

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Physiologie cellulaire et physiopathologie

Présenté par :

HADDOUCHE Nawel & DERNANI Hadjer

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne et hémolytique de l'huile
essentielle de syzygium aromaticum(clou de girofle).*

Soutenu le : 19/ 09/ 2018

Devant le jury composé de :

M. LEKBAL S.

MAA

Univ. de Bouira

Président

M. LIBDIRI F.

MAA

Univ. de Bouira

Promoteur

M. LAMINE S.

MCB

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2017/2018

Résumé

La présente étude vise à déterminer l'activité antibactérienne de l'huile de girofle contre divers agents pathogènes. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile de clou de girofle contre certaines bactéries pathogènes. L'activité antibactérienne est réalisée par une technique de diffusion sur puits d'agar contre les bactéries pathogènes et la zone d'inhibition est mesurée en mm de diamètre.

L'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) a été obtenue par distillation à la vapeur en utilisant un système de type Clevenger. L'extraction de l'huile a été obtenue à partir de 50 g de fleurs séchées de plantes pendant 3 h avec 500 ml d'eau distillée. La phase aqueuse a été séparée par une ampoule à décanter par séparation simple.

Une méthode de chromatographie liquide à haute performance a été appliquée pour détecter les constituants majeurs d'huiles essentielles de girofle.

L'effet de la température sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de girofle contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Entéroccocos feacalis* a été déterminé. Les huiles essentielles des clous de girofle ont montré une activité antibactérienne après traitement à 100 ° C pendant 30 min, ce qui suggère que la température élevée n'affecte pas l'activité d'HE.

Tandis que l'activité hémolytique a été évaluée sur les globules rouges d'un donneur unique et sain. Les résultats obtenus d'effet d'huiles sur des érythrocytes isolés du sang humain, incubés dans un milieu tampon PBS (pH 7,4) à 37°C), ont montré que cette plante présente un effet toxique selon la dose utilisé.

Dans la présente étude, l'huile de clou de girofle s'est avérée tout aussi efficace contre les organismes à Gram positif et à gram négatif. Ainsi, cette étude permet de conclure que l'huile de girofle possède une activité antibactérienne.

Abstract

The present study aims to determine the antibacterial activity of clove oil against various pathogens. The purpose of this study is to evaluate the antibacterial activity of clove oil against certain pathogenic bacteria. Antibacterial activity is achieved by agar well diffusion against pathogenic bacteria and the inhibition zone is measured in mm of diameter.

Clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) was obtained by steam distillation using a Clevenger type system. The extraction of the oil was obtained from 50 g of dried flowers of plants for 3 h with 500 ml of distilled water. The aqueous phase was separated by a separatory funnel by simple separation.

A High-performance liquid chromatography method has been applied to detect major constituents of clove essential oils.

The effect of temperature on the antibacterial activity of clove essential oils against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* was determined. Clove essential oils showed antibacterial activity after treatment at 100 ° C for 30 min, suggesting that the high temperature does not affect the activity of E.O.

While hemolytic activity has been evaluated on the red blood cells of a single, healthy donor. The results obtained from the effect of oils on erythrocytes isolated from human blood, incubated in PBS buffer medium (pH 7.4) at 37 ° C.), showed that this plant has a toxic effect according to the dose used.

In this study, clove oil was found to be equally effective against gram-positive and gram-negative organisms. Thus, this study concludes that clove oil has antibacterial activity.

Remerciements

AU NOM D'ALLAH LE CLEMENT LE MISERICORDIEUX PAIX ET SALAM SUR SON PROPHETE MOHAMMED

« الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله »

Nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour achever ce travail, et tous eux qui ont contribué à la

réalisation de ce travail en particulier à:

Notre encadreur Monsieur LIBDIRI Farid maître assistant à l'université de Bouira, pour avoir accepté de nous encadrer, et qui a proposé le thème de ce mémoire, et pour ses conseils qui ont amélioré la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions également messieurs les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement :

Monsieur LEKBAL F, pour accepter de présider ce jury. Monsieur LAMINE S, le chef département à l'université de Bouira, pour accepter d'examiner ce travail.

Les personnels de laboratoire de microbiologie de l'université de Bouira. Tous les enseignants qui ont contribué à nous former durant le cycle d'étude.

(Nawel et Hadjer)

Dédicace

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser
ce travail que
je dédie :*

A mes très chers parents,

*Tout d'abord et spécialement à ma chère mère qui aurais été fière de ma réussite.
Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte
maman, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les
sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon
bien-être. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma
reconnaissance éternelle et de mon infini amour.*

*A mon très agréable père, qui s'est tant sacrifié pour moi et pour assurer mon bien
être. J'espère que je suis à la hauteur de ce qu'il attend de moi. Puisse Dieu, le
Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue Vie.*

Mes frères

***zakaria, younes**, aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour
vous, Votre joie me comble de bonheur. Puisse Dieu vous garde, éclaire votre
route et vous aide à réaliser vos vœux les plus chers. ,*

*A tous mes amis (es) en particulier **chihani salma**, en souvenir de notre sincère et
profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je
vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Hadjer



Dédicaces

A mon père

Ta sagesse et ton courage ont toujours été sécurisants pour moi. Tu es aussi un travailleur exemplaire et infatigable, avec tes modestes moyens, tu as toujours subvenu à nos besoins, tu as rempli pleinement ton rôle de père. Que Dieu fasse que je continue à bénéficier longtemps encore de tes conseils.

A Ma mère

Depuis mon enfance, tu t'es efforcée de m'inculquer les valeurs morales qui sont les tiennes. J'espère que je suis à la hauteur de tes attentes. Que Dieu te bénisse et te donne longue vie afin que tu bénéficies des fruits de l'arbre que tu as planté et entretenu.

A mes très chers sœurs : Kahina, Nabila, Linda, Ikram

A mon frère : Samir

A toute ma grande famille et voisins.

A mon binôme Hadjer

A mes amis : Mes amis d'enfance, Mes amis de la fac surtout mon très chère "Salma"

Merci d'avoir toujours partagé avec moi les moments de joie et de peine, Recevez à ce travail en témoignage de tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

A toute promotion physiologie cellulaire 2017.

A tous mes enseignants du cycle primaire à l'université, pour la connaissance que vous m'avez transmis, à vous tous mes respects.

A tous ceux qui me sont chers. Je dédie ce modeste travail.

Nawel



Listes des figures

Figure 1: Pierre poivre (1719-1786).....	4
Figure 2: Représente la carte géographique des principaux producteurs de clou de girofle du monde.	4
Figure 3: Structure de l'arbre de giroflier.....	6
Figure 4: Vue rapprochée des feuilles de girofle jeunes et matures.....	6
Figure 5: Bourgeons de girofle maturés.....	7
Figure 6: Clous rose récoltés avant l'épanouissement de la fleur.....	7
Figure 7: Principaux constituants de huile de <i>S.aromaticum</i>	10
Figure 8: Les étapes de l'extraction d'une huile essentielle	11
Figure 9: Les sites d'action des constituants des huiles essentielles.....	12
Figure 10: Formes principales des bactérie	14
Figure 11: La forme bâtonnet (<i>Escherichia coli</i>) et cocci (<i>Staphylococcus</i>).....	15
Figure 12: Structure de la paroi des bactéries à gram positif	15
Figure 13: Structure de la paroi des bactérie à gram négatif.....	16
Figure 14: Cibles de l'action des antibiotiques.....	17
Figure 15: Mécanismes de la résistance bactérienne.....	19
Figure 16: Bourgeons de clou de girofle séchés.....	19
Figure 17: Les étapes de l'hydro-distillation	24
Figure 18: Montage de hydro-distillation des clous de girofle.....	24
Figure 19: Distillat (eau+HE).....	25
Figure 20: Etapes de séparation des phases du distillat.....	25
Figure 21: photo personnelle ; Appareil d'HPLC	27
Figure 22: photo personnelle; Système d'HPLC	27
Figure 23: photo personnelle ; Colonne d'HPLC C18 125.....	28
Figure 24: photo personnelle phase mobile utilisé (Eau filtrée, méthanol, l'acétonitrile)	27
Figure 25: Photos personnelles; phase de chargement de la boucle.....	29
Figure 26: Photos personnelles; phase d'injection de l'échantillon	29
Figure 27: Photo personnelle; vanne d'injection fermée	33
Figure 28: Le ré-isolément des souches bactériennes	36
Figure 29: Les souches bactériennes	36
Figure 30: Préparation de l'inoculum	37
Figure 31: Ensemencement par écouvillon	38
Figure 32: Préparation des dilutions de l'huile essentielle.....	36
Figure 33: L'effet de la température sur l'activité antibactérienne	37
Figure 34: Schéma décrivant les étapes du protocole expérimental pour étudier l'effet hémolytique des huiles essentielles de clou de girofle.....	39
Figure 35: Chromatogramme de l'échantillon d'huile essentielle de girofle	49
Figure 36: Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'huile de <i>S.aromaticum</i> après 60min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale	53

Liste des tableaux

Tableau I:Dénomination internationales de <i>Syzygium aromaticum</i>	5
Tableau II: Descriptions pathogènes des souches bactériennes utilisées	23
Tableau III: Les conditions chromatographiques utilisés.....	29
Tableau IV: Les diamètres des halos d'inhibitions.....	39
Tableau V:Caractéristique organoleptiques	47
Tableau VI: Résultats de la composition d'huile essentielle de girofle	43
Tableau VII: Les diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance des souches bactériennes comparé au DMSO.....	44
Tableau VIII:Les résultats de diffusion d'huile comparé au DMSO.....	45
Tableau IX:L'effet de concentrations décroissantes de syzygium aromaticum sur la croissance des bactéries.....	46
Tableau X:Les CMI de l'HE vis à vis des trois souches testé et leur pouvoir bactériostatique ou bactéricide	47
Tableau XI: Les résultats de CMI par les dilutions.....	48
Tableau XIII:L'effet des différentes températures sur l'activité antibactériennes du clou de girofle..	58
Tableau XIV: Résultats de l'effet de différentes températures sur l'activité antibactérienne.....	59

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

BN : Bouillon nutritive

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice;

DMSO: dimethyl sulfoxid

DO: Densité optique

GN: gélose nutritive

GMH: Gélose Muller Hinton

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide haute performance)

IC50: Concentration inhibitrice à 50%.

Rdt: Rendement

µl : Microlitre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

g : gramme

% : Pourcentage

PH : Potentiel hydrogène

UFC : Unité formant colonie

HE: Huile(s) Essentielle(s);

CG : Clous de Girofle;

°C : degré Celsius;

T°: température;

h : heure;

mn : minute;

mm : millimètre;

nm : nanomètre;

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction : 1

Partie I:Etude bibliographique

Chapitre I:Généralité sur la plantes

I- Le Giroflier, d’hier à aujourd’hui 3

I-1-Histoire de l’épice : 3

I-2-Histoire de giroflier : 3

I-3-Origine / Distribution : 4

II-Etude de la plante 5

II-1-Description botanique du giroflier 5

II-1-1-Classification de l’espèce : 5

II-1-2-Caractéristiques botaniques : 5

II-2-Culture et récolte du giroflier 7

II-2-1- Agro- écologie : 7

II-2-2-La récolte : 7

II-3-Saveur et Arôme 8

II-4-Propriétés thérapeutiques : 8

II-5-Toxicité de girofle : 8

Chapitre II: les huiles essentielles

I-L’aromathérapie et les huiles essentielle 9

I-1-Définitions : 9

II-Généralités sur les huiles essentielles 9

II-1-Définition: 9

II-2-Conservation des huiles essentielles : 9

II-3-Composition chimique des huiles essentielles : 9

II-3-1-Terpènes: 10

II-3-2-Composés aromatiques: 10

II-4-Chimie de syzygium aromaticum.....	10
II-5-Répartition et localisation des huiles essentielles :	11
II-5-1-Répartition :	11
II-5-2-Localisation :	11
III-Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle :	11
IV-Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles	12

Chapitre III: Le monde microbien

I-Généralités sur le monde microbien :	13
I-1-Généralités :	14
I-2-Définitions des bactéries :	14
I-3-La morphologie bactérienne :	14
I-4-La paroi des bactéries à Gram positif et négatif	15
I-4-1-Gram positif :	15
I-4-2-Gram négative :	16
II-Les antibiotiques :	16
II-1-Généralités :	16
II-2-Définition :	16
II-3-Effet des antibiotiques sur les bactéries :	17
II-4-Résistance aux antibiotiques :	17
II-4-1-Causes de la résistance	17
II-4-2-Origine de la résistance :	18
II-4-3-Mécanismes de résistance :	18

Partie II: Partie expérimentale

Chapitre I:Matériels et Méthodes

I-Matériels et méthodes :	19
I-1-Matériels	19
I-1-1-Choix du matériel végétal :	19
I-1-2-Matériel microbiologique :	19
I-2 -Méthodes :	23
I-2-1-Méthode d'extraction des huiles essentielles (Hydro-distillation) :	23
II-Les analyses de l'huile essentielle :	26
II-1-L'analyse physique :	26
II-2- L'analyse chimique :	26

II-2-1-Chromatographie en phase liquide à haute performance	26
II-2-2- Appareillage	27
II-2-3- Colonne	28
II-2-4- Méthode de l'analyse d'HPLC	28
III-Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne:	34
III-1-Les étapes de l'activité antibactérienne par la méthode des puits:	36
IV- L'effet de la température sur l'activité antibactérienne:	37
V-L'activité hémolytique :	38

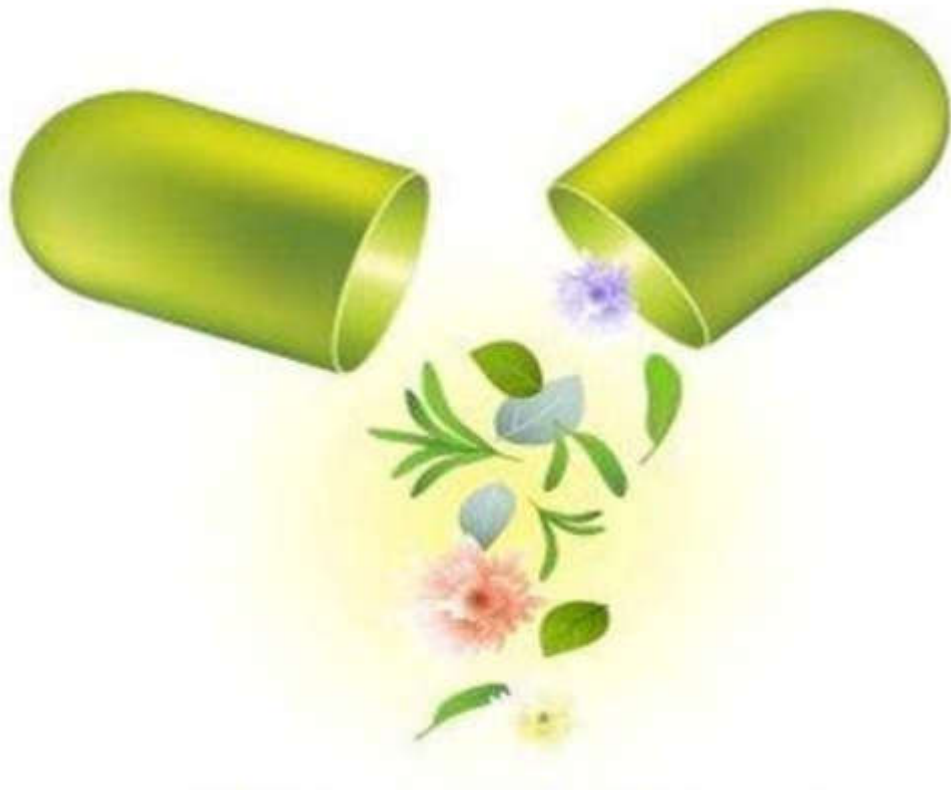
Chapitre II: Résultats et discussion

II-Résultat et discussion :	46
II-1-Description de l'huile essentielle obtenue :	47
II-2-Les analyses de l'huile essentielle	47
II-3-L'activité antibactérienne :	44
II-4-L'effet de différentes températures sur l'activité antibactérienne du clou de girofle:	58
II-5-L'activité hémolytique	53
Conclusion :	55

Les références bibliographiques

Annexes

Résumés



Introduction

Introduction :

Depuis longtemps, les moyens thérapeutiques naturels étaient les seuls remèdes dont disposait l'humanité. Ils ont utilisées les plantes médicinales et aromatiques dans le processus de la lutte contre les maladies infectieuses.

