REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Chimie

Spécialité : Chimie Macromoléculaire

Par :

ZAOUI Saddam hosin

GASMI Ahmed

Thème :

Etude des propriétés physicochimiques du clou de girofle et de son huile essentielle

Soutenue publiquement le : 20/06 /2018., Devant le jury composé de :

M^{me} MAACHOU H	MCB	Univ de Médéa	Présidente
M^{me} MADANI L	MCB	Univ de Médéa	Examinatrice
M^{me} BENALLEL H	MAA	Univ de Médéa	Examinatrice
M^{me} MIMI N	MCB	Univ de Médéa	Encadreur

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Ce travail de mémoire a été réalisé au laboratoire de biologie de l'université YAHIA Fares de Médea, une partie de l'étude a été effectuée aux laboratoires physicochimique et microbiologique du groupe Saidal de Médéa.

Tous d'abord nous remercions énormément Dieu tout puissant et Miséricordieux, qui nous a tout donné pour vivre sur terre et chercher à apprendre pour accomplir la mission pour laquelle il nous a crée.

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans l'aide des personnes aux quelles nous voulons adresser nos sincères remerciements.

En premier lieu nous tenons à adresser nos plus vifs remerciements à notre encadreur Mme MIMI Nassiba de nous avoir proposé le sujet de ce mémoire et d'avoir porté une attention constante à notre travail. Aussi pour ces précieux conseils, son aide, son soutien, sa discipline. Nous tenons à lui exprimer nos chaleureux remerciements pour la qualité de son enseignement.

Nos plus sincères remerciements s'adressent au Dr MAACHOU, qui a accepté de juger ce travail en tant que Président du Jury de soutenance de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury, Mme MADANI et Mme BENALLEL d'avoir accepté de consacrer de leur temps pour juger ce travail, de l'intérêt qu'elles ont bien voulu prodiguer à nos activités de recherche, en acceptant d'être examinatrices en participant au Jury de soutenance de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous les ingénieurs de laboratoire en particulier, M^{me} Meziani, M^{me} ben kortbi et Aide.S.

Nous remercions aussi Mesdames Guardaoui, Zouambia, Bouchrit, Chaaoiti et Frarsia.S.

Nous désirons aussi remercier le personnel du groupe SAIDALde Médéapour l'aide précieux qu'ils nous ont porté.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail de recherche.

.

Dédicaces

Je dédie ce travail …

À mon adorable mère, qui a veillé à ce que je puisse réussir dans mes études, m'a entouré de sa tendresse et qui a toujours veillé à mon confort et bien être afin que je ne manque rien

À mon père, qui m'a donné un magnifique modèle de sacrifice, de labeur et de persévérance

À mes chers frères Fathi et Rabah
Pour mon cousin Zohir
Ma nièce Meriem
Pour ma belle mère
A mes chères sœurs, qui sont toujours présentent à coté de moi
A tous mes neveux

À mes oncles et tantes, cousins et cousines.

A toute ma grande famille ZAOUI

A tous ceux qui aiment et aident SADDAM

A tous mes amis : Smail ; Moumen ;Ahmed ; Issam ;Rachid et Halim
Mon binôme de mémoire Ahmed.

A tous mes collègues de la promotion chimie macromoléculaire je dédie ce travail.

À tous mes enseignants tout au long de mes études

Saddam

Dédicaces

A mon père
Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours vers l'avant, ne jamais baisser les bras et pour son enseignement continu.

À l'esprit de ma précieuse mère
qui m'a souhaité le succès

À ma belle mère qui m'a encouragé pendant le parcourt de mes études.

A mes chers frères et sœurs : Mouloud, Salim, Zoulikha, Zahra, Djaouida, Sarah, pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A toute ma grande famille

A tous mes amis : Smail, Rachid, Nasreddine, Brahim
Mon binôme de mémoire Saddam Hocine

A tous mes collègues de la promotion chimie Macromoléculaire, je dédie ce travail.

Ahmed

Liste des figures

Figure I.1: Montage d'entraînement à la vapeur d'eau ……..…..……. 06

Figure I.2 : Montage d' Hydrodiffusion …….……...…… 07

Figure I.3 : Montage d'extraction par solvant ……...……... 08

Figure I.4 : Montage d'hydro distillation ……...…….. 09

Figure I.5: Montage d'extraction par les corps gras ……..…….. 10

Figure I.6:Montage d'extraction assistée par micro-onde. …..……...…… 11

Figure I.7 : Clou de girofle……..…… 11

Figure I.8 : Giroflier (Syzygiumaromaticum) …….…… 11

Figure I.9: β-caryophyllène …….……... 16

Figure I.10: L'eugénol …….…….…… 16

Figure I.11 : Méthyleugénol …….…… 17

Figure I.12: Formule de la molécule d'acétate d'eugényle …….……. 18

Figure I.13: Réfractomètre ……..…..…… 20

Figure I.14: Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.…... 23

Figure I.15 : Structures chimiques des antioxydants naturels. ……..… .24

Figure I.16: Gram positif ……. .25

Figure I.17 : Gram négatif. …… …25

Figure II.1 : Montage d'hydrodistillation ……...……...… ..29

Figure II.2 : Refractomètre …… 32

Figure II.3 **:** Papier pH ……...…..….32

Figure II.4 **:** pH mètre ……32

Figure II.5 : Détermination de l'Ia par titrage ……32

Figure II.6 : Moule contenant la pastille …….....33

Figure II.7 : Presse hydraulique de laboratoire ……... ..35

Figure II.8 : Spectrophotomètre FTIR ……. ..35

Figure II.9 : Les milieux spécifiques des souches bactériennes ……...…. .. 38

Figure II.10 : Boites à pétries contenants les souches bactériennes ……...…... 38

Figure III.1 : Spectre FTIR de la poudre de clou de girofle …….. 44

Figure III.2 : Spectre IR de HE de clou du girofle ……..……45

Figure III. 3 : Principaux constituants de l'HE du clou de girofle …….. ...46

Figure III.4 : Variation de l'absorbance des échantillons de DPPH en fonction de la concentration en HE de clou de girofle ……..... 48

Figure III.5 : Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations en HE du clou de girofle..... 48
Figure III.6 : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des étalons ……..... 49
Figure III.7 : Zones d'inhibition obtenues par l'action de l'HE de clou de girofle sur les souches testées à différents pourcentages dans le tween 80 : 30%, 50% et 100% en HE. ……..... 51
Figure III.8 : Valeurs moyennes des diamètres de l'activité antibactérienne …….....…..53

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés organoleptiques de l'H E du clou de girofle ……..……39

Tableau 2 : Résultats des rendements en HE…….....40

Tableau 3: Valeur de l'indice de réfraction…….42

Tableau 4 : données IR de quelques groupements fonctionnels…….....47

Tableau 5. Absorbances des différents échantillons testés……..47

Tableau 6: Valeurs des diamètres d'inhibition des souches bactériennes utilisées…….52

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

I_a : Indice d'acide

I_S : Indice de saponification.

I_E : Indice d'ester

M : masse molaire

N : normalité

pH: Potentiel d'hydrogène

R : Rendement

T : température

V : volume

ρ: masse volumique

HE : Huile Essentielle

IR : Infrarouge

KBr : Bromure de potassium

MHE : Masse d'huile essentielle (g)

$MgSO_4$: Sulfate de magnésium

NaCl : Chlorure de sodium

ppm : partie par million

RHE% : Rendement en Huile Essentielle (%)

DPPH: 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

ISO : International Standard Organisation

AOAC: Association of Official Agricultural Chemist

MOS : Organisation mondiale de santé

A% :Activité antioxydant

Sommaire

Chapitre I : Synthèse bibliographique ……

I. Généralité sur les huiles essentielles ……...02

I.1. Historique ……....02

I.2. Définition des huiles essentielles ……..02

I.3. Origine et localisation des huiles essentielles ……...02

I.4. Composition chimique des huiles essentielles ……..03

I.4.a. Les terpènes ……....03

I.4.b. Composés aromatiques ……..03

I.4.c. Composés d'origine diverses ……..03

I-5. Propriétés des huiles essentielles ……..03

I-5-1. Propriétés biologiques ……...03

I-5-2. Propriétés physiques des huiles essentielles ……....04

I-6. Utilisation des huiles essentielles ……04

I-7. Toxicité des huiles essentielles ……....05

I-8 Méthodes d'extraction des huiles essentielles ……...…05

I-8-1. Entraînement à la vapeur d'eau ……..06

I-8-2. Hydrodiffusion ……...…07

I-8-3. L'expression à froid ……...07

I-8-4. Extraction par solvants …….….....07

I-8-5. Hydrodistillation…….….....08

I-8-6. Extraction par les corps gras …….....09

I-8-7. Extraction par micro-ondes ……...…….....10

I-9. Clous de Girofle ……...……....11

I-9-1. Définition ……...…….....12

I-9-2.Historique ……...…….....12

I-9-3. Caractéristique Botanique ……..……...……...…12

I-9-4. Composition Chimique et Propriétés …..……...…….....12

I-9-4-a. Composition Chimique ……..……12

I-9-4-b. Propriétés ……..…….....13

I-9-5. Utilisations ……...…….....13

I-9-5-a. Domaines médicinale et cosmétique ……..…13

I-9-5-b. Domaine culinaire……....13
I-9-6. Les différentes H.E. issues du giroflier ……..….13
I-9-6-a. H.E du clou ……...……14
I-9-6-b. H.E de griffe ……....…14
I-9-6-c. H.E de feuilles ……..…….14
I-9-6-d. .H.E de tiges ……..….....14
I-9-7. La genèse des molécules aromatiques ……..…...….15
I-10.Caractérisation des huiles essentielles …….……19
I-10-1. Caractéristique organoleptiques ……..……19
I-10-2. Caractéristiques physicochimiques des HE…….……19
a- Rendement en huile essentielle …….……..19
b- La mesure de la densité ……...19
c- Indice de réfraction ……...……...20
d- Mesure de pH ……..20
e- Indice d'acide IA ……..……...21
f- Indice de saponification IS ……..21
g- Indices d'iode Ii …….……..21
h- Indice d'ester Ie …….……..21
i- Spectroscopie infrarouge ……..……...21
j- Chromatographie en phase gazeuse(CPG)…...……22
k- Activité antioxydant ……..…….…..22
I-10-3. Caractérisation biologique : Activité antimicrobienne…….....**...**24
a- Introduction……...24
b- La diversité du monde microbien ……24
b-1. Les bactéries ……..……...……25
b-1-1. Bactéries à gram négatif ……..……...……...25
a-Escherichia coli ……..……26
b- Pseudomonas aeruginosa …….……..……..…...26
b-1-2. Bactéries à gram positifs ……....…..26
a-Staphylococcus aureus ……..….26
b-Enterococcus faecalis …….…..…27

Chapitre II : Matériels et méthodes

II-1.But de l'étude …….....……28
II-2.Le matériel végétal ……...…..……28

II-3. Matériels et produits utilisés ……28
II-4. Procédé d'extraction ……...…….29
II-5. Caractérisations …….……...30
II-5-1. Détermination du rendement d'extraction …….…….....30
II-5-2.Taux d'humidité …….……....31
II-5-3.La densité ……...…31
II-5-4. Indice de réfraction …….....31
II-5-5. Mesure du pH ……....32
II-5-6. Indice d'acide IA …….…..32
II-5-7. Détermination de l'indice d'ester ……..33
II-5-8. Détermination d'indice de saponification ……..34
II-5-9. Analyse infrarouge …….....34
II-5-10. Activité antioxydant …….…...35
II-5-11. Activité antibactérienne …….....37

Chapitre III : Résultats et interprétations

III-1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles ……39
III-2. Taux d'humidité ……..…….……..39
III-3. Propriétés physico-chimiques …….……40
a- Rendement de l'extraction …….……...40
b- La densité …….……41
c- Indice de réfraction …….……..42
d- Mesure de PH ……..……..42
e- Indice d'acide Ia ……...……42
f- Indice d'ester ……..……...42
g- Indice de saponification ……..…… .43
h- Analyse infrarouge ……...……..43
i- Activité antioxydante ……...……..47
j- Activité antibactérienne ……...….50
Conclusion.....54
Références bibliographiques.....56

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو استخلاص الزيوت الأساسية للقرنفل ودراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية.

قمنا بعملية الاستخلاص بواسطة تقنية التقطير المائى

الخصائص الفيزيائية-الكيميائية والبيولوجية المقاسة هي: معدل الرطوبة ، ودرجة الحموضة .معامل الانكسار الكثافة ، مؤشر الحمض ، مؤشرالاستر ؛مؤشر التصبن، مضادات الأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا.

أظهرت النتائج أن القرنفل غني بمضادات الأكسدة ولديه نشاط مضاد للبكتيريا مهم جدا.

نتيجة المردود هي ما بين 8.43٪ و 9.06٪ للتجارب المختلفة التي أجريت من خلال تغيير بعض المعايير مثل: كتلة القرنفل المستخدمة في البداية ،حجم وطبيعة مذيب الاستخلاص.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الأساسية، القرنفل، المؤشرات الفيزيائية والمؤشرات الكيميائية.

Résumé:

Le but de ce travail est d'extraire les huiles essentielles du clou de girofle et d'étudier leurs propriétés physico- chimiques. Nous avons effectué l'extraction par la technique d'hydrodistillation.

Les Propriétés physico- chimiques et biologiques mesurées sont : le taux d'Humidité, le pH; l'Indice de réfraction; la densité, l'indice d'acide, l'indice d'esters, indice de saponification, l'activité antioxydante et antibactérienne.

Les résultats montrent que le clou de girofle est riche en antioxydants et possède une activité antibactériènne très importante.

Le résultat du rendement est compris entre 8,43% à 9,06% pour les différentes expériences réalisées en faisant varier quelques paramètres tel que : la masse de clou de girofle utilisée initialement, le volume ainsi que la nature du solvant d'extraction.

Mots clés: huiles essentielles, clous de girofle, indices physiques et indices chimiques.

Abstract :

The objective of this work is to extract essential oils of cloves and to study their physicochemical properties. We carried out the extraction by hydrodistillation technique.

The physicochemical and biological properties measured are: the humidity rate, the pH; refractive index; density, acid index, ester index, saponification index, antioxidant and antibacterial activity.

The results show that clove is rich in antioxidants and has a very important antibacterial activity.

The result of the yield is between 8,43% and 9,06% for the various experiments carried out by varying a few parameters such as: the cloves mass used initially, the volume as well as the nature of the extraction solvent

Key words: essential oils, cloves, physical indices and chemical indices.

Introduction

Introduction

Depuis plusieurs années, l'homme est habitué à utiliser les plantes pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que: le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie **[1]**.

L'huile essentielle de clous de girofle possède de nombreuses propriétés médicinales, dues à l'eugénol : elle est anti-inflammatoire, antiseptique, parasiticide et anesthésiant local (utilisé à ce titre par les dentistes). Elles sont utilisées dans certains médicaments, en parfumerie, en phytothérapie ou comme agent de saveur dans l'alimentation **[2]**.

