flore mondiale. Paris : Ed. Nathan. 11 ; 13-15 P.
- Homéopathie-Définition, avantage et controverse. (2018). [En ligne]. consulté le 28 février 2018.disponible sur : www.santé-medecine.journaldesfemmes.fr

J

- Jammaledine, M. (2010). Extraction et caractérisation de la composition des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* du Moyen Atlas [Mémoire]. Université sidi mohammed ben abdellah. Fès.
- Jorite, S. (2015). La phytothérapie, une discipline entre passé et future : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel. [Thèse]. Bordeaux, Université de Bordeaux.

K

- Kalemba, D., Matla, M., & Smętek, A. (2012). Antimicrobial activities of essential oils Dietary Phytochemicals and Microbes (pp. 157-183): Springer.
- Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M.-F. (2008). Etude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160-164.
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981.

- Kong M., Chen X G., Liu C S., Liu C G., Meng X H ., yu L J .(2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E.coli*. *Colloid surf.B-Biointerfaces*, 65:197-202.
- Kuete, V. (2017). Chapter 29 *Syzygium aromaticum* Medicinal Spices and Vegetables from Africa (pp. 611-625): Academic Press.
- Kumar, Y., Agarwal, S., Srivastava, A., Kumar, S., Agarwal, G., & Khan, M. Z. A.(2014). Green conversion of hazardous red mud into diagnostic X-ray shielding tiles .

L

- Lacoste, S. (2014). Ma bible de la phytothérapie [magazine]. Edition : Quotidien Malin.
- Lagunez Rivera, L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique.
- Lionnet, L. (2010). « Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de maître ès Sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires option biomédecine », p. 159.
- Lawless J. (2002). *The Encyclopaedia of Essential Oils*. Thorsons, London.
- Li Ming B., Eerdunbayaer, Akiko N., Eizo T., Keinosuke O., Hideyuki I., Tsutomu H. (2012). Hydrolysable tannins isolated from *Syzygium aromaticum*: Structure of a new C-glucosidic ellagitannin and spectral features of tannins with a tergalloyl group. *Heterocycles*, 85(2), 365-381.
- Lim, T. K. (2014). *Syzygium aromaticum*. *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants* (pp. 460-482). Springer.
- Lobstein A., Couic-Marinier F., Barbelet S. (2017). Huile essentielle de clou de girofle .Elsevier Masson SAS, (569), 59-61.
- Lee S., M. Najiah, W. Wendy & M. Nadirah, (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Front. Agric. China*, 3 (3), 332-336.

M

- Macias F., Castellano R., Oliva P., Cross., Torres A.(1997).Proceedings of Brighton, UK , 33-38
- Marchand, Jacques. (2019). Utilisation de l'aromathérapie dans le traitement du stress et de l'insomnie, Université de LORRAINE, P 11-12
- Marzouki, H., Elaissi, A., Khaldi, A., Bouzid, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Porcedda, S. (2009). Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *Open Natural Products Journal*, 2, 86-91.
- Mazerolles,C.(2008).Giroflier.http://www.labohevea.com/fiche_produit.php?langue=FR&id=GIR001.
- Menghani, E., Rana, A., Saraswat, P., & Pareek, A. (2014). Antibacterial potentials of two indian spices. 5(3), 666-672.
- Ministère de l'agriculture de la république de Madagascar. Giroflier [en ligne]. (2014) [consulté le 19.09.14]. Disponible sur : <http://www.agriculture.gov.mg/wp-content/uploads/2014/pdf/Giroflier.pdf>
- Morin J., Malhuret R. and Bastide P. (1983). Aromathérapie. exemples de la réalisation pratique de l'utilisation des huiles essentielles et thérapeutique. ISSN 0992-9406.

N

- Nagendra P.M.N., Shankara B.S. and Sreenivasa M.Y. (2010). Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*- the causative agent of die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology*, Vol.6 (1): pp.127-133

O

- Ohkubo T. and Shibata M. (1997). The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol.*J. Dent. Res*; 76 :848-851.
- Oliveira Pereira,P., Mendes,J. M. et Oliveira Lima,E. (2013). « Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum* », *Med.Mycol.*, vol. 51, no 5, p. 507-513, juill. 2013, doi: 10.3109/13693786.2012.742966.
- Olle, M., Bender, I., & Koppe, R. (2010). The content of oils in umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, 8(3), 687-696.

P

- Patricia B. (2005). L'utilisation des huiles essentielle dans les affections inflammatoire en complément du traitement ostéopathique. Mémoire de Master. 62 Pages.
- Pibiri M. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielle. Thèse doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne 28- 52 pages.
- Prasad R. and Kapoor K. (2004). Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242: pp.215-248.