Si on définit la phytothérapie d'un point de vue étymologique, le terme "phyto" provient du grec ancien avec le terme plus précis "phyton" et signifie "végétal". La phytothérapie est donc la "thérapie par le végétal dans un but préventif ou curatif mais également esthétique(Boukhobza & Goetz, 2014).

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse des molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire(Bouzouita, Kachouri, Ben Halima, & Chaabouni, 2008).

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

En Algérie comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité.

La situation est plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle.

En effet, en 2002, l'OMS estime que, pour se soigner, 80 % de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales(Biyiti, Meko'o, Tamzc, & Amvam Zollo, 2004).

Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation(Traoré, Ouattara, Yéo, Doumbia, & Coulibaly, 2012)

Dans notre étude nous avons choisi d'utiliser une plante connue par ses effets bénéfiques qui est nommée Giroflier ; son bouton floral (clou de girofle) possède une odeur caractéristique et à saveur chaude et piquante.

Notre travail consiste à extraire l'huile essentielle de cette espèce par la méthode d'hydrodistillation afin de tester *in vitro* son activité antibactérienne en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI). Ainsi d'étudier l'activité hémolytique sur le sang humain.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Le premier, est consacré à l'étude de la plante (*Syzygium aromaticum*), historique, origine et distribution, description botanique, culture et récolte, les propriétés thérapeutiques, toxicité de cette plante.

Le deuxième chapitre est une généralité sur huiles essentielles (composition, répartition, mécanisme d'action).

Le troisième chapitre est une généralité sur le monde microbien (morphologie, la résistance bactérienne).

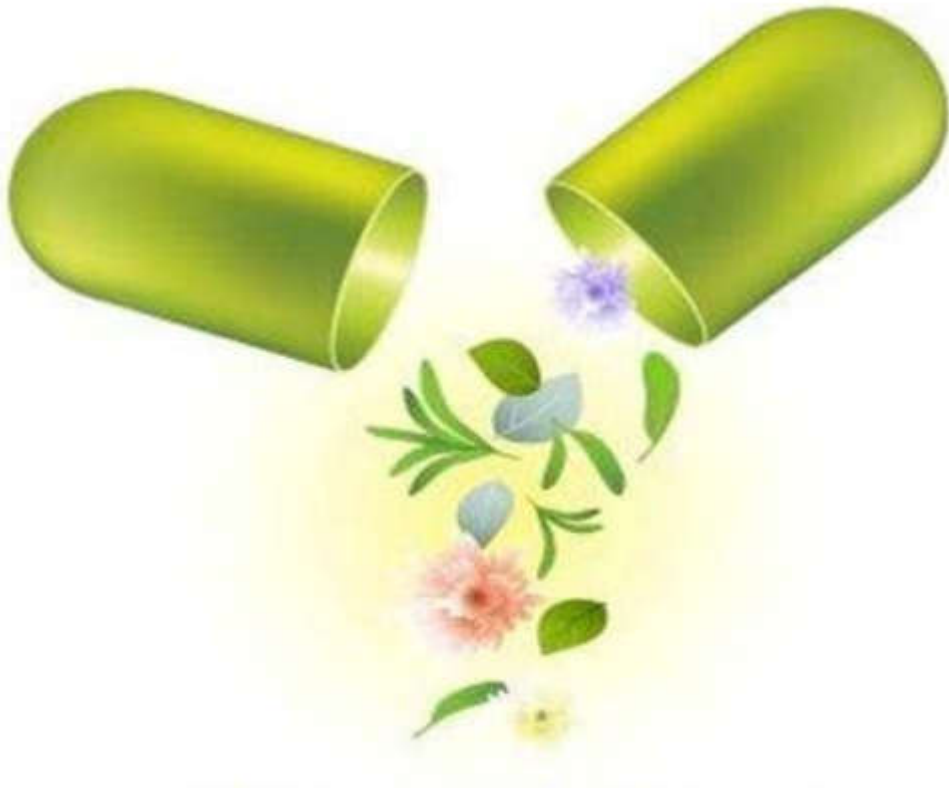
Dans la partie expérimentale seront présentées la technique d'extraction de huile essentielle de la plante étudiée (hydrodistillation) ; la composition chimique de huile essentielle utilisant HPLC et les techniques d'évaluation des effets biologiques (activité antibactérienne et hémolytique).

Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives à entreprendre à l'avenir.

Partie bibliographique



Chapitre I



Généralité sur la plante



I- Le Giroflier, d'hier à aujourd'hui

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

Les épices sont traditionnellement utilisées depuis l'Antiquité pour la conservation des produits alimentaires car elles ont des propriétés antiseptiques et désinfectantes (De, Krishna De, & Banerjee, 1999). *Syzygium aromaticum* est une épice utilisée depuis longtemps par les guérisseurs traditionnels ayurvédiques de l'Inde (Saeed & Tariq, 2008) pour soigner les affections respiratoires et digestives (Aggarwal & Shishodia, 2006). Et aussi sont considérées comme une source riche en composés antimicrobiens bioactifs (Menghani, Rana, Saraswat, & Pareek, 2014). La recherche dans divers domaines mène actuellement leurs études pour étudier les effets des épices sur la santé humaine (Y. Kumar et al., 2014) ; en utilisant leurs huiles essentielles.

I-2-Histoire de giroflier :

Le girofle est une épice connue depuis des lustres. Il est d'abord enregistré à la période des Han chinois (220 avant (JC)-206 après Jésus Christ (JC)) (Danthu et al., 2014).

Le nom clou de girofle est dérivé du mot français clou et *clavo* espagnol, les deux signifiant «clou», en raison de sa ressemblance avec la forme d'un clou (P. Kumar, Jaiswal, Singh, Singh, & Singh, 2011).

Autour du 16^{ème} siècle, les Portugais ont brisé l'arabe monopole du commerce des épices en mer (François, 1936). Au début du 17^{ème} siècle, la direction hollandaise enlève des girofliers de toutes les îles sauf Amboina anterne, afin d'en augmenter le prix (Charles, 2013). Jusqu'au 18^{ème} siècle où le contrôle sur la production était encore plus drastique pour maintenir artificiellement les prix (Razafimamonjison et al., 2014).

La Compagnie Française des Indes missionna-t-elle Pierre Poivre (figure 1) pour aller chercher ce fameux clou de girofle. Lors d'un premier voyage, il transporta clandestinement quelques plants de muscadier de Timor à l'île de France, sans résultat (Ranoarisoa, 2012).

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



Figure 1: Pierre poivre (1719-1786)(Breazeale, 2009)

De nos jours, les clous de girofle sont disponibles dans toutes les grandes surfaces, à des prix accessibles, après avoir bouleversé des civilisations entières et coûté la vie à de nombreux hommes.

I-3-Origine / Distribution :

Les clous de girofle sont originaires de l'Indonésie et se trouvent surtout dans le nord et le centre de Maluka (Moluques) et Papua Barat (Irian Jaya)(Bhowmik et al., 2012). et maintenant largement cultivé au Brésil, en Haïti, au Kenya, en Malaisie, à Maurice, au Mexique, aux Seychelles(Lim, 2014).en particulier en Zanzibar, à Madagascar, aux Philippines, en Inde, au Sri Lanka, en Tanzanie(Charles, 2013).

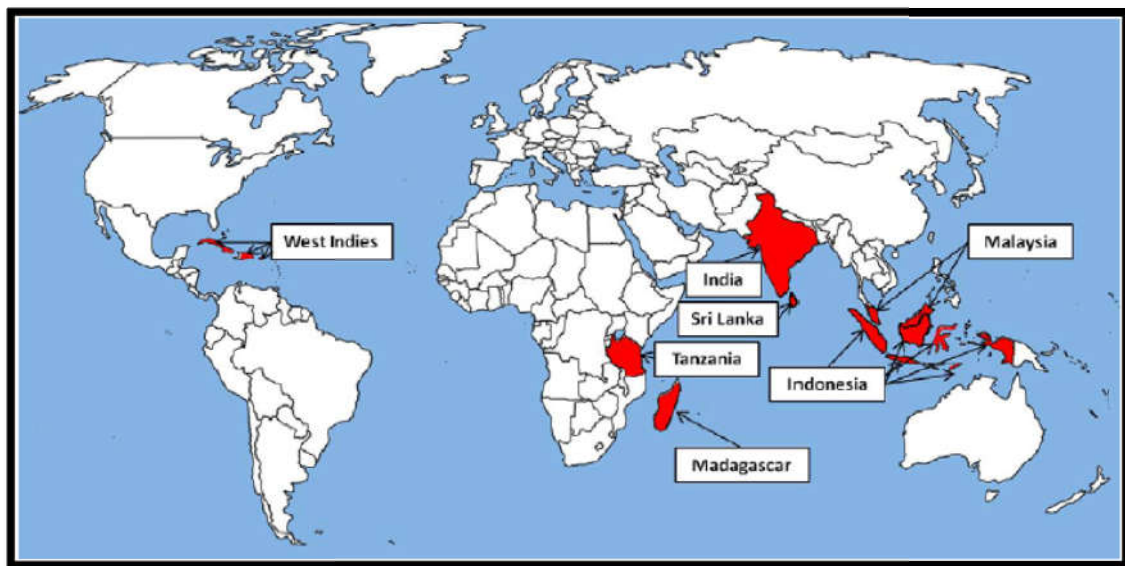


Figure 2:Représente la carte géographique des principaux producteurs de clou de girofle du monde(Kamatou, Vermaak, & Viljoen, 2012).

II-Etude de la plante

II-1-Description botanique du giroflier

II-1-1-Classification de l'espèce :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta (= phanérogames)

Sous-embranchement : Magnoliophytina (= angiospermes)

Classe : Magnoliopsida (= dicotylédones)

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Syzygium*

Espèce : *S. aromaticum* (Ghedira, Goetz, & Le Jeune, 2010).

Tableau I: Dénomination internationales de *Syzygium aromaticum*

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

II-1-2-Caractéristiques botaniques :

Syzygium aromaticum L. (clou de girofle) est une épice aromatique historique (Joseph & Sujatha, 2011), appartient à la famille Myrtaceae (Aneja & Joshi, 2010) qui regroupe plus de 3000 espèces réparties en 48 à 134 genres environ (Kubitzki, 2011). Les huiles essentielles sont les principaux constituants chimiques du clou de girofle (Saikumari, Rani, & Saxena, 2016).

C'est un grand arbre qui abrite les îles Moluques (M. Gupta, Singh, Gularia, & Gupta, 2015), avec une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, qui peut atteindre une hauteur de 20 mètres, avec un port pyramidal et un tronc gris clair.



Figure 3:Structure de l'arbre de giroflier(Wichtl & Anton, 2003)

Ses feuilles persistantes(Alma, Ertas, Nitz, & Kollmannsberger, 2007), de 8 à 10 cm de long, sont fixes, inversées, pelées, ovales et rectangulaires, avec une surface supérieure vert rougeâtre, et une face vert sombre, entrecoupée légèrement(Goetz & Ghedira, 2012). Ils sont aromatiques et produisent un fort arôme de clou de girofle lorsqu'ils sont froissés.



Figure 4:Vue rapprochée des feuilles de girofle jeunes et matures(Mohammed, Ahmed, & Hussien, 2015).

La floraison se compose de petites cymes ramifiées (4-5 cm), regroupées en un groupe de trois à cinq petites fleurs parfumées, avec une coupe tubulaire blanche, puis rouge (quatre rouges). Et blanc coréen rose (quatre accents blancs).(Ghedira et al., 2010)

La fleur, hermaphrodite, a beaucoup d'asperges (formant pompon)(François, 1936). Le fruit, appelé "antholfe", est une plante pourpre avec une structure violette qui contient une seule graine de 1,5 cm de long.



Figure 5:Bourgeons de girofle maturés(Kim et al., 1998)

II-2-Culture et récolte du giroflier

II-2-1- Agro- écologie :

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

II-2-2-La récolte :

Le moment le plus favorable à la récolte est déterminé par la couleur rosé du clou de girofle (**figure6**). Le giroflier donne des clous à partir de la 5ème année. et sont récoltés une à deux fois par an (Mazerolles, 2008).



Figure 6:Clous rose récoltés avant l'épanouissement de la fleur(Danthu et al., 2014)

II-3-Saveur et Arôme

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

II-4-Propriétés thérapeutiques :

Le girofle s'utilise le plus souvent sous forme d'huile essentielle. Le dosage diffère selon le problème à traiter(Hamadou & Touki, 2017) ; En agriculture, l'huile essentielle possède un effet protecteur des cultures contre les insectes (Danthu et al., 2014) ;Traditionnellement, les clous de girofle étaient utilisés pour le traitement des maux de dents(Karkosh, 2012). Très bon anesthésiant local dans les soins des plaies. (Ghedira et al., 2010),est un anti-carcinogène.(Barakat, 2014). antidiabétique, antivirale ,anti-inflammatoires(Lim, 2014).Il est aussi connue par leur activité antioxydant(Fu et al., 2007) ;Cette plante représente l'une des sources les plus riches en composés phénoliques tels que l'eugénol.(Cortés-Rojas, de Souza, & Oliveira, 2014) .elle a une activité analgésique ,avec des propriétés antibactérienne (Mittal, Gupta, Parashar, Mehra, & Khatri, 2014) (**Annexe 2**).

