

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique moléculaire et amélioration des plantes

Présenté par :

MELLIS Saadia ATHMANE Bochra

Thème

**Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante
clous de girofle**

Soutenu publiquement le 03/07/2024

Jury:

Présidente: Melle NEHILA A.

Examinatrice: Mme SEHARI N.

Encadrante: Melle BELMOKHTAR R.

Grade

« MCB »

« MCB »

« MAA »

Année universitaire 2023-2024

Remerciements

Tout d'abord, nous tiens à remercier Allah, le Tout-Miséricordieux, de m'avoir accordé la santé, la force et la détermination nécessaires pour mener à bien ce projet de mémoire. C'est grâce à Ses bénédictions que nous avons pu surmonter les défis et les moments de doute pour arriver à la finalisation de ce travail.

*Voudrais exprimer nos profondes gratitude envers notre directeur de mémoire, **Melle Rahma Belmokhtar**, pour son encadrement, ses précieux conseils et son soutien tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également les membres du jury la présidente **Melle Nehila A.** et l'examinatrice **Mme Sahari N.** pour avoir accepté d'évaluer notre travail et pour les éclairages qu'ils apporteront lors de la soutenance. Leurs remarques et suggestions seront une source de réflexion enrichissante pour nous.*

Nous ne saurions oublier de remercier nos familles et nos amis pour leur soutien moral et leurs encouragements tout au long de ce parcours. Leur présence et leur affection ont été un réel réconfort dans les moments de stress et de fatigue.

Dédicace

With profound gratitude, I dedicate this modest work to those whom, regardless of the terms embraced, I could never fully express my heartfelt love for.

*The woman who suffers without letting me suffer, who has never denied my soul's needs and who has spared no effort to make me happy : my adoring mother, **Bakhta**.*

*The man, my precious gift from Allah, who gave me life, my utmost respect and love : my dear father, **Naceur**.*

*My second father **Nedjadi**, who has never ceased to advise, encourage and support me throughout my studies, may Allah protect you and always grant you success and happiness.*

*My dear siblings **Sihem**, **Mouna**, **Basma** and my brother **Mohamed**, my best friends **Asma**, **Fatima** and **Mohamed**. Thank you for all the support you have given me over the past years, and particularly this year, may Allah protect you for me.*

My grandmother, may Allah give you a long and joyful life.

*My uncle **Athmane**, although you are no longer by my side, your memory and your legacy live on within me. You have been an exceptional mentor and friend.*

It is with gratitude and respect that I dedicate this memoir to your memory.

Athmane Bochra

Dédicace

Je dédie cet ouvrage

A ma chère mère KARIMA, A mon cher père BENDAOUD,

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir

Et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mes frères, ZAKI, KHALED, ABDENOUR, ALI

Et ma sœur MERYAMA,

Pour son soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

*A ma deuxième mère KHAIRA, Qui m'a aidé et supporté dans les moments
difficiles.*

A mes chers amis pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

Mellis Saadia

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Chapitre I :

la plante Syzygium aromaticum

I.1- Généralités sur le Giroflier (<i>Syzygium aromaticum</i>)	4
I.1.1-Origine	4
I.1.2-Taxonomie	4
I.1.3- Description botanique	5
I.1.4-Culture et récolte.....	6
I.1.5- Toxicité du clou de girofle.....	7

Chapitre II :

Huiles essentielles

II.1- Définition des huiles essentielles.....	9
II.2-Composition chimique	9
II.3-L'huile essentielle de <i>syzygium aromaticum</i>	11
II.3.1-Phénylpropanoïdes	11
II.3.2-Sesquiterpènes.....	12
II.3.3-Esters aromatiques.....	12
II.3.3-Autres composants	12
II.4- Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	13
II.4.1. Distillation.....	15
II.4.1.1. Hydrodistillation ou "distillation à l'eau"	15
II.4.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau (Vapo-hydrodistillation)	16
II.4.1.3- Hydro-diffusion	16
II.4.2-Extraction par fluide supercritiques.....	17
II.4.3- Extraction assistée par micro-onde.....	18
II.4.4-Enfleurage.....	18
II.4.4.1- Enfleurage à froid	19
II.4.4.2 – Enfleurage à chaud.....	19
II.5-Conservation des huiles essentielles.....	19
II.6-Activités biologiques des huiles essentielles	19
II.6.1- Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	20
II.6.2- Pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	20

Chapitre III:

Matériel et Méthodes

III.1-Matériel biologique	23
III.2- Souches microbienne utilisées	23
III.3- Extraction par hydro distillation.....	24
III.3.1-Hydro-distillateur	24
III.4-Analyses de l'huile essentielle	26
III.4.1-Caractéristiques organoleptique	24
III.4.2-Calcul de rendement	26
III.4.3- Paramètres physico-chimiques	26
III.4.3.1-Mesure de pH	26

Table des matières

III.4.2.2-Mesure de pouvoir rotatoire	27
III.5-Activité antimicrobienne	27
III.6-Etude de l'activité antimicrobienne in vitro des huiles essentielles.....	27
III.7- Etude de l'activité antioxydante	29
III.7.1-Matériel et réactifs.....	29
III.7.2-Produits employés	29
III.7.3-Détermination du pouvoir antioxydant	30

Chapitre IV:

Résultats et Discussions

IV.1-Analyses de l'huile essentielle	33
IV.1.1- Caractéristiques organoleptiques	33
IV.1.2-Analyse physico-chimique	33
IV.1.2.1- calcul de rendement	33
IV.1.2.2-Contrôle du pH.....	34
IV.1.2.3-mesure de pouvoir rotatoire	34
IV.2-Evaluation de l'activité antimicrobienne	35
IV.2.1-Activité antibactérienne	35
IV.2.2-Lecture des résultats.....	39
IV.2.2-Activité antifongique.....	39
IV.3-Evaluation de l'activité antioxydante.....	41
IV.3.1-Test au DPPH.....	41
IV.3.2-Détermination de la valeur EC50.....	43
Conclusion.....	46
Références bibliographiques.....	47

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

µl : microlitre

G : gramme

% : pourcentage

HES: Huiles essentielles

HV : Huile Végétale

C : carbone

°C : degré Celsius

T° : température

H : heure

Mn : minute

Mm : millimètre

GN : gélose nutritive

DMSO : Diméthylsulfoxyde

SM : Solution mère

Liste des figures

Figure 1 : Buttons de clous de girofle	4
Figure 2 : Allure d'un giroflier de l'Indonésie	4
Figure 3 : feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleur verte du giroflier.	6
Figure 4 : Boutons floraux et fleurs de giroflier.....	6
Figure 5 : Biogenèse des constituants Chimique des huiles essentielles.....	6
Figure6: Structures de quelques dérivées du phénylpropane	10
Figure7: Quelques composés terpéniques	10
Figure 8 : Quelques composés de l'huile essentielle de clou de girofle.....	11
Figure 9 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation.....	15
Figure10 : Schéma d'un appareil de distillation des plantes aromatiques à générateur de vapeur séparé de l'alambic (vapo-distillation)	16
Figure 11: Schéma du procédé d'hydrodiffusion.	17
Figure 12 : Schéma de principe d'une extraction par CO ₂ supercritique	17
Figure 13 : Schéma d'une extraction assistée par micro-onde sous vide	18
Figure 14 : Enfleurage de pétales de rose.....	18
Figure 15: Clous de girofle.....	23
Figure 16: hydro-distillateur (photo réelle)	24
Figure 17 : Etapes d'extraction de l'huile essentielle (Photos réelles).....	25
Figure 18 : Dépôt des disques imbibés (photo réelle)	28
Figure 19 : Résultat de l'aromatogramme des souches microbiennes testées (photos réelles).....	40
Figure 20: Résultat de l'aromatogramme de la souche antifongique	40
Figure 21 : Forme réduite du radical DPPH	41
Figure 22 : évolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de l'HE de clou de girofle.....	41
Figure23 : Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait du clous du girofle en différentes concentrations.....	43
Figure24 : Variation du taux de piégeage du DPPH par la vitamine C en différentes concentrations.....	43

Liste des tableaux

Tableau 01 : composition chimique d'huile essentielle d'un clous de girofle.	11
Tableau02 : Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction	13
Tableau03 : produits et standards utilisés, leurs marques et puretés.....	30
Tableau 04 : Caractéristiques organoleptiques.....	33
Tableau 05 : Calcul du rendement d'huile extrait à partir de clous de girofle	33
Tableau 06 : Résultats du mesure de pH	34
Tableau 07 : Résultats du mesure de pouvoir rotatoire.....	35
Tableau 08 : Résultats de l'aromatogramme.....	35
Tableau 09 : Résultats de l'aromatogramme.....	39
Tableau 10 : Variation du taux de piégeage (1%) du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des clous de girofle.....	42
Tableau 11 : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des étalons d'antioxydants (vitamine C).....	42
Tableau 12 : valeurs EC50 de l'extrait de clous de girofle et le standard antioxydant (vitamineC).....	43

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales jouent un rôle essentiel dans le traitement des maladies et sont devenues une voie importante pour l'accès aux soins. Leur composition riche en métabolites secondaires offre un potentiel inépuisable pour la découverte de nouvelles substances thérapeutiques. Les plantes aromatiques, quant à elles, produisent des molécules odorantes qui composent les huiles essentielles (HE)(**Sophie, 2015**).

Les huiles essentielles sont des produits complexes renfermant des composés volatils extraits de diverses parties des plantes telles que les fleurs, les feuilles, le bois, les racines, l'écorce ou les fruits. Elles sont obtenues par distillation à la vapeur d'eau ou par extraction mécanique. La distillation à la vapeur d'eau est le procédé d'extraction le plus couramment utilisé pour obtenir ces précieuses huiles essentielles (**Chagra, 2019**).

Les huiles essentielles ont de nombreuses applications en thérapeutique, en cosmétique, en agroalimentaire...etc. De plus le potentiel d'utilisation des huiles essentielles et de leurs Constituants comme fongicides est renforcé par leur biodégradabilité (**Macias et al.,1997 ; Cowan, 1999**). L'eugénol, présent à hauteur de 78% dans l'huile essentielle extraite des clous de girofle (**Dzamic et al.,2009**), provient des boutons floraux secs du giroflier récolté avant leur éclosion. Ces clous de girofle possèdent diverses propriétés, notamment acaricides(**Fichi et al.,2007**), antifongiques, antibactériennes, Antioxydants, antivirales et anesthésiques (**Chaieb et al., 2007 ; Lee et al., 2009**), et sont largement utilisés comme agent de saveur dans de nombreux produits alimentaires (**Lawless,2002**).

Les scientifiques recherchent activement des alternatives aux antibiotiques en raison de leur utilisation excessive, qui a contribué à la montée de souches résistantes, voire multi-résistantes, aux antibiotiques. En outre, les fongicides synthétiques présentent des effets secondaires néfastes, incitant à la recherche de moyens de traitement du sol plus efficaces et moins polluants (**Wilson et al., 1993**). L'étude vise à évaluer l'efficacité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de clous de girofle sur des bactéries pathogènes pour l'homme et sur des champignons néfastes pour le sol. Les clous de girofle sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydants, ce qui en fait un candidat intéressant pour lutter contre les microorganismes pathogènes. Cette étude permettra de mieux comprendre le potentiel de l'huile essentielle de clous de girofle comme agent antimicrobien et antioxydant naturel. Le manuscrit est structuré en quatre chapitres :

- Le premier chapitre est une étude bibliographique en générale consacrée sur les huiles essentielles et l'espèce étudié (clous de girofle).
- Un deuxième chapitre décrit les matériels et les méthodes utilisés lors de cette étude.

Introduction

- Un troisième chapitre correspond aux résultats et aux discussions concernant les paramètres physicochimiques, l'activité antimicrobienne et antioxydant de clous de girofle.
- Nous terminerons ce mémoire par la conclusion issue des principaux résultats obtenus faisant le bilan des questions non résolues et ouvrant de nouvelles problématiques.