Notre travail de recherche constitue une tentative dont l'objectif est d'étudier les propriétés physico-chimiques de clou de girofle et l'extraction de son huile essentielle. La caractérisation de son huile essentielle permet de connaitre sa composition chimique, son effet antibactérien ainsi que son activité antioxydante, ces propriétés montrent les effets thérapeutiques de cette plante médicinale importante.

Notre travail est organisé en trois grandes parties :

- La première partie présente une synthèse bibliographique regroupant les différentes définitions, les méthodes d'extractions et de caractérisation des huiles essentielles existants.
- La deuxième partie regroupe les différents modes opératoires et matériels utilisés pour nos expériences
- La troisième partie représente les résultats obtenus et leurs interprétations.

Enfin, nous terminons par une conclusion et des perspectives pour des nouvelles études.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur les huiles essentielles

I.1. Historique

Les essences parfumées connues dès l'origine des civilisations, furent d'abord utilisées pour des usages sacrés. Rites funéraires, embaumement des morts, onctions des élus, sacrifices aromatiques aux ancêtres et aux divinités apparaissent comme une constante des mondes antiques **[2]**, de la Chine à la Perse et de l'Arabie à la Grèce **[3].**Le nom huile essentielle a été inventé au 16èmesiècle par le réformateur suisse de la médecine, Paracelsus Von Hohenheim qui a appelé le composant efficace essentia de Quinta de drogue **[4]**.Trois milles huiles essentielles environ sont connues, dont environ 300 sont destinées à un usage commercial **[5]**. Parallèlement, nous retrouvons l'utilisation de végétaux dans les pratiques thérapeutiques de ces diverses civilisations, selon différents stades évolutifs liés à leur utilisation **[6]**.

I.2. Définition des huiles essentielles

L'huile essentielle, essence ou également appelé huile volatile, est l'ensemble d'extraits volatils de complexe obtenu des plantes aromatiques.

L'Association Française de Normalisation AFNOR a défini les huiles essentielles comme étant des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques **[7]**.

I.3. Origine et localisation des huiles essentielles :

Les huiles volatiles peuvent être considérées comme des résidus du métabolisme végétal. Suite à la photosynthèse au niveau des chloroplastes, l'énergie produite (sous forme de glucides, NADPH et d'ATP) contribue au développement de la plante et indirectement à la biosynthèse de multiples composés secondaires parmi elles les huiles essentielles.

Les essences sont synthétisées par les végétaux supérieurs, il y aurait environ 17500 espèces aromatiques réparties dans une cinquantaines de familles dont les Lamiaceae, les Asteraceae, les Rutaceae et les Lauraceae. Ces espèces sont caractérisées par la présence d'organes spécifiques responsables de la synthèse et de stockage deshuiles essentielles : les poches (Myrtacées, Rutacées) ou les canaux sécréteurs, les poils sécréteurs (Lamiaceae) et les cellules sécrétrices (Zingiberaceae, Lauraceae)**.** L'accumulation des huiles essentielles peut être

dans toutes les parties de la plante : sommités fleuries (lavande), écorces (cannelier), rhizomes (Gingembre), fruits (Anis)…etc. **[8]**.

I.4. Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée **[9]**. Il s'agit de groupe des terpènes de formule brute générale est $(C_5H_8)_n$ spécialement les monoterpènes (n=2) et les sesquiterpènes (n= 3), prépondérants dans la plupart des essences, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane **[10]**.

I-4.a. Les terpènes

Les mono terpènes est les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales **[11]**.

I-4.b. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane ou appelés composés phénoliques sont moins répondants que les terpénoides **[12]**. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines HE d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, cannelles) eugénol, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde **[13]**.

I-4.c. Composés d'origine diverses

Il existe un nombre non négligeable de produits résultants de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemples des carotènes ou des acides gras **[12]**.

I-5. Propriétés des huiles essentielles

I-5-1. Propriétés biologiques

La diversité des constituants présents dans les huiles essentielles entraîne des Activités [14] :

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

- **propriétés spasmolytiques et sédatives** : de très nombreuses drogues à huiles essentielles (badiane, menthe, verveine,…) sont efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux.
- **propriétés irritantes** : augmentent les mouvements de l'épithélium cilié au niveau de l'arbre bronchique et l'élimination rénale d'eau par effet local directe

I-5-2. Propriétés physiques des huiles essentielles

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

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

I.6. Utilisation des huiles essentielles

Ces HE agissent selon leur tropisme ; ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone en particulier, ces substances volatiles pénètrentles tissus et l'organisme. Par exemple, l'H E de basilic est particulièrement actif au niveau de la digestion. Celle de cyprès améliore la circulation. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des H E car leur usage peut comporter des inconvénients. Par exemple, une HE de menthe des champs est indiquée pour stimuler les personnes fatiguées, elle soulage les douleurs névralgiques mais ne doit jamais être utilisée dans un bain, sous peine d'irritation sérieuse de la peau. Outre ces propriétés principales, elles ont toutes une vertu **[15]**.

I.7. Toxicité des huiles essentielles :

Dans le monde actuel des produits naturels, il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive. Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires, parce que l'efficacité et la toxicité ce n'est souvent qu'une question de quantité **[16,17].** Il convient d'ailleurs de relativiser ce risque car il concerne essentiellement les personnes fragiles, notamment les bébés et les enfants, les personnes âgées et les femmes enceintes ou allaitantes. La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques pour lesquelles des risques ont été identifiés suite à des tests. Une famille biochimique particulière, celle des cétones, est ici particulièrement visée: elle présente une neurotoxique et un risque abortif.

1. Pour une autre famille, celle des phénols, sa causticité sera particulièrement tournée vers la peau (dermocausticité) et le foie (hépatotoxique). Ces huiles essentielles à phénols ne s'utiliseront donc pas ni par voie cutanée ni par voie rectale, seule la prise orale sera possible. En cas de traitement long, pour éviter tout risque hépatotoxique, il faudra observer une fenêtre thérapeutique.
2. Une autre toxicité provient des HE contenant des furocoumarines et pyrocoumarines.

Leur application cutanée, ou même leur prise par voie orale, peut provoquer, sous l'effet prolongé du soleil, des réactions érythémateuses susceptibles de favoriser la carcinogénèse et l'accélération de la mélano-genèse.

Enfin, l'absorption orale d'huiles essentielles riches en mono terpènes (toutes les espèces depins et de sapins, de genévriers et même le santal blanc) sur de longues périodes peut enflammer et détériorer à terme, les néphrons (les unités fonctionnelles du rein). C'est ce que l'on nomme une néphrotoxicité [**18, 19].**

Lorsque tous ces effets toxiques sont présents à l'esprit, avoir recours aux huiles essentielles en parfaite innocuité n'est qu'une question de choix : celui de l'huile, de la dose, de la durée et de la voie d'administration. Comme pour un médicament, il existe pour chaque huile essentielle un équilibre entre le bénéfice et le risque qui doit aussi être envisagé en fonction du sujet.

I-8. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, de caractéristiques

physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction [20]. Les principales méthodes d'extraction sont [21] :

- Entraînement à la vapeur d'eau.
- L'hydrodiffusion.
- L'expression à froid.
- Extraction par solvants.
- Hydrodistillation.
- Extraction par les corps gras.
- Extraction par micro- ondes.

I-8-1.Entraînement à la vapeur d'eau

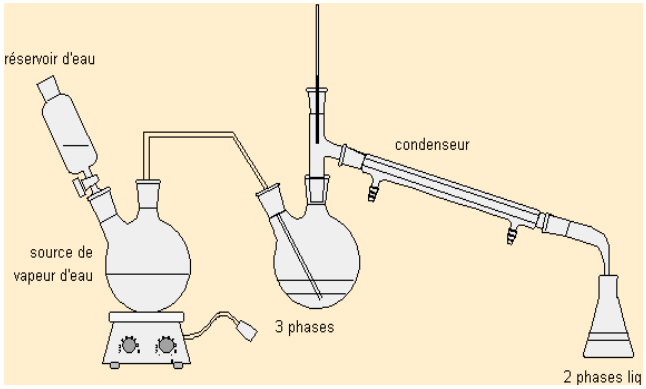
Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînables par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe [22].

Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation.[23]

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

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

Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydro distillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion[24].



FigureI.1: Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

I-8-2. Hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du hautvers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant [25].

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

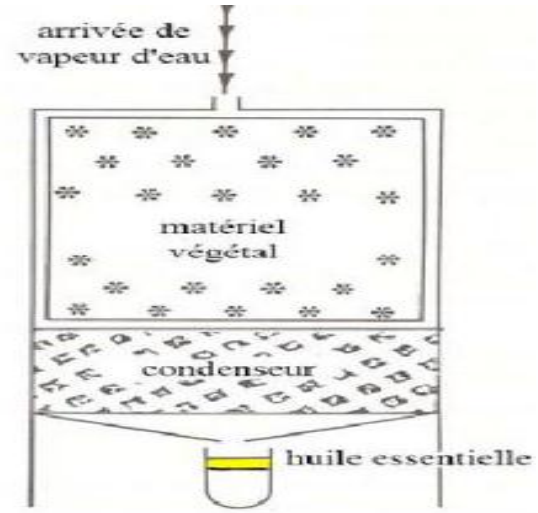


Figure I.2 : Montage d' Hydrodiffusion

I-8-3. L'expression à froid

L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation [26].

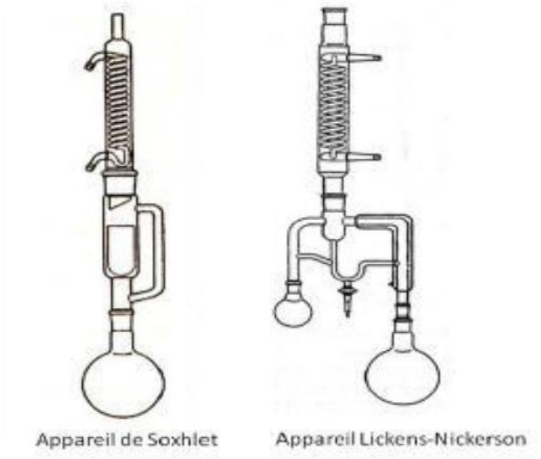
D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau [27].

I-8-4. Extraction par solvants

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

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool [28]. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants.

Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque des électivité ; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure [29].



FigureI.3 : Montage d'extraction par solvant

I-8-5. Hydrodistillation

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

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

Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation [29].

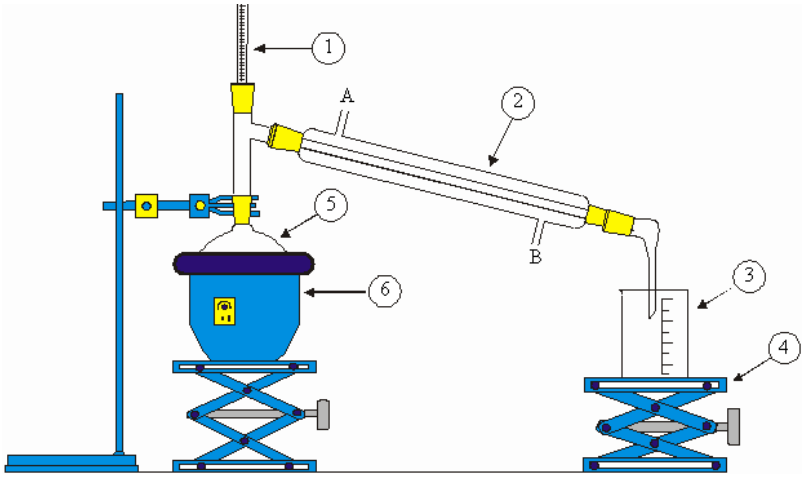


Figure I.4 : Montage d'hydrodistillation

1-Thermomètre, 2-Réfrigérant,3-Bécher. 4-support élévateur, 5-ballon, 6-chauffe-ballon, A-sortie d'eau, B-entrée d'eau.

I-8-6. Extraction par les corps gras

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

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

Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras [28].

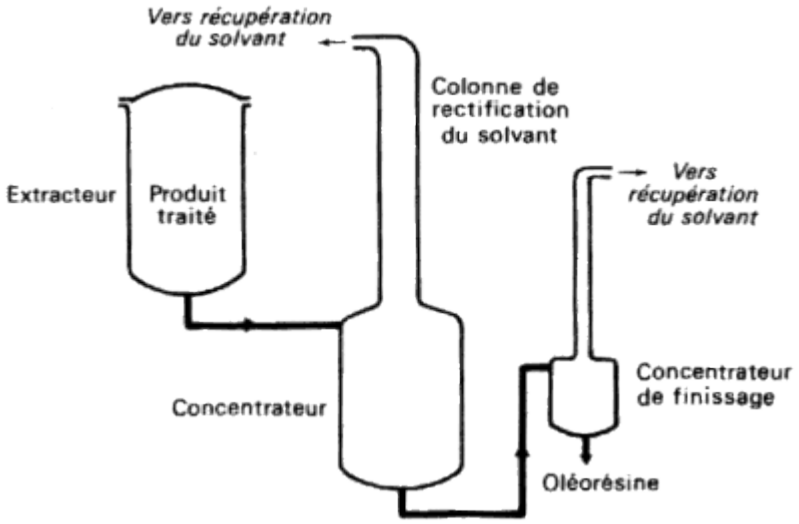


Figure I. 5: Montage d'extraction par les corps gras

I-8-7. Extraction par micro-ondes

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelée (**V**acuum **M**icrowave **H**ydro **D**istillation) (VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences [25].

Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants : rapidité, économie du temps d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvant résiduel [29,30].



FigureI.6: Montage d'extraction assistée par micro-onde.

I-9. Clous de Girofle



Figure I.7 : Clou de girofle



Figure I.8 : Giroflier

Classification systémique

Classe	Angiosperme
Sous- classe	Tiporées
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	Syzygium
Espèce	Syzygiumarmaticum

I-9-1. Définition

Le girofle ou giroflier est un arbre originaire des Iles Moluques dans l'archipel indonésien. Les clous sont en fait des boutons de fleurs de couleur verte puis rouge une fois mûrs, les clous se séparent de leur jolie couleur brune lors de la phase de séchage, qui se déroule à l'air libre pendant un mois [31].

I-9-2.Historique

L'épopée indienne du Ramayana, décrit le giroflier comme un arbre apparu 200 ans avant Jésus Christ utilisaient comme une épice. Les Chinois utilisaient déjà les clous de girofle sous la dynastie Han 206 ans avant Jésus Christ. En les mâchant pour avoir meilleure haleine, ainsi que pour ses vertus médicinales et culinaires. Les Grecs et des Romains utilisaient les clous de girofles au 1ersiècle. Une récente découverte archéologique suggère que le commerce du girofle avec l'occident pourrait en fait avoir commencé bien plus tôt. En effet, on a trouvé un clou de girofle parmi des restes calcinés sur le sol d'une cuisine incendiée du site mésopotamien de Terqa dans l'actuelle Syrie, daté de 1700 avant Jésus Christ [32]. En Europe, le clou de girofle apporté les Arabes, étant d'un usage réservé aux riches Siennois [33].

I-9-3. Caractéristique Botanique

Originaire de l'archipel des Moluques, cet arbre apprécie les sols tropicaux maritimes drainés. Ses feuilles sont opposées, coriaces et persistantes. Ses fleurs blanc rosé sont groupées en petites cymes compactes et ramifiées. Le bouton floral (clou) a une morphologie typique : partie quadrangulaire et une tête globuleuse, entourée par les 4 sépales et constituée des 4 pétales enfermant de très nombreuses étamines recourbées.