II-5-Toxicité de girofle :

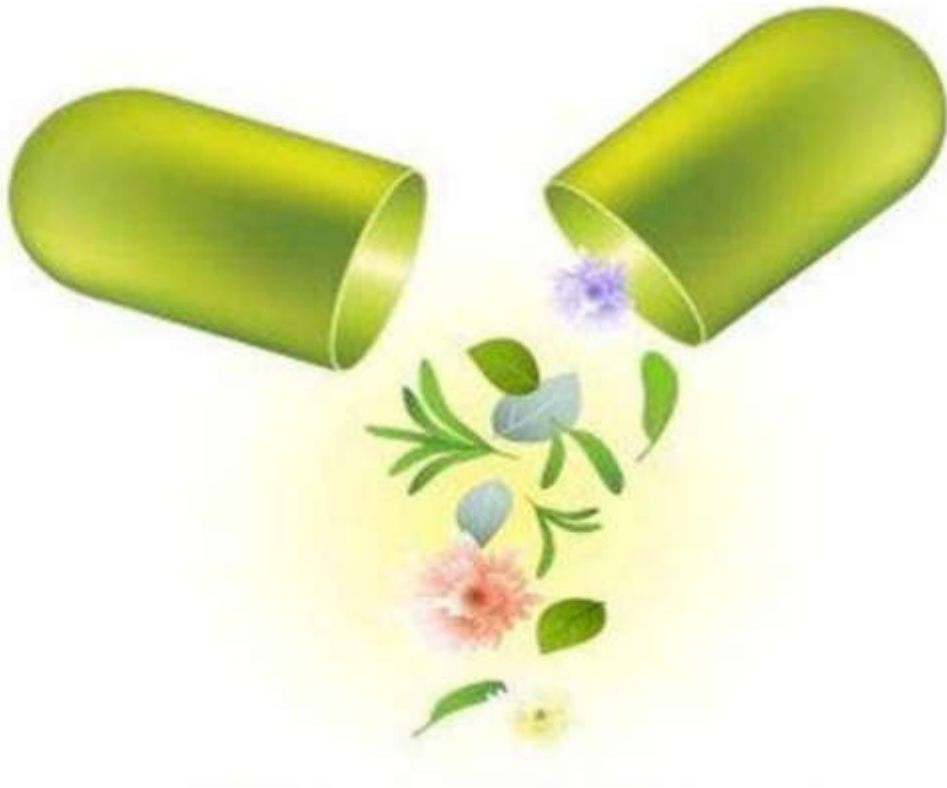
L'usage abusif du clou de girofle peut devenir toxique. De grandes quantités doivent être évitées pendant la grossesse. Le clou de girofle peut être irritant pour les voies gastrointestinales et devrait être évité chez des personnes ayant des ulcères gastriques ou le syndrome du colon irritable. Dans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

La sur-utilisation peut conduire à une insuffisance rénale, des modifications de la fonction hépatique, une dyspnée, une perte de conscience, et même la mort. L'huile de clou de girofle, riche en eugénol peut irriter la peau et les muqueuses. En usage externe elle est potentiellement dermo-caustique. Par voie interne, est une toxique neurologique à très forte dose.

Cette huile est contre-indiquée chez les femmes enceintes, qui allaitent, les enfants, en cas d'eczémas et de fragilité cutanée.

Son emploi dépend de la dose; 100g de clous de girofle en une fois est mentionné toxique(Aouadhi, 2010).

Chapitre II



Les huiles essentielles

I-L'aromathérapie et les huiles essentielles**I-1-Définitions :**

L'aromathérapie se définit comme une thérapeutique utilisant les huiles essentielles végétales. Au terme « aromathérapie » est donc le plus souvent associée la notion d'huiles essentielles(Lardry & Haberkorn, 2007) .

II-Généralités sur les huiles essentielles**II-1-Définition:**

Il est connu depuis l'antiquité que les huiles essentielles présente une activité antiseptique non négligeable(J Kaloustian et al., 2008).Sont l'un des groupes les plus importants de constituants végétaux (Fontanay & Mougenot, 2015). Et sont des mélanges complexes de composés volatils produits par les plantes.(Kalemba, Matla, & Smętek, 2012) ;sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques(Lagunez Rivera, 2006).

II-2-Conservation des huiles essentielles :

L'huile essentielle se conserve bien a condition de ne pas les exposer à la lumière, les tenir loin des sources de chaleurs et d'utiliser des bouteilles en verre teinté(Jacques Kaloustian & Hadji-Minaglou, 2013). Les huile essentielles sont volatiles, elles perdent progressivement leurs propriétés et leur arôme.(Hamadou & Touki, 2017) ;L'huile été conservés à 4 °C lorsqu'ils ne sont pas utilisé(Oshomoh, Idu, & Udinyiwe, 2015).

II-3-Composition chimique des huiles essentielles :

Dans certaines huiles commercialement importantes, plus de 300 constituants ont été connus jusqu'à présent. Ceux-ci sont subdivisés en deux groupes: les hydrocarbures constitués presque exclusivement de terpènes (mono-terpènes, sesquiterpènes et di-terpènes) et les composés aromatiques qui, à côté du terpène, possèdent des squelettes phénylpropanoïdes(Kalemba et al., 2012).

II-3-1-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(Soualeh & Soulimani, 2016).

II-3-2-Composés aromatiques:

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle(Hamadou & Touki, 2017).

II-4-Chimie de *syzygium aromaticum*

S.aromaticum représente l'une des principales sources végétales de composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques et hydroxyphényl propènes, ainsi que les terpénoïdes(Bao et al., 2012); (Kamatou et al., 2012);(Cortés-Rojas et al., 2014). L'eugénol (1) est le composé principalement responsable de l'arôme du clou de girofle et constitue 72 à 90% de l'huile volatile de girofle (Kamatou et al., 2012). Les autres constituants courants de l'huile essentielle comprennent l'acétate d'eugényle (2), le β -caryophyllène (3), le salicylate de méthyle (4), le pinène (5), la vanilline (6)(Kueté, 2017) et l' α -humulène (7) (**Annexe 1**).

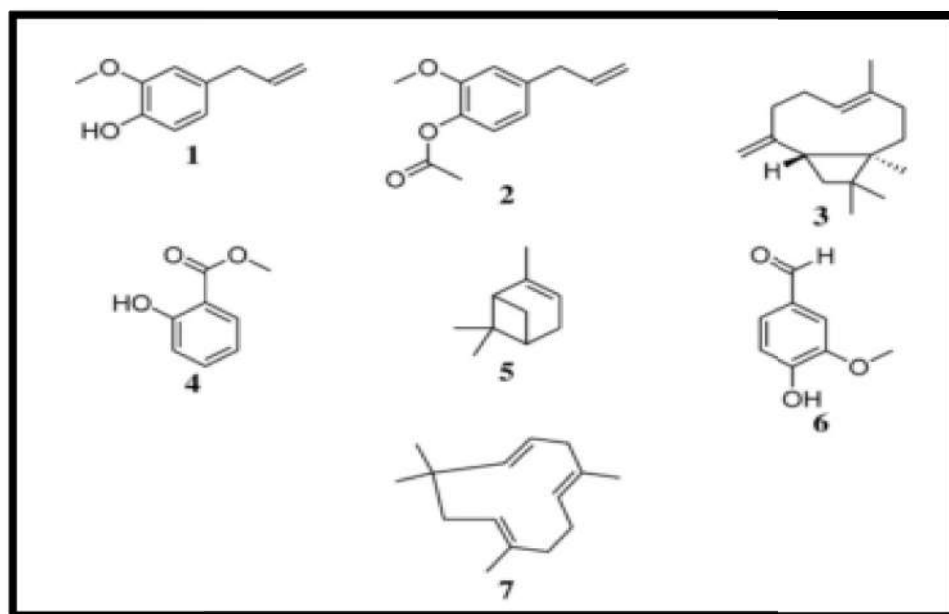


Figure 7:Principaux constituants de huile de *S.aromaticum*(Jirovetz et al., 2006)

II-5-Répartition et localisation des huiles essentielles :

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

II-5-1-Répartition :

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y aurait 17500 espèces aromatiques. Peuvent être stockées dans tous les organes de la plante (fleurs, graines, racines, feuilles, fruits...)(Bouhdid, Abrini, Baudoux, Manresa, & Zhiri, 2012).

II-5-2-Localisation :

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

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

III-Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle :

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quelque soit le « type » d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale, les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (figure 8).

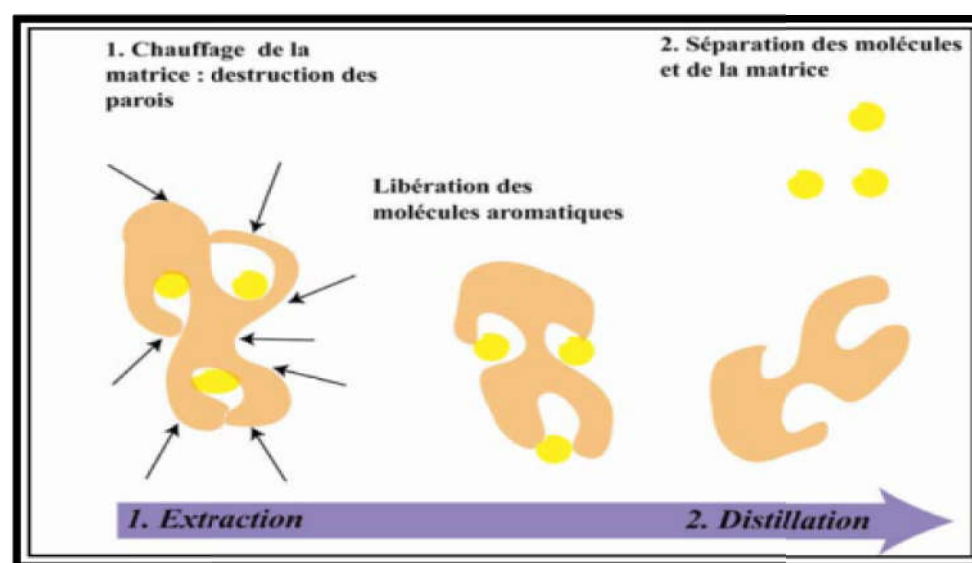


Figure 8:Les étapes de l'extraction d'une huile essentielle(Hamadou & Touki, 2017)

IV-Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des

Huiles essentielles sont :

- l'altération de la paroi cellulaire ;
- la dégradation de la membrane cytoplasmique ;
- l'altération des protéines membranaires ;
- la fuite du contenu cellulaire ;
- la coagulation du cytoplasme ;
- l'épuisement de la force de mouvement des protons.

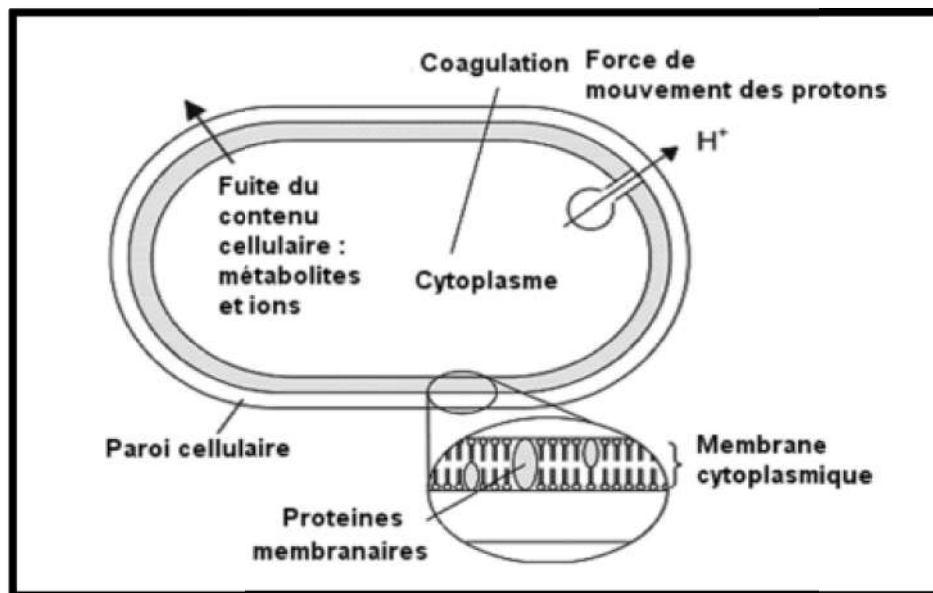
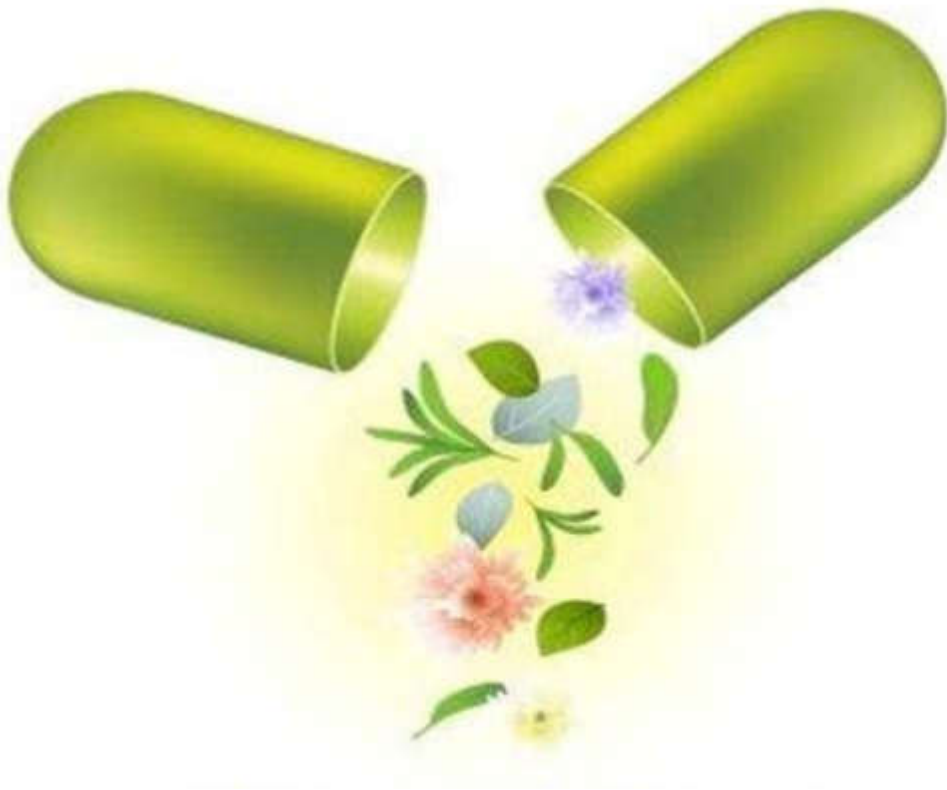


Figure 9: Les sites d'action des constituants des huiles essentielles (Goetz & Ghedira, 2012)

Chapitre III



Le monde microbien

I-Généralités sur le monde microbien :

I-1-Généralités :

Selon Bourgeois, 1999 dans les pays en développement, les maladies infectieuses sont des problèmes de santé courants en raison de leur fréquence et de leur gravité. Mais malgré les dommages causés par ces micro-organismes nocifs, le monde scientifique a découvert de nombreux traitements pour soulager les patients. Ces traitements ont réduit la propagation des maladies infectieuses (Traoré et al., 2012).

I-2-Définitions des bactéries :

Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement. Ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes (Pandey & Singh, 2011). Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques (Bouyahya et al., 2017).

I-3-La morphologie bactérienne :

Taille des bactéries de l'ordre du micromètre : de 0,5 μm à plus de 10 μm , la grande majorité mesurant de 1 à 4 μm (Trogia, 2014).

Trois formes principales: coques, bacilles, bactéries spiralées.