Chapitre I : Plante

Syzygium aromaticum

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

Syzygium aromaticum est une épice utilisée depuis Longtemps par les guérisseurs traditionnels ayurvédiques de l'Inde (Saeed et Tariq, 2008), Pour soigner les affections respiratoires et digestives (Aggarwal et Shishodia, 2006). Elles Sont aussi considérées comme une source riche en composés antimicrobiens bioactifs (Menghani et al, 2014).

I.1.1-Origine

Le Giroflier, est un arbre tropical appartenant à la grande famille des Myrtacées, originaire D'Indonésie, dans la partie sud des Philippines et les îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du Sud (Madagascar, Brésil, Zanzibar), principalement dans des pays tropicaux. (Sophie, 2015)

I.1.2-Taxonomie



Figure 1 : Buttons de clous de girofle (<https://www.super-marmite.com/blog/clous-de-girofle/>)

Règne : Plantae

Classe : Angiosperme

Sous-classe : Tiporées

Ordre : Myrtales

Famille: Myrtaceae

Genre : *Syzygium*

Espèce: *Syzygium aromaticum*

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum* :

- *Caryophyllus aromaticus* L. (1753)
- *Eugenia caryophyllata* Thunb. (1788)

- *Eugenia caryophyllus* Spreng. (1825)
- *Eugenia aromatica* (L.) Baill. (1876)
- *Jambosa caryophyllus* (Thunb.) Nied. (1893)
- *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, (1939)

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés (Sophie, 2015).

I.1.3- Description botanique

C'est un grand arbre fruitier, élancé, de forme conique, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, qui peut atteindre jusqu'à 20 mètres de haut, à port pyramidal et au tronc gris clair ridé (figure 2)(Barbelet, 2015).

De nos jours, il ressemble souvent à un arbuste car il est régulièrement taillé pour faciliter la cueillette. Ces feuilles, de 8 à 10 cm de long, sont coriaces, persistantes, opposées, pétiolées, ovales, aux limbes lancéolés, à la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre, légèrement ponctué. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. Le pétiole portant le limbe mesure entre 0,5 et 1cm de long. Les nervures sont nombreuses mais ne se voient pas beaucoup et la marge de la feuille est lisse (Barbelet, 2015).

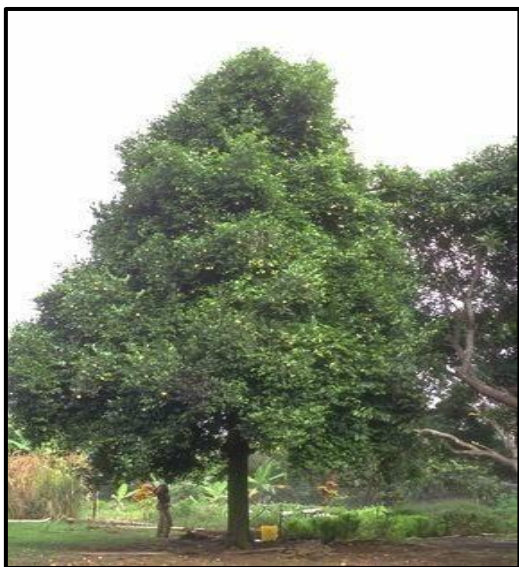


Figure 2 : Allure d'un giroflier de l'Indonésie

(<https://leschroniquesduvegetal.wordpress.com/2023/04/03/le-giroflier-un-tresor-qui-vieillit-bien/>)

A l'état adulte, les feuilles sont vert foncé luisant, mais lorsqu'elles se développent elles sont de couleur rose et comme saupoudrées d'or (figure 3).

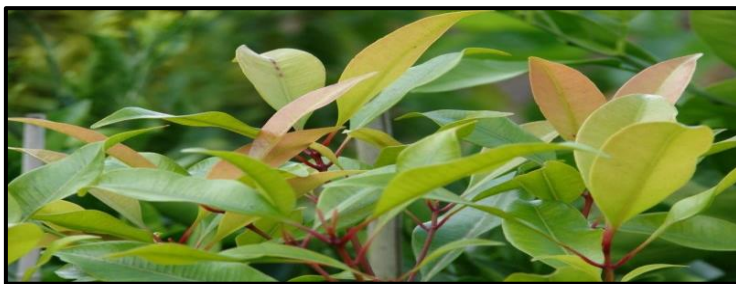


Figure 3 : feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleur verte du giroflier
(Barbelet, 2015)

Quant aux « griffes de girofles », moins estimées, ce sont en fait les pédicelles floraux. Ils sont nommés « griffes » car ces pédicelles se terminent par une série de petites bractées en forme de Griffes (**figure 4**)(Barbelet, 2015).

Les fruits sont nommés « antofles » dans le commerce. Ce sont des petites baies elliptiques : environ 2,5cm de long pour 1cm de large. Ils sont de couleur pourpre, généralement uniloculaire, et ont une ou parfois deux graines à enveloppe rouge. (Boulard, 2001).



Figure 4 : Boutons floraux et fleurs de giroflier (Barbelet, 2015)

I.1.4-Culture et récolte

Le giroflier, comme beaucoup d'autres plantes de la famille des Myrtacées, est habitué aux climats tropicaux. Il a besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 Mètres. Les climats marins semblent favoriser son développement. Le giroflier a besoin d'un sol volcanique (ou sédimentaire), au bord de mer, avec une forte Pluviométrie bien répartie sur l'année, et un ensoleillement plus marqué à l'apparition des Inflorescences(Ramarijaona and Rabary, 1985).

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

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

La période de récolte diffère selon les zones de production. A Madagascar, les clous sont Récoltés d'octobre à janvier, quand ils sont bien roses et qu'ils contiennent le maximum d'essence. A Zanzibar, il y a deux cueillettes annuelles : de Juillet à septembre et de décembre à Janvier, du fait que le Giroflier y fleurisse deux fois par année.

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

I.1.5- Toxicité du clou de girofle

Le danger du clou de girofle : Un usage excessif du clou de girofle peut entraîner une toxicité. Il est important d'éviter d'ingérer de grandes quantités pendant la grossesse. Il est recommandé d'éviter le clou de girofle chez les individus souffrant d'ulcères gastriques ou de syndrome du côlon irritable en raison de son potentiel irritant pour les voies gastro-intestinales. Les clous de girofle peuvent provoquer des nausées, des vomissements, des diarrhées et de graves hémorragies digestives lorsque consommés en surdoses(**Dernani et al.,2018**).

*Chapitre II :Huiles
essentielles*

II.1- Définition des huiles essentielles

La définition qui semble la plus universellement acceptée est la suivante : « Les huiles essentielles (H.Es) sont définies comme étant des produits de composition, généralement complexe, renfermant des substances volatiles et odorantes contenues dans divers organes des plantes : fleur, feuille, bois, racine, tige, écorce, fruit, ou autre. Elles sont obtenues soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage (Florence, 2012).

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Paster *et al.*, 1990 ; Caccioni *et al.*, 1994 ; Cowan, 1999 ; Nielsen *et al.*, 2000 ; Lamiri *et al.*, 2001 ; Cimanga *et al.*, 2002).

II.2-Composition chimique

Les H.Es sont des combinaisons complexes de composés organiques qui présentent des structures et des fonctions chimiques très variées (Thomas *et al.*, 2004). La composition peut fluctuer d'une dizaine à plus de 300 composants (Hellal, 2011). L'efficacité de leurs effets biologiques dépend principalement de la nature du composé dominant (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) ou des composés minoritaires. La composition moyenne d'une huile essentielle est de soixante-quinze molécules actives. Les composés chimiques les plus couramment utilisés dans les huiles essentielles sont les terpènes et les phénylpropanes (composés aromatiques) (Chassaing, 2008).

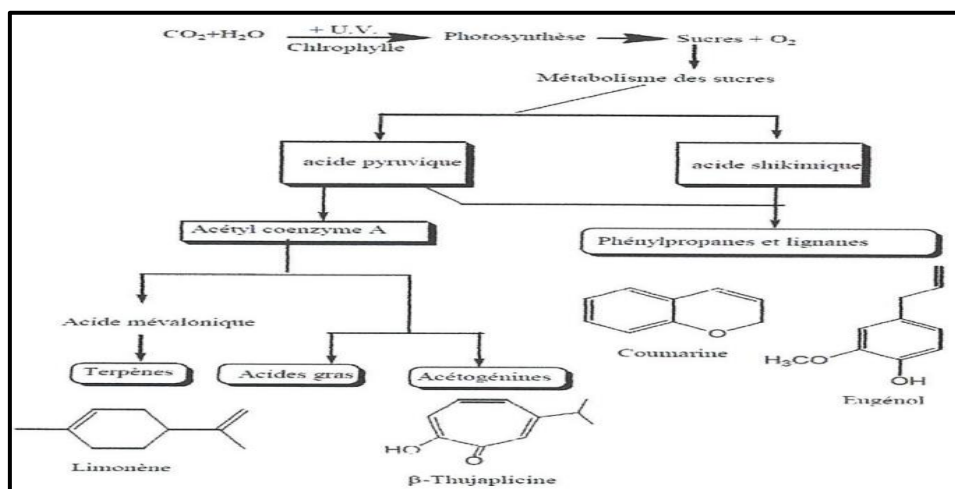


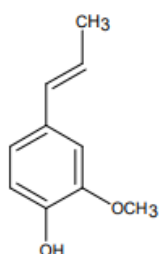
Figure5: Biogenèse des constituants Chimiques des huiles essentielles.

• Composés aromatiques

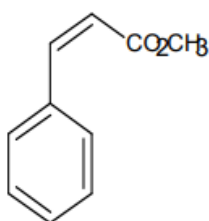
Il s'agit de substances oxygénées et volatiles issues du phénylpropane (Fig2). Les composés odorants de cette catégorie comprennent la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Les huiles essentielles du clou de girofle, de la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon...etc.

• Composés terpéniques

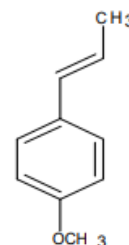
Les carbures terpéniques sont des molécules d'origine végétale, renferment une ou plusieurs doubles liaisons. Les composés terpéniques prépondérants dans la plupart des essences, sont des hydrocarbures de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Ils sont formés d'unités isopréniques à cinq atomes de carbone ($C_{20}H_{32}$) et les triterpènes ($C_{30}H_{48}$)...etc. Ils ont même origine métabolique (Figure 06).



Eugénol



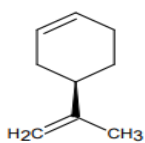
(Z)- cénamate de methyl



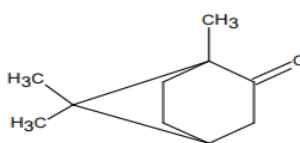
Méthylchavécol ou estragol

Figure06 : Structures de quelques dérivées du phénylpropane (Bakkalia *et al.*, 2008)

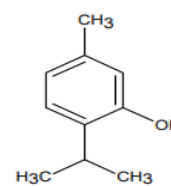
Monoterpènes



Limonène

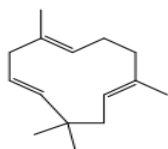


Camphre

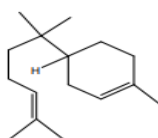


Thymol

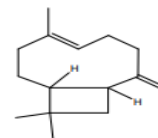
Sesquiterpènes



α-Humulène



β-caryophyllène



α-Bisabolol

Figure07 : Quelques composés terpéniques (Bakkalia *et al.*, 2008)

II.3- Huile essentielle de *syzygium aromaticum*

L'huile essentielle des clous de girofle contient principalement de l'eugénol, de 75 à 85%, de l'acétate d'eugénol, de 4 à 10 %, du β -caryophyllène, de 7 à 10 % et de faibles quantités d'autres produits (dont un peu de vanilline). L'eugénol, extrait de l'huile essentielle des clous de girofle ou des feuilles de giroflier sont utilisées dans certains produits des domaines médical et dentaire en raison de ses propriétés antalgique et antiseptique. L'H.E. des clous de girofle, extraite par hydro distillation, contient principalement deux composés : l'eugénol et l'acétyleugénol et l'une des caractéristiques fondamentales de cette huile est sa densité élevée ($d = 1,066 > d_{\text{eau}} = 1.00$), ce qui nous permet de les séparer par simple décantation.