I-9-4. Composition Chimique et Propriétés

I-9-4-a. Composition Chimique

Le clou de girofle renferme une quantité importante d'huile essentielle 15 à 20%, des tanins (famille des polyphénols), un peu d'amidon et des matières fibreuses cellulosiques.

Le pédoncule floral (griffes) renferme 5 à 6%d'huile, dans les feuilles la quantité d'huile est de 3à 4%. L'huile de girofle est très riche en eugénol de 70 à 85%. On trouve aussi d'autres composés terpéniques (dont environ 10 % caryophylléne), aliphatiques, aromatiques et hétérocycliques.

I-9-4-b. Propriétés

Le clou de girofle possède des propriétés qui sont dues essentiellement à l'eugénol qui est rapidement métabolisé et excrété, et considéré comme non cancérigène. Il peut être présent dans les aliments jusqu'à une concentration de 1500 ppm [34].

I-9-5. Utilisations

Le clou de girofle trouve sont application dans divers domaines :

I-9-5-a. Domaines médicinale et cosmétique

Les boutons floraux du giroflier possèdent des propriétés antiseptiques et anesthésiques qui sont reconnues depuis très longtemps et proposées dans les douleurs dentaires. Il entre dans la composition du khôl, primitivement onguent ophtalmique. Le clou de girofle est un anti inflammatoire et antibactérien, il est utile pour lutter contre beaucoup d'infections urinaires, digestives et cutanées vu qu'il renferme une quantité importante en eugénol [34].

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

Le clou de girofle sert de parfum d'ambiance sous forme de « pomme d'ambre » que l'on fabrique en piquant toute la surface d'une orange de clous de girofle [35].

I-9-5-b. Domaine culinaire

En cuisine, il est présent dans le pain d'épices, les biscuits en mélange avec la cannelle, les marinades, la choucroute et il est indispensable à la plupart des currys, comme il est utilisé en infusion avec le thé.

Le giroflier est surtout cultivé pour ses "clous" qui servent d'aromates dans l'alimentation d'un grand nombre de pays. On cultive également le giroflier pour ses feuilles dont on extrait une essence très riche en eugénol.

I-9-6. Les différentes H.E. issues du giroflier

Le giroflier est à l'origine de plusieurs types d'huiles essentielles, de qualité différente selon la partie de la plante utilisée. Il existe l'essence de clous, des feuilles, des griffes et

des tiges. L'huile essentielle de clou est essentiellement utilisée en parfumerie et en aromathérapie, alors que l'huile essentielle de feuille est de loin la plus commercialisée, notamment pour la production d'eugénol du fait de son faible coût et de sa récolte plus facile.

Dans la Pharmacopée française et dans la Pharmacopée européenne, sont répertoriées les monographies du clou de girofle, de l'huile essentielle du clou de girofle, et depuis 2007 la monographie de l'huile essentielle de feuille de giroflier.

I-9-6-a. H.E du clou

Elle est extraite des clous du giroflier, c'est à dire des inflorescences à l'état de bouton, par distillation à la vapeur d'eau.

Les clous renferment à l'état frais environ 15 à 20% d'huile essentielle, dont 78 à 98%d'eugénol.

Selon la pharmacopée européenne, l'HE de clous de girofle est un liquide jaune, limpide, virant au brun lorsqu'il est exposé à l'air.

En ce qui concerne la composition, la Pharmacopée définit des intervalles de quantité recommandée pour chaque constituant [36] :

de 75,0 à 88,0 % pour l'eugénol, de 5,0 à 14,0 % pour le β-caryophyllène et de 4,0 à 15,0 % pour l'acétyleugénol (acétate d'eugényle).

I-9-6-b. H.E de griffe

L'huile essentielle de griffe est essentiellement produite pour des raisons économiques. En effet, lors de la récolte des clous, ceux-ci sont séparés de leurs pédicelles: c'est le griffage. Les griffes recueillies sont alors elles aussi distillées en tant que « produit secondaire ». Les griffes renferment de 4 à 6% d'huile essentielle dont 80 à 95% d'eugénol.

I-9-6-c. H.E de feuilles

Cette huile est plus facile à obtenir car les feuilles peuvent être récoltées toute l'année, ce qui assure une source de revenu plus stable pour les producteurs. Cependant sa composition est moins intéressante du point de vue de l'aromathérapie [37]. Elle est utilisée pour sa ressource en eugénol qui constituait la matière première de la fabrication de la vanilline. Les feuilles contiennent 1 à 3 % d'huile essentielle dont 75 à 88% d'eugénol.

I-9-6-d.H.E de tiges

De même que l'H.E de griffe, l'H.E de tige ne présente pas un intérêt majeur, elle est produite afin d'optimiser le rendement des récoltes.

I-9-7. La genèse des molécules aromatiques

La photosynthèse est le phénomène nécessaire et indispensable au métabolisme végétal. Il conditionne la synthèse des métabolites actifs de la plante. Le principe de la photosynthèse est le suivant : le pigment vert situé dans les feuilles de la plante, la chlorophylle, capte le rayonnement solaire (photons). La chlorophylle utilise cette énergie pour scinder la molécule d'eau en hydrogène et oxygène. L'oxygène est en majeure partie rejeté dans l'air ambiant, tandis que l'hydrogène réagit avec le dioxyde de carbone absorbé par la plante afin de former des sucres [38].

$$6CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{\text{Lumière}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

Dioxyde de carbone + Eau glucose + dioxygène

A partir de ces sucres et par des procédés d'oxydo-réductions, la plante élabore des molécules spécifiques (métabolites primaires et métabolites secondaires). Il existe deux voies principales de biosynthèse [39]:

- la voie des terpènes.
- la voie des phénylpropanes.

La voie des terpènes fait intervenir de l'isopenténypyrophosphate (I.P.P) et aboutit à la synthèse de monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) et de diterpènes ($C_{20}H_{32}$). A partir de ces molécules, et par l'intermédiaire des réactions d'oxydo-réductions, d'autres métabolites se forment comme les alcools, aldéhydes, phénols, cétones, oxydes, acides, esters, etc.. [38].

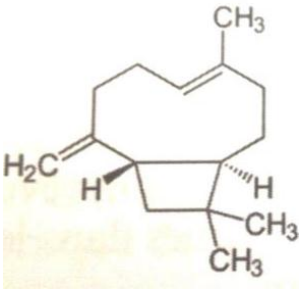
La voie des phénylpropanoïdes emploie l'acide shikimique, et forme directement des composés aux fonctions biochimiques variées : phénols, acides, coumarines, etc. Celles-ci entreront par la suite dans la composition d'autres molécules comme les lactones ou les méthyl éthers [38].

On parle alors de deux grandes classes de constituants dans les huiles essentielles: les terpènes et les composés aromatiques. Les composés aromatiques présentent au moins un cycle benzénique. Les autres constituants des H.E. existent à l'état de traces et neconditionnent pas l'activité de l'huile essentielle [37].

Ci-après sont présentées les principales molécules de l'H.E de clou de girofle.

a- **Les sesquiterpène**

Le β-caryophyllène constitue un exemple de sesquiterpène présente dans l'H.E. de giroflier (5 à 14%).



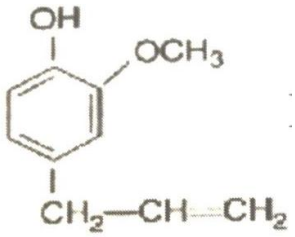
FigureI.9: β-caryophyllène

L'H.E. de giroflier contient des sesquiterpènes comme l'α-humulène <1%, camphène 1%, et le γ-pinène<1% [40].

b- **Les composés aromatiques**

Le composé prépondérant dans les huiles essentielles du giroflier est l'eugénol (figure **10**). Issu de la dégradation de la phénylalanine (acide aminé), l'eugénol possède une structure en C_6C_3, à laquelle se greffent d'autres fonctions.

L'eugénol appartient aux phénylpropanoïdes (molécules dérivées du phénylpropane), mais il est rattaché au groupe des phénols monoterpéniques car ses propriétés s'en rapprochent [38].



FigureI.10: L'eugénol

Parmi les 3 « phénols » les plus puissants dans les H.E. : carvacrol, thymol, et eugénol, l'eugénol est le moins toxique [41].

L'eugénol est un principe actif qui, à la différence des autres phénols, possède un pouvoir anesthésiant. L'étude de KLEIN AH, CARSTENS ML et CARSTENS E a permis de comparer ce pouvoir anesthésiant à celui du carvacrol sur la langue. 524 personnes y ont participé. Les

résultats démontrent ainsi que l'eugénol peut augmenter le seuil de détection pour un faible stimuli tactile (jusqu'à 0,2 mm). En revanche, le carvacrol ne modifie en rien la perception de ces stimuli [42].

Autre caractéristique de l'eugénol, cette molécule procure une forte activité antiagrégante plaquettaire à l'huile essentielle [43]. D'après plusieurs recherches son action cible le facteur d'activation plaquettaire [44]. C'est aussi un antagoniste de l'acide arachidonique (inducteur de l'agrégation plaquettaire). Il a été démontré en comparant les IC50 (Concentration inhibitrice médiane) de l'eugénol et de l'aspirine, que l'eugénol possédait un pouvoir antiagrégant plaquettaire plus puissant que l'aspirine [45] (jusqu'à 5 fois supérieur selon certaines études)[46]. L'aspirine est prescrite pour ses propriétés antiagrégantes à dose minimum de 75mg. L'huile essentielle de clou de girofle, quant à elle, est utilisée à raison de 3 gouttes par jour en moyenne. Ce dosage correspond à environ 65mg d'huile essentielle, soit 52mg d'eugénol.

A la posologie recommandée dans le cadre d'un conseil officinal, un risque d'inhibition de l'agrégation plaquettaire est possible avec l'H.E de clou de girofle. Il conviendra donc de faire preuve de vigilance envers les personnes traitées par un anticoagulant ou un antiagrégant plaquettaire.

c- Les éthers

Il s'agit en fait de phényléthers, du fait de la présence d'un cycle benzénique. Un exemple de phényléther est le méthyl-eugénol de la figure 11 :

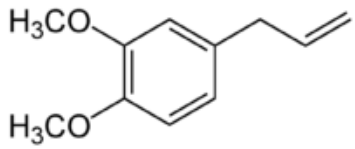


Figure I.11: Méthyleugénol

Bien qu'en général ces composants apportent des propriétés intéressantes aux huiles essentielles, dans le cas du méthyleugénol, sa concentration devra être inférieure à 0,5% afin de minimiser les risques d'irritations et d'allergies cutanées.

d- Les esters aromatiques

Un ester est le produit de la combinaison chimique d'un alcool aromatique et d'un acide. L'ester d'une huile essentielle proviendra en général de l'alcool qu'elle contient [40].

Dans le cas de l'H.E. de clou de girofle, l'ester est l'acétate d'eugényle (figure 12), issu de l'eugénol.

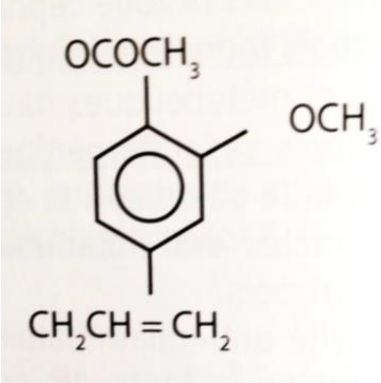


Figure I.12: Formule de la molécule d'acétate d'eugényle

Un autre exemple d'ester aromatique est le salicylate de méthyle, qui lui est présent en très petite quantité dans l'huile essentielle (<1%) [38].

Ce sont des molécules antispasmodiques musculotropes et neurotropes. Au même titre que l'eugénol, l'acétate d'eugényle possède également des propriétés antibactériennes.

Mais c'est surtout un stimulant général, très utile en cas de dépression hivernale par exemple [37].

e- Autres composants

Bien que présents en faible quantité dans l'huile essentielle de clou de girofle, ces composants renforcent l'action des constituants, révélant une synergie d'action.

f- Les Aldéhydes aromatiques

L'oxydation de l'eugénol aboutit à la formation d'un aldéhyde aromatique : la vanilline. C'est par le biais de ce procédé que l'arôme artificiel de la vanille a été synthétisé durant de nombreuses années.

g- **Les oxydes sesquiterpèniques**

Ces molécules sont issues de l'oxydation des sesquiterpènes, et sont peu représentées dans les huiles essentielles. Leurs propriétés restent mal connues, mais il s'agirait de molécules anti-inflammatoires et faiblement anxiolytiques [37]. Parmi elles, l'oxyde de caryophyllène qui est présent dans l'H.E. de clou de girofle (<1%).

I-10.Caractérisation des huiles essentielles

I-10-1. Caractéristique organoleptiques

Les Caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur, odeur, gout) étaient autrefois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.

I-10-2. Caractéristiques physicochimiques des HE

Les HE sont caractérisées par leurs propriétés physiques (densité, indice de réfraction, taux d'humidité,…) ainsi que par leurs propriétés chimiques (pH, indice d'acide, d'ester, d'iode) permettant d'évaluer la nature des composés organiques (acide, ester, alcène) présents dans l'essence.

Ces normes ont été déterminées par plusieurs organisations connus à l'échelle mondiale comme :

ISO : International Standard Organisation.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AOAC: Association of Official Agricultural Chemist.

a- Rendement en huile essentielle

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

RHE = M'/M.100

RHE : rendement en huile essentielle des clous de girofle ;

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

M : masse des clous de girofle broyés en gramme.

b- La mesure de la densité

La densité (la masse volumique) est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume. C'est le rapport entre un certain volume de l'huile essentielle et la masse de ce même volume ; la densité est ainsi obtenu par g /cm3.

c- Indice de réfraction

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

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

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



Figure I.13: Réfractomètre.

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

d- Mesure de pH :

Le pH l'abréviation de 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

e- Indice d'acide Ia :

C'est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution Ethanol titrée d'hydroxyde de potassium, c'est-à-dire la mesure de l'indice acide réalisée par titrage.

f- . Indice de saponification Is :

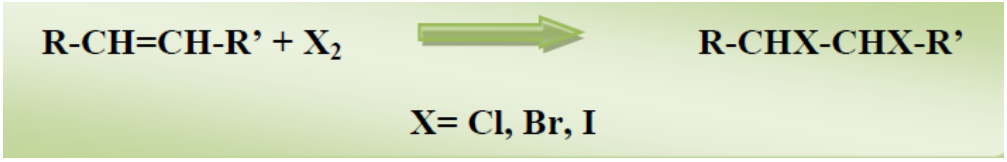
Indice de saponification représente la quantité de potasse (KOH) ou de la soude (NaOH) en mg nécessaire pour saponifier un gramme de l'huile essentielle.

Is = ((V0-V1) * M * N) / m

g- Indices d'iode Ii

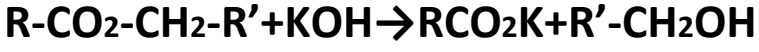
L'indice d'iode est le nombre de gramme d'iode que peuvent fixer les doubles liaisons de 100 g d'huile, quel que soit le réactif halogène utilisé.