R

- Ramarijaona Rabary BC. (1985). Le giroflier de Madagascar : conditions de production et différentes utilisations. Thèse de chirurgie dentaire. Université de Nancy L, 110 p.
- Ranoarisoa, K. M. (2012). Evolution historique et Etat des lieux de la filière girofle à Madagascar.
- Rhayour, K. (2016). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtiliset* sur *Mycobactirium phleiet*, *Mycobacterium fortuitum* thèse présentée en vue de l'obtention du Doctorat National.

S

- Saeed, S., & Tariq, P. (2008). In vitro antibacterial activity of clove against Gram negative bacteria. *Pak. J. Bot*, 40(5), 2157-2160.
- Shakeri A., Khakdan F., Soheili V., Sahebkar A., Rassam G., Asili J. (2014). Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepetaucrainica* L.spp. *kopetdaghensis*. *Ind. Crop. Prod.*58, 315-321.
- Stéphane F., Marie-Eugénie M., Raphaël E.(2015).Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *HEGEL* [ISSN 2269-0530], 2015, 02.
- Sophie, B.(2015).Le giroflier :Historique , description et Utilisation de La plante et de son huile essentielle. Diplôme d'Etat de docteur : Pharmacie .Université de Lorraine, 114 pages.

T

- Tariq, S. (2019). « A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens », *Microb. Pathog.*, vol. 134, p. 103580, sept. 2019, doi: 10.1016/j. micpath. 2019.103580.

W

- Wicht M., Anton R.(2003). *Plantes thérapeutiques. Tradition pratique officinales, science et thérapeutique*. 2ème édition. Paris : Edition TEC et DOC.692 Pages.
- Wilson C.L., M.E. Wisniewski, S. Droby & Chalutz E. (1993). A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Sci. Hortic.*, 53, 183-189.

Z

- Zheng G.Q., Kenny P.M. and Lam K.T. (1992). Sesquiterpènes from clove (*Eugenia caryophyllata*). As potential anticarcinogenic agents. *J. Nat. Prod.* ; 55: 999-1003.

Webographie:

Anonyme 1: (<https://les-methodes-dextraction/lhydrodistillation/>)

Anonyme 2: (https://www.scentree.co/fr/Clou_de_Girofle_HE.html)

Anonyme 3: (<https://blog/clou-de-girofle-et-mal-de-dent-n86>)

Anonyme 4: (<http://www.agriculture.gov.mg/wp-content/uploads/2014/pdf/Giroflier.pdf>)

Anonyme 5: (<https://fr/photos/clou-de-girofle>)

Annexes

Annexe 1

Les milieux de culture utilisés

Milieu Muller Hinton

-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300 g
-Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
-Amidon de maïs.....	5 g
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée	1000 ml

Gélose nutritive

-Peptone.....	5 g
-Extrait de viande.....	1 g
-Extrait de levure.....	2,5 g
-Chlorure de Sodium.....	5 g
-Agar-Agar.....	15g/l

Milieu Sabouraud

-Peptone	10 g
-Gélose.....	20 g
-Glucose.....	20 g
-Eau distillée.....	1000 ml

La Gélose Hektoen

-Peptone	12g
-Extrait de levure.....	3g
-Lactose.....	12g
-Saccharose.....	12g
-Salicine.....	2g
-Sels biliars.....	9g

-Fuchsine acide.....	0,1g
-Bleu de bromothymol.....	0,065g
-Chlorure de sodium.....	5g
-Thiosulfate de sodium	5g
-Agar	14g
-Ph	7,5-0,2

Milieu Chapman

-Peptone.....	10g
-Extrait de bœuf.....	1g
-Chlorure de sodium	75g
-D-mannitol.....	10g
-Rouge de phénol.....	25g
-Agar	15g

Résumé

Notre recherche porte sur l'étude et la mise en évidence des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*.

L'extraction de l'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum* est réalisée par la méthode d'hydro distillation.

D'après cette étude, le rendement d'extraction obtenu (3,75%) est assez satisfaisant, ce qui fait de cette plante une source naturelle valorisable. L'huile essentielle se caractérise par un pH de 6,79, ce qui facilite son intégration dans diverses préparations.

Le test de mise en évidence du pouvoir antimicrobien est réalisé sur cinq souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*) et sur 3 souches fongiques (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*).

D'après nos résultats, l'huile essentielle possède un effet anti bactérien sur *Escherichia coli* (30mm), *Bacillus subtilis* (25mm), *Staphylococcus aureus* (16mm). La bactérie *Escherichia coli* se démarque par la sensibilité la plus élevée. Cependant, une résistance est constatée pour les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*

Par ailleurs, un pouvoir antifongique remarquable est obtenu avec les champignons *Aspergillus fumigatus* (35mm), *Fusarium sp.* (45mm) et *Aspergillus niger* (29mm).