Elle possède de nombreuses propriétés essentiellement dues à l'eugénol: anti-inflammatoire, antiseptique, parasiticide et c'est un anesthésiant local (utilise en chirurgie dentaire par exemple).

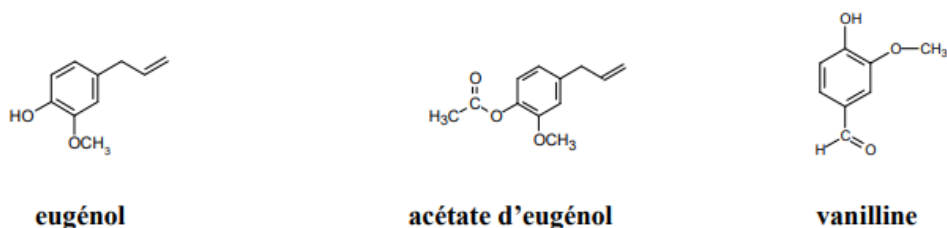


Figure 08 : Quelques composés de l'huile essentielle de clou de girofle

Le clou de girofle contient plus de 15% d'une huile essentielle, l'eugénol qui a été un produit volatile synthétisé par le giroflier présent le compose majoritaire de cette huile.

Tableau 01 : composition chimique d'huile essentielle d'un clou de girofle

Composition	%
Eugénol	70 à 90%
Acétate d'eugénol	9 à 15%
B-caryophyllène	5 à 12%
Acide oléanique	2%
Copaène, α-humulène, caryophyllène oxyde	<1%
Vanilline, furfural, méthyl amyl Acétone	Traces

II.3.1- Phénylpropanoïdes

L'eugénol est le principal constituant des huiles essentielles du giroflier. Cette substance fait partie des phénylpropanoïdes (Klein *et al.*, 2013). Ce sont des substances très

efficaces contre les maladies (bactéricides, virucides et parasitocides), elles ont également un effet immunostimulant. L'eugénol est le moins toxique des trois "phénols" les plus puissants présents dans les huiles essentielles : carvacrol, thymol et eugénol (Klein *et al.*, 2013).

II.3.2- Sesquiterpènes

Il s'agit de terpènes de formule $C_{15}H_{24}$, qui sont trop lourdes pour être entraînées dans le distillat lors de la distillation. Elles ne représentent donc pas la majorité des huiles essentielles en termes de quantité. Le sesquiterpène présent dans l'H.E. de giroflier est le β -caryophyllène (5 à 14%). Selon Mailhebiau (1989), les sesquiterpènes sont des substances calmantes et anti-inflammatoires. Effectivement, ils agissent (Klein *et al.*, 2013). D'autres sesquiterpènes sont présents dans l'H.E. de giroflier, tels que l' α -humulène <1%, le camphène 1% et le γ -pinène <1%amine, ce qui réduit les symptômes inflammatoires tels que les démangeaisons et les irritations. (Mailhebiau *et al.*, 1992).

II.3.3-Esters aromatiques

Un ester est un composé chimique issu de la fusion d'un alcool aromatique et d'un acide. L'ester de l'H.E. de clous de girofle est l'acétate d'eugényle, qui est obtenu à partir de l'eugénol. Le salicylate de méthyle est un autre ester aromatique qui se trouve en très faible quantité dans l'huile essentielle (<1%) (Mailhebiau *et al.*, 1992). Il s'agit de composés musculotropes et neurotropes antispasmodiques. De la même manière que l'eugénol, l'acétate d'eugényle est également antibactérien. Cependant, c'est principalement un stimulateur global, extrêmement bénéfique en cas de dépression hivernale (Klein *et al.*, 2013).

II.3.3-Autres composants

Malgré leur faible présence dans l'huile essentielle de clous de girofle, ces éléments renforcent l'action des autres composants, démontrant ainsi une synergie d'action.

- **Les huiles essentielles aromatiques :** L'oxydation de l'eugénol entraîne la création d'un oxyde. Aromatique aldéhyde : la vanilline. C'est grâce à cette méthode que l'arôme artificiel de la vanille a été fabriqué pendant plusieurs années.
- **Les oxydes de sesquiterpène :** Ces composés proviennent de la transformation des sesquiterpènes et sont rares dans les huiles essentielles. Les caractéristiques de ces molécules sont mal connues, mais ils pourraient être des molécules anti-inflammatoires et peu anxiolytiques (Jirovetz *et al.*, 2006). Parmi elles, on retrouve l'oxyde de caryophyllène présent dans l'huile essentielle de clous de girofle (<1%).

II.4- Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites avec des rendements extrêmement faibles (environ 1 %), ce qui les rend fragiles, rares, mais néanmoins précieuses. Dès lors, les différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles ou des extraits aromatiques doivent être mises en œuvre. La variété et la complexité des huiles essentielles rendent difficile le choix des méthodes d'obtention. **(Fernandez et Cabrol-Bass,2007).**

➤ Principaux paramètres d'extraction

La volatilité est l'un des principaux paramètres à considérer lors des opérations essentielles d'extraction de matières premières naturelles aromatiques.

- La capacité à se dissoudre ;
- La taille et la forme des composants ;
- L'adsorption.

Le tableau 2 récapitule les méthodes les plus fréquemment employées ainsi que quelques catégories de produits. La plupart du temps, ces méthodes d'extraction sont utilisées en ligne pour réaliser diverses opérations essentielles**(Peyron, 1992).**

Tableau02 : Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction (Peyrone, 1992)

Techniques	Propriétés	Produits fabriqués
Evaporation Déshydratation - Séchage Concentration de miscella (S/pres. atm. ou réduite) Concentration de jus de fruits	Volatilité	Résinoïdes, concrètes Oléorésines
Distillation Rectification (S/pres. atm. ou réduite) Distillation sèche		Isolats, déterpénés Huile empyreumatique
Co-distillation Avec eau (S/pres. atm. ou en surpression) Hydrodistillation et à vapeur humide Vapeur sèche Avec un autre fluide (S/pres. atm. ou réduite) Alcool Polyols		Huiles essentielles Eaux aromatisées Alcoolats Distillats moléculaires
Extraction liquide / solide Solvant conservé : Corps gras Alcool Solvant éliminé: Fluide liquide Fluide liquéfié (ou supercritique)	Solubilité	Pommade Infusion – Teinture } Concrète, résinoïde
Extraction liquide / liquide Discontinue Continue		Essences déterpénées
Cristallisation après concentration partielle et refroidissement		Menthol – Anéthol
Broyage – tamisage	Formes et taille des particules	Huiles essentielles d'agrumes
Expression – Filtration		
Glaçage – Filtration		
Séparation au moyen de membranes		
Séparation chromatographique Décoloration	Adsorption	Huiles essentielles Absolues

II.4.1. Distillation

Cela représente la méthode la plus répandue et la plus appropriée pour obtenir les H.Es les plus pures (**NormesAFNOR, 1992**). Le concept implique de placer les plantes dans un alambic industriel ou dans un ballon au laboratoire, puis de les chauffer avec de l'eau, de la vapeur ou les deux. La chaleur élevée provoque l'explosion ou l'éclatement des cellules contenant les huiles, qui se dispersent dans la vapeur d'eau. Ensuite, elles sont dirigées vers un condensateur et réfrigérées afin de se réduire à nouveau à la liquéfaction. Lorsque l'huile flotte à la surface de l'eau de distillation (hydrolat), un essencier ou « séparateur florentin » est utilisé pour séparer l'huile par différence de densités. L'hydrodistillation, également appelée distillation d'eau, distillation à la vapeur ou hydrodistillation à la vapeur, ainsi que l'hydrodiffusion. Ils se distinguent par le niveau de contact entre l'eau liquide et la matière végétale.

Il existe trois techniques qui utilisent le principe de la distillation.

II.4.1.1. Hydrodistillation ou “distillation à l'eau”

L'hydrodistillation est une méthode d'extraction dans le rôle est d'entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau sous l'action de la chaleur, les cellules végétales éclatant et libèrent des composés organiques odorants et volatils. La vapeur d'eau formée entraîne les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant. La condensation de ce mélange gazeux, provoque sa séparation en deux phase liquide : une phase organique huileuse est très odorante, appeler huile essentielle contenant la majorité des composés odorants.

Une phase aqueuse odorante, appelée « eaux aromatiques », qui n'en contient que très peu.

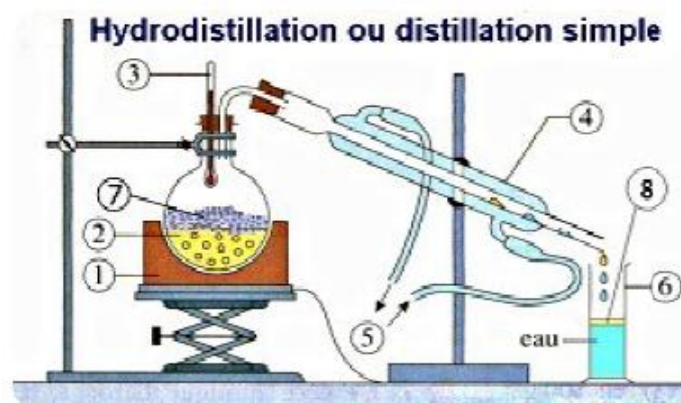


Figure09 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation

1 : Chauffe –ballon ; 2 : Ballon rond contenant de l'eau, quelques grains de pierre-ponce et de la matière première ; 3 : Thermomètre ; 4 : Tube réfrigérant ; 5 : Arrivée et sortie d'eau pour assurer le refroidissement du réfrigérant lavande ; 6 : Éprouvette ; 7 : Fleurs de lavande 8 : Phase organique contenant le solvant extracteur + les huiles essentielles.

II.4.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau (Vapo-hydrodistillation)

L'essencier sépare les vapeurs saturées de composés volatils en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase aqueuse (hydrolat). À la différence de l'hydrodistillation, les plantes ne sont pas placées dans l'eau et sont disposées sur une grille ou une claie perforée au-dessus de la base de l'alambic, à une distance suffisante du fond de l'alambic. L'huile de Palmarosa est une phase organique. Selon **Guezzen (2019)**, cette méthode permet d'éviter certains dommages par rapport à l'hydrodistillation.

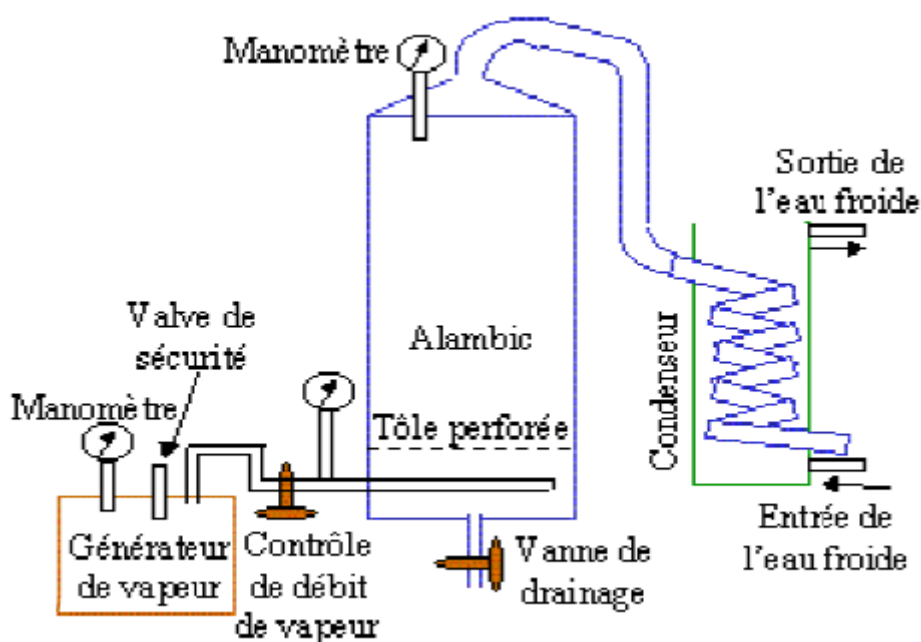


Figure10: Schéma d'un appareil de distillation des plantes aromatiques à générateur de vapeur séparé de l'alambic (vapo-distillation)(**Benjilali, 2006**)

II.4.1.3- Hydro-diffusion

La codistillation vers le bas est l'hydrodiffusion. La vapeur d'eau entraîne avec elle toutes les substances volatiles. La plante est alors soumise à une impulsion de vapeur d'eau, saturée et humide, mais jamais surchauffée verticalement.(**Wijesekara et al., 1997**).