Les liaisons éthyléniques fixent les halogènes d'après la réaction suivante :



h- Indice d'ester Ie

L'indice d'ester est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique des esters contenus dans 1g d'HE.



i-Spectroscopie infrarouge :

La spectroscopie IR est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. Comme pour toutes les techniques de spectroscopie, elle peut être employée pour l'identification de composés ou pour déterminer la composition d'un

échantillon. Les tables de corrélation de spectroscopie infrarouge sont largement présentes dans la littérature scientifique.

L'IR se situe entre 2 µm et 50 µm en longueur d'onde, mais on utilise dans ce domaine les nombres d'ondes notés ϋ, exprimés en cm^{-1}[47]

j- **Chromatographie en phase gazeuse(CPG)**

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative.

L'échantillon est injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de Gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile est une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte.

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

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

k- Activité antioxydant

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité de résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, àla capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles($OH^{\bullet}$) et superoxydes ($O^{\bullet}_2$) **[48]**.

Les antioxydants sont des molécules qui aident le corps à lutter contre les radicaux libres en les neutralisant, afin qu'ils deviennent inoffensifs **[49],** ils peuvent être classés en deux groupes selon le niveau de leur action : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires.

k-1.Les antioxydants primaires

Ils sont appelés également les antioxydants vrais ou antioxydants radicalaires, sont des molécules (notées AH) capables d'interrompre la chaine auto catalytique de l'oxydation en bloquant les radicaux lipidiques $R^{\bullet}$ et $ROO^{\bullet}$ par transfert d'un atome d'hydrogène pour reformer RH et ROOH. De la même manière, ils peuvent transformer les radicaux $RO^{\bullet}$ en ROH, bloquant ainsi la formation des aldéhydes **[50]**.

k-2.Les antioxydants secondaires

Ils sont appelés aussi préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des molécules exogènes; des substances décomposant les hydro-peroxydes en alcools, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou des disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV **[51]**. Contrairement aux enzymes antioxydants, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes **[52]**.

k-3. Les sources des antioxydants

a-Sources synthétiques

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyper-lipoprotéinémiques, les β-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes (Figure.14) [53].

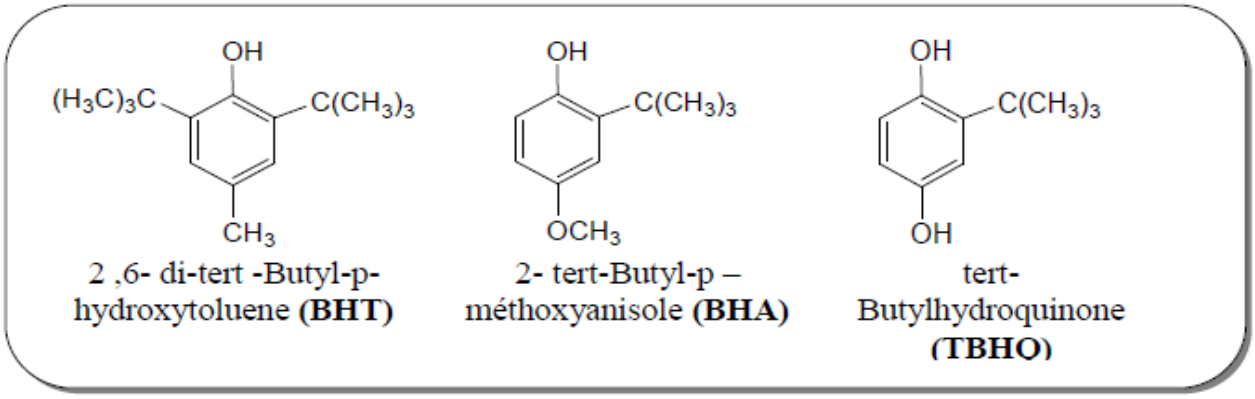


Figure I.14: Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.

b-Sources naturelles

Les antioxydants d'origine alimentaire sont nombreux, certains sont liposolubles comme : tocophérols ; β carotène ; lycopène, d'autres sont hydrosolubles comme l'acide ascorbique ; et d'autre sont plus hydrosolubles que liposolubles comme les polyphénols.

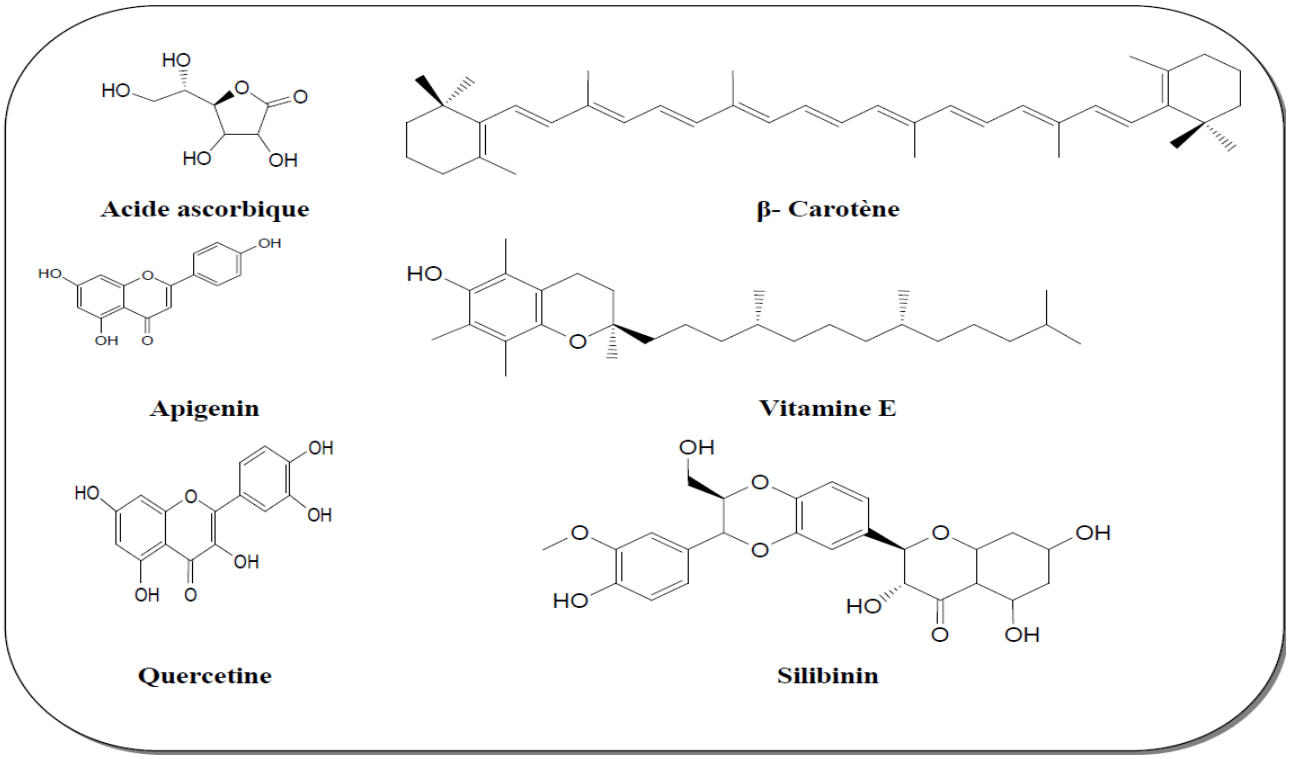


Figure I.15 : Structures chimiques des antioxydants naturels.

I-10-3. Caractérisation biologique: Activité antimicrobienne

a- Introduction

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes, bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus **[54,55]**. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave **[56]**.

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes au niveau économique. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique **[57]**.

b- **La diversité du monde microbien**

b-1. Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires et procaryotes présents dans tous les milieux. La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique. Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 2 µm et, jusqu'au début du XXIe siècle, les spécialistes considéraient que les plus petites mesuraient 0,2 µm, mais il existe des « ultramicrobactéries », y compris en eau douce **[58]**.

Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées.

Pour distinguer entre les bactéries au microscope optique, une méthode importante et largement utilisée en bactériologie, c'est "la coloration de Gram". Elle consiste à traiter des bactéries fixées à la chaleur, par un colorant basique (violet de gentiane) puis une solution iodo-iodurée (mordançage), toutes les cellules se colorent en violet. Soumises ensuite à l'action de l'alcool éthylique elles se répartissent en : cellules qui conservent la coloration violette dites à **gram positif** et qui sont décolorées, appelées à **gram négatif**. Pour mieux distinguer ces deux catégories, le frottis bactérien est finalement traité par de la fuchsine basique, les bactéries à gram négatif sont roses et celles à gram positif restent violettes **[59]**.

Après leur réaction avec les différents colorants utilisés par cette méthode, les bactéries se divisent en deux groupes majeurs : bactéries à gram positif (colorées en violet), bactéries à gram négatif (colorées en rose). Cette distinction de réponse à la coloration de gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à gram négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries à gram positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir **(Fig16 ; 17) [59,60]**.

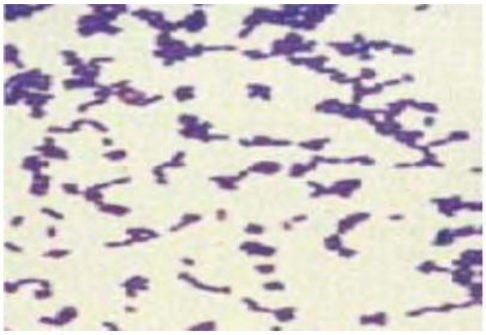


Figure I.16: Gram positif.



Figure I.17 : Gram négatif.

b-1-1. Bactéries à gram négatif

a-Escherichia coli

Le genre Escherichia fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, l'Escherichia coli, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux. La presque totalité des souches d' l'Escherichia coli sont pas pathogènes puisque cette bactérie est un hôte normal de l'intestin des mammifères **[61]**. L'Escherichia coli est le seul qui soit sans équivoque toujours d'origine fécale et, à ce titre, il est de plus en plus considéré comme l'organisme indicateur spécifique d'une pollution fécale.

b- Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu, est une bactérie gram-négative du genre pseudomonas. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés) **[59]**. Est une cause rare mais connue de septicémie néonatale et d'une forme de méningite à évolution grave, provoquant une mortalité de 10 à 80 %. Plusieurs infections ont été mises en rapport avec la consommation d'aliments pour nourrissons.

b-1-2. Bactéries à gram positifs

a-Staphylococcus aureus

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grecstaphylos), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de NaCl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Le staphylococcus est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). Staphylococcus aureus se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), gram positif et

catalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom **[58]**.

b-Enterococcusfaecalis

Enterococcusfaecalis est une bactérie commensale à gram positif, habitant dans le tube digestif des humains et d'autres mammifères.

Comme d'autres espèces du genre Enterococcus, E.faecalispeutcauser des infectionsmort elles chez l'homme et le singe, particulièrement dans un environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité et au risque nosocomial. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin **[62]**.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II- Matériels et méthodes

II-1.But de l'étude

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire de biologie de l'université de Médéa. Son objectif est l'étude des propriétés physicochimiques des huiles essentielles de clou de girofle ainsi que l'étude de ses propriétés antibactériènnes.

Notre travail a consisté, dans un premier temps, à extraire l'huile essentielle de clou girofle par hydrodistillation ensuite à effectuer son analyse par les différentes méthodes de caractérisation. Une partie de cette caractérisation a été réalisée aux laboratoires physico-chimique et microbiologique du groupe SAIDAL de Médéa.

II-2.Le matériel végétal

Le matériel végétal, clou de girofle, a été acheté du marché de la ville de Médéa

II-3. Matériels et produits utilisés

Matériels	Produits
- Pilon et mortier - Bécher - Erlenmeyer - Réfrigérant - Balance - Ballon - Pierres ponces - Chauffe ballon - Ampoule à décanter - Balance - Agitateur magnétique - Pycnomètre - Réfractomètre - Papier pH - Etuve - Pipette - Rotavapeur - Burette - Spectrophotomètre UV-visible - Spectrophotomètre IR - Papier filtre - Boites à Petrie - Tubes essais - Seringue	- Girofle - Eau distillé - Chlorure de sodium - Diéthyl éther - Cyclohexane - Sulfate de magnésium anhydre, $MgSO_4$ (s) - Phénolphtaléine - solution de KOH - DPPH° (M=394,3 g/mol) - Ethanol - TWEEN 80

II-4. Procédé d'extraction

a- Technique d'hydro-distillation

On fait piler dans un mortier 30 g de clous de girofle à l'aide du pilon. On Introduit la poudre obtenue dans un ballon de 500 ml. On ajoute 200 ml d'eau distillée et 3 grains de pierres ponces, puis on réalise le montage de la figure II.1, ci-dessous, correspondant à l'hydrodistillation.

On fait circuler l'eau froide dans le réfrigérant à eau, puis, à l'aide du chauffe-ballon, On porte le mélange à ébullition, ce qui entraine la formation d'une vapeur qui va entrainer les constituants volatiles, ces vapeurs s'élèvent et passent dans le réfrigérant qui est constamment refroidi.

Au contact des parois du réfrigérant, les vapeurs chaudes se condensent et s'écoulent au goutte à goutte dans un erlenmeyer où elles forment le distillat. Ce dernier est liquide de couleur blanchâtre contenant de l'eau et de fines gouttelettes d'HE en suspension.

On fait fonctionner l'hydrodistillation jusqu'à recueillir 100 à 120 ml de distillat puis on stoppe le chauffage. Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter,

1- Ballon
2- Chauffe ballon,
3- Thermomètre
4- Réfrigérant
5- Erlenmeyer
6- Mélange réactionnel
7- Distillat
8- Support élévateur,

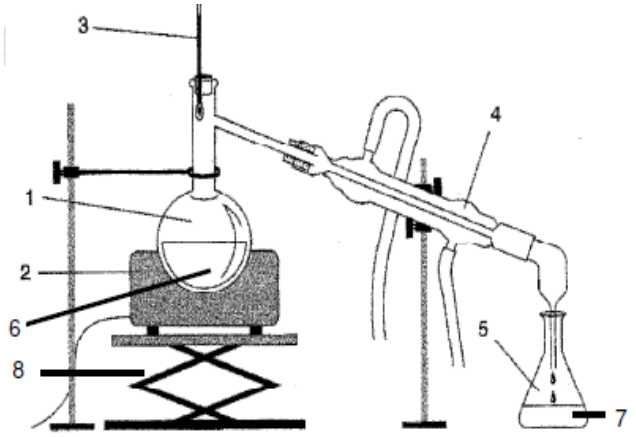


Figure II.1 : Montage d'hydrodistillation

b- Relargage

Le distillat ainsi obtenu ne permet pas la récupération de l'HE par simple décantation, il faut effectuer un relargage.

On ajoute au distillat 40 mL de solution saturée de chlorure de sodium (sel de cuisine) puis on ferme l'ampoule à décanter et on agite.

c- Extraction liquide-liquide

On verse 15 mL de diéthyléther ou de cyclohexane dans l'ampoule à décanter contenant le distillat.

On bouche l'ampoule puis on agite 2 minutes en effectuant un dégazage de temps à autre puis on laisse décanter.