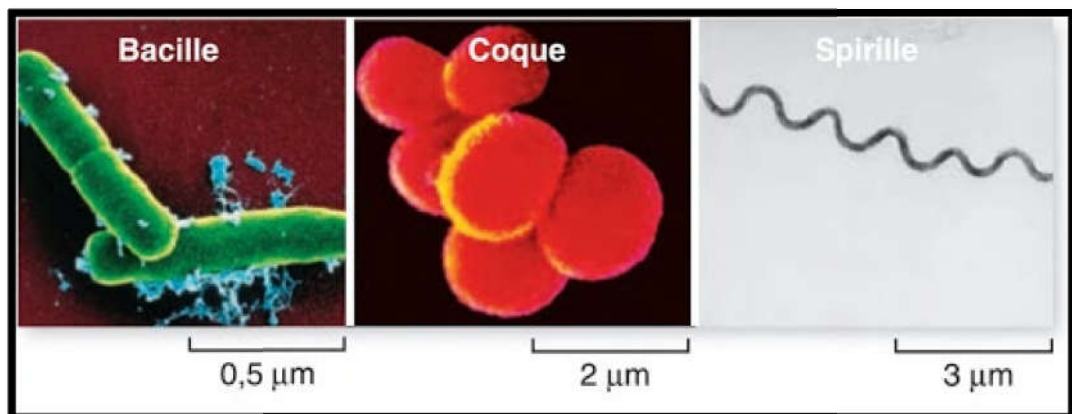


Figure 10: Formes principales des bactéries (Johnson, Raven, Losos, Bouharmont, & Singer, 2011)

A titre d'exemple, *Escherichia coli* a la forme d'un bâtonnet, *Staphylococcus aureus* a forme cocci et s'assemble en amas (Bouyahya et al., 2017).

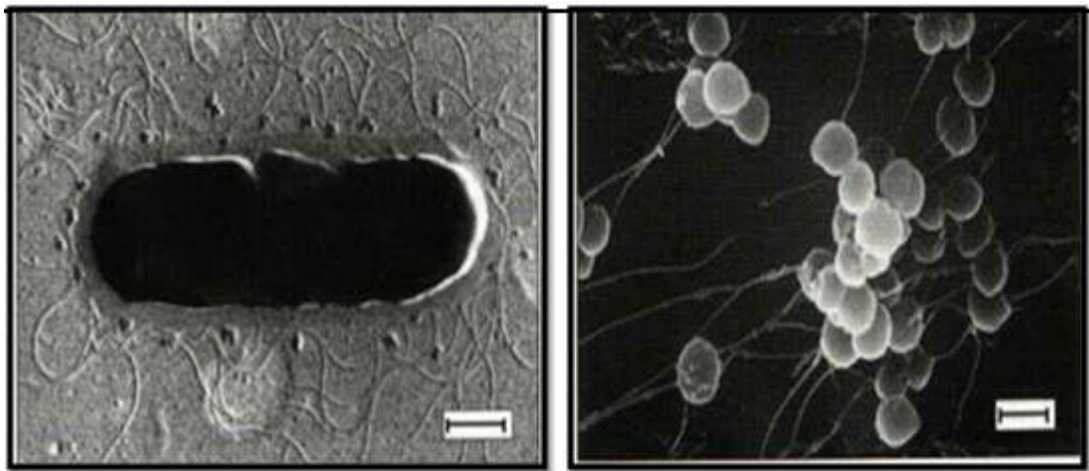


Figure 11: La forme bâtonnet (*Escherichia coli*) et cocci (*Staphylococcus*) (Hart & Shears, 1997)

I-4-La paroi des bactéries à Gram positif et négatif

La paroi est une structure rigide et résistante qui protège la bactérie et lui donne sa forme. Sa nature variable est à l'origine de la coloration de Gram qui permet de distinguer deux grands groupes bactériens, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Chevalet et al., 2010).

I-4-1-Gram positif :

Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est constituée presque exclusivement de la couche de peptidoglycane, à laquelle sont associés des polymères d'acide teichoïque.

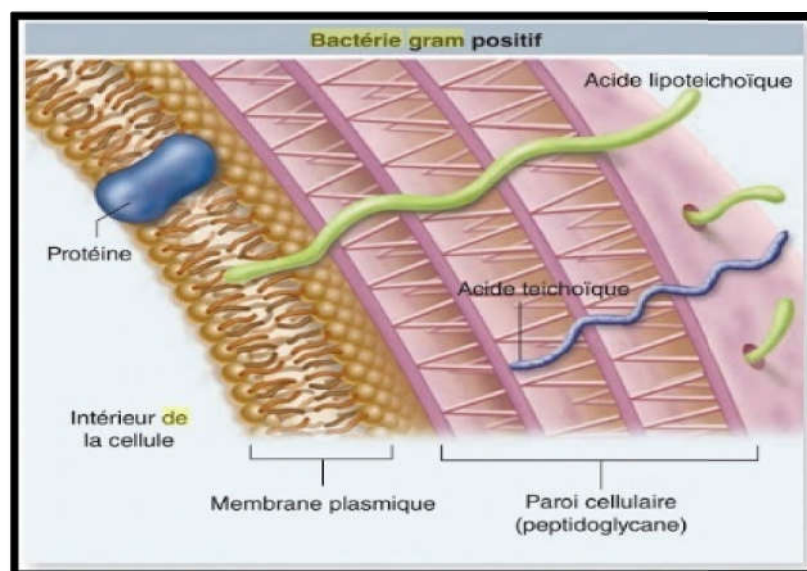


Figure 12: Structure de la paroi des bactéries à gram positif (Johnson et al., 2011)

I-4-2-Gram négative :

Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus complexe. La couche de peptidoglycane est plus fine que celle des Gram positif, et elle est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines. La partie lipopolysaccharidique de la paroi des Gram négatif comprend les molécules d'endotoxine (lipide A) qui contribuent au pouvoir pathogène bactérienne(Bouyahya et al., 2017).

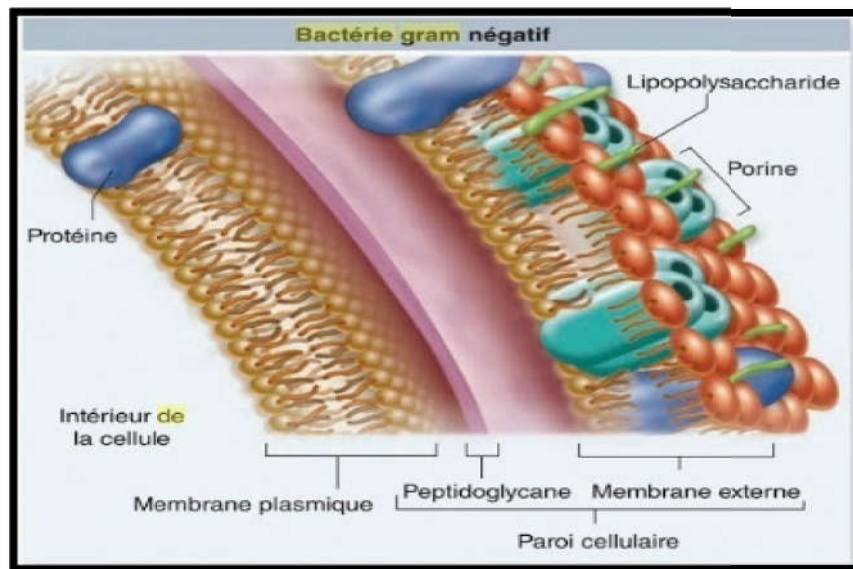


Figure 13:Structure de la paroi des bactérie à gram négatif(Johnson et al., 2011)

II-Les antibiotiques :

II-1-Généralités :

Il est devenu indispensable à l'homme de mener une lutte contre l'envahissement des microorganismes, pour conserver ses biens, et pour "protéger son existence».

Les moyens de lutte sont nombreux, les agents physiques (température, rayonnements...), les agents chimiques (métaux lourds, chlore, alcools...) sont très actifs mais nocifs, malgré les dommages il y a d'autres agents, possédants une "toxicité sélective": ils s'opposent à la multiplication bactérienne sans nuire aux cellules de l'hôte, et sont utilisés pour cette raison en thérapeutique, ce sont les "Antibiotiques"(Hamadou & Touki, 2017).

II-2-Définition :

Les antibiotiques sont des substances destinées à agir sur les microorganismes indésirables principalement chez les humains(Pibiri, 2006) .

II-3-Effet des antibiotiques sur les bactéries :

Le mode d'action des antibiotiques est connu car ils sont développés en fonction de leur « cible » (Figure 14), On les classe d'ailleurs selon leur mécanisme de destruction de la cellule bactérienne :

1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne
2. Antibiotiques inhibant la synthèse de la membrane cytoplasmique
3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique
4. Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques et de la synthèse de l'ADN.
5. Antibiotiques agissant par inhibition compétitive (exemple d'autres mécanismes).

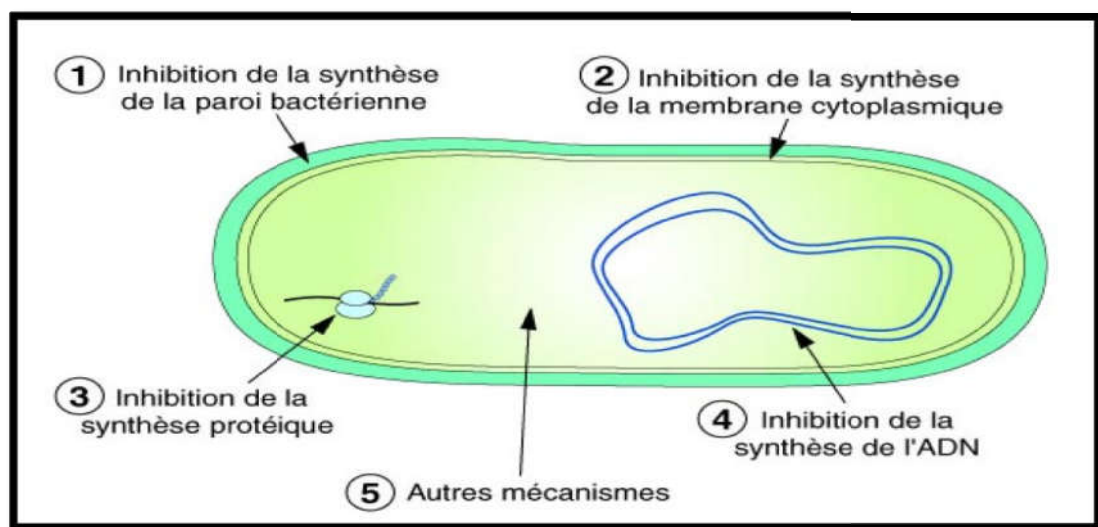


Figure 14: Cibles de l'action des antibiotiques (Descamps-Marie, 2008)

II-4-Résistance aux antibiotiques :

II-4-1-Causes de la résistance

Les antibiotiques sont une découverte thérapeutique importante en pratique médicale. Avec le temps, les microbes ont développé certaines formes de résistances vis-à-vis de ces antibiotiques (Nascimento, Locatelli, Freitas, & Silva, 2000). Ce phénomène de résistance est dû à plusieurs facteurs tels que l'utilisation suboptimale des antibiotiques au cours des traitements. Son émergence est due également à l'hospitalisation prolongée, le non-respect des pratiques hygiéniques et le transfert des malades entre les hôpitaux (Abdullah, Hatem, & Jumaa, 2015).

II-4-2-Origine de la résistance :

On distingue deux types de résistance microbienne : naturelle et acquise.

1-Résistance naturelle :

C'est une résistance intrinsèque, commune à une population, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques. Elle se caractérise par des modifications structurales, dans le cas de la membrane externe des bactéries à Gram-, et métaboliques, dans le cas du bacille de la tuberculose insensible à un grand nombre d'antibiotiques en s'opposant à l'action des antibiotiques par le biais de son métabolisme original. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique.

2-Résistance acquise :

Elle est due à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent (Bouyahya et al., 2017).

II-4-3-Mécanismes de résistance :

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes. Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes, et ils sont classés en plusieurs voies. Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents.

1. Modification des cibles des antibiotiques :

Le deuxième mécanisme de résistance est celui qui affecte les cibles des antibiotiques. Dans certaines situations, la bactérie modifie l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques. Par exemple, certaines souches pathogènes telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* modifient l'affinité des protéines de liaison à la pénicilline (penicillin-binding proteins, PBP), ce qui leur permet de résister à des antibiotiques de la famille des β -lactamines (les antibiotiques qui ciblent spécifiquement les enzymes de synthèse de la paroi bactérienne).

2. Inhibition d'antibiotiques :

Certaines bactéries synthétisent des enzymes qui inhibent l'action des antibiotiques en dégradant ou en modifiant ce dernier. La modification des antibiotiques peut se faire de différentes façons selon les réactions chimiques catalysées (l'acétylation, la glycosylation, la nucléotidylation, la substitution, la ribosylation et/ou la phosphorylation). La modification induite, par ces enzymes, peut inactiver certains antibiotiques tels que les aminoglycosides, le chloramphénicol, les streptogramines, les macrolidescte ou bien diminuer leurs affinités vis-à-vis de leurs cibles .

Les bactéries, en fait, partagent souvent les opérons responsables de l'expression de ces enzymes, même parfois via le transfert horizontal .

3. Empêchement de l'entrée de l'antibiotique :

Certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne, et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux qui leur permet d'exporter les antibiotiques à l'extérieur (Bouyahya et al., 2017).