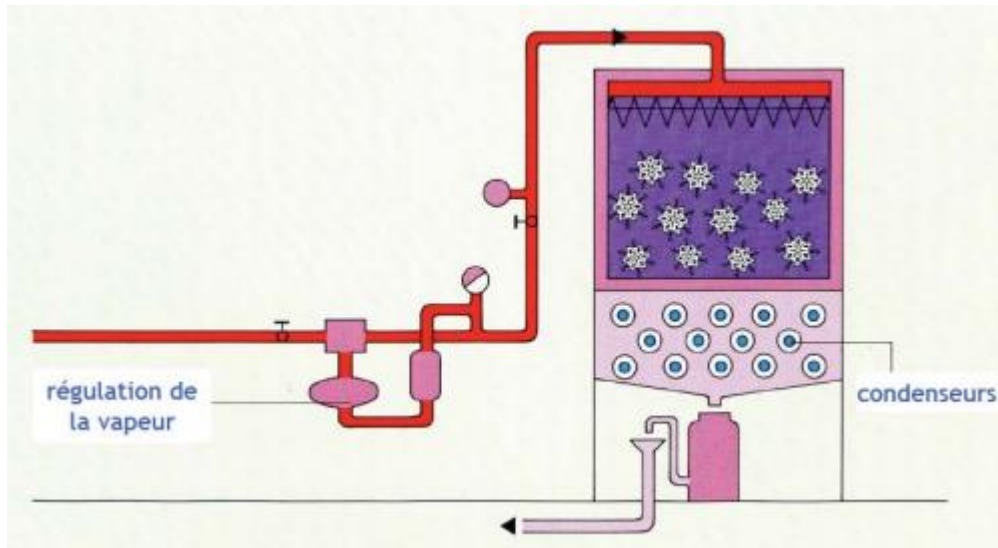


Figure 11: Schéma du procédé d'hydrodiffusion.

II.4.2-Extraction par fluide supercritiques

Le dioxyde de carbone est le liquide supercritique le plus couramment utilisé, stable, insipide, inodore et incolore, mais peut être asphyxiant à des concentrations élevées. Il est thermodynamiquement stable, insipide, inodore et incolore, mais peut être asphyxiant à des concentrations élevées. L'utilisation du dioxyde de carbone est relativement récente, le CO₂ étant le plus largement utilisé en raison de sa disponibilité et de ses conditions d'extraction simples. (Besombres, 2008).

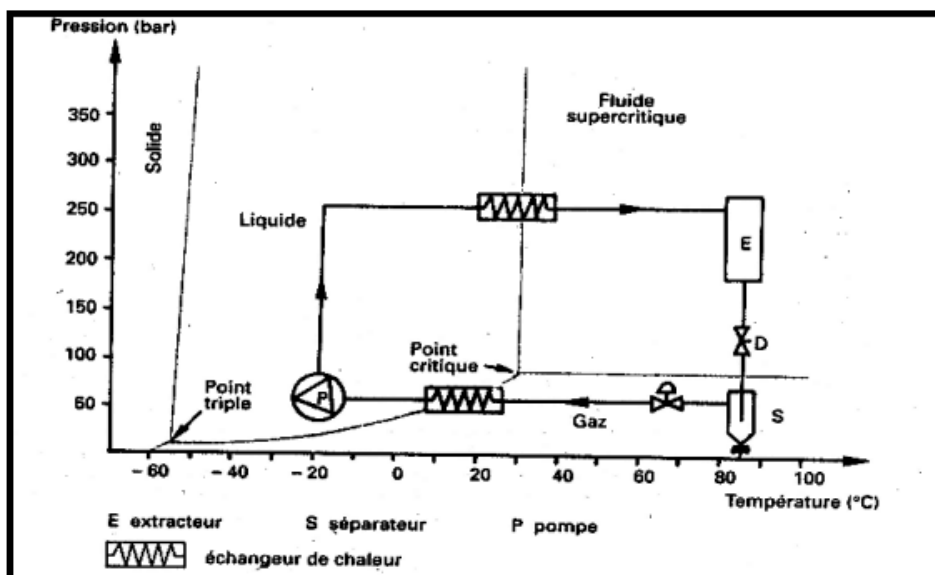


Figure12: Schéma de principe d'une extraction par CO₂ supercritique (Pellerin, 2001)

II.4.3- Extraction assistée par micro-onde

Micro-ondes, électromagnétiques à la vitesse de la lumière, sont utilisées industriellement pour le transfert de chaleur, notamment pour l'extraction d'huiles essentielles. La haute fréquence (2,45 GHz) à leurs quatre micro-ondes permet de refroidissement entre les dipôles (Besombres, 2008).

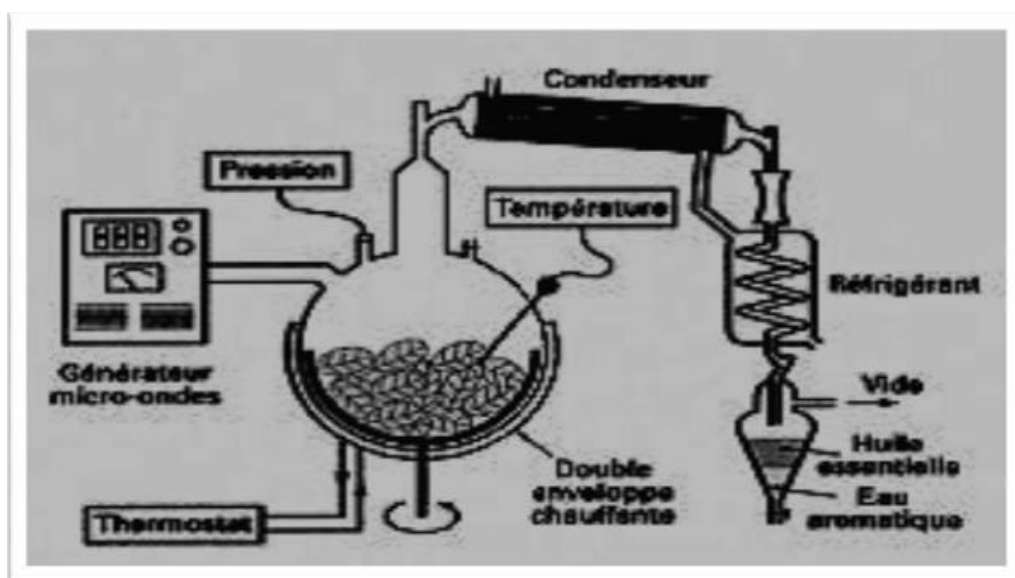


Figure13 : Schéma d'une extraction assistée par micro-onde sous vide (Besombres, 2008)

II.4.4-Enfleurage

Cette méthode est particulièrement employée typiquement dans le domaine de la parfumerie, lorsque l'hydrodistillation dénature les molécules à extraire. Les fleurs sont disposées sur des châssis de verre enduit et renouvelées tous les 3 à 7 jours selon les espèces.



Figure14: Enfleurage de pétales de rose (Baleh, 2011)

II.4.4.1- Enfleurage à froid

L'enfleurage est une méthode efficace d'extraction des huiles florales de haute qualité, particulièrement délicates, en suspendant les plantes dans l'huile froide et en les changeant après 12-24 heures, en préservant leur pureté et leur qualité.

II.4.4.2 – Enfleurage à chaud

La technique de macération de l'enfleurage à chaud dans la graisse consiste à incorporer et à détrempier les plantes pendant 12 à 24 heures, à pressuriser et à remplir une chaudière, puis à filtrer afin de séparer la graisse des fleurs.

II.5-Conservation des huiles essentielles

IL est essentiel de prendre certaines précautions lors de la conservation des huiles essentielles. Après avoir extrait l'huile essentielle, il est nécessaire de la conserver dans des flacons en verre opaques bien scellés afin de les protéger de la lumière. Il est également important d'éviter tout contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée des flacons). Ensuite, il est nécessaire de maintenir les flacons à une température basse entre (4 -5 C°).

Une fois distillée, l'H.E. est passée par un filtre puis conservée dans une cuve hermétique. Effectivement, les composés présents dans une huile essentielle sont plutôt volatils et requièrent certaines mesures de préservation. L'huile devra être reposée au moins un mois avant d'être utilisée(Mailhebiau, 1989). Il sera emballé et commercialisé dans des bouteilles en verre opaque brun ou bleu afin de la protéger de la lumière et de l'oxygène. Il est recommandé de ne pas utiliser du plastique car il peut être incompatible avec certaines huiles essentielles.

II.6-Activités biologiques des huiles essentielles

Les H.Es sont largement employées dans le domaine des cosmétiques, de la parfumerie, de l'industrie alimentaire (les arômes) et également dans le domaine de l'aromathérapie. Il s'agit d'une méthode de traitement qui utilise le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les H.Es.(Hellal,2011).

II.6.1- Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

Les huiles essentielles de girofle sont effectives dans la lutte contre la propagation de certains agents bactériens. Les propriétés antibactériennes des huiles sont connues depuis longtemps et sont confirmées par des publications. Les molécules présents dans les huiles sont douées de propriétés antibactériennes, notamment les alcools, les aldéhydes et les phénols (tels que carvacrol, le thymol et l'eugénol). L'huile essentielle de giroflier fait partie des huiles ayant le plus fort pouvoir antibactérien. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* pourrait être attribuée aux phénols et notamment à son constituant majoritaire l'eugénol. Les taux de croissance de *Listeria* souches monocétogènes ont significativement réduits par un traitement de 1 % et 2% d'H.E. de clous de girofle. L'huile essentielle du fruit a montré une forte activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, tandis que l'huile essentielle des feuilles inhibe fortement la croissance de *Bacillus cereus* avec une CMI de 39 µg/mL. L'acétate d'eugényl n'est pas le seul composant dans l'H.E. de clous de girofle à avoir une activité antibactérienne. L'acétate d'eugényl possède également des propriétés bactéricides sur les bactéries aussi bien Gram négative que Gram positive. La nature des composés très volatils et instables des huiles essentielles les rendent très instables et doivent être stockées dans des conditions adéquates pour conserver leurs propriétés chimiques ainsi que physiques. Les souches Gram (-) résistent à l'effet inhibiteur des huiles essentielles, ce peut être expliquée par la présence de protéines membranaire appelées pompes à efflux qui expulsent l'agent antimicrobien hors de la cellule avant qu'il puisse agir. L'intensité de l'effet de l'huile essentielle du clou de girofle est variable selon les souches étudiées.