On vide la phase aqueuse puis la phase organique dans un bécher. On remet la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter et on procède à une 2ème extraction en ajoutant 15 mL de cyclohexane. On vide la phase organique dans le même bécher.

d- Séchage de la phase organique

Il a pour but d'éliminer les traces d'eau encore présentes dans la phase organique. On ajoute pour cela des cristaux d'un agent desséchant, le sulfate de magnésium anhydre, $MgSO_4$ (s).

Le sulfate anhydre capte les traces d'eau qui pourraient encore rester dans la phase organique. Enfin on effectue une filtration et on récupère la phase organique.

Après filtration de la solution on effectue l'évaporation du solvant d'extraction avec le rotavapeur et récupération de l'huile essentielle de clou de girofle (35°C pour le diéthyléther et 80°C pour le cyclohexane).

L'huile finale obtenue est conservée dans des flacons en verre opaque à une température de 4°C

Les expériences sont réalisées en faisant varier le volume du solvant d'extraction ainsi que la masse de clou de girofle utilisée au départ.

II-5. Caractérisations

II-5-1. Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (Me) et la masse de la matière végétale utilisée séché (Mv). Il est donné par la formule suivante:

R%= (Me / Mv) * 100

R%: Rendement en %.

Me : Masse d'huile essentielle extraite

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

II-5-2.Taux d'humidité

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

On prend une quantité de 20g en poudre de clou de girofle et on met dans une étuve à 105 °C durant 2h

On calcule le pourcentage d'eau contenue dans la poudre par la formule :

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

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

m_0 : Masse de l'échantillon prise avant séchage en g.

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

II-5-3. La densité

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

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

m_0 : la masse du pycnomètre vide (en g).

m_1 : la masse (en g) du pycnomètre, remplie d'eau distillée.

m_2 : la masse (en g) du pycnomètre, remplie de l'huile.

D : la valeur de la densité

II-5-4. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est largement supérieur à 1 pour les huiles essentielles, sa mesure sera mentionnée avec 3 ou 4 chiffres après la virgule. L'appareil le plus couramment utilisé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre d Abbe (figure II.2), les indices de réfraction sont déterminés dans l'intervalle 1,300 à 1,700.

Pour effectuer la mesure, le réfractomètre est préalablement étalonner par l'eau distillée dont l'indice de réfraction est connu (Ir (eau) = 1,335) à 20°C.

On fait déposer ensuite quelques gouttes d'HE entre les deux faces des prismes. A l'aide de l'oculaire et le bouton de réglage, l'interface entre la zone sombre et la zone éclairée est amené au centre du réticule. Les irisations sont supprimées pour obtenir une ligne nette entre les deux zones. Puis la valeur de l'indice est notée par l'échelle de lecture.



II-2. Refractomètre

II-5-5. Mesure du pH

On met quelques gouttes d'H E sur un bout de papier pH (figure II.3), après le changement de la couleur du papier on la compare avec une gamme de couleurs qui varient selon le pH. La mesure du pH est réalisée aussi à l'aide d'un pH mètre numérique (figure II.4).



Figure II.3. Papier pH



II-4. pH mètre

II-5-6. Indice d'acide Ia

On introduit 0,5 g d'HE dans un erlenmeyer propre et sec, on ajoute 5ml d'éthanol avec la pipette et quelques gouttes de phénolphétaléine.

On dose la solution obtenue avec du KOH contenue dans la burette. Après le virage de la couleur vers le rose, on arrête le titrage et on note le volume de la solution de KOH utilisée (figure II.5).



Figure II-5. Détermination de l'Ia par titrage

L'indice d'acide est calculé par la formule :

Ia = (V * N * M) / m

M: masse molaire de KOH (56.1 mol/l).

V : le volume, en millilitres, de solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage.

N : normalité de la solution de KOH (0.1N).

m : la masse, en grammes, de la prise d'essai.

II-5-7. Indice d'ester I_E

L'indice d'ester, est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile. **(AFNOR).**

•Principe :

Hydrolyse des esters par chauffage dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanoïque titrée d'hydroxyde de potassium et dosage de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

•Réactifs :

Ethanol à 96% volumique.

C (KOH)= 0.5 mol/l.

C (H Cl)= 0.5 mol/l.

•Mode opératoire :

-Introduire dans un ballon 0.5 g d'huile essentielle, ajouter à l'aide d'une burette 25ml de la solution d'hydroxyde de potassium KOH ainsi que des fragments de pierre de ponce;

-Adapter un tube en verre au réfrigérant puis placer le ballon sur le bain d'eau bouillante pendant une heure;

-Laisser le ballon refroidir, démonter le tube, ajouter 20 ml d'eau puis 5 gouttes de solution de phénophtaléine, comme indicateur et enfin titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec une solution d'acide chlorhydrique.

L'indice d'ester est donné par la formule suivante:

$$\mathbf{I_E = M \,.\, C\, /m\, (V_0 - V) - Ia}$$

M : Masse molaire de KOH (56.1 g :mol)

C : concentration molaire (0,5 M)

V_0: le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique dans le test blanc.

V: le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisée.

m: la masse en gramme de prise d'essai.

Ia: la valeur d'indice d'acide.

II-5-8. Détermination d'indice de saponification

C'est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation et à la saponification des esters, présents dans 1g de substance. **(AFNOR).**

L'indice de saponification est donné par la formule suivant :

$$\mathbf{I_S = I_A + I_E}$$

II-5-9. Analyse infrarouge à transformée de Fourier FTIR

Les spectres infrarouges ont été obtenus grâce à un spectrophotomètre FTIR- 8400 de marque SHIMADZU , à partir de pastilles de KBr anhydre renfermant environ 1 % en masse de poudres d'échantillons constituées de poudre de clou de girofle.

Dans un premier temps on effectue la préparation de l'échantillon en pastille (figure II.6). L'échantillon en poudre est incorporé à un support qui n'absorbe pas dans l'IR moyen, c'est le bromure de potassium KBr.

Un mélange homogène à l'état 1% de poudre / poudre KBr est préparé puis déposé dans un moule qui est soumis à une très forte pression dans une presse hydraulique (figure II.7). Il est ensuite extrait du moule sous forme d'une pastille.



Figure II.6. Moule contenant la pastille



Figure II.7.Presse hydraulique de laboratoire

La pastille est placée dans le compartiment de mesure du spectre. Le signal enregistré par le détecteur donne le spectre IR de l'échantillon (figure II.8).

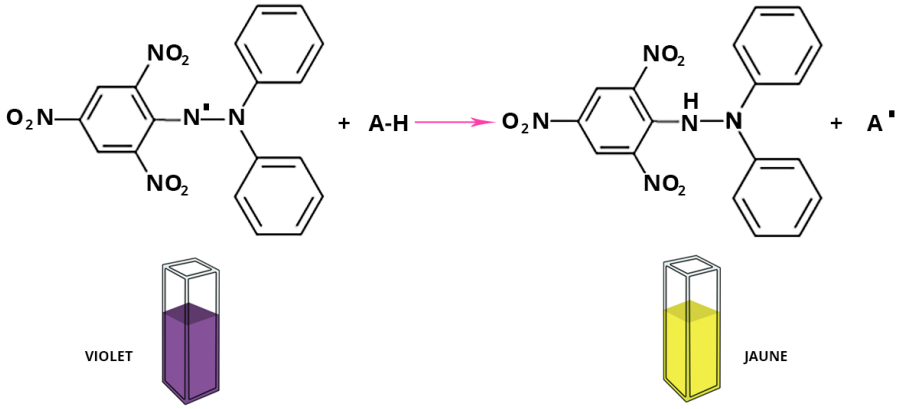


Figure II.8 Spectrophotomètre FTIR

II-5-10. Activité antioxydante

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire

le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle.



La réduction du DPPH° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 517 nm (λ max DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydants.

Mode opératoire

Le pouvoir antiradicalaire a été testé en utilisant le DPPH. Cette dernière comprend les étapes suivantes :

- On préparé La solution de DPPH par dissolution de 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol.
- On prend des volumes Différents d'huile essentielle de clou de girofle dans des tubes à essai (20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl, 150µl, 200 µl).
- Dans chaque tube, on ajoute l'éthanol jusqu'à un volume total de 1000µl (1ml).
- On ajoute 1ml de solution de DPPH à chaque tube, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution éthanolique contenant le radical libre DPPH (2,2-Diphényl-1-picryhydrazyle) et l'apparition de la couleur jaune qui correspond à la forme non radical (DPPH-H).

  Après agitation, les tubes sont laissés dans l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes.

  Les lectures de l'absorbance sont effectuées au spectrophotomètre (UV-visible) à longueur d'onde λ=517nm.

  Le blanc est préparé dans les mêmes conditions citées en remplaçant la quantité d'HE par l'éthanol.

L'acide gallique est un antioxydant de référence utilisé comme témoin positif.

A%= Abs control –Abs échantillon / Abs control x 100

A% : Rapport d'activité des radicaux libres.

Abs control : L'absorbance de la solution blanc.

Abs échantillon : L'absorbance de l'échantillon.

IC50 : Concentration en antioxydant nécessaire pour réduire 50% du DPPH initial

Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

II-5-11. Activité antibactérienne

- Mode opératoire

a) Préparation de l'inoculum

- Réaliser une suspension bactérienne à partir de culture jeune de bactéries (18-24h), prélever quelques colonies isolées et incorporer dans 5 ml d'eau physiologique.
- Agiter et homogénéiser la suspension manuellement.
- 4 tubes correspondant aux 4 souches utilisées ont été préparés
- Mesurer la densité des suspensions bactériennes à l'aide de densitomètre (0.5 Mac Farland) pour chaque suspension.
- Incubé les suspensions bactériennes dans l'étuve à 37°C pendant 20 à 25 mn.

b) Préparation des milieux de culture

- Liquéfier les milieux de culture gélosés dans un bain marie à 95°C et garder la surfusion dans une étuve à 45°C.
- Sous hotte à flux laminaire, verser aseptiquement les milieux de culture gélosés sur les boites de pétrie en raison d'épaisseur 4mm de boite pétrie.
- Laisser refroidir et solidifier à température ambiante et conserver dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

c) Ensemencement

- Imbiber aseptiquement un écouvillon avec la suspension bactérienne.
- Essorer l'écouvillon en pressant fermement et entourant sur la paroi interne du tube, afin de décharger du surplus de suspension.

- Ensemencer aseptiquement une boite de Pétrie en frottant délicatement l'écouvillon sur la surface de la gélose en stries serrées, répéter l'opération trois fois, en entourant la boite à 60°C de façon à croiser les stries, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

d) Dépôt des disques

- Prélever aseptiquement un disque stérile de 9 mm avec une pince stérile.
- Mettre en contacte le bout de disque avec huile essentielle pure, qui va être absorbée par le disque par capillarité.
- Déposer le disque ainsi imbibé d'huile essentielle à la surface de la gélose, au centre de boite de Pétrie.
- Incuber les boites à 37°C durant 24 h.

e) Lecture

- Observer l'absence ou la présence de la zone claire autour des disques.
- Mesurer avec précision le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition. L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Mutai et al (2009) [63]. Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 5 classes:

- Très fortement inhibitrice : D ≥30 mm.
- Fortement inhibitrice : 21 mm ≤ D ≤ 29 mm.
- Modérément inhibitrice : 16 mm ≤ D ≤ 20 mm.
- Légèrement inhibitrice : 11mm ≤ D ≤16 mm.
- Non inhibitrice: D < 10 mm.



Figure II.9 Les milieux spécifiques des souches bactériennes

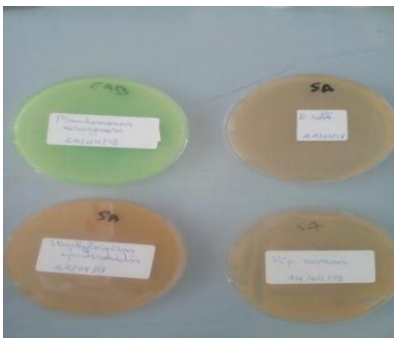


Figure III.10. Boites à pétries contenants les souches bactériennes

Chapitre III

Résultats et interprétation

Chapitre III : Résultats et interprétations

III-1.Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Les propriétés organoleptiques de notre huile essentielle aspect, couleur, odeur sont résumés dans le tableau suivant:

Tableau 1 : Propriétés organoleptiques de l'H E du clou de girofle

	Aspect	**Couleur**	**Odeur**
Norme AFNOR	Liquide mobile limpide parfois, légèrement visqueux	Jaune très clair	Epicée caractéristique de l'eugénol
Huile Essentielle Etudiée	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Epicée

On remarque que notre huile essentielle obtenu en utilisant la technique d'hydrodistillation présente selon le tableau 1 des caractéristiques : aspect, couleur et odeur qui sont les mêmes décrits par les normes AFNOR.

III-2.Taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau [63]. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être faible.

Après 2 heures de séchage, le poids se fixe à 17,79g pour une masse de 20g initialement utilisée.

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

$m_0 = 20$ g.

$m_1 = 17{,}79$g.

H(%) = 11 ,05 %

Les résultats d'analyse de notre échantillon montrent que la teneur en eau est de 11,05%, Cette valeur est légèrement élevée ; cela n'influe pas beaucoup sur sa bonne conservation.

Un taux d'humidité assez élevée influe négativement sur la bonne conservation de l'HE, sur la durée d'extraction et donc sur le rendement.

III-3. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles. Ci-dessous quelques propriétés sont déterminés.

a- Rendement de l'extraction

Le rendement en HE est influencé par plusieurs paramètres parmi lesquels citons : la teneur en eau, la nature de la plante, l'origine, la période de récolte, la durée de séchage et la technique d'extraction utilisée.

La plante des régions dont le climat est sec donne un rendement assez élevé en HE, vu qu'elle contienne une teneur faible en eau.

Les résultats obtenus, en faisant varier quelques paramètres tel que : la masse de la plante utilisée, le volume ainsi que la nature du solvant d'extraction, sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats des rendements en HE

Expériences	Solvant d'extraction	Volume du solvant d'extraction	Masse de clou de girofle utilisée	Masse sèche	Masse de l'H.E obtenue	Rendement
1	Cyclohexane	20	30	26.7	2,25	8.43
2	Diéthyléther	20	30	26.7	2,29	8.57
3	Diéthyléther	30	30	26.7	2,34	8.76
4	Diéthyléther	40	30	26.7	2,42	9.06
5	Diéthyléther	30	15	13.35	1,15	8.61

Le rendement est calculé par rapport à la masse de la matière végétale sèche. Le tableau 2 montre des valeurs de rendements inférieurs à 10 % alors que le clou de girofle renferme entre 15 à 20% d'HE [64]. Cela est peut être dû à la méthode d'extraction utilisée. L'hydrodistillation malgré qu'elle représente l'une des meilleures méthodes d'extraction donnant une HE pure, elle représente quelques inconvénients de perte en HE volatils. D'après Fadil et al [65], le rendement est influencé par le temps d'hydrodistillation, par le rapport masse matière végétale/eau ainsi que la durée de séchage de la plante, il est important d'étudier l'influence de ces paramètres sur le rendement dans de prochaines études.