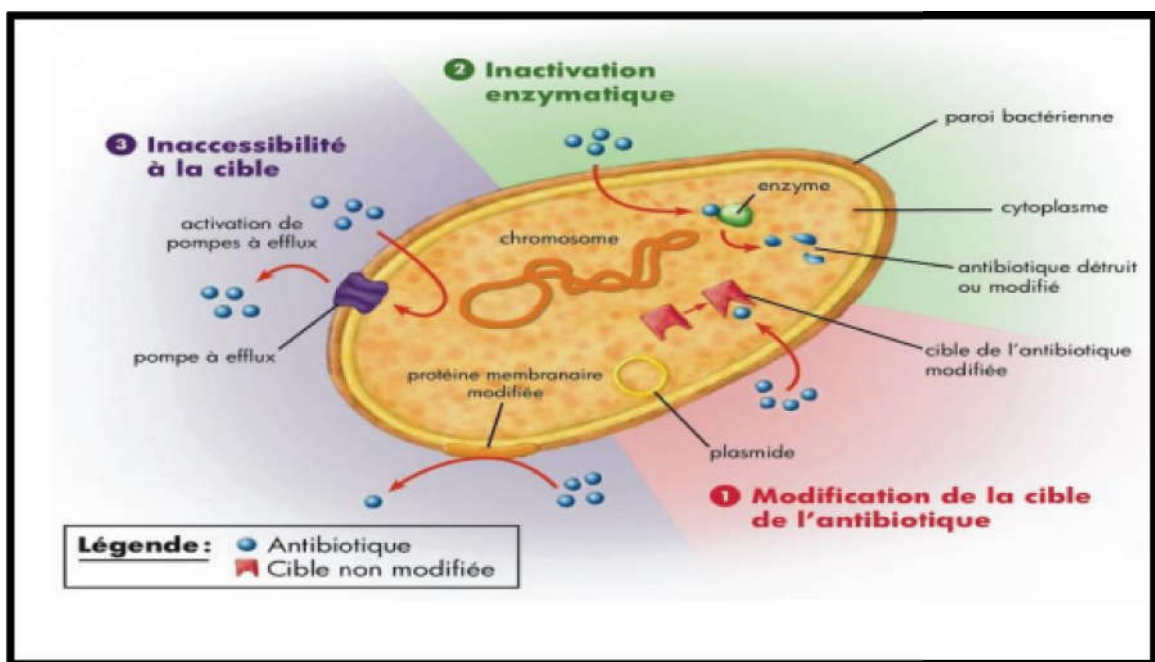
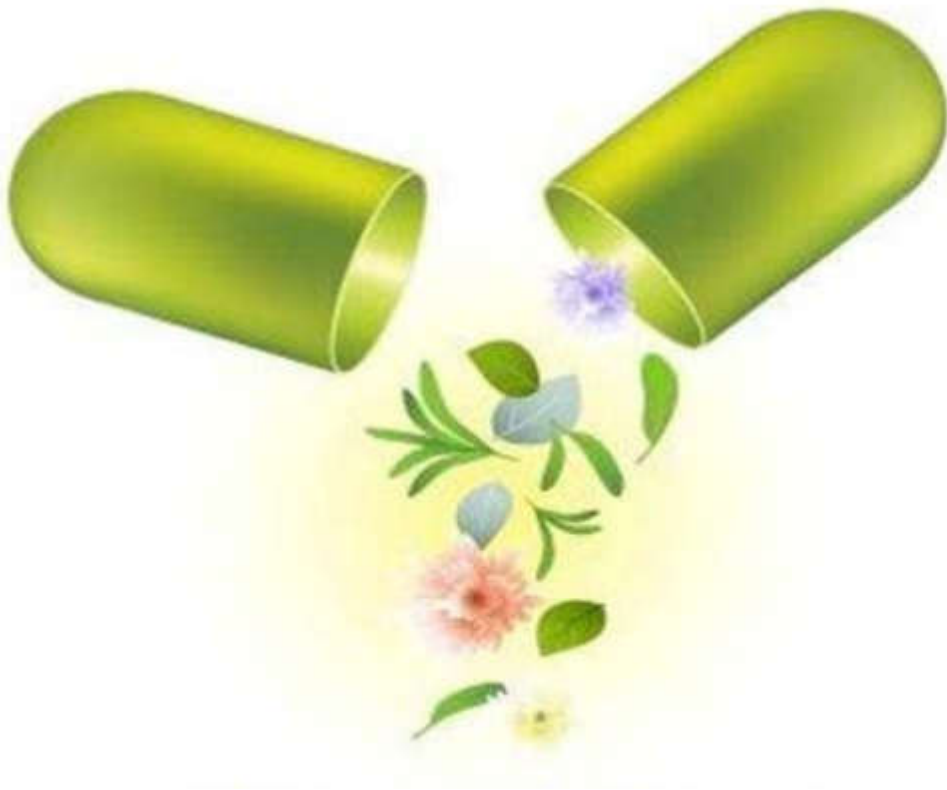


Figure 15: Mécanismes de la résistance bactérienne (Coustes, 2016)

Partie expérimentale



Chapite I



Matériels et méthodes

I-Matériels et méthodes :

Cette étude expérimentale a été réalisée au laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et la vie et de l'univers de l'université Akli Mohand Oulhadj de Bouira et laboratoire de recherche CRD de Bouverdes, pendant la période allant de 24 Avril à 6 juin 2018. Dans le but de déterminer la composition chimique et activité antibactérienne et hémolytique de huile essentielle de clou de girofle en vue de l'utilisation dans la lutte biologique.

I-1-Matériels

I-1 -1-Choix du matériel végétal :

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

La Parties utilisées dans ce travail est les clous de girofle (les boutons floraux), dont sera extraire l'huile essentielle.



Figure 16:Bourgeons de clou de girofle séchés

I-1-2-Matériel microbiologique :

➤ Souches bactériennes :

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail ont été fournies par le Laboratoire (Université de Bouira). Le choix de ces souches a été porté sur la base de leur importance dans le domaine clinique (Infections...etc.) sont des souches de références (*E.coli* ATCC25923 et *S.aureus* ATCC25922 et *Entérocooccus faecalis*ATCC 29212) (**Tableau II**). Ont été utilisées dans notre travail afin d'évaluer in vitro le potentiel antimicrobien de huiles essentielles de girofle.

Tableau II: Descriptions pathogènes des souches bactériennes utilisées (Lowy, 1998) ; (Mouas, Benrebiha, & Chaouia, 2017)

Groupe de genre	Espèces	Habitat préférentiel	Pouvoir pathogène
Bacille Gram ⁻	<i>E. coli</i>	-Matières fécales	-Infections urinaire
	ATCC25923	-Aliments contaminés	-infections intestinales
Cocci Gram ⁺	<i>Staphylococcus aureus</i>	-Nez, peau, air	-Infections cutanées
	ATCC25922		
CocciGram ⁺	<i>Entéroccoccus faecalis</i>	-Tube digestif	-infections de la vessie
	ATCC 49452		et de la prostate.

➤ Milieu de culture (Annexe 3)

- ❖ Bouillon nutritif
- ❖ Gélose nutritive
- ❖ Gélose Mueller Hinton (milieu de l'activité antibactérienne)

I-2 -Méthodes :

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

I-2-1-Méthode d'extraction des huiles essentielles (Hydro-distillation) :

La matière végétale est immergée directement dans un ballon rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant (De Cliff & Harerimana, 2013). Cependant, l'hydro-distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005).

I-2-1-1-Protocole expérimental

- Pèse 50 g de clou de girofle broyé.
- Puis Introduire la poudre dans un ballon de 1000 ml.
- Ajouter 500 ml d'eau distillée.
- Réalise le montage et le faire vérifier.
- Faire circuler l'eau froide dans le réfrigérant à eau, puis, à l'aide du chauffe-ballon, porter le mélange à ébullition (thermostat maximum)
- Recueille le distillat dans un erlenmeyer et on stoppe le chauffage.

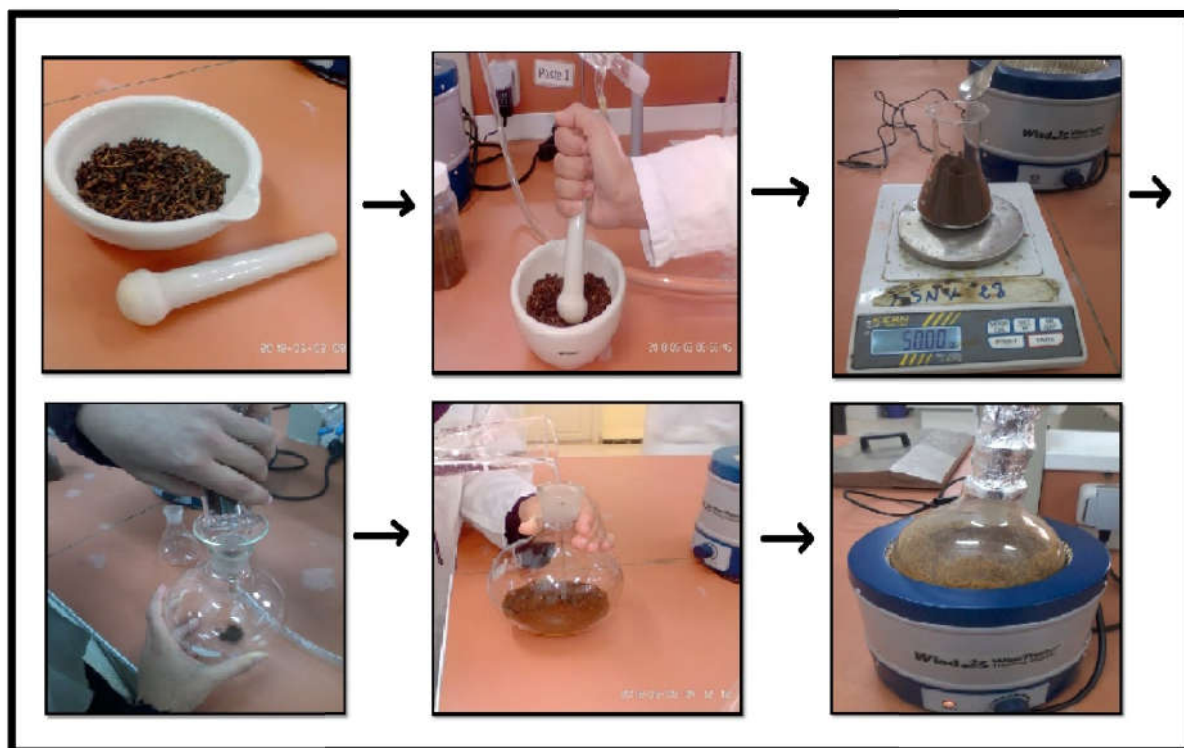


Figure 17: Les étapes de l'hydro-distillation

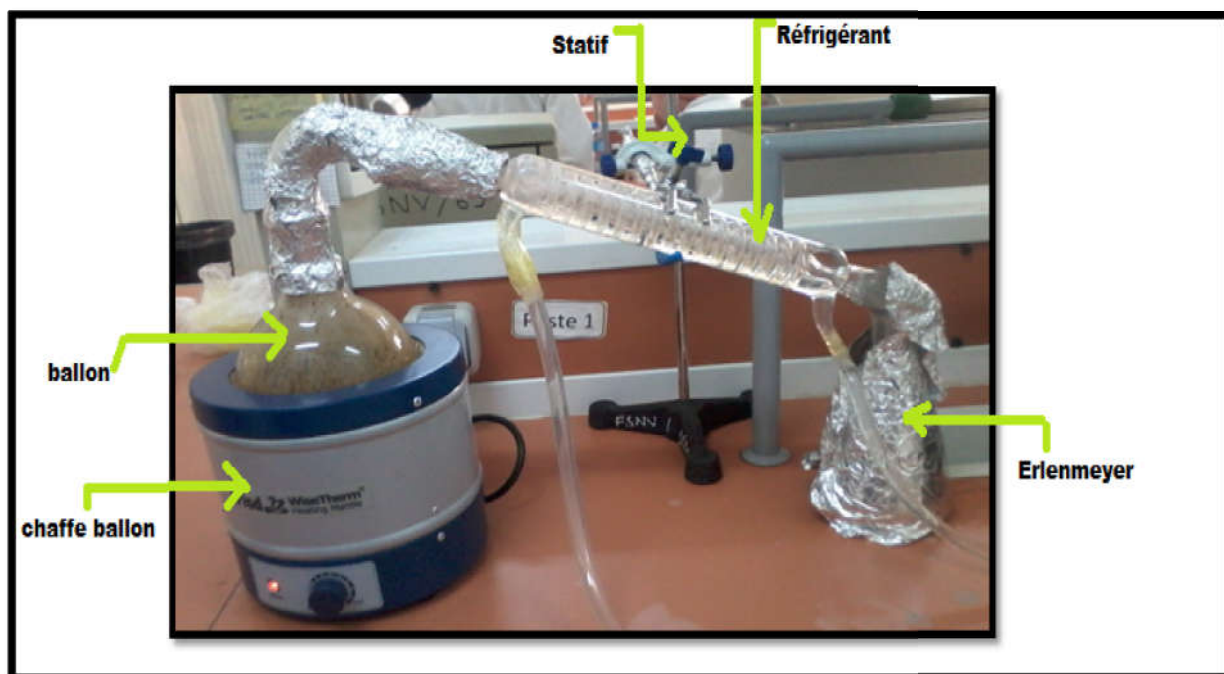


Figure 18: Montage de hydro-distillation des clous de girofle

I-2-1-2-Séparation des essences de l'eau :

Cette méthode est très simple, elle consiste à laisser décanter le distillat ce qui provoque le dépôt de l'HE de girofle sous l'effet de différence des densités. L'HE ainsi séparée de la phase aqueuse est récupérée.



Figure 19: Distillat (eau+HE)

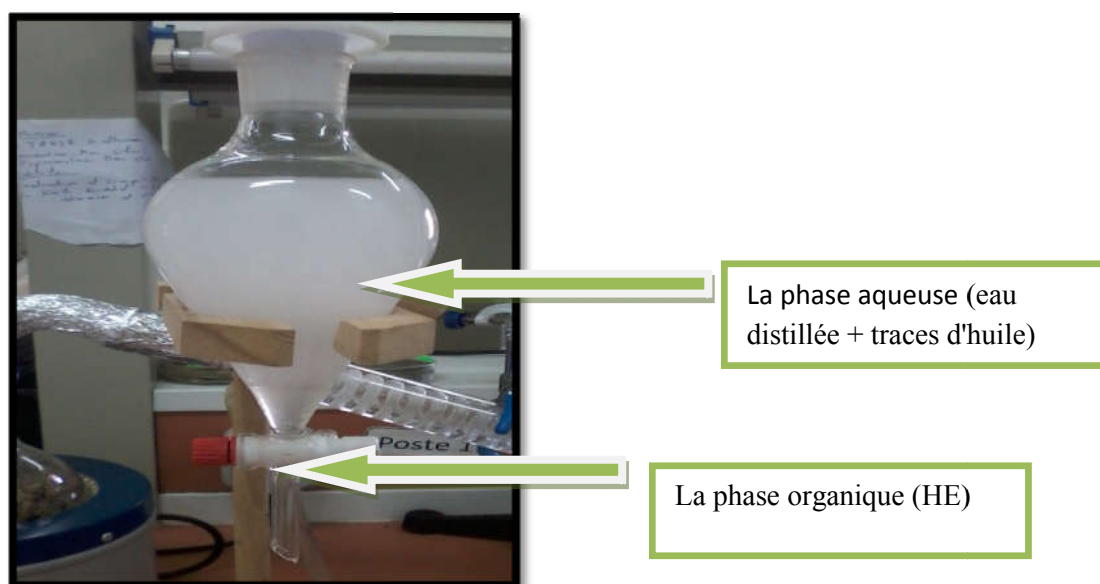


Figure 20: Etapes de séparation des phases du distillat

I-2-1-3-La conservation de l'huile essentielle :

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables, après l'extraction l'HE avait été conservée dans des flacons en verre opaques bien scellé de manière à les protéger de la lumière, il faut également éviter le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée des flacons), par la suite il faudra garder les flacons à une température basse entre (4 -5 °C)(Bekhechi, Atik-Bekkara, & Abdelouahid, 2008).

II-Les analyses de l'huile essentielle :

II-1-L'analyse physique :

1) Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M_e) et la masse de la matière végétale utilisée (M_v). (Kapadiya & Desai, 2017) ; Il est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = (M_e / M_v) \times 100$$

R%: Rendement en %.

Me : Masse d'huile essentielle extraite exprimé en gramme (g).

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en gramme (g).

2) La 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 (Hamadou & Touki, 2017).