II.6.2- Pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

La détermination de l'activité antioxydante (capacité ou potentiel) des divers échantillons biologiques est généralement basée sur l'inhibition d'une réaction particulière en présence d'un antioxydant (Bousbia, 2011). L'oxydation des aliments entraîne des modifications qui impactent leur saveur, leur couleur, leur odeur et donc leur qualité nutritionnelle. Les lipides subissent cette oxydation par une chaîne de réactions radicalaires en présence d'oxygène. Ces hydroperoxydes présentent une instabilité et se transforment rapidement en différents sous-produits tels que des époxydes, des cétones et des aldéhydes, ce qui compromet la qualité des produits alimentaires (Daouda, 2015). Selon plusieurs recherches. Le clou de girofle

(*Syzygium aromaticum* (L.)) joue un rôle crucial dans la médecine traditionnelle en raison de ses nombreuses propriétés biologiques. Les composés chimiques du clou de girofle comprennent différentes catégories et groupes tels que les hydrocarbures, les monoterpènes, les composés phénoliques et les sesquiterpènes. Les composés phytochimiques les plus fréquemment observés dans l'huile de girofle sont l'eugénol (70 à 85 %), l'acétate d'eugénol (15 %) et le β -caryophyllène (5 à 12 %) (**Mittal et al., 2014**). L'eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol), parmi les divers ingrédients actifs, possède de nombreux bénéfices biologiques tels que des propriétés antioxydantes, anticancérigènes, antibactériennes, antifongiques et insecticides (**Mittal et al., 2014**).

Chapitre III : Matériel et Méthodes

Le matériel et méthodes d'une étude ou d'un projet est essentielle pour comprendre comment la recherche a été menée. Cette section détaille les outils, les matériaux et les procédures spécifiques utilisés pour collecter des données ou mener des expériences. Elle fournit un cadre clair pour la reproductibilité des résultats et permet aux lecteurs de comprendre la rigueur méthodologique appliquée.

III.1-Matériel biologique

Le matériel végétal utilisé comme matière première est représenté par le clou de Girofle, une plante disponible dans le marché tout au long de l'année.

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

- **Couleur** : Marron
- **Odeur** : Forte



Figure 15: Clous de girofle

III.2- Souches microbiennes utilisées

Dans ce travail une collection de 5 souches microbiennes est utilisée au total : 4 souches bactériennes ATCC (American Type Culture Collection), et 1 souche fongique. L'ensemble des souches a été fourni par le laboratoire de microbiologie et de l'activité microbienne avec les détails représentés ci-dessous :

Espèce	Gram	Famille
<i>E.coli</i>	Gram -	Enterobacteriaceae
<i>S.aureus</i>	Gram +	Staphylococcaceae
<i>P.aeruginosa</i>	Gram -	Pseudomonadaceae
<i>B.subtilis</i>	Gram +	Bacillaceae
<i>C.albicans</i>	Gram +	Saccharomycetaceae

III.3-Extraction par hydro distillation

III.3.1-Hydro-distillateur

L'appareil utilisé pour l'hydro-distillation est schématisé dans (la figure 16). Il comprend un chauffe-ballon qui permet une distribution homogène du chauffage dans le ballon, un ballon en verre où sont placées la poudre du clou de girofle et l'eau distillée, une colonne de condensation de vapeur (réfrigérant) issue de l'échauffement du ballon, et une ampoule à décanter en verre qui reçoit les extraits de la distillation et permet la séparation de la phase aqueuse de la phase huileuse par décantation.



Figure 16: hydro-distillateur (photo réelle)

Mode opératoire

La méthode d'extraction choisie est l'hydro distillation selon la Pharmacopée Européenne (2004).

- Introduire 40g de poudre dans un ballon contenant 400ml d'eau et de porter l'ensemble à ébullition (température environ 85°C).
- L'huile essentielle se vaporise par chauffage en même temps que l'eau et est entraînée par la vapeur d'eau vers le réfrigérant (zone froide). Les vapeurs se transforment en liquide. Ce dernier est en général formé de 2 liquides non miscibles encore appelés phases :
 - La phase aqueuse, la plus abondante est constituée d'eau dans laquelle sont dissoutes très peu d'essences odorantes.
 - La phase organique (huile essentielle) est constituée d'essences odorantes.
- L'huile essentielle de clou de girofle a une densité supérieure à celle de l'eau (clou de girofle),
- Après 40 minutes, on observe l'apparition de la première goutte de distillat. La distillation se poursuit jusqu'à obtention d'environ 140 ml de distillat (après 4 heures).

Matériel et Méthodes

- Le dernier est transféré dans une ampoule à décanter de 500 ml et extrait par trois fois 15 ml de dichlorométhane.
- L'ensemble est agité et dégazé. Après décantation, on obtient deux phases :
La phase supérieure (l'eau) et la phase inférieure.
- Après la séparation des deux phases, on sèche la phase inférieure (phase organique) à l'aide du sulfate de magnésium et on filtre. Par la suite, on évapore le dichlorométhane (40°C) jusqu'à l'obtention d'une huile jaunâtre (utiliser évaporateur rotatif)
- L'huile essentielle est ainsi récupérée et conservée à une température 4°C, à l'abri de la lumière dans des flacons en verre sombre pour éviter sa dégradation.



Figure 17 : Etapes d'extraction de l'huile essentielle (Photos réelles)

III.4-Analyses de l'huile essentielle

III.4.1- Caractéristiques organoleptiques

Pour évaluer les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles, plusieurs méthodes et équipements peuvent être utilisés:

Évaluation sensorielle :

- ☐ **Olfaction** : L'évaluation de l'odeur est généralement effectuée par des panels de dégustation formés. Ils peuvent utiliser des flacons spécifiques ou des diffuseurs pour libérer l'arôme de l'huile essentielle.
- ☐ **Goût** : Certaines huiles essentielles peuvent être goûtées pour évaluer leur saveur, souvent diluées dans une solution neutre pour éviter toute irritation.
- ☐ **Apparence** : L'aspect visuel de l'huile essentielle peut être évalué pour noter sa clarté, sa couleur et toute particule visible.

III.4.2-Calcul de rendement

on prélève l'huile que l'on pèse directement, et on calcule le rendement d'après la formule ci-dessous :

$$RH = (MH / Mmv) \times 100$$

Où:

RH : rendement en huile (%)

MH : Masse de l'huile essentielle en grammes.

Mmv : Masse de la matière végétale en grammes.

III.4.3- Paramètres physico-chimiques

III.4.3.1-Mesure de pH

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

III.4.3.2-Mesure de pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire est la capacité d'une substance à faire tourner le plan de polarisation de la lumière. Cette propriété est mesurée en degrés (°) et peut être positive (+) ou négative (-) selon le sens de rotation. La mesure du pouvoir rotatoire permet d'analyser la composition chimique des substances. La mesure de pouvoir rotatoire est réalisée en utilisant un polarimètre au niveau du laboratoire.

III.5-Activité antimicrobienne

- **Activation des souches étudiées**

A partir d'un milieu de conservation on effectue un prélèvement de 1ml qui va être introduit dans 9ml de bouillon nutritif, qu'on incube à 37°C durant 3 heures. 0,1 ml de cette dernière solution est ensemencée en surface dans une boîte de pétri renfermant le milieu solide (MH), et qui va être incubé à 37°C durant 24 heures (**Moroh et al, 2008**).

- **Repiquage des souches bactériennes**

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum (**Moroh et al, 2008**).

- **Préparation de l'inoculum**

Après 24 heures d'incubation à 37°C, trois à quatre colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 5 ml de bouillon nutritif. Des dilutions de suspension bactérienne sont effectuées afin de standardiser l'inoculum. La concentration finale des bactéries.

III.6-Etude de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles

Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland est préparée à partir d'une culture pure et jeune âgée de 18 heures. Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à 625 nm, peut être diminuée (ou augmentée) en ajoutant plus de culture afin d'ajuster la densité optique (DO).

Il est à signaler d'une part que la suspension ajustée devra contenir 107UFC/ml (units forming colony /ml) et d'autre part que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au-delà de 15 minutes faute de quoi la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

Cet inoculum sert à ensemer des géloses de Mueller Hinton coulées dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm (qui correspond à 20 ml pour les boîtes de 90 mm de diamètre) puis séchées à l'étuve à 37°C avant emploi.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Pour chaque souche testée, trois boîtes de Pétri sont écouvillonnées par le même écouvillon à la condition d'être recharger pour chacun d'elles.

Des disques de papiers wattmen de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de gélose ensemencée après avoir été chargé de 15 µl d'huile essentielle diluée dans du DMSO (dimethylsulfoxyde). D'autres disques, imbibé de DMSO sont utilisés comme témoins. Des antibiotiques sont effectués en parallèle avec les aromagrammes. Afin de garantir des conditions expérimentales comparables, chaque trois dépôt d'huile essentielle de concentration similaire ont été placés dans la même boîte. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré.

- La sensibilité de la souche est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm.
- La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm.
- Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm.

Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm la bactérie est très sensible (**Duraffourd et al.,1990**).



Figure 18 : Dépôt des disques imbibés (photo réelle)

III.7- Etude de l'activité antioxydant

III.7.1-Matériel et réactifs

L'évaluation de l'activité antioxydant de l'extrait des clous de girofle a été réalisée en utilisant le matériel suivant :

- Un spectrophotomètre UV-visible de la marque Jenway.
- Une balance sensible avec une précision de 0.01 mg.
- Des tubes à essayer avec leurs supports.
- Deux pipettes graduées de 1ml ainsi qu'une micropipette (pipette personnalisée).
- Le papier aluminium est utilisé pour protéger les solutions de la lumière.
- Une fiole de 100 ml pour préparer la solution de DPPH.

III.7.1-Produits employés

Tableau 03: produits et standards utilisés, leurs marques et puretés

Produits et standards	Marque	Pureté
DPPH	Flucka	97%
Méthanol	Merck	99,50%
Vitamine C	Sigma-Aldrich	>99%

Pour le DPPH l'absorbance mesurée à 517 nm montre une chute rapide dans un intervalle très réduit de la dose d'extrait des clous de girofle, comme le montre le **Tableau 03**.

La solution de concentration de 0,04 % du DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) est dissoute dans le méthanol absolu à raison de 4 mg de DPPH dissous dans 100 ml de méthanol. On a préparé les échantillons en dissolvant 0,5 mg d'extrait dans 01 ml de méthanol. Ensuite, cette solution, appelée solution mère, est diluée afin d'obtenir des concentrations variées, d'environ mg par ml. En même temps, on a préparé des solutions méthanoliques contenant de la vitamine C, en dissolvant 0,2 mg de chaque standard dans 01ml de méthanol. Les conditions de mesure de l'absorbance sont identiques à celles de l'échantillon testé. On ajoute 1 ml de méthanol dans des tubes secs et stériles et les différentes concentrations.

Un blanc est préparé pour chaque dilution avec 1 ml de méthanol et 1 ml de la solution DPPH.

La lecture est réalisée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible par la mesure d'absorbance à 517 nm dans des cuves en quartz de 2 ml.

III.7.3-Détermination du pouvoir antioxydant

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH à 50% (EC50), les résultats sont exprimés en activité antioxydant, qui exprime la capacité de piégeage du radical libre et elle est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydant << AA% >> est donnée par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Abs control} - \text{Abs test}) / \text{Abs control} * 100$$

Soit :

AA : Activité antioxydant.

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Abs control : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution méthanol + DPPH.

Abs test : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV.1-Analyses de l'huile essentielle

IV.1.1- Caractéristiques organoleptiques

Chaque extrait se distingue par ses caractéristiques organoleptiques telles que l'odeur, l'aspect et la couleur. Les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des clous de girofle sont comparées aux normes d'AFNOR dans le (Tableau 4).

Tableau 04: Caractéristiques organoleptiques (Nardi *et al.*, 2003)

	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 pale	Forte odeur épicée et tonifiée

Notre H.E présente des paramètres organoleptiques similaires à ceux mentionnés dans la littérature.

IV.1.2-Analyse physico-chimique

Auparavant, les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle étaient les caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur, odeur, goût), mais comme ces propriétés ne fournissent que des informations très limitées sur ces essences, il faut recourir à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont déterminées par des normes reconnues qui concernent les caractéristiques physicochimiques (Taleb, 2015).