Un autre paramètre qui peut être la cause de ce résultat est la nature et le volume de solvant d'extraction utilisé. D'après les résultats du tableau 2, il apparait clairement que le volume du solvant d'extraction influe sur le rendement en HE, le meilleur résultat est obtenu avec 40ml de solvant, Le volume de 20ml peut être insuffisant pour extraire toutes les gouttes d'HE qui se trouvent en suspension dans la phase aqueuse, vu que la densité de l'eugénol,

constituant principal de l'huile essentielle (environ 80%), est de 1.06 (proche de celle de l'eau) pour cela la séparation des 2 phases organique et aqueuse, ne peut pas se faire par une simple décantation.

Nous avons procédé au relargage pour séparer les deux phases. Le relargage est une opération qui consiste à rajouter du NaCl au mélange afin de permettre la récupération de l'Eugénol à travers des 2 phases.

L'ajout de NaCl qui est soluble dans l'eau, augmente la densité de la phase aqueuse qui va se trouver enfin au dessous de la phase organique par différence de densité.

L'Eugénol étant soluble dans le solvant d'extraction (cyclohexane, diethylether), ce dernier est rajouté au mélange qui est bien agité pour permettre la récupération des molécules d'Eugénol qui sont dispersées même dans la phase aqueuse. La densité des solvants d'extraction, cyclohexane et diethylether, est inférieure à celle de la phase aqueuse, donc la phase organique va se trouver enfin au dessus de la phase aqueuse ce qui permettra une bonne séparation par décantation.

Lorsque le volume du solvant d'extraction est assez suffisant et pour une expérience réalisée dans de bonnes conditions on peut atteindre un rendement compris entre 15 à 20% d'HE de clou de girofle

Le rendement obtenu pour une masse de 15 g de clou de girofle utilisée initialement est de 8.61%, celui obtenu avec 30g de clou de girofle pour le même volume de solvant d'extraction est de 8.78 %. On remarque que le rendement n'est pas trop influencé par la masse de plante utilisée initialement mais beaucoup plus par le volume de solvant qui doit être suffisant pour extraire toute la quantité d'HE se trouvant dans la masse de plante utilisée.

b- La densité

La densité est le rapport de la masse d'un volume d'un composé sur la masse d'un même volume de corps de comparaison. Le corps de comparaison pour les liquides c'est l'eau.

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

m_0 : la masse du pycnomètre vide (en g).

m_1 : la masse (en g) du pycnomètre, remplie d'eau distillée.

m_2 : la masse (en g) du pycnomètre, remplie de l'huile.

d : la valeur de la densité

$m_0 = 47,71g$.

$m_1 = 53,71$ g

$m_2 = 54,25$ g

d = 1,09

La densité de notre HE est de 1,09, ce résultat est conforme aux normes de pharmacopée européenne 2008.

c- Indice de réfraction

L'indice de réfraction obtenu (Tableau 3), est conforme avec les normes AFNOR généralement utilisé pour l'identification et comme un critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers.

Tableau 3: Valeur de l'indice de réfraction

	HE	**Norme AFNOR**	
		Minimum	maximum
Indice de réfraction	1 .525	1.5280	1.5346

d- Mesure de PH

En utilisant le papier pH, ce dernier change de couleur vers le jaune. En effectuant la comparaison avec une gamme de couleurs qui varient selon le pH ; on trouve que le pH de notre HE est compris entre 5 et 6.

En mesurant le pH de l'huile essentielle de clou de girofle avec le pH mètre numérique on trouve une valeur de pH = 5.78. Cette valeur indique que l'HE du clou de girofle est légèrement acide.

e- Indice d'acide Ia

Ia = (V * N * M) / m

M: masse molaire de KOH (56.1 mol/l).

N : normalité de la solution de KOH (0.1N).

m = 0,5 g.

Ia = 16,83

f- Indice d'ester

I_E= [M. C /m (V_0-V)] - Ia

M : Masse molaire de KOH (56.1 g :mol)

C : concentration molaire (0,5 M)

V_0: le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique dans le test blanc.

V: le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisée.

m: la masse en gramme de prise d'essai (0,5g).

Ia: la valeur d'indice d'acide.

V_0=2,45ml

V= 1,1ml

I_E = 28.05/0,5(2,45 – 1,1) - 16,83

I_E = 58,90

g- Indice de saponification

I_S = Ia + I_E

Is = 16,83+58,90 = **75,73**

h- Analyse infrarouge

Les spectres infrarouges ont été obtenus grâce à un spectrophotomètre FTIR de marque Shimadzu 8400, sur des pastilles de KBr anhydre renfermant environ 1 % en masse de poudre de clou de girofle.

Les spectres FTIR correspondants à la poudre de clou de girofle et l'huile essentielle extraite sont représentés sur les figures III. 1 et III.2 respectivement.

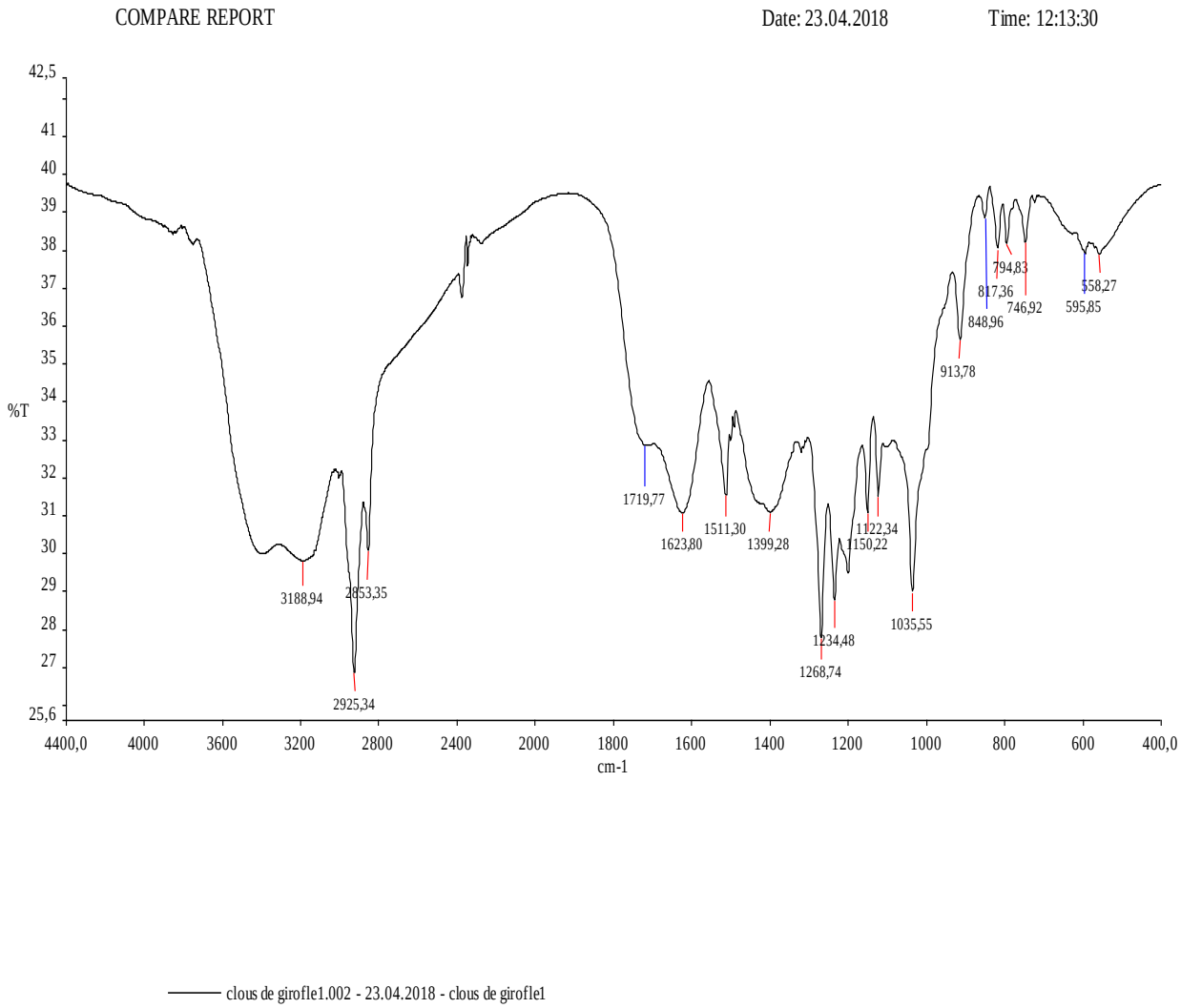


Figure III.1 Spectre FTIR de la poudre de clou de girofle

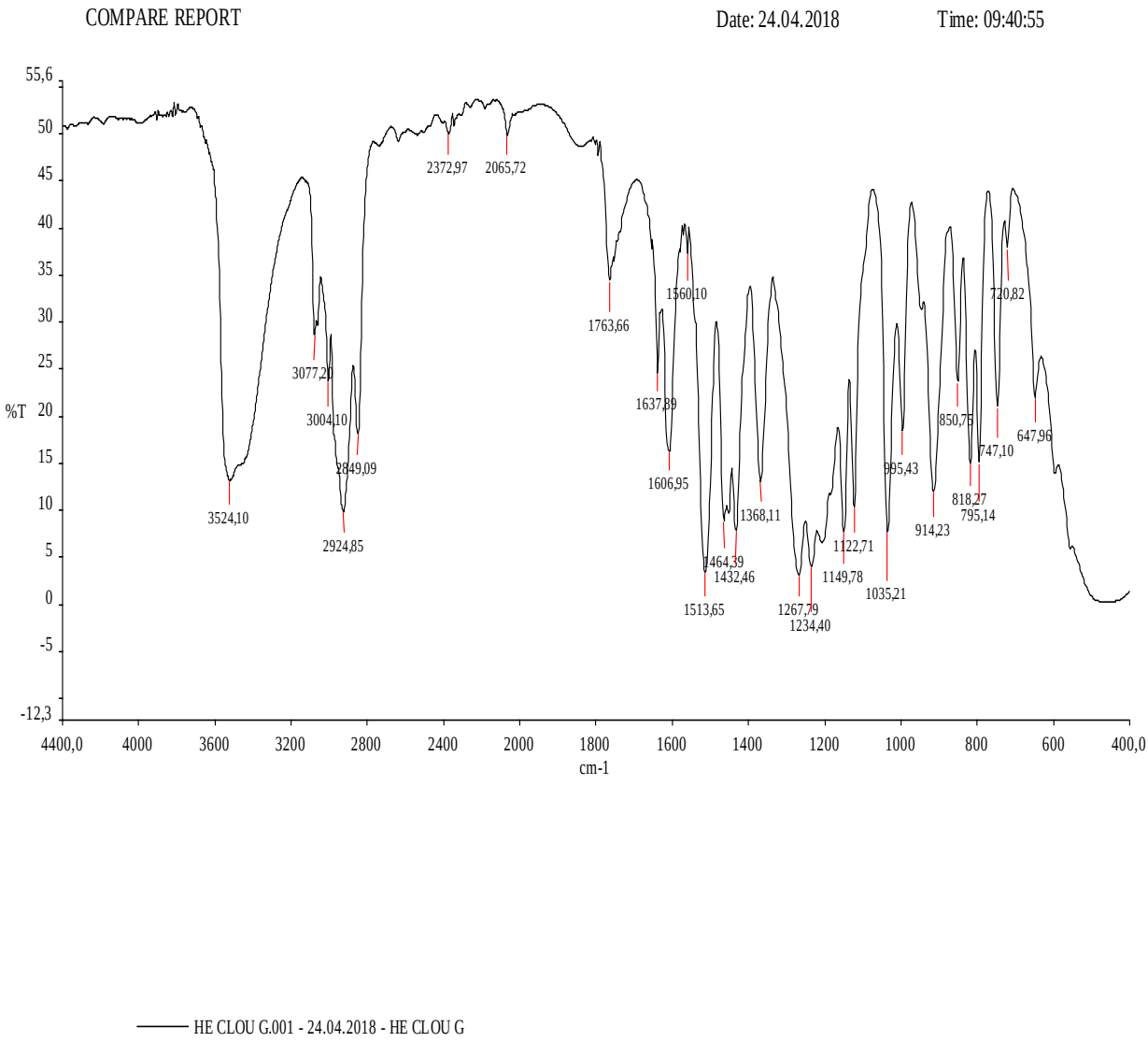


Figure III.2 : Spectre IR de HE de clou du girofle

La région infrarouge plus utile pour le type d'études que nous réalisons est comprise entre 4000 et 400 cm^{-1}. Chaque bande est caractérisée par sa fréquence, sa largeur et sa forme générale. La fréquence, ou la longueur d'onde d'absorption dépend des masses relatives des atomes, de la constante de force des liaisons et de la géométrie des atomes. La largeur de la bande est proportionnelle entre autres à la vitesse de mouvement de la molécule. Les spectres obtenus sont caractéristiques des composants présents dans l'échantillon. Ils nous fournissent de l'information sur la structure chimique et sur la conformation et la dynamique de l'échantillon étudié.

L'huile essentielle de clou de girofle contient plusieurs composés [64]:

- des sesquiterpènes : comme alpha et bêta caryophyllènes
- des esters : comme l'hexanoate d'éthyle, acétate de 2-heptanyle, Acetate d'eugénol (de 4 à 10%),
- des phénols : eugénol (75 à 85%), cis et trans isoeugénol, 4-allylphénol.
- des oxydes : oxyde de caryophyllène, époxyde d'humulène.

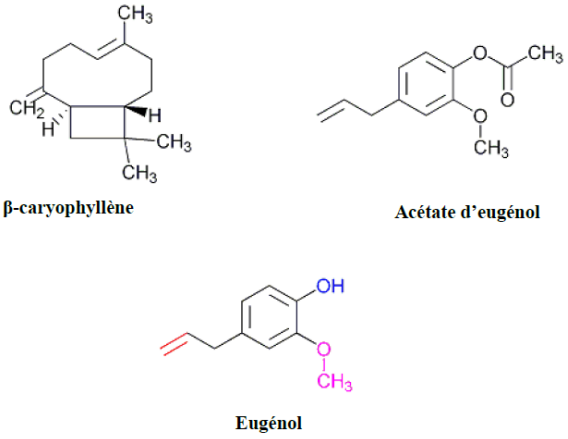


Figure III. 3. Principaux constituants de l'HE du clou de girofle [64]

L'Eugénol, constituant principal de l'HE de clou de girofle, est un composé phénolique ; il est caractérisé par la bande d'absorption caractéristique du groupement OH située à 3524 cm^{-1} sur les deux spectres correspondants à la poudre et à l'HE du clou de girofle. Cette bande large et intense caractérise la liaison hydrogène du phénol [47].

La bande d'absorption située à 2850 cm^{-1} sur les deux spectres est caractéristique du groupe méthoxy CH_3-O de l'ester; la bande située entre 1700 et 1790 caractérise le groupement C=O de l'ester.

Ces bandes d'absorption correspondent aux esters présents dans l'HE de clou de girofle en particulier l'acétate d'eugénol qui se trouve en pourcentage plus élevé en comparaison aux autres esters.