II-2- L'analyse chimique :

II-2-1-Chromatographie en phase liquide à haute performance

La détermination de la composition chimique de notre huile essentielle a été faite par chromatographie en phase liquide à haute performance en suivant la méthode de (Rana, Rana, & Rajak, 2011) qui a utilisé les produits chimiques et matériel suivants :

- 1) Le méthanol CH_3OH de catégorie HPLC.
- 2) L'acétonitrile a été utilisé.
- a) L'eau filtrée a été obtenue en passant l'eau dans un système Millipore (Direct-Q3).

II-2-2- Appareillage

Un Système de chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) de model YL9100 a été utilisé.

- ❖ Notre appareil d' HPLC est composé de;
 - Réservoirs de solvants (phase mobile).
 - Dégazeur (évite les bulles d'air) de model YL9101.
 - Système d'injection.
 - Pompe de model YL9110.
 - Détecteur UV de model YL9120.

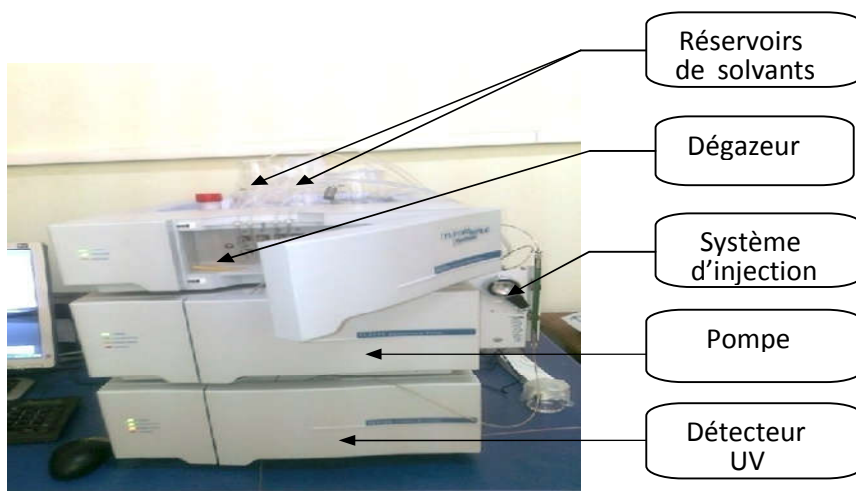


Figure 21:photo personnelle ; Appareil d'HPLC

- ❖ Le système d'HPLC est équipé d'un enregistreur et d'une imprimante.



Figure 22:photo personnelle; Système d'HPLC

II-2-3- Colonne

Une colonne d'HPLC C18 125 apolaire en silice (250 mm x 4,6 mm, dimension particulaire 5 μm), de model S/N H10-065 a été employée.

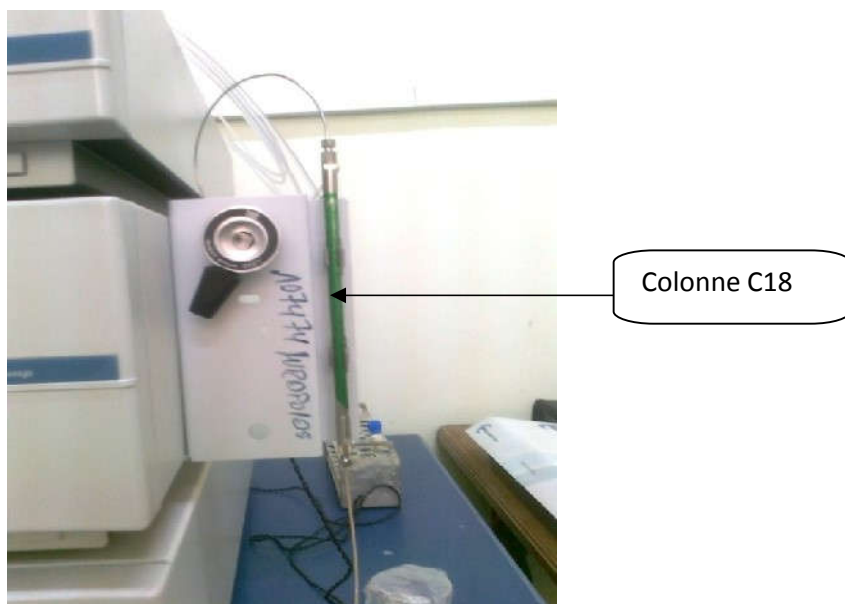


Figure 23:photo personnelle ; Colonne d'HPLC C18 125

II-2-4- Méthode de l'analyse d'HPLC

Cette analyse d'HPLC a été entreprise pour obtenir des informations sur la composition en phénol d'huile de clou de girofle.

Il s'agit de déterminer qualitativement et quantitativement les trois constituants de l'huile de clou de girofle à savoir: L'eugénol, l'acétate d'eugényle et le β -caryophyllène.

➤ Conditions chromatographiques

Les différentes conditions chromatographiques utilisés dans notre analyse d'HPLC d'huile de clou de girofle, sont mentionnées dans le **tableau III**.

Tableau III: Les conditions chromatographiques utilisés

Conditions chromatographiques	
Phase stationnaire	Ø Colonne d'HPLC type silice greffé C18 (125) apolaire (250 x 4,6 mm, dimension particulaire 5 µm).
Phase mobile	Ø L'eau filtrée : méthanol : l'acétonitrile (50x2 : 45 x 2 : 5 x 2 % v /v), à un débit de 1 ml /min.
Débit de phase mobile	➤ 1 ml /min.
Echantillon injecté	➤ 20 µl d'huile de clou de girofle.
Détections UV	➤ 254 nm
Nombre de pompes utilisés	➤ Une seule pompe
Température d'injecteur	➤ Systématique à 40C°.
Température de colonne	/
Température du détecteur	/
Temps limites de détections	➤ 1h

II-2.4.1. Mode opératoire

➤ préparation de l'échantillon d'huile de clou de girofle

L'échantillon d'huile brute des clous de girofle a été filtré, on appliquant un Microfiltre MILLIPORE (0,2 μm , unité de filtration 5 bars).

A l'aide d'une seringue, On exerce une pression de 5 bars sur l'échantillon d'huile, 5 min après l'échantillon d'huile a été purifié de ses impuretés.

➤ Préparation de la phase mobile

Après avoir filtré l'eau par un système Millipore. Nous avons versé 100ml de cette eau ultra pure dans une éprouvette graduée.

Dans une autre éprouvette graduée nous avons mis 90ml de méthanol, puis à l'aide d'une pipette nous avons ajouté 10ml de l'acétonitrile ensuite, nous avons mis l'ensemble des trois solvants (l'eau filtrée, méthanol, l'acétonitrile) 200 ml dans un flacon que nous avons agité pour obtenir un solvant homogène de phase mobile.

La phase mobile de 200ml a été utilisé pour la détection des composants l'eugénol, l'acétate d'eugényle et β -caryophyllène.

Enfin, nous avons placé ce flacon dans le réservoir de l'appareil d'HPLC.

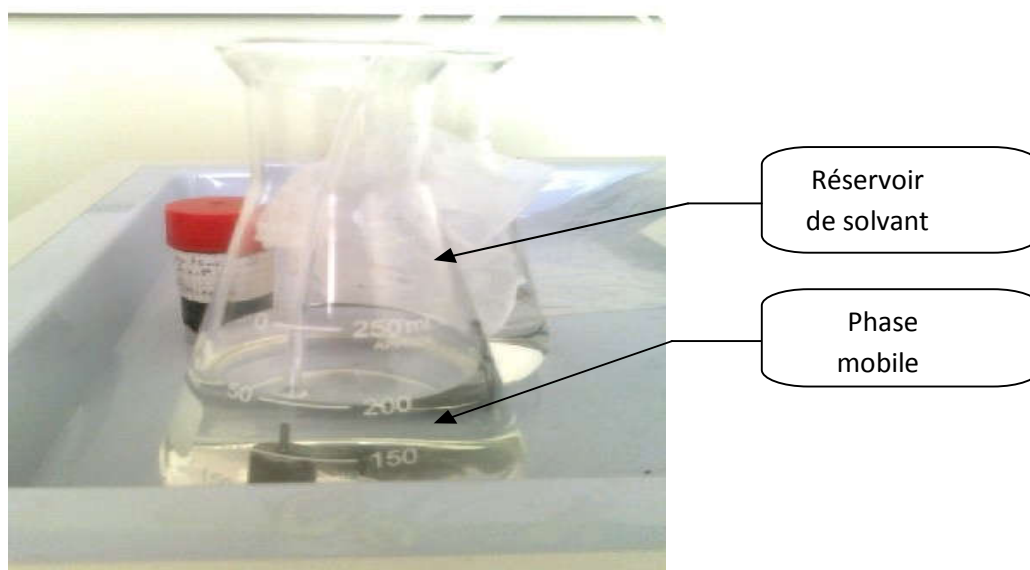


Figure 24:photo personnelle phase mobile utilisé (Eau filtrée, méthanol, l'acétonitrile)

➤ **Mise en marche du système d'HPLC**

❖ **Test : détection du composant l'Eugénol, l'acétate d'eugényle, et β -caryophyllène**

Après à voir allumé le système d'HPLC, nous avons placé un piston de la pompe au fond du réservoir de la phase mobile.

Puis à l'aide du logiciel YL Clarity de l'appareil d'HPLC nous avons inséré les conditions chromatographiques suivantes:

- 1) Nombre de pompes utilisées : 1
- 2) Type de colonne (PS) : C18 125
- 3) phase mobile utilisée : méthanol /Eau /l'acétonitrile
- 4) Débit de la phase mobile : 1 ml /min
- 5) Volume d'échantillon éjecté : 20 μ l
- 6) Détection UV: 254 nm
- 7) Temps limite de détection : 1h

On utilisant une seringue d'HPLC, nous avons extrait 20 μ l d'huile essentielle de clou de girofle que nous avons mise dans le dispositif d'injection de l'appareil d'HPLC (**chargé puis injecté**).

a) Chargement (remplissage)

Nous avons introduit l'aiguille de la seringue dans le septum du dispositif d'injection. Puis nous avons rempli la boucle avec l'échantillon contenu dans cette seringue dont le trop plein à été rejeté vers l'extérieur.

Pendant cette étape, la phase mobile circule en permanence sur la colonne Poussée par la pompe sous haute pression.

A ce stade, la seringue est retirée du dispositif d'injection.

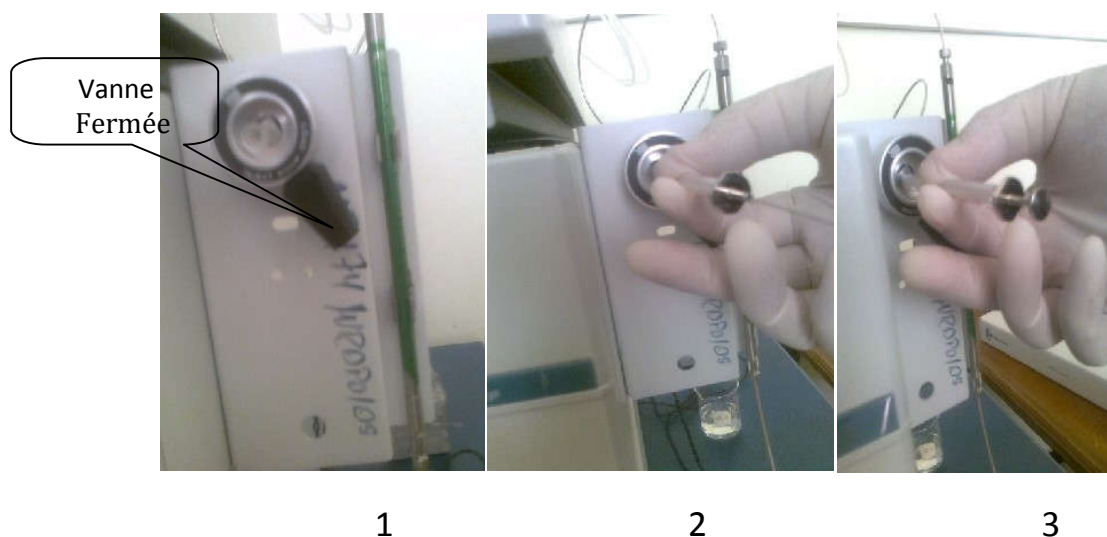


Figure 25:Photos personnelles; phase de chargement de la boucle

b) Injection de l'échantillon

Le contenu de la boucle est injecté, entourant la vanne d'injection (figure 25), la phase mobile est mise en contact avec la boucle et la colonne.

Au cours de cette étape, l'échantillon est véhiculé sur le système chromatographique à l'aide de la phase mobile.

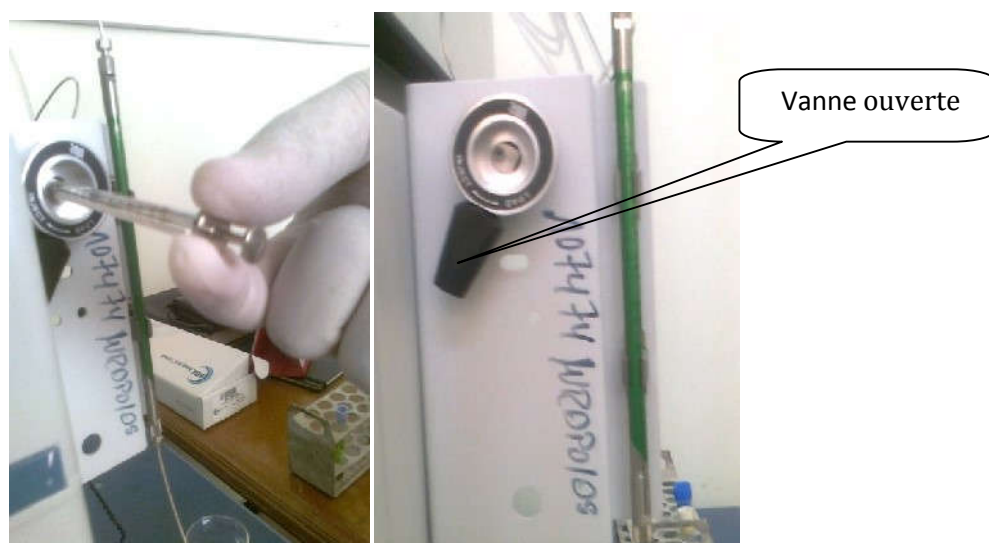


Figure 26:Photos personnelles; phase d'injection de l'échantillon



Figure 27:Photo personnelle; vanne d'injection fermée

- On patiente pendant 30 min pour l'analyse d'HPLC.
- A leurs sorties de la colonne et grâce au détecteur UV les différents solutés de l'échantillon sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.
- A la fin du temps de détection, on obtient un chromatogramme complet.
- A l'aide de notre logiciel, nous avons modifié le chromatogramme, en supprimant les bruits de fond.
- Puis nous avons limité chaque pic principal avec deux traits, pour permettre au logiciel de mesurer les surfaces et les hauteurs de ces derniers.
- Enfin on ferme la vanne d'injection et on imprime les résultats de l'analyse d'HPLC.