IV.1.2.1- calcul de rendement

Le pourcentage du rendement d'huile extrait dans cette étude est représenté dans le tableau 5.

Tableau5 : Calcule du rendement d'huile extrait à partir de clous de girofle

Masse traitée(g)	100	40	40	20
Volume d'eau (ml)	500	500	500	500
Durée d'extraction (h)	30 min	2h30min	3h15min	1h
Masse d'huile obtenue(g)	2,622	1,374	2,095	1,84
Rendement (%)	2,622	3,435	5,2375	9,2

Dans notre situation, l'utilisation de l'hydrodistillation est plus efficace que d'autres méthodes d'extraction. Elle se caractérise par sa simplicité, son coût abordable et sa facilité d'utilisation. En complément de l'analyse des rendements en HE a permis d'obtenir des résultats satisfaisants pour l'extraction par voie de purification par l'hydrodistillation.

Les propriétés physicochimiques de l'huile de clou de girofle, notamment, le pH et le pouvoir rotatoire ont été établis selon des méthodes standardisées par l'AFNOR.

IV.1.2.2-Contrôle du pH

Le tableau suivant présente les résultats obtenus de la mesure de pH. Les résultats montrent la nature acide d'huile extrait à partir du clou de girofle.

Tableau 06: Mesure du pH

Méthodes	Papier pH	pH mètre
pH	3-5	3,71

IV.1.2.3-Mesure de pouvoir rotatoire

L'huile essentielle de clou de girofle possède un pouvoir rotatoire qui est très utile pour son identification, sa caractérisation et son contrôle de qualité.

De nombreuses études ont examiné le pouvoir rotatoire de l'huile essentielle de clou de girofle, révélant des variations des valeurs α dues à des facteurs tels que l'origine des clous de girofle, les méthodes d'extraction et les conditions d'analyse. Le tableau 07 résume les mesures du pouvoir rotatoire issues de certaines études :

Tableau 07 : Résultats du mesure de pouvoir rotatoire

Étude	Température (°C)	Pouvoir rotatoire (α) (°)
Benmansour <i>et al.</i> (2019)	25	-1,48
Présente étude	25	-1,52

On observe que le pouvoir rotatoire (α) de l'huile essentielle de clou de girofle est toujours négatif, ce qui est caractéristique des molécules optiquement actives ayant une configuration (R).

La valeur de α varie entre -1.48° et -1.52° pour les différentes études présentées. Cette variation peut s'expliquer par plusieurs facteurs, tels que l'origine des clous de girofle, la méthode d'extraction de l'huile essentielle, la concentration de l'huile dans le solvant, la longueur d'onde de la lumière utilisée et la température de mesure.

IV.2-Evaluation de l'activité antimicrobienne

IV.2.1-Activité antibactérienne

IV.2.2-Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait en observant l'absence de croissance bactérienne autour des disques, en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en millimètres, et en interprétant ces résultats à l'aide de symboles indiquant la sensibilité des bactéries (**Tableau 8**).

Tableau 08 : Résultats de l'aromatogramme

Souche microbienne	Gram	Diamètre (mm)	Sensible	Résistante
<i>Escherichia coli</i>	-	27±	+++	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	26	+++	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	22	+++	/
<i>Bacillus subtilis</i>	-	30	+++	/

L'effet de l'huile essentielle de clou de girofle sur les souches bactériennes :

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* ont montré un effet positif (souches sensibles).

Selon une étude réalisée par **Rhayour (2016)**, il a été démontré que l'huile essentielle de girofle a une activité bactéricide principalement grâce à son composant principal, l'eugénol, issu de la famille des phénols. Il semble donc que les HE commencent par fixer ces molécules sur les membranes bactériennes, ce qui entraîne des changements de structure

et de perméabilité, entraînant ainsi une perte de constituants cellulaires causée par une lyse importante des cellules bactériennes.

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

Dans cette étude, une importante activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle contre *E. coli* a été observée. Ce résultat est surprenant, car *E. coli* est une bactérie à Gram négatif, généralement considérée comme plus résistante aux huiles essentielles.

Afin de confirmer ce résultat inattendu, les tests d'activité antibactérienne ont été répétés à plusieurs reprises. À chaque fois, l'huile essentielle de clou de girofle a démontré une activité positive contre *E. coli*.

Ce résultat contraste avec celui d'une étude précédente (**Atmani et al., 2015**), qui avait observé que la souche à Gram négatif *E. coli* était sensible à l'huile essentielle de clou de girofle.

Certains auteurs ont rapporté que la sensibilité des bactéries aux extraits végétaux ne dépend pas nécessairement de leur classification Gram, mais plutôt de la composition spécifique des extraits utilisés (**Dorman et al., 2000**). Cela pourrait expliquer les résultats divergents observés dans les différentes études.

<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

Figure 19 : Résultat de l'aromatogramme des souches microbiennes testées (photos réelles)

L'activité antibactérienne de l'extrait d'huile essentielle a été évaluée par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide Muller-Hinton. Cette méthode permet de mesurer l'efficacité de l'extrait à inhiber la croissance microbienne in vitro. Pour cela, le diamètre des halos d'inhibition à l'extérieur de la zone de croissance fermée a été mesuré.

Les bactéries sont classées comme sensibles ou résistantes selon les critères suivants :

Diamètre des halos < 8 mm : bactéries résistantes (-)

Diamètre des halos entre 9-19 mm : bactéries sensibles (+)

Diamètre des halos entre 15-19 mm : bactéries très sensibles (++)

Diamètre des halos $\geq$ 20 mm : bactéries extrêmement sensibles (+++)

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

Selon **De Billerbeck (2007)**, l'activité des huiles devrait être liée à la composition spécifique des huiles volatiles de la plante, à la configuration structurale des composants constitutifs des huiles volatiles, à leurs groupes fonctionnels et aux interactions synergiques possibles entre les composants.

Cette activité pourrait être attribuée au composé majoritaire de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, qui est l'eugénol (appartenant à la classe des phénols). L'eugénol est très actif contre les micro-organismes testés, utilisé comme agent bactéricide ou bactériostatique selon la concentration utilisée.

Il rend la membrane du micro-organisme perméable, provoquant une fuite d'ion K⁺, ce qui implique la perte de l'osmose de la cellule suivie de la mort du micro-organisme. De plus, il empêche la croissance du micro-organisme (**Beloud, 2003**).

L'huile essentielle étudiée attaque la membrane bactérienne en modifiant ses propriétés physiques. Cette membrane est composée de glycérophospholipides et se divise en deux couches : une couche hydrophobe et l'autre hydrophile. Elle est semi-perméable et permet le passage de molécules polaires ainsi que de gaz.

Dans la situation actuelle, l'eugénol provoque une perte de cette perméabilité sélective en combinant des parties hydrophiles et hydrophobes. Cette augmentation de perméabilité fait perdre à la bactérie ses constituants cellulaires.

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

Enfin, si la bactérie survit, l'huile attaquera directement le matériel génétique de cette dernière (Bouzaa *et al.*, 2022).

IV.2.3-Activité antifongique

L'activité antifongique a été expérimentée sur la levure du genre *Candida* : *Candida albicans*.

Les résultats des diamètres d'inhibition sont exposés dans (Tableau 9).

Tableau 09 : Résultats de l'aromatogramme

Souche fongique	Diamètre (mm)	Sensible
<i>Candida albicans</i>	34mm	+++

D'après les informations fournies, les principaux résultats sont les suivants :

- La levure *Candida albicans* s'est montrée très sensible à l'extrait de clou de girofle, comme en témoignent les importants halos d'inhibition observés.
- L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) a démontré une forte activité antifongique sur l'ensemble des souches testées.

Ces données suggèrent que les composés bioactifs présents dans le clou de girofle, qu'il s'agisse de l'extrait ou de l'huile essentielle, pourraient être utilisés comme agents antifongiques naturels potentiels, notamment dans le traitement des infections à *Candida albicans*.



Figure 20: Résultat de l'aromatogramme de la souche antifongique (photos réelles)

Les fongicides synthétiques sont largement utilisés pour prévenir la croissance des champignons filamenteux et constituent une alternative aux produits chimiques reconnus pour leurs propriétés cancérogènes, tératogènes, oncogènes et génotoxiques (**Nagendra et al., 2010**).

L'huile essentielle de clous de girofle possède une forte activité antifongique contre *Candida albicans*, un pathogène fongique opportuniste (**Barour, 2022**)

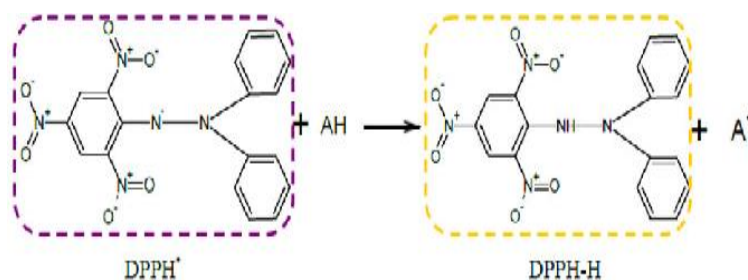
Les études ont montré que l'huile essentielle de clous de girofle a une activité inhibitrice élevée contre la croissance de *Candida albicans*. Les composés majeurs de l'huile, comme l'eugénol et le β -caryophyllène, sont responsables de cette activité antifongique.

De plus, les résultats de ces travaux concordent avec ceux d'autres chercheurs qui ont également rapporté l'efficacité de l'huile essentielle de clous de girofle contre d'autres pathogènes fongiques comme *Penicillium sp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*

Donc, l'huile essentielle de clous de girofle représente une option intéressante pour le développement de nouveaux agents antifongiques naturels, notamment contre les infections à *Candida albicans* (**Barour, 2022**).

IV.4-Evaluation de l'activité antioxydante

IV.4.1-Test au DPPH



Où AH est un composé antioxydant capable de céder un H^+ au radical DPPH.

Figure 21 : Forme réduite du radical DPPH (In Benayache *et al.*,2011)

L'activité antioxydante des huiles a été évaluée en utilisant la méthode par le DPPH. Les huiles essentielles ont été évaluées pour leur capacité à capturer les radicaux DPPH selon les critères décrits par (Velazquez *et al.* 2003).

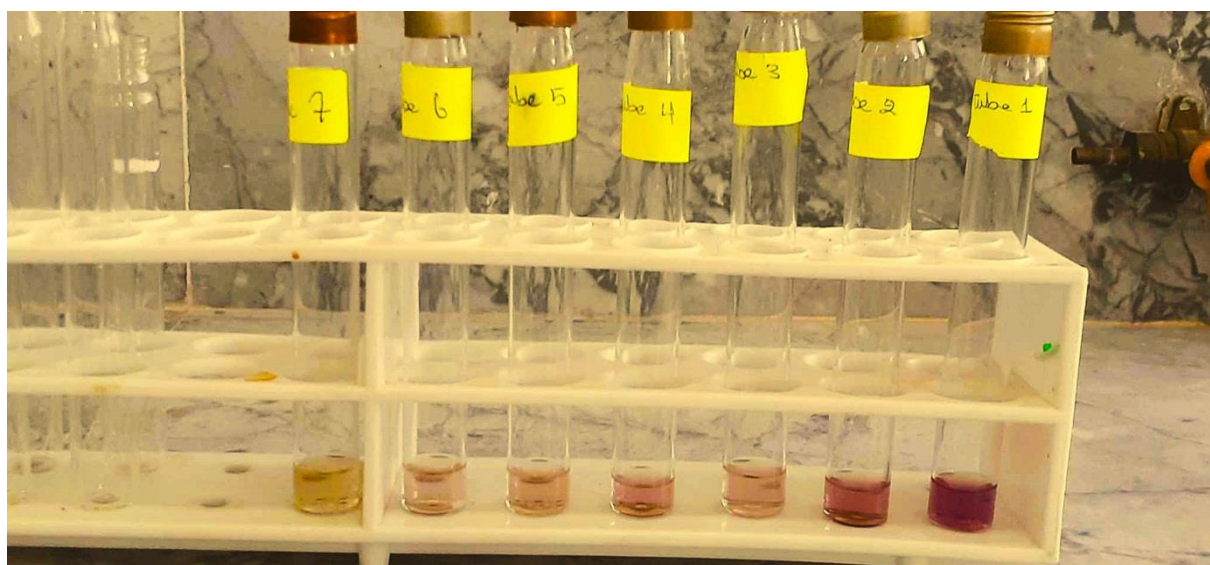


Figure 22 : évolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de l'HE de clous de girofle (photos réelles)

Tableau 10: Variation du taux de piégeage (1%) du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des clous de girofle

Tube (n°)	Concentration (mg.ml ⁻¹)	V (µl)	I _{moy} (%)
1	0,00000	0	0
2	0,00125	5	68,346
3	0,00250	10	73,925
4	0,00500	20	78,992
5	0,01000	40	84,856
6	0,01500	60	87,304
7	0,02000	80	89,468

Le tableau présente les résultats de l'expérience pour sept tubes différents, chacun contenant une concentration d'extrait de clous de girofle différente. Il montre que le pourcentage d'inhibition du DPPH augmente avec la concentration d'extrait de clous de girofle. Cela signifie que les clous de girofle ont une activité antioxydante, c'est-à-dire qu'ils sont capables de piéger les radicaux libres. Les radicaux libres sont des molécules instables qui peuvent endommager les cellules et contribuer au vieillissement et à diverses maladies.