Les bandes d'absorptions entre 1625 et 1680 cm^{-1} caractérisent le groupement C=C de l'alcène des sesquiterpènes, et celles entre 1450 et 1600 cm^{-1} caractérisent le C=C aromatique de l'eugénol et de l'acétate d'eugénol ainsi que les autres composés aromatiques se trouvant en faibles pourcentages dans notre HE.

Tableau 4 : données IR de quelques groupements fonctionnels [47]

Liaison	Fonction	Nombre d'onde en cm^{-1}
C-H	Alcane	2810 – 3000
C-H	Aromatique	3030 – 3080
C-H	Alcène	3000 – 3100
O-H	Alcool	3300 – 3600
C=O	Aldéhyde et cétone	1650 – 1730
C=O	Ester	1700 – 1790
C=O	Amide	1650 – 1700
C=C	Aromatique	1450 – 1600
C=C	Alcène	1625 – 1680

i- Activité antioxydante

Le test antioxydant est réalisé en utilisant la méthode de DPPH. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 5.

- **Résultats**

Abs control est l'absorbance de solution à blanc 0,245.

A%= (Abs control –Abs échantillon / Abs control) x 100

Tableau 5. Absorbances des différents échantillons testés

Concentration de l'HE (µl/ml)	Abs échantillon	A%
20	0,230	6.1
40	0,196	20
60	0,172	29,6
80	0,144	41,1
100	0.129	47
150	0,110	55
200	0 ,090	63

Le pouvoir antioxydant du clou de girofle est bien illustré sur la courbe de la figure III.4.

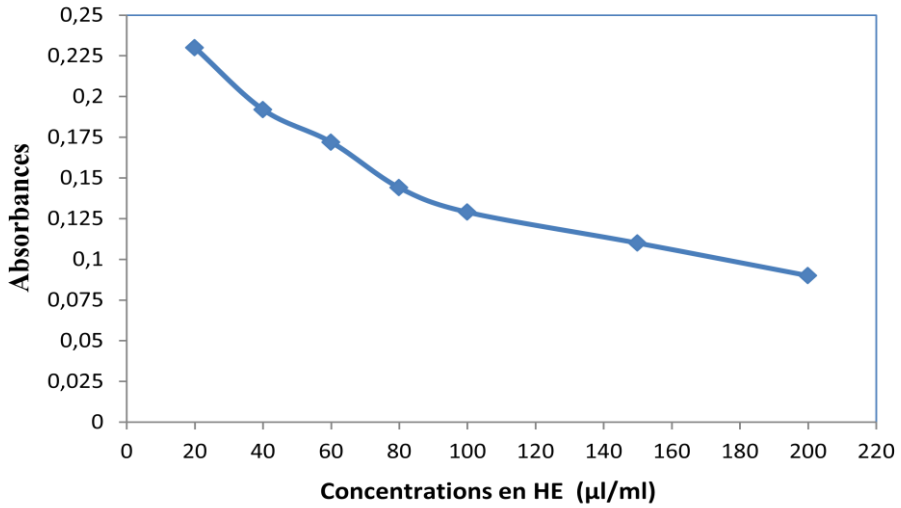


Figure III.4. Variation de l'absorbance des échantillons de DPPH en fonction de la concentration en HE de clou de girofle

Sur cette figure, il apparait clairement que le clou de girofle possède une activité antioxydante. La diminution de l'absorbance de la solution de DPPH, contenant l'HE de clou de girofle à différentes concentrations en HE, traduit la réduction du $DPPH^{\bullet}$ en DPPH-H donc la diminution de la concentration initiale de ce radical en comparaison avec le contrôle (Acide gallique). La quantité de DPPH-H formée dépend de la concentration en antioxydants.

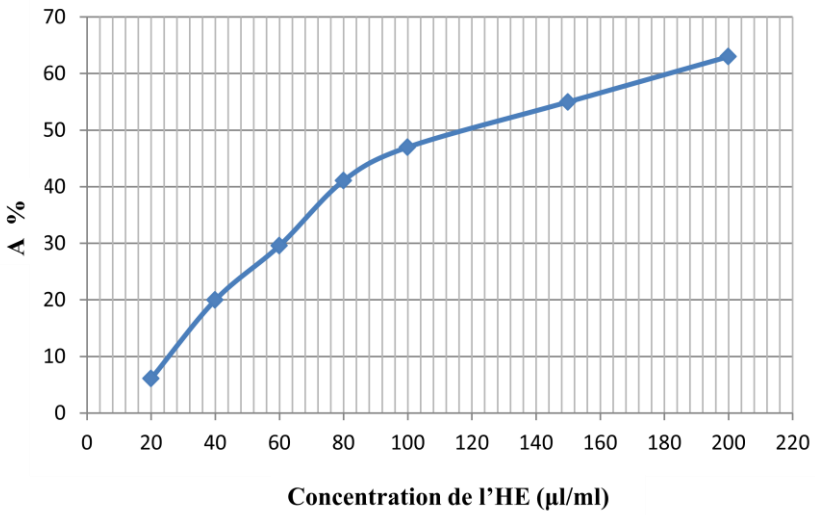


Figure III.5. Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations en HE du clou de girofle

Le IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydants requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

A partir de la courbe de variation du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration en HE de clou de girofle illustrée sur la figure III.5, on tire la valeur de l'inhibition de 50% du DDPH : IC50 = 118 µl/ml

En utilisant la masse volumique de l'HE de clou de girofle, on détermine le IC50 en mg/ml :

$m=\rho * v$ $\rho = 1.09$ g/ml

$m = 1.09 * 118 * 10^{-6} = 0.000128$ g

IC50 = 0.128 mg /ml

L'huile essentielle du clou de girofle avec un IC50 de 0,128 mg/mL montre une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide galique (0.0065 mg/ml), de la quercétine (0.0075 mg/ml) et la rutine (0.0092 mg/ml) comme c'est montré sur la figure III. 6.

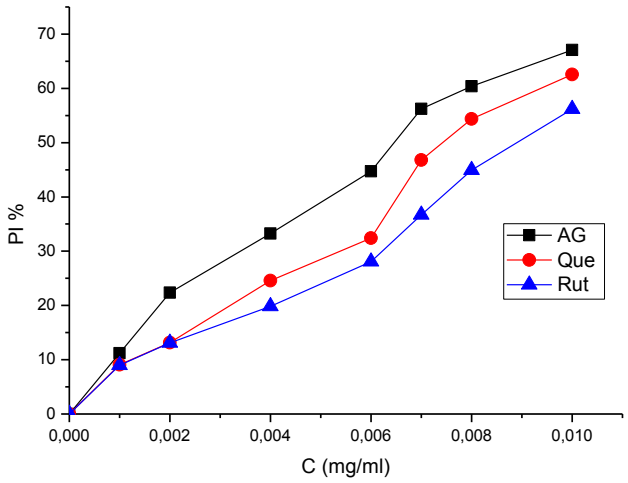


Figure III.6. Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des étalons

La propriété antioxydante de l'HE du clou de girofle explique son effet thérapeutique. Son utilisation régulière permet d'augmenter globalement la réponse immunitaire aux agressions extérieures. On l'utilise en période de convalescence, en cas de fatigue de fin d'hiver, d'épidémies, d'infections (bactéries, virus, champignons), en diffusion (avec du citron par exemple) en cas de maladie tropicale (amibiase, fièvre typhoïde, etc.) comme le paludisme ou lorsque le système immunitaire est affaibli **[**1**]**.

Une alimentation riche en antioxydants protège la personne de plusieurs maladies liées aux radicaux libres tel que : le cancer, l'arthrite, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et le diabète.

j- Activité antibactérienne

Il s'agit de déterminer le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI). La plus faible concentration se traduit par l'inhibition de la croissance visible des bactéries en utilisant la méthode de disque.

- **Etude de l'effet antimicrobien par la méthode de disque**

La méthode de disque a permis de déterminer l'action de l'huile essentielle du clou de girofle dissout dans le TWEEN 80 sur les différentes souches. Celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'HE comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des échantillons explique les variations de leurs compositions chimiques

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite du clou de girofle en utilisant le diéthyléther et celle obtenue en utilisant le cyclohexane comme solvant d'extraction a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Celle-ci permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations des différents extraits (30%, 50% et 100%) en mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques. Ces derniers représentent l'activité antimicrobienne maximale. Nous illustrons ces résultats sur la figure III-7.

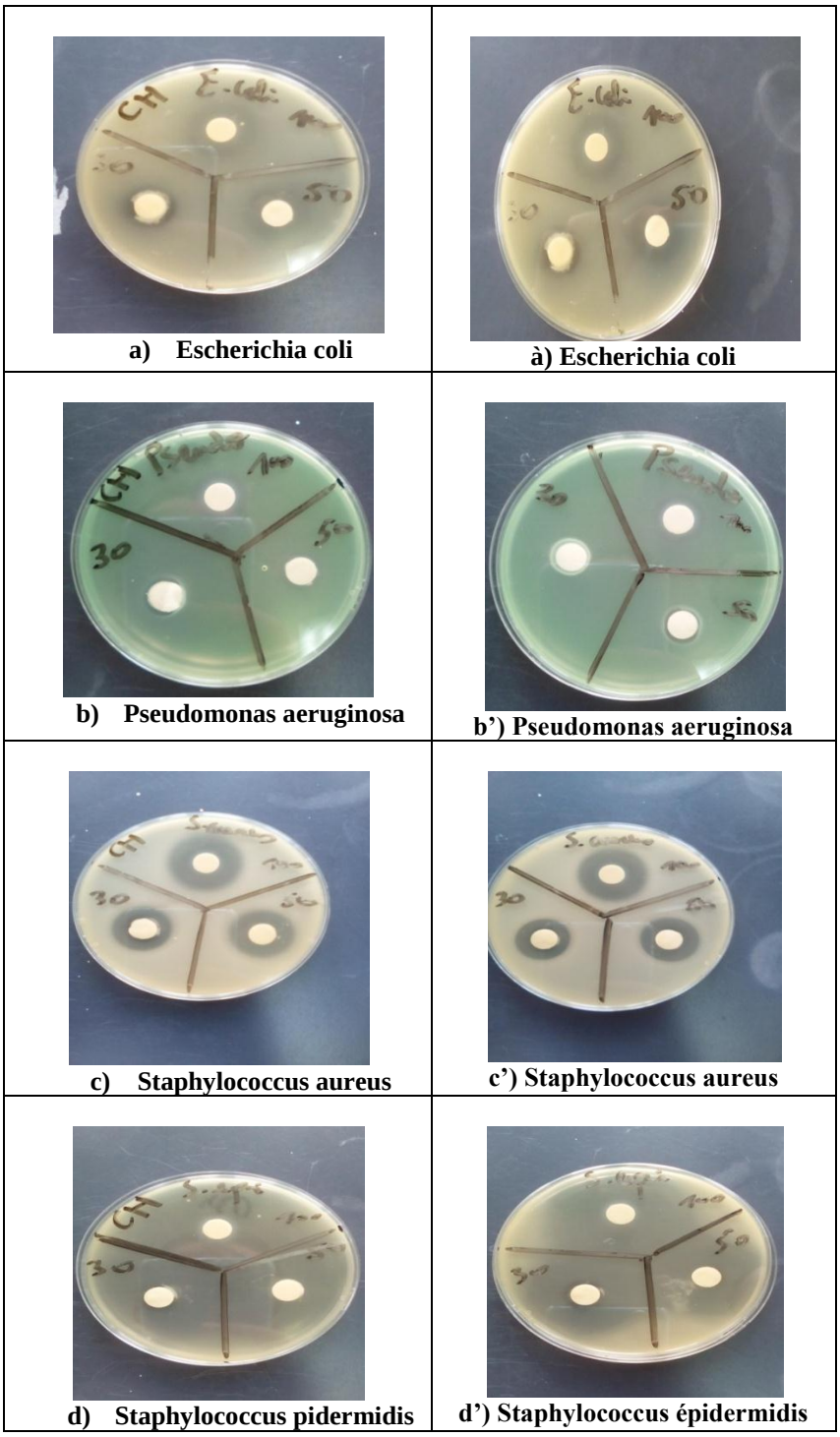


Figure III.7. Zones d'inhibition obtenues par l'action de l'HE de clou de girofle sur les souches testées à différents pourcentages dans le tween 80 : 30%, 50% et 100% en HE.
(Série : a,b,c,d : HE utilisée obtenue en utilisant le cyclohexane comme solvant d'extraction ; Série :à, b', c', d' : HE utilisée obtenue en utilisant le diéthyléther comme solvant d'extraction

Tableau 6: Valeurs des diamètres d'inhibition des souches bactériennes utilisées

Souche	Milieux de culture	Solvant d'extraction Cyclohexane		Solvant d'extraction diéthyléther	
		HE dans le Tween 80 en %	**Diamètre d'inhibition (mm)**	HE dans le Tween 80 en %	**Diamètre d'inhibition (mm)**
Staphylococcus aureus	Soja agar	30	**19**	30	**17**
		50	**22**	50	**20**
		100	**26**	100	**24**
Staphylococcus Epidermidis	Milieux 11	30	**35**	30	**32**
		50	**40**	50	**37**
		100	**53**	100	**48**
Pseudomonas aeruginosa	Cetrimide agar	30	**11**	30	**11**
		50	**13**	50	**12**
		100	**14**	100	**14**
Escherichia coli	Soja agar	30	**16**	30	**13**
		50	**19**	50	**17**
		100	**21**	100	**19**

Les différentes valeurs du tableau 6 montrent des diamètres d'inhibition supérieurs de 2 mm pour l'HE obtenue en utilisant le cyclohexane comme solvant d'extraction, en comparaison à celle obtenues avec l'HE extraite avec le diéthyléther.

Le cyclohexane, qui peut exister en traces dans notre HE, possède donc un effet antibactérien mais il reste un solvant toxique.

Il est recommandé dans une prochaine étude de tester l'effet antibactérien des solvants d'extraction avant de procéder à leurs utilisations et d'éviter l'utilisation de solvants toxiques qui peuvent rester en traces dans notre HE.

L'activité antibactériènne de l'HE de clou de girofle diffère d'une bactérie à une autre, son effet est plus important sur Staphylococcus Epidermidis en comparaison aux autres souches. Cette variation est bien illustrée sur l'histogramme de la figure III.8.