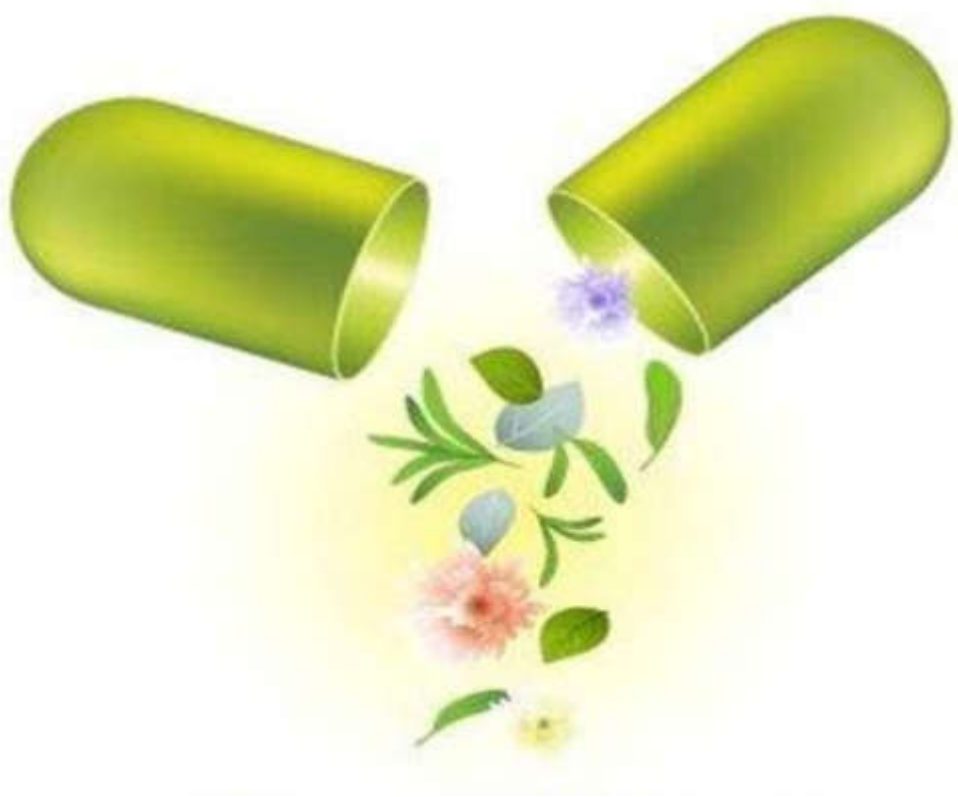
II-2.4.2. Analyses qualitatives et quantitatives

1. La recherche des composants

Les pics sont identifiés par la comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des solutés de référence (étalons), ou la liste des Indices de rétention pour les composés fréquemment rapportés des huiles essentielles végétales.

2. La quantification des composants

La quantification des composés est obtenue directement à partir des surfaces des pics des solutions de référence, puis exprimés en pourcentages par le logiciel YL Clarity.



Activité antibactérienne

III-Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne:

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations(El Amri et al., 2014).

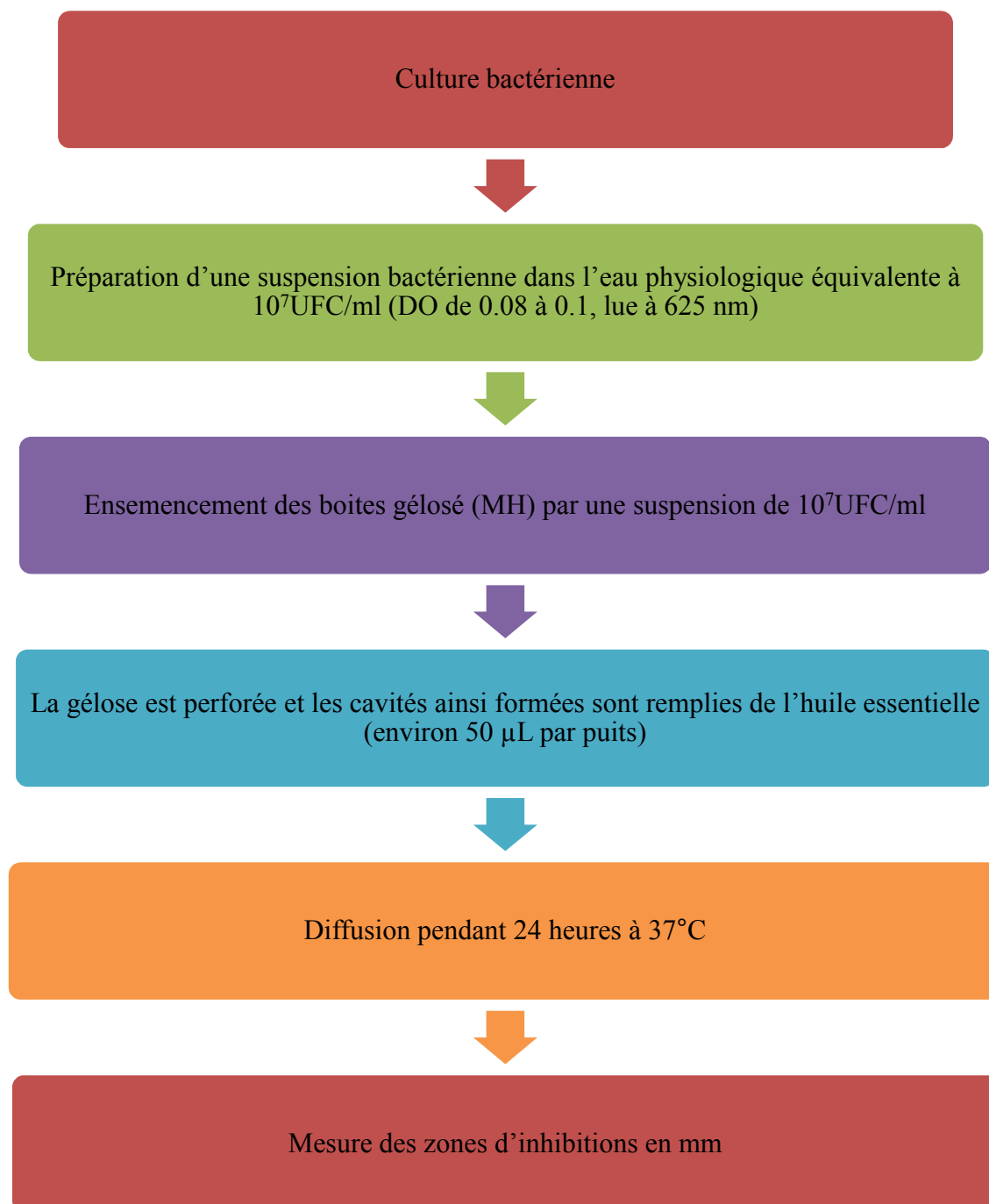


Figure 24 : Etapes de réalisation du test d'activité antibactérienne.

III-1-Les étapes de l'activité antibactérienne par la méthode des puits:**a) Le ré-isolément des souches bactériennes :**

- A l'aide d'une pipette pasteur on prend un morceau de la culture ; et on le met dans le BN.
- Mettre dans l'étuve pendant 24h à 37°.Après 24 h d'incubation, ces tubes sont conservés à la T° de réfrigération (4 °C). Dans le but de garder toujours la disponibilité en souches.

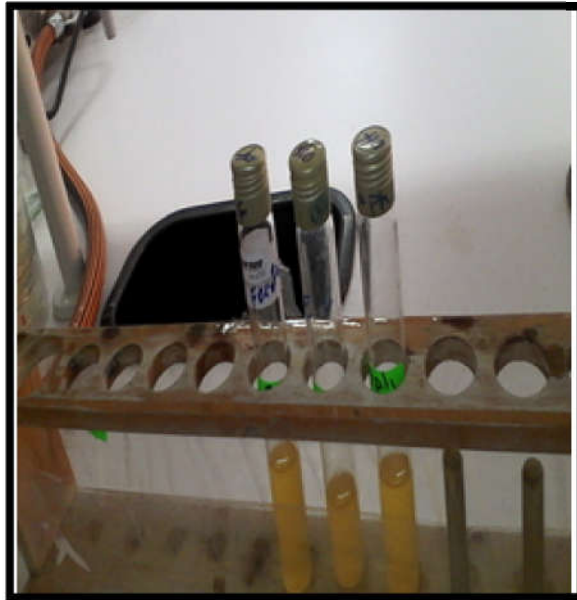


Figure 28:Le ré-isolément des souches bactériennes

b) La culture bactérienne :

Les colonies bien isolées des cultures bactériennes à partir d'une culture de plaque d'agar ont été transférées dans un milieu de bouillon contenant du flaon. La culture en bouillon a été incubée à 37 °C pendant une nuit et la turbidité de la culture de bouillon a été ajustée à 0,5 McFarland standards avec une solution saline stérile(Sharma & Baranwal, 2014).

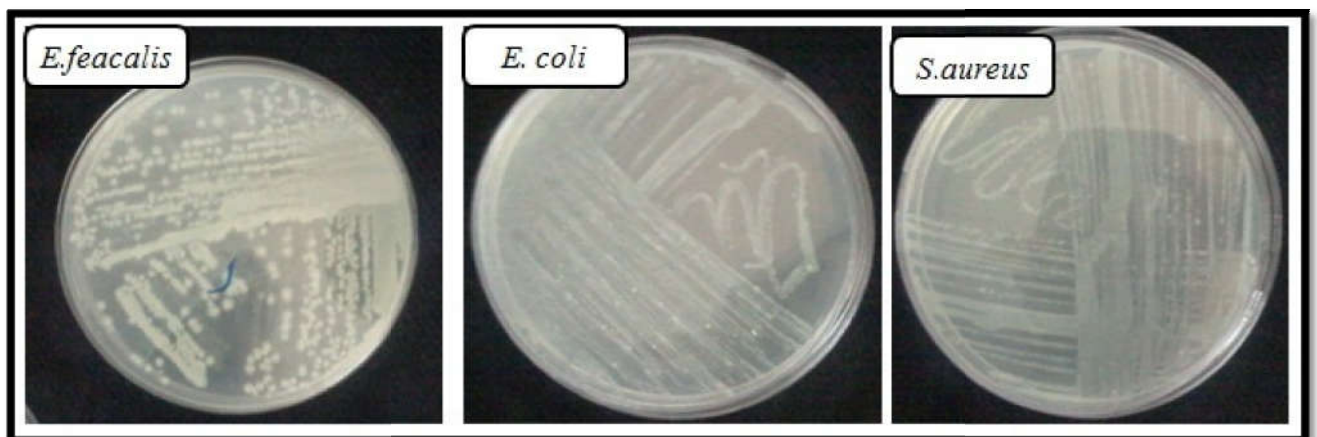


Figure 29: Les souches bactériennes

c) Préparation de l'inoculum :

A partir des boîtes contenant les germes on a préparé des suspensions pour chaque espèce. A l'aide d'une pipette pasteur on prélève deux ou trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérilisée. (0.9% NaCl) de façon à obtenir un inoculum d'une opacité équivalente à une DO de 0.08 à 0.1, lue à 625 nm.

Ajuster l'inoculum, soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou l'eau physiologique stérile, s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum (Bonnet et al., 2017).

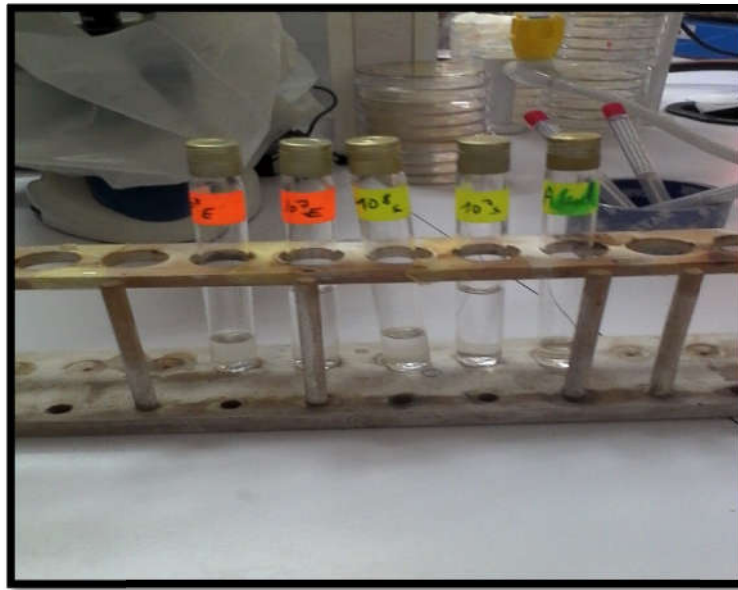


Figure 30:Préparation de l'inoculum

d) L'ensemencement:

Ensemencer la gélose Mueller-Hinton avec la suspension bactérienne par la méthode d'écouvillonnage et Laisser sécher.

- le milieu de culture utilisé est Muller – Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la Contamination du manipulateur et de la paillasse).
- l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à Chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose(De Cliff & Harerimana, 2013).

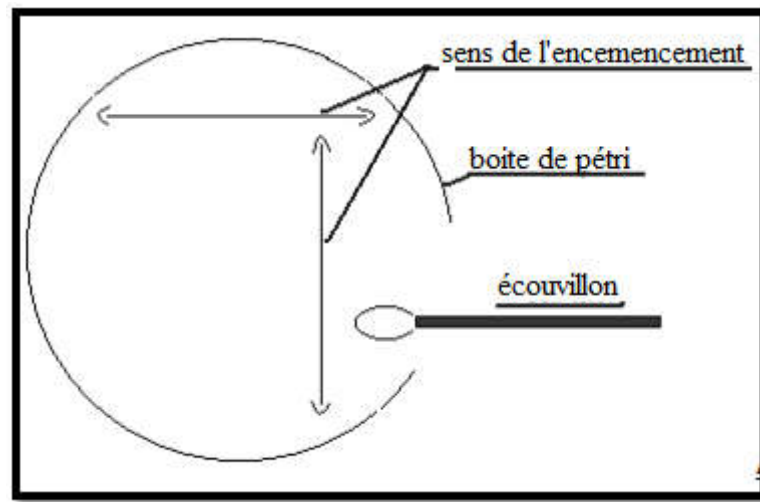


Figure 31:Ensemencement par écouvillon

e) Tests d'inhibitions :

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles nous avons utilisé deux méthodes :

1) La méthode de diffusion en puits :

Ces procédés ont été réalisés suivant plusieurs références(Hernandez Ochoa, 2005; Khebichat, 2014)et modifiées si nécessaire selon les moyens existants.

- Des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton agar sont ensemencées aseptiquement par une suspension de 10^7 UFC/ml
- L'ensemencement se fait par écouvillonnage. après le séchage des boîtes, la gélose est perforée à l'aide de la partie supérieure d'un embout stérile (6mm).
- Les cavités ainsi formées sont remplies de la solution huileuse avec une concentration de 0,5 g/L (environ 50 μ L par puits).Selon (Baudry & Brézellec, 2006)L'huile essentielle est rarement prise comme liquide pure, habituellement ses solutions sont utilisées.
- Le solvant DMSO a été utilisé comme contrôle négatif.
- Après diffusion de l'HE durant 1 heure, étuver les boîtes à 37C° durant 24 heures.

L'activité antimicrobienne est déterminée à l'aide d'une règle mesurant les diamètres des zones claires (mm) qui se forment autour des puits ($\emptyset$ du puits est inclus : 6 mm).