- Le tableau indique que le taux d'inhibition du DPPH est de 0 % pour le tube 1, qui ne contient pas d'extrait de clous de girofle. Cela confirme que le DPPH n'est pas inhibé par lui-même.
- Le tableau indique que le taux d'inhibition du DPPH est de 68,346 % pour le tube 2, qui contient la concentration d'extrait de clous de girofle la plus faible (0,00125 mg/ml). Cela suggère que même une faible concentration d'extrait de clous de girofle a une activité antioxydante.
- Le tableau indique que le taux d'inhibition du DPPH est de 89,468 % pour le tube 7, qui contient la concentration d'extrait de clous de girofle la plus élevée (0,02000 mg/ml). Cela suggère que l'activité antioxydante des clous de girofle augmente avec la concentration d'extrait.

Tableau 11 : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des étalons d'antioxydants (vitamine C)

Tube	Concentration (mg.ml ⁻¹)	V (µl)	I _{moy} (%)
1	0,0000	0	0,000
2	0,000498753	5	12,379
3	0,002955665	30	32,120
4	0,005825243	60	62,945
5	0,00861244	90	68,366
6	0,013953488	150	73,463
7	0,018181818	200	77,832

IV.3.2-Détermination de la valeur EC50

La présence d'une activité antioxydante remarquable dans l'huile essentielle de clous de girofle est principalement due à sa forte concentration en eugénol. L'efficacité de cette huile essentielle en tant qu'antioxydant naturel est confirmée par les résultats obtenus par la méthode DPPH, ce qui en fait une alternative prometteuse aux conservateurs synthétiques dans différentes applications industrielles. La valeur EC50 est une mesure de la concentration d'un échantillon qui est nécessaire pour inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique de 50%. Dans le contexte de l'activité antioxydante, la valeur EC50 est la concentration d'un échantillon nécessaire pour piéger 50% des radicaux libres dans un DPPH solution. Une valeur d'EC50 inférieure indique qu'un échantillon a une activité antioxydante plus élevée, tandis qu'une valeur d'EC50 plus élevée indique qu'un échantillon a une activité antioxydante plus faible (**Vimala et al. ,2011**). On sait que l'acide ascorbique (vitamine C) a une propriété antioxydant très élevée et c'est pourquoi nous l'avons utilisé comme standard pour le comparer à nos échantillons, où le rôle antioxydant de l'acide ascorbique découle de ses propriétés réductrices.

Tableau 12: valeurs EC50 de l'extrait de clous de girofle et le standard antioxydant (vitamine C)

Composés	EC50 (µg/ml)
L'HE de clous de girofle	0,950
Vitamine C	4,8

Les résultats de cette expérience suggèrent que les HEs de clous de girofle pourraient être une source utile de composés antioxydants. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats et pour déterminer la meilleure façon d'utiliser les clous de girofle à des fins thérapeutiques.

Les résultats de cette expérience sont en accord avec les résultats d'autres études qui ont montré que les clous de girofle ont une activité antioxydant. Par exemple, une étude a montré que l'extrait de clous de girofle a un effet protecteur contre les dommages oxydatifs induits par le peroxyde d'hydrogène dans les cellules hépatiques **Chen and Kong (2010)**. Une autre étude a montré que l'extrait de clous de girofle a un effet protecteur contre les dommages oxydatifs induits par les rayons ultraviolets dans les cellules de la peau **Yang et al., (2010)**

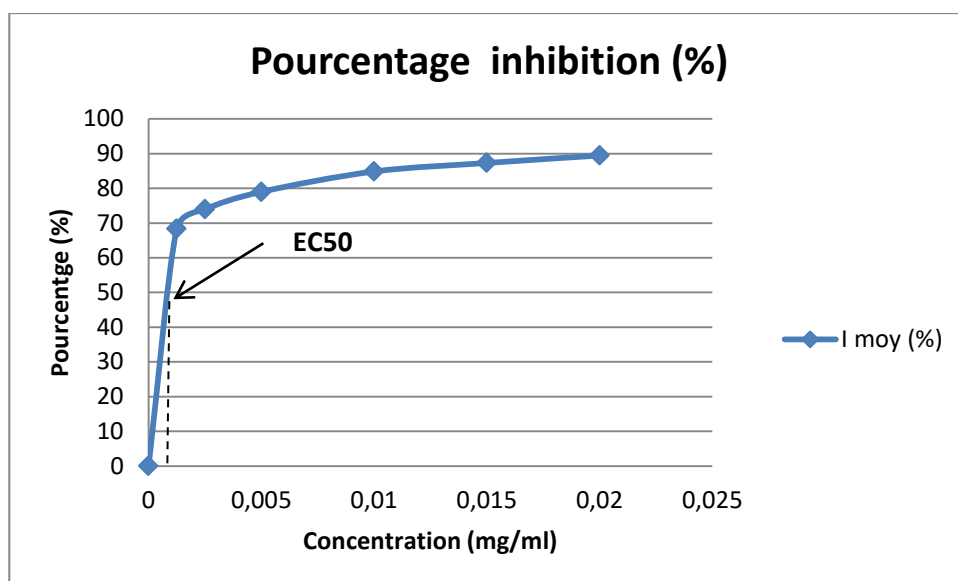


Figure23 : Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait du clous du girofle en différentes concentrations

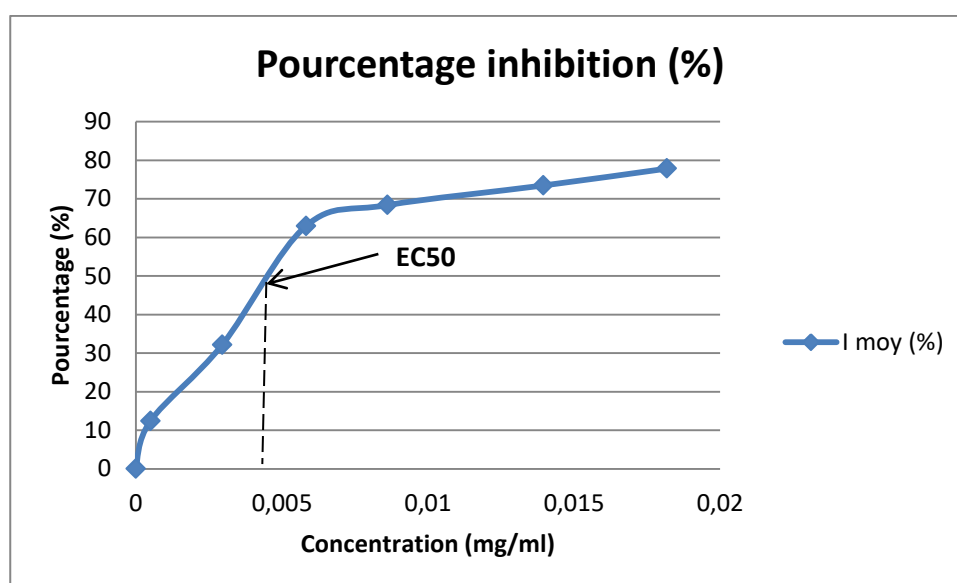


Figure24 : Variation du taux de piégeage du DPPH par la vitamine C en différentes concentrations

Conclusion

Conclusion

Le clou de girofle est à l'origine une épice locale orientale. Cependant, pendant la période. Il est devenu au fil du temps un produit de luxe en Occident, puis un produit alimentaire. (En particulier en utilisant de la vanilline) avant d'être employé comme un produit d'aromathérapie. De nos jours, on peut également trouver le bouton floral du giroflier dans divers produits.

Pendant notre étude, Il a été observé que le clou de girofle contient une quantité d'huile que l'on peut extraire par hydrodistillation avec un rendement variant entre (2,622%et 9,2%) et nous avons examiné la composition chimique, l'activité antioxydante en capturant les radicaux libres, ainsi que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de clou de girofle. Les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* ont présenté des effets, anti-oxydants par inhibition des radicaux DPPH, une EC₅₀ de 0,950 (µg/ml) a été notée. Une bonne sensibilité des souches microbiennes et fongique à l'huile. Ces résultats confirment que huile de clous de girofle possède une activité inhibitrice étendue sur les microorganismes testés.

En effet, les résultats de ces travaux montrent que le clou de girofle peut être considéré comme le champion de tous les antioxydants connus à ce jour. Une goutte d'huile de clou de girofle est 400 fois plus puissante. Le clou de girofle est une herbe médicinale puissante avec un héritage traditionnel et une histoire solide. Il a des avantages pour la santé physique, mentale et émotionnelle. Il possède des propriétés antioxydantes, antifongiques, antivirales, antimicrobiennes, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anesthésiques, analgésiques et insectifuges. L'eugénol est le principal constituant responsable des propriétés médicinales du clou de girofle. Il est l'épice la plus importante du monde.

Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur ce fruit en se focalisant sur d'autres extraits voir même isolement de substances qui sous-tendent les diverses activités détectées. De plus, des études approfondies concernant l'identification des composés par des méthodes plus performantes (CPG, CPG/SM) seront nécessaires. Pour mieux évaluer l'activité antibactérienne, d'autres études *in Vitro* et *in Vivo* seraient intéressantes, et il serait souhaitable de faire d'autres poursuites afin de dévoiler les autres activités biologiques de *Syzygium aromaticum*.

Références Bibliographiques

“A”

Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for Prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71(10), 1397-1421.

Amshoff Gjh. (1966). Myrtacées. Paris: MNHN ;P. 3-4; 16.

Atmani H., Baira K. (2015). Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères physico –chimique de l'huile essentielle du clou de Girofle *Syzygium aromaticum*. Mémoire de Master : Biologie et Physiologie Végétal.

Azevedo N.R., Campos I.F., Fereira H.D., Prtes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C., Paula J.R. & Ferri P.H. (2001). Chemical variability in the essential oil of Hyptis Suaveolens. *Phytochemistry*; 56: 733-736.

“B”

Bakkalia. F, Averbeck. S, Averbeck. D, Idaomar.M. (2008). Biological effects of essential oils.A review. *Food and Chemical Toxicology*; 46: 446–475

BARBELET S. (2015). Le Giroflier : Historique, Description Et Utilisations De La Plante Et De Son Huile Essentielle. (Mémoire de fin d'étude Pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie) Université De Lorraine.

Barbelet, S. (2015). *Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine). (Le giroflier)

Barour, R., & Derguini, A. (2022). *Etude de l'activite antibacterienne de l'huile essentielle du clou de girofle (syzygium aromaticum)* (Doctoral dissertation, École Nationale Supérieure Vétérinaire).