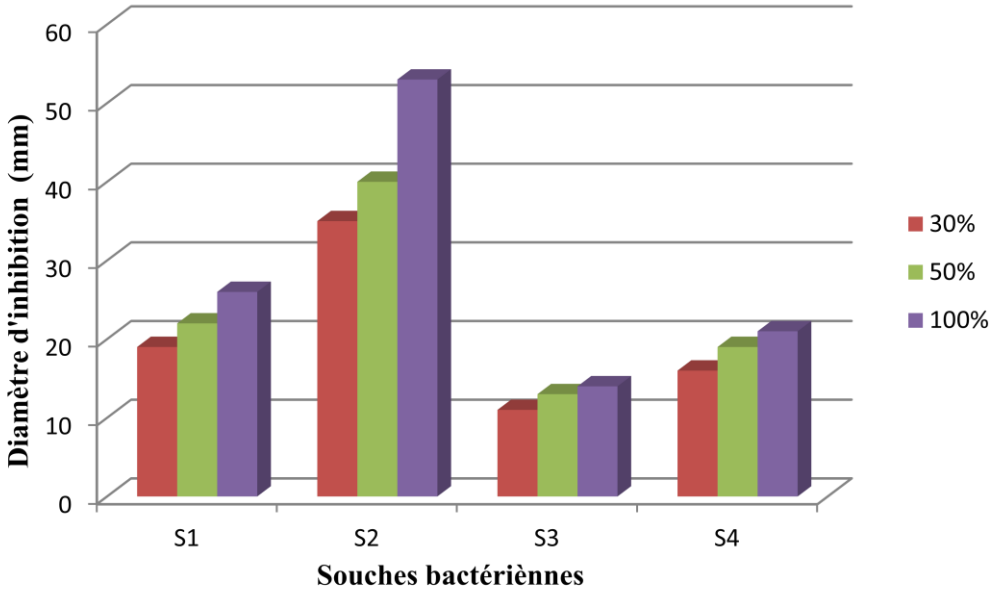


Figure III.8. Valeurs moyennes des diamètres de l'activité antibactérienne de :
S1 : **Staphylococcus** aureus, S2 : Staphylococcus Epidermidis, S3 : Pseudomonas aeruginosa et S4 : Escherichia coli

La concentration minimale inhibitrice pour la souche S3 est de 30%, pour les autres souches elle doit correspondre à une valeur inférieure à 30%. Il est recommandé dans de prochaines études de tester l'inhibition pour des concentrations inférieures à 30% en HE (soit 20% et 10%) pour détecter la valeur minimale inhibitrice.

L'activité antibactérienne de l'HE de clou de girofle montre bien ses effets thérapeutiques car il permet de combattre le rhume ainsi que divers problèmes digestifs en particulier le mal de ventre. Il est utilisé depuis longtemps pour soulager le mal de dents vu ses propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires [64, 66, 67].

Conclusion et perspectives

Conclusion

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps comme remèdes des maladies humaines puisqu'elles contiennent des composants chimiques de valeur thérapeutique. Selon l'OMS, plus de 80% de la population mondiale dépendent encore de la médecine traditionnelle pour prendre soin de leur santé.

En Algérie, nombreuses sont les plantes décrites pour leurs vertus médicinales, c'est pour cela que nous nous sommes intéressés à étudier l'une de ces plantes, clou de girofle.

Notre travail s'est intéressé à l'étude des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de cette plante médicinale importante ainsi que l'activité antibactérienne.

Les résultats obtenus montrent que les propriétés physicochimiques telles que la densité, l'indice de réfraction, pH, sont conformes aux normes AFNOR. La détermination des indices chimiques : indice d'acide, d'ester et de saponification a montré certains renseignements sur la pureté de nos huiles essentielles ainsi que la quantité d'acides libres présents dons notre huile.

Notre huile extraite par hydrodistillation présente un rendement compris entre 8,43 et 9,06. Cette variation est liée et influencée par le volume et la nature du solvant d'extraction.

L'analyse IR de l'HE a fait apparaitre des bandes d'absorptions caractéristiques des groupements fonctionnels : de phénol, de fonction alcènes, d'oxydes, d'ester et de cycles aromatiques correspondants aux différents constituants de notre HE.

Notre huile essentielle est capable de neutraliser le radical DPPH$^{\bullet}$ au cours du temps et en fonction de la concentration des antioxydants, ceci se traduit par la diminution de la concentration initiale de ce radical en comparaison avec le contrôle Acide gallique.

De même l'activité biologique de l'huile de clou de girofle présente un pouvoir antibactérien très important sur toutes les souches bactériennes surtout sur la souche Staphylococcus Epidermidis, l'huile essentielle du clou de girofle peut servir comme bactéricide naturel.

Perspectives

Ce travail de mémoire doit être poursuivi par d'autres études comparatives avec d'autres plantes en effectuant d'autres analyses telle que la chromatographie et en illustrant d'autres propriétés telles que : l'activité antifongique et antiparasitaire.

Références bibliographique

Références bibliographiques :

[1]. ABI FARAJ C., A guide to medicinal plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga (Spain), (2005).193.

[2]. SANGWAN, N. S., FAROOQI, A. H. A., SHABIH, F., & SANGWAN, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation *34*, p 3-21.

[3]. Blanc-Mouchet, J. "Odeurs. L'essence d'un sens." Autrement. Paris, (1987).

[4]. Guenther, E. *The Essential Oils: history, origin in plants, production and analysis*. New York: D Van Nostrand, (1948).

[5]. Van de Braak S.A.A.J. , & Leijten G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins : A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. (p.116): CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, (1999)..

[6]. RANDRIANARIVELO Roger, Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de MADAGASCAR « cinnamosma fradgrans», mémoire de docteur, biochimie (biotechnologie – microbiologie), Université d'Antananarivo MADAGASCAR, (2010), p 4.

[7]. AFNOR, Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse P 471. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles P 323. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles (2000), P 663.

[8]. OUBRAHIM, Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurusnobilis*L, *Ocimum basilicum*L. et *Rosmarinusofficinalis*L.) de l'Est Algérien, thèse en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat (LMD), UNIVERSITE BADJIMOKHTAR–ANNABA, (2014), P 18.

[9]. KURKIN, V. A, Chem. Nat. Compd, (2003), p 39,123.

[10]. BENZEGGOUTA. N, Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. Diplôme de Magister en Pharmaco chimie Université Mentouri de Constantine. (2005). p38.

[11]. HAMDANI. D, Action des poudres et des huiles de quelques plantes aromatiques sur les paramètres biologiques du bruche de Haricot *acanthoscelides obtecus* say. Coleoptera Bruchidae. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Mémoire en vue de l'obtention de magister en sciences biologiques, (2012), p 97.

[12]. HELLAL. Z, Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (Sardina pilchardus), Magister en BIOLOGIE Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. (2011),p 8, 9, 10,12.112

[13]. BRUNETON. J, Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. *Tec*. &*Doc*. Lavoisier 3ème edition, Paris, (1999).

[14] De Billerbeck V.G., Roques C., Vanierie P. et Marquier P., Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Revue hygiene, (2002) pp 248- 254.

[15]. Maach A.et Jemali A, étude des caractéristiques physico-chimique des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc : Menthe Naa Naa Abdi, Coriandre, IA V Hassan II, Rabat, Maroc, (1986).

[16] Scimeca D., Les plantes du bonheur, Ed. Alpen, (2007), p.12-17.

[17] Festy D., Les huiles essentielles ça marche ! Avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S EDITION, (2011), p. 22-26, ISBN : 978-2- 84899-316-4

[18] Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer-verlag France, Paris, (2012), p. 17,160, ISBN : 978-28178-0308.

[19] Festy D., Je ne sais pas utiliser les huiles essentielles : Découvrir l'aromathérapie, le guide pour se soigner facilement et sans risque, Ed. Leduc. S, (2012), p. 92.

[20] MAYER B.G ; « Extraction au CO2 : Nouvelles applications pour l'industrie alimentaire », Bios (Paris), vol 21, N° 3, (1999), pp 47-51 ,

[21]. CHACOU M, et BASSOU K, Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verteMentha SpicataLisdue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogenes: E.coli,Pseudomonas aeroginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus subtiluis et Candida albicans. Mémoire de DES microbiologie. Université de Kasdi Merbah Ouargla, (2007).p.1427.

[22] El-BAHAI M., Al-HARIRU M., YART. et BAMOSA A. Cardiac inotropic and hypertrophic effects of Nigella *sativa*. Department of Physiology, College of Medicine, King Faisal University, PO Box 2114, Dammam, 31451, Saudi Arabia, (2000), P. 1.2.3

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

[24] MahmoudI. Nassar1*, AhmedH. Gaara, AhmedH. El-Ghorab, Abdel-RazikH. Farrag, Hui Shen, EnamulHuq andTomJ. Mabry ChemiCal Constituents of Clove (Syzygium aromaticum, fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity (2007).

[25] Fauchére J.L. et Avril J.L..Bactériologie générale et médicale.Elleipsesedition Marketing, (2002), ISBN: 2-7298-0747-0

[26] Hosttetman K. Tout savoir sur le pouvoir des plantes. Ed. Favre. S.A. Lausanne. Suisse, (1997).

[27] Naili.N EP Kesraoui ; Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus leucotrichus* Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'études médicales Spécialisées (DEMS) en Botanique médicale et Cryptogamie, (2013).

[28] BRUNETON J, Pharmacognosie « Phytochimie Plantes » médicinales 3ème éd, Tec et Doc, Paris (1999)- pp 484-540 (livre)

[29] Abderrahim EL HAIB, Valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, Thèse de doctorat de l'université Paul Sabatier, (2011).

[30] Mompon B ; Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO_2, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4 rencontre internationale de Nyons, (1994), p. 149-166.

[31] Sophie Barbelet Le giroflier : historique, description et utilisation de la plante et de son huile essentielle, Thèse de doctorat de l'université de lorraine, (2015).

[32] Peter Marius Veth, Sue O'Connor et Matthew Spriggs, "The Archaeology of the AruIslands. Eastern Indonesia", Terra Australis, Vol. 22, février (2007)

[33]: www.Wikipédia.com / XXIX 127-128

[34] Dr Jean-Michel Hurtel, Giroflier, Copyright 2001

[35] : Fabre d'Églantine, Rapport fait à la Convention nationale dans la séance du 3 du second mois de la seconde année de la République Française, p. 28 [archive].

[36] DIRECTION DE LA QUALITE DU MEDICAMENT DU CONSEIL DE L'EUROPE. Pharmacopée Européenne. 5e éd. Sainte-Ruffine : Maisonneuve S.A. ; (2004).

[37] WERNER M, VON BRAUNSCHWEIG R. L'aromathérapie : principes, indications, utilisations. Paris : Ed. Vigot ; 2008. 334 p.

[38] MAILHEBIAU P, SOULIER JM, AZEMAR J. Collège d'aromathérapie Philippe Mailhebiau : étude et prescription de la médecine aromatique. Nouvelles Presses Internationales ; (1992). 163 p.

[39] STAUB H, BAYER L. Traité approfondi de phytoaromathérapie : avec présentation de 750 huiles essentielles connues. Paris: Ed. Grancher ; (2013). 750 p.

[40] MAILHEBIAU P. La nouvelle aromathérapie : caractérologie des essences et tempéraments humains. Toulouse : Ed. Nouvelle Vie ; (1989). 372 p.

[41] FAUCON M. Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription : monographies : huiles essentielles, huiles végétales, hydrolats aromatiques. Paris : Ed. Sang de la Terre ; (2012). 879 p.

[42] KLEIN AH, CARSTENS ML, CARSTENS E, Eugenol and carvacrol induce temporally desensitizing patterns of oral irritation and enhance innocuous warmth and noxious heat sensation on the tongue, Pain. (2013) ; 154(10) : 2078-2087.

[43] RAYNAUD J. Prescription et conseil en aromathérapie. Paris : Ed. Tec &Doc ; (2006).

[44] SAEED SA, SIMJEE RU, SHAMIM G, GILANj AH, Eugenol : a dual inhibitor of platelet-activating factor and arachidonic acid metabolism. Phytomedicine. 1995; 2(1): 23-28.

[45] RAGHAVENDRA RH, NAIDU KA. Spice active principles as the inhibitors of humans platelet aggregation and thromboxane biosynthesis. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2009 ; 81(1) :73-78.

[46] SRIVASTAVA KC, 1993. Antiplatelet principles from a food spice clove (Syzygium aromaticum L) Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1993; 48(5) : 363-372.

[47] M. Hesse. H. Meier. B. Zeeh. Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique. Masson. Paris, (1997).

[50] Reynal B., Multon J.L, Additif et auxiliaire de fabrication dans les industries agroalimentaire, Ed. Tec & Dec, (2009), p.119, ISBN: 978-2-7430-1071-3.

[48] Barus C., Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques, Thèse de Doctorat université deToulouse, (2008), p.8

[49] Lévy-Dutel L., Scotto E., Les saveurs du bien être : Vivre heureux et centenaire, Ed. Eyrolesse, 2011, p. 31, ISBN : 97B-2-212-54681-1.

[50] Alain dit Philippe BIDIE, Banga B. N'GUESSAN, Adou F. YAPO, Jean David N'GUESSAN, Allico Joseph DJAMAN, Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne, Sciences & Nature Vol. 8 N°1: 1 - 11 (2011).

[51] Rolland Y., Antioxydants naturels végétaux, *Oléagineux . CorpsGrasLipides(CPL)*, (2004), 11 (6) : 419-24.

[52] Dacosta Y., Les phytonutriments bioactifs : 669 réfeérences bibliographiques, Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003, p. 317

[53] Diallo A., Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guine e nse* Willd (Myrtacées), Thèse de Doctorat en Pharmacie université de Bamako, (2005), p.11, 13.

[54] Hill R.B.J., Rowlands D.J.& Rifkind D., Infectious pulmonary disease inpatient receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. Th e New England Journal of Me dicine (1964), 271: 1021-1028.

[55] Hart P.E, Russel E.Jr & Remington J.S., The compromised host and infection II, Deep fungal infection. Th e Journal of Infectious Disease , (1969), 120: 169-176.

[56] Persidis A., Antibacterial and antifugal drug discovery. Nature Biote ch nology, (1999), 17:1141-1142.

[57] Rhayour K., Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Esherichia coli, Bacillussubtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum, Thèse de Doctorat de Biologie Cellulaire université de Fès, 2002, p.2.

[58] Hahn M. W., Lunsdorf H., Schauer M., Hofle M. G., Boenigk J., and Stadtler P., Isolation of novel ultra-micro-bacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. Applied Environmental of Microbiology, (2003), 69:1442-1451.

[59] Leclerc H., Gaillard J-L, Simonet M., Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien, Doin Editeur, Paris, (1995), p.506.

[60] Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall International Ed., (1997).

[61] Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J., *Esch e rich ia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology, (2000), 88: 106S-116S.

[62] Ruiz-Garbajosa P., Canton R., Pintado V., Coque TM., Willems R., Baquero F., Genetic and phenotypic differences among Enterococcusfae calisclones from intestinal colonisation and invasive disease. Clinical Microbiology and Infection, (2006), 12: 1193-1198.

[63] C. Mutai, C Bii, G Rukunga, J Ondicho, P Mwitari, D Abatis, C Vagias, V Roussis, J Kiruic, Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenesisolated from Acacia, **2009**; 6(1): 42–48.

[64] MEMMOU Faiza, Synthèse, Etude cinétique et évaluation de l'activité de dérivés de l'Eugénol. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle. Thèse de doctorat de l'université ABOUBEKR BELKAID de TLEMCEN, (2015).

[65] M. Fadil, A. Farah, B. Ihssane, T. Haloui, S. Rachiq, Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse, *J. Mater. Environ. Sci. 6 (8) (2015) 2346-2357*

[66] HAMADOU Faiza et TOUKI Soumia, Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices : Girofle, Poivre Noir. Mémoire de Master de l'université KASDI MERBAH Ouargla , (2017).

[67] ATMANI Hanane et BAIRA Kaouther, Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères Physico-chimique de l'huile essentielle du clou de girofle Syzygium aromaticum L. Memoire de Master de l'université Fréres Mentouri 1 Constantine, (2015)..