Les résultats des activités obtenues démontrent que l'huile essentielle étudiée se caractérise par une plus large activité sur les champignons étudiés comparativement aux bactéries.

Mots clés: *Syzygium aromaticum*, huile essentielle, activité antibactérienne, activité antifongique, inhibition, extraction

Abstract

Our research focuses on the study and demonstration of the antimicrobial activities of the essential oil of *Syzygium aromaticum*.

The extraction of the essential oil from the flower buds of *Syzygium aromaticum* is carried out by the method of hydro distillation.

According to this study, the extraction yield obtained (3.75%) is quite satisfactory, which makes this plant a valuable natural source. The essential oil is characterized by a pH of 6.79, which facilitates its integration into various preparations.

The test for demonstrating antimicrobial power is carried out on five bacterial strains (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*) and on 3 fungal strains (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*).

According to our results, the essential oil has an antibacterial effect on *Escherichia coli* (30mm), *Bacillus subtilis* (25mm), *Staphylococcus aureus* (16mm). The bacterium *Escherichia coli* stands out with the highest sensitivity. However, resistance is observed for the strains *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*

Moreover, a remarkable antifungal power is obtained with the mushrooms *Aspergillus fumigatus* (35mm), *Fusarium sp.* (45mm) and *Aspergillus niger* (29mm).

The results of the activities obtained demonstrate that the essential oil studied is characterized by a broader activity on the fungi studied compared to bacteria.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, essential oil, antibacterial activity, antifungal activity, inhibition, extraction

ملخص

يركز بحثنا على دراسة وإثبات الأنشطة المضادة للميكروبات للزيت العطري من *Syzygium aromaticum*

يتم استخراج الزيت العطري من براعم زهرة *Syzygium aromaticum* بطريقة التقطير المائي.

وفقاً لهذه الدراسة، فإن إنتاجية الاستخراج التي تم الحصول عليها (3.75%) مرضية تماماً، مما يجعل هذا النبات مصدراً طبيعياً ثميناً. يتميز الزيت العطري برقم هيدروجيني قدره 6.79 ، مما يسهل تكامله في المستحضرات المختلفة.

تم إجراء اختبار إثبات فاعلية مضادات الميكروبات على خمس سلالات بكتيرية (*Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus niger* و *Fusarium sp.*).

وفقاً لنتائجنا، فإن الزيت العطري له تأثير مضاد للجراثيم على *E. Coli* (30 ملم)، *Bacillus subtilis* (25 ملم)، *Staphylococcus aureus* (16 ملم). تبرز بكتيريا *Escherichia coli* بأعلى حساسية. ومع ذلك، لوحظ وجود مقاومة لسلالات *Enterococcus sp*، *Pseudomonas aeruginosa*.

علاوة على ذلك، يتم الحصول على قوة رائعة مضادة للفطريات مع *Fusarium, sp.* (35) *Aspergillus fumigatus* (45 ملم) و *Aspergillus niger* (29 ملم).

أظهرت نتائج الأنشطة التي تم الحصول عليها أن الزيت العطري المدروس يتميز بنشاط أوسع على الفطريات المدروسة مقارنة بالبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: *Syzygium aromaticum*، الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للفطريات، التشبيط، الاستخلاص.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BOUZAA Fatma
ZID Hanadi
HARIZA Esma

Etude des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de la plante *Syzygium aromaticum*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Notre recherche porte sur l'étude et la mise en évidence des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*.

L'extraction de l'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum*. est réalisée par la méthode d'hydro distillation.

D'après cette étude, le rendement d'extraction obtenu (3,75%) est assez satisfaisant, ce qui fait de cette plante une source naturelle valorisable. L'huile essentielle se caractérise par un pH de 6,79, ce qui facilite son intégration dans diverses préparations.

Le test de mise en évidence du pouvoir antimicrobien est réalisé sur cinq souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*) et sur 3 souches fongiques (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*).

D'après nos résultats, l'huile essentielle possède un effet anti bactérien sur *Escherichia coli* (30mm), *Bacillus subtilis* (25mm), *Staphylococcus aureus* (16mm). La bactérie *Escherichia coli* se démarque par la sensibilité la plus élevée. Cependant, une résistance est constatée pour les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp*.

Par ailleurs, un pouvoir antifongique remarquable est obtenu avec les champignons *Aspergillus fumigatus* (35mm), *Fusarium sp.* (45mm) et *Aspergillus niger* (29mm).

Les résultats des activités obtenues démontrent que l'huile essentielle étudiée se caractérise par une plus large activité sur les champignons étudiés comparativement aux bactéries.

Mots-clés : *Syzygium aromaticum*, Huile essentielle, Activité antibactérienne, Activité antifongique, Inhibition, Extraction

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Microbiologie (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Dr. ZITOUNI Hind (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Dr. GHORRI Sanaa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Dr. MEZIANI Meriem (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).