Bayala, B. (2014). Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II ; Université Joseph Ki-Zerbo (Ouagadougou, Burkina Faso).

Beloud, A. (2003). Plante médicinales d'Algérie. Offices des publications universitaires, p. 144-145.

Benjilali, B. (2006).Extraction des plantes aromatiques et médicinales. Cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements ; Département des sciences alimentaires et nutritionnelles, Institut agronomique et vétérinaire (I.A.V.) Hassan II, Rabat, Maroc ; pp : 18-23.

Besombres, C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques. Thèse doctorat de l'université de la Rochelle ; page : 49, 50.

Billerbeck, V.G. (2007).Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* 5, 249–253.

Boullard, B. (2001). Plantes médicinales du monde : croyances et réalités. Paris : Ed. ESTEM ; p. 511-512.

Bousbia, N. (2011). *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).

Bouazza, A & Zid, H & Hariza, E. (2022).Etude des activités antimicrobienne de l'huile essentielle de la plante *Syzygium aromaticum* ,(université frères Mentouri constantine 1).Composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepetaucrainica* Constantine : Université de Frères Mentouri, 71 pages.

“C”

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

Chaouch Amira, T. N. R. F. (2023). Conception d'un gel antibactérien à base des huiles essentielles (Clou de girofle, Thym et la Sauge).

Chen, Y., & Kong, F. (2010). Evaluation of antioxidant activity of nutmeg, clove and cinnamon extracts using an oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 5967-5970.

“D”

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

“E”

El Haib, A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse doctorat. L'Université Toulouse III (Paul Sabatier); page:8.

“F”

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

Fichi G., F. Giovanelli, D. Otranto & S. Perrucci, (2007). Efficacy of an essential oil of *caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Exp. Parasitol.*, 115, 168-172.

Fortuitum thèse présentée en vue de l'obtention du Doctorat National.

“G”

Guerrouf Boutheyna-Mihoubi Fella, B. M. C. E. (2023). Revue bibliographique sur les plantes aromatiques algériennes : Composition chimique et vertus antiparasitaires et antifongique. (Revue bibliographique sur les plantes aromatiques algériennes)

“H”

Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et anti oxydantes de certaines huiles essentielles des citrus ; mémoire de magister ; page: 03.

HEYWOOD VH.(1996). Les plantes à fleurs : 306 familles de la flore mondiale. Paris : Ed. Nathan ; p. 11 ; 13-15.

“I”

In Benayache, F., et al. (2011). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 335-340.

“J”

J. BRUNETON, (2016). Pharmacognosie – Phytochimie – Plantes médicinales, Ed. Tec et Doc Lavoisier – Paris – 5ème édition .

“K”

Kong M., Chen X G., Liu C S., Liu C G., Meng X H ., yu L J .(2008).Antibacterial
Kpadonou, D., Allanto, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Agbani, P., Gbaguidi, F., Baba-Moussa, L., ... & Kpoviessi, S. (2019).Relations entre composition chimique, activité antioxydante et toxicité des huiles essentielles de deux espèces de *Cymbopogon* acclimatées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(2), 1201-1209.

“L”

Lawless J. (2002). The Encyclopaedia of Essential Oils. Thorsons, London.L.spp. *kopetdagensis*.Ind. Crop. Prod.58, 315-321.

Lee S., M. Najiah, W. Wendy & M. Nadirah, (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) Against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Front. Agric. China*, 3 (3), 332-336.

Leitão G. G., Leitão S. G. et Vilegak W,(2002).Quik preparative separation of naturel Naphtopyranones with Antioxidant Activity by High-speed Counter-Current Chromatography.Z., *Naturforsch*, 57c, , p. 1051-1055.

Lucchesi, L. (2005).Extraction sans solvant assisté par micro-ondes .Thèse de doctorat université de la Réunion ; page : 24

“M”

Macias F., Castellano R ., Oliva P ., Cross., Torres A. (1997). Proceedings of Brighton, UK , 33-38

Mailhebiau, P. (1989). La nouvelle aromathérapie : caractérologie des essences et tempéraments humains. Toulouse : Ed. Nouvelle Vie ; 372 p.

Menghani, E., Rana, A., Saraswat, P., & Pareek, A. (2014).Antibacterial potentials of Two indian spices. 5(3), 666-672.

Molyneux, P(2004). The use of the stable free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J. Sci. Technol 26 (2) , p. 211-219.

Myrtacées. (1953)Paris : Firmin-Didot et Cie ; P. 1-2.

“N”

Nagendra P.M.N., Shankara B.S. and Sreenivasa M.Y. (2010). Antifungal activity of Neem. Journal of Agricultural Technology, Vol.6 (1): pp.127-133

Normes AFNOR. (1992). Recueil des normes françaises. Huiles essentielles. AFNOR, Paris.

“P”

Padua L.S., Bunyapraphatsara N., Lemmens R.H.M.J. (1999). Plant Resources of South-East Asia; page: PERRIER DE LA BÂTHIE H. Flore de Madagascar et des Comores, 152ème famille,

Pellerin, P. (2001) : Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. Ann. Fals. Exp. Chim. V. 94, N°954 – pp : 51-62.

Peyron L. ;(1992). Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Chapitre 10, pp 217 – 238. Cité In : Les arômes alimentaires. Coordinateurs RICHARD H. et MULTON J.-L. Ed. Tec & Doc-Lavoisier et Apria. 438 p.

Piochon M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: Thèse de doctorat, université du Québec à Chicoutimi, Canada ; page : 25

“R”

Ramarijaona Rabary BC. (1985). Le giroflier de Madagascar : conditions de production et Différentes utilisations. Thèse de chirurgie dentaire. Université de Nancy I ; 110 f.

Ranoarisoa KM. (2012). Evolution historique et état des lieux de la filière girofle à Madagascar [Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome]. Antananarivo : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques ; 89

Rhayour, K. (2016). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Université de Fès. p 170.

“S”

Saeed, S., & Tariq, P. (2008). In vitro antibacterial activity of clove against Gram negative bacteria. Pak. J. Bot, 40(5), 2157-2160.

Samer, I., & Ladj, O. (2021). *Effet anti-biofilms de l'huile essentielle des clous de girofle « Syzygium aromaticum »* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

Shakeri A., Khakdan F., Soheili V., Sahebkar A., Rassam G., Asili J. (2014). Chemical Silos Thomas, Marc Malanda, Laurent Loubaki ;Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de Cymbopogon citratus grâce à un plan factoriel complet 23. Journal of Food Engineering ; 65 : 219–22

Sophie, B. (2015). Le giroflier : Historique , description et Utilisation de La plante et de Son huile essentielle. Diplôme d'Etat de docteur : Pharmacie .Université de Lorraine, 114p.

Sousa E., Chiavone filho O., Moreno M.T, Silva D.N, Marques M.O.M et Meireles M.A.A. (2002). Experimental results for the extraction of essential oil from Lippia sidoidescham. Brazilian journal of chemical Engineering. 19 (2): 229-24

Svoboda K.P, Hampson J.B.; (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate of aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant biology department, Sac Aucheneruive Ayr. Scotland; pp: 224-232.

“T”

Treiner J. (2000). Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France ; page :143.

“U”

Utilisation, culture. (1999) Volume 3 : plantes à épices, à aromates, à condiments. Paris: Ed. CME ; p. 1-11.

“V”

Violaine, C. (2008). L'aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval. Eds ; page: 2, 4.

“W”

Wilson C.L., M.E. Wisniewski, S. Droby & Chalutz E. (1993). A selection strategy for Microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Sci. Hortic.*, 53, 183-189

“Y”

Yang, G., Yu, R., & Mei, N. (2010). In vitro antioxidant and UV-protective activities of clove (*Syzygium aromaticum* L.) extract. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17), 9727-9734.

Résumé

L'utilisation des huiles essentielles, notamment en aromathérapie, se développe à l'échelle mondiale, portée par la demande de produits naturels et la reconnaissance de leurs effets bénéfiques sur la santé.

L'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum* (giroflie) est extraite par hydrodistillation, avec un rendement d'extraction satisfaisant de 9.2% selon cette étude. L'huile essentielle se caractérise par un pH de 4.12, ce qui facilite son utilisation dans diverses préparations. Les analyses ont montré que l'huile essentielle possède une forte activité antibactérienne et antifongique et un pouvoir antioxydant.

L'huile essentielle possède un effet antimicrobien sur *Escherichia coli* (27mm) *Pseudomonas aeruginosa* (26mm), *Staphylococcus aureus* (22mm), *Bacillus subtilis* (30mm) et *Candida albicans* (34mm).

Effet antioxydant test la capacité de piéger le radical libre DPPH. En comparaison avec d'autres standards de référence, les pouvoirs de piégeage de ce radical sont classés dans cet ordre l'extrait de clous de girofle > vitamine C. Cet extrait possède le plus fort potentiel antioxydant, qui est principalement dû à son principal composé eugénol.

A la lumière de ces études, l'huile essentielle de *Syzygium Aromaticum* est qualifiée comme antioxydant, antimicrobienne à large spectre.

Mots clés : Clous de girofle, huile essentielle, activité antibactérienne, activité antioxydant, extraction.

ملخص

تتطور استخدام الزيوت العطرية، وخاصة في العلاج بالروائح، على نطاق عالمي، مدفوعة بالطلب على المنتجات الطبيعية والاعتراف بآثارها المفيدة على الصحة.

يتم استخراج الزيت العطري من براعم أزهار (*Syzygium aromaticum* القرنفل) عن طريق التقطير المائي، مع عائد استخراج مرضٍ قدره 9.2% وفقاً لهذه الدراسة. يتميز الزيت العطري بدرجة حموضة 4.12، مما يسهل استخدامه في مختلف المستحضرات. أظهرت التحليلات أن الزيت العطري له نشاط مضاد للبكتيريا والفطريات وأكسدة قوي.

أظهر الزيت العطري تأثيراً مضاداً للميكروبات على *Escherichia coli* (27mm), *Pseudomonas aeruginosa* (26mm), *Staphylococcus aureus* (22mm), *Bacillus subtilis* (30mm), and *Candida albicans* (34mm).

مستخلص القرنفل مضاد للأكسدة، له القدرة على التقاط الجذر الحر DPPH. مقارنة بمعايير المرجع الأخرى، تصنف قدرات التقاط هذا الجذر في هذا الترتيب: مستخلص القرنفل < فيتامين ج. يمتلك هذا المستخلص أقوى إمكانات مضادة للأكسدة، والتي ترجع بشكل رئيسي إلى مركبه الرئيسي الإيجينول. في ضوء هذه الدراسات، يمكن وصف الزيت العطري لـ *Syzygium Aromaticum* بأنه مضاد للأكسدة ومضاد للميكروبات على نطاق واسع.

الكلمات المفتاحية: زيت القرنفل الاساسي، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة، الاستخراج.

Abstract

The use of essential oils, particularly in aromatherapy, is growing worldwide, driven by the demand for natural products and the recognition of their beneficial effects on health. The essential oil from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove) is extracted by hydrodistillation, with a satisfactory extraction yield of 9.2% according to this study. The essential oil is characterized by a pH of 4.12, which facilitates its use in various preparations.

The analyses have shown that the essential oil has strong antibacterial, antifungal, and antioxidant activities. The essential oil has an antimicrobial effect on *Escherichia coli* (27mm), *Pseudomonas aeruginosa* (26mm), *Staphylococcus aureus* (22mm), *Bacillus subtilis* (30mm), and *Candida albicans* (34mm). It also has an antioxidant effect, with the ability to scavenge the DPPH free radical. Compared to other reference standards, the radical scavenging powers are ranked in this order: clove bud extract > vitamin C. Based on these studies, the essential oil of *Syzygium aromaticum* is qualified as antioxidant and broad-spectrum antimicrobial.

Keywords: Clove, essential oil, antibacterial activity, antioxidant activity, extraction.