La sensibilité des souches envers l'HE est classée selon les diamètres des halos d'inhibitions de (Ponce, Fritz, Del Valle, & Roura, 2003):

Tableau IV: Les diamètres des halos d'inhibitions

Le diamètre	La sensibilité des souches
$\emptyset < 8 \text{ mm}$	non sensible(-) ou résistante
$9 < \emptyset < 14 \text{ mm}$	Sensible(+)
$15 < \emptyset < 19 \text{ mm}$	très sensible (++)
$\emptyset > 20 \text{ mm}$	extrêmement sensible (+++)

2)- Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide :

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne (Guinoiseau, 2010). Elle n'est évaluée que pour les microorganismes qui affichent une certaine sensibilité.

Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution en série sur milieu Mueller Hinton agar selon le protocole décrit par (Baudry & Brézellec, 2006) :

- Diluer l'HE dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO) (1:4 ; 1:8 ; 1:16 ; 1:32 et 1:64).

Ce choix a été fait, parce que, le DMSO est le solvant préférable pour la majorité des auteurs, notamment, (Gachkar et al., 2007) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

- ensemencée la suspension bactérienne par écouvillonnage et déposé dans chaque puits 50 μ l de chaque dilution
- Diffusion de l'HE durant 1 heure.
- Incubation à 37 C° pendant 24 heures.
- Après incubation, tous les puits sont examinés et la CMI (μ l/ml) est déterminée en prenant en compte la plus faible concentration en HE qui inhibe tout développement bactérien.

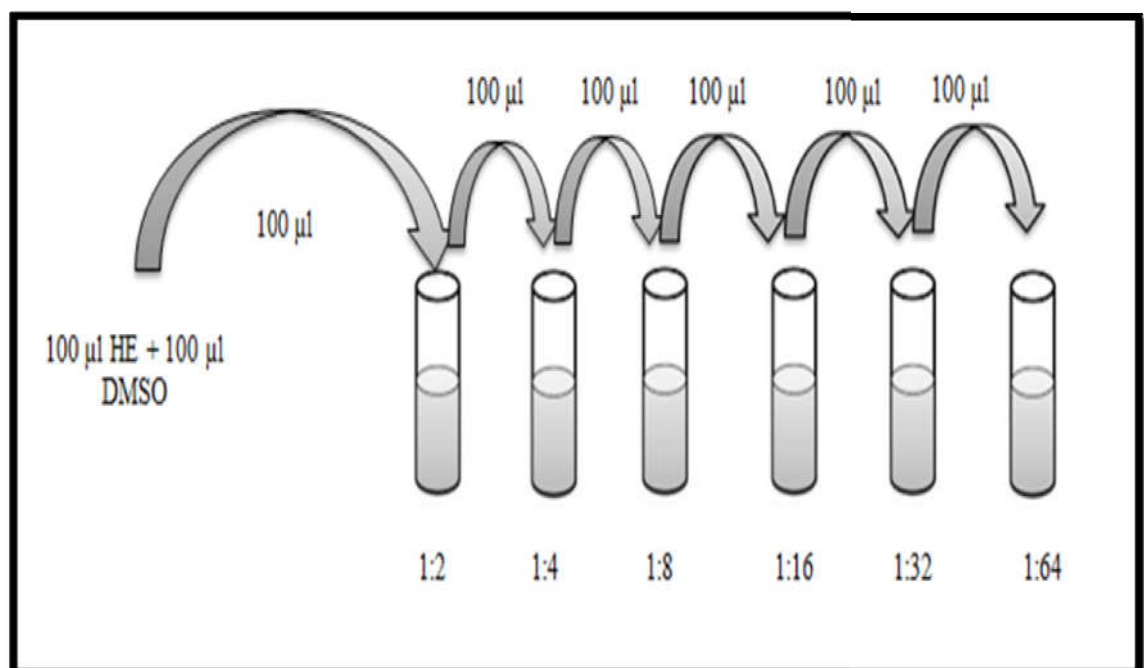
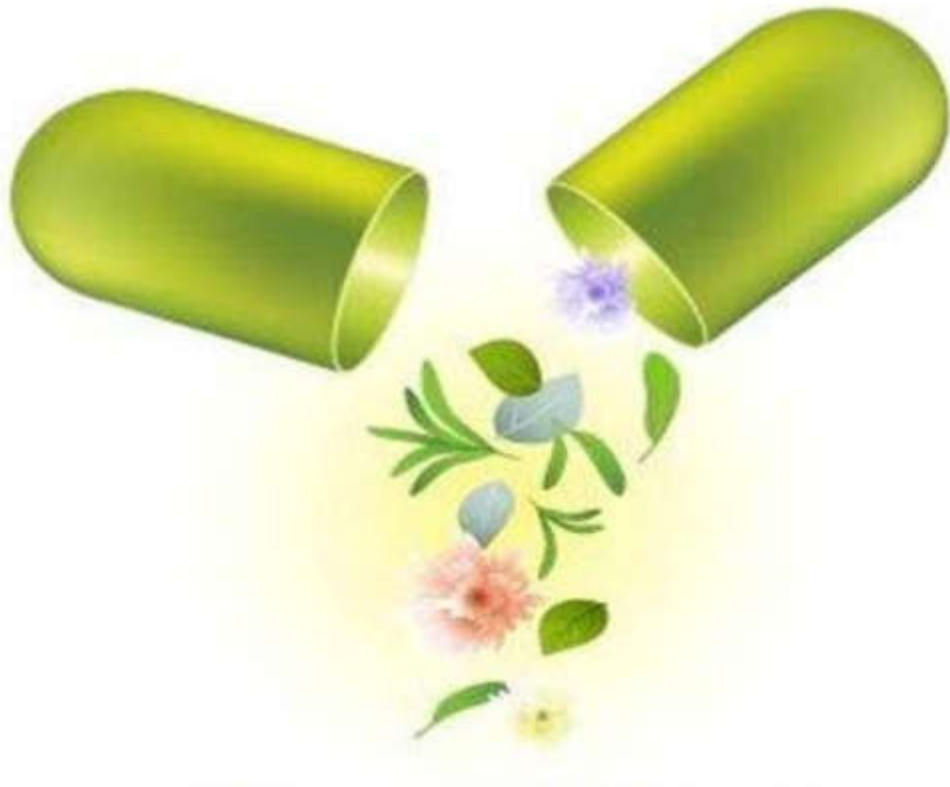


Figure 32:Préparation des dilutions de l'huile essentielle



L'effet des différentes températures sur l'activité antibactérienne

IV- L'effet de la température sur l'activité antibactérienne:

L'effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle a été déterminé par les méthodes décrites par (Karkosh, 2012) avec des modifications :

- L'huile extraite a été incubée à 25, 50, 75 et 100 °C, respectivement, dans un bain d'eau pendant 30 minutes.
- l'extrait chauffé aux différentes températures a été refroidi et conservé à 4°C Jusqu'à utilisation.
- Ensuite, le test d'activité antibactérienne a été réalisé contre la bactérie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *E.faecalis*, à l'aide de la méthode de diffusion en puits.
- Les puits formés sont remplis d'HE chauffée.

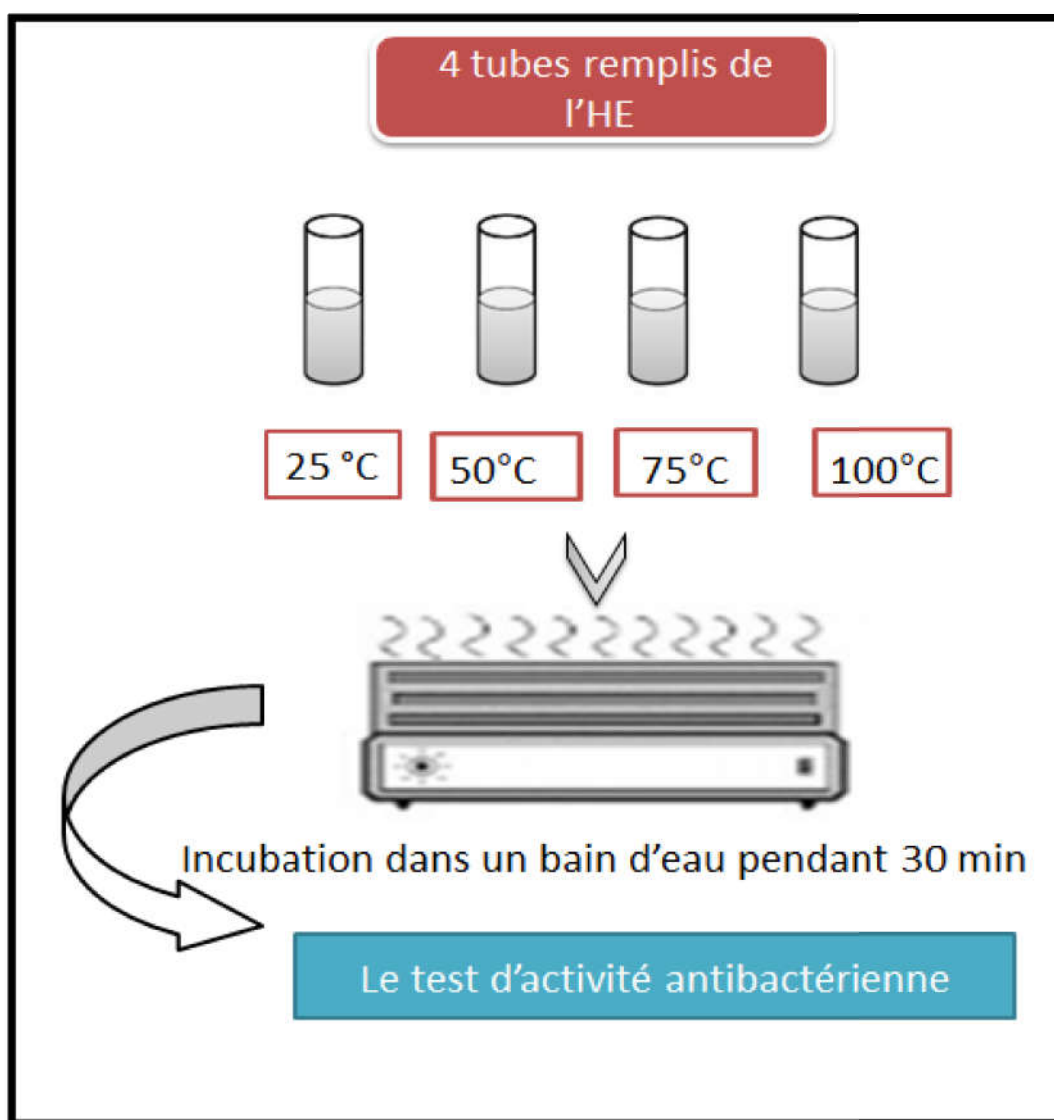
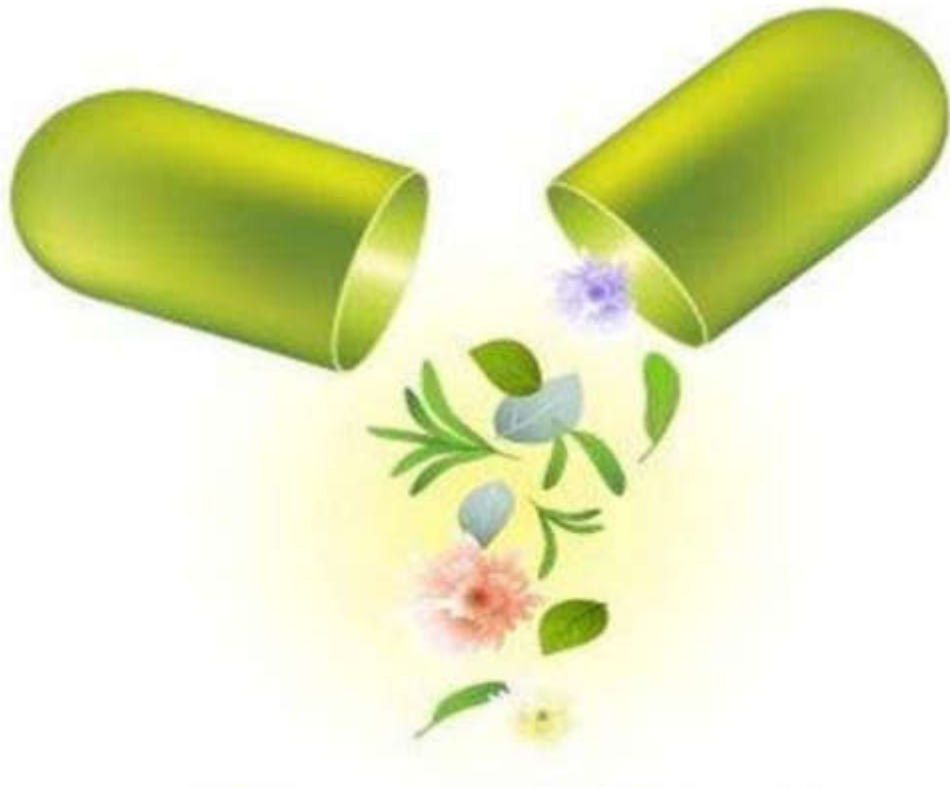


Figure 33:L'effet de la température sur l'activité antibactérienne



Activité hémolytique

V-L'activité hémolitique :

Les tests de l'effet hémolitique de HE de clous de girofle ont été réalisés sur une suspension érythrocytaire du sang humain, incubée dans un tampon phosphate salin à PH=7,4.

❖ Préparation de la suspension érythrocytaire :

Cinq millilitre de sang d'une personne saine ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 5 min à 1000 tour/min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé trois fois avec du PBS(Annexe 4) ; après la dernière centrifugation, 0.4 ml du culot a été additionné à 9.6 ml de tampon phosphate salin (0,2M à un pH de 7,4) pour obtenir une solution érythrocytaire d'hématocrite à 4 %(Yang, Sun, & Fang, 2005).

❖ Test d'effet hémolitique :

Le protocole suivi celui décrit par (Rodrigues et al., 2013)avec quelque modifications : dans des tube a hémolysé

- Déposer 20 µl d'huile essentielle diluée en série dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS; 0,25µl/ml, 0,625µl/ml, 0,0156µl/ml et 0,00390 µl /ml).
- dans chaque tube on ajoute 80 µl d'une suspension érythrocytaire de 4%
- incubé pendant 1 h à 37°C dans un bain marin.
- La réaction a été ralentie en ajoutant 200 µl de PBS, puis la suspension a été centrifugée à 1000 tour pendant 10 minutes.
- La Lyse cellulaire a ensuite été mesurée par spectrophotométrie (540 nm).
- Le PBS est utilisé comme un contrôle négatif (l'absence d'hémolyse).
- hémolyse totale (contrôle positif) est obtenue par la mise en suspension des globules rouge avec l'eau distillée (ED).
- Les résultats ont été déterminés par le pourcentage d'hémolyse par rapport au contrôle positif (100% hémolyse).

Selon(Mahmoodzadeh, Zarrinnahad, Bagheri, Moradia, & Shahbazzadeh, 2015) ; le % d'hémolyse est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ hémolitique} = \frac{\text{Densité Optique (échantillon)} - \text{Densité Optique (Témoin négatif)}}{\text{Densité Optique (hémolyse totale)}} \times 100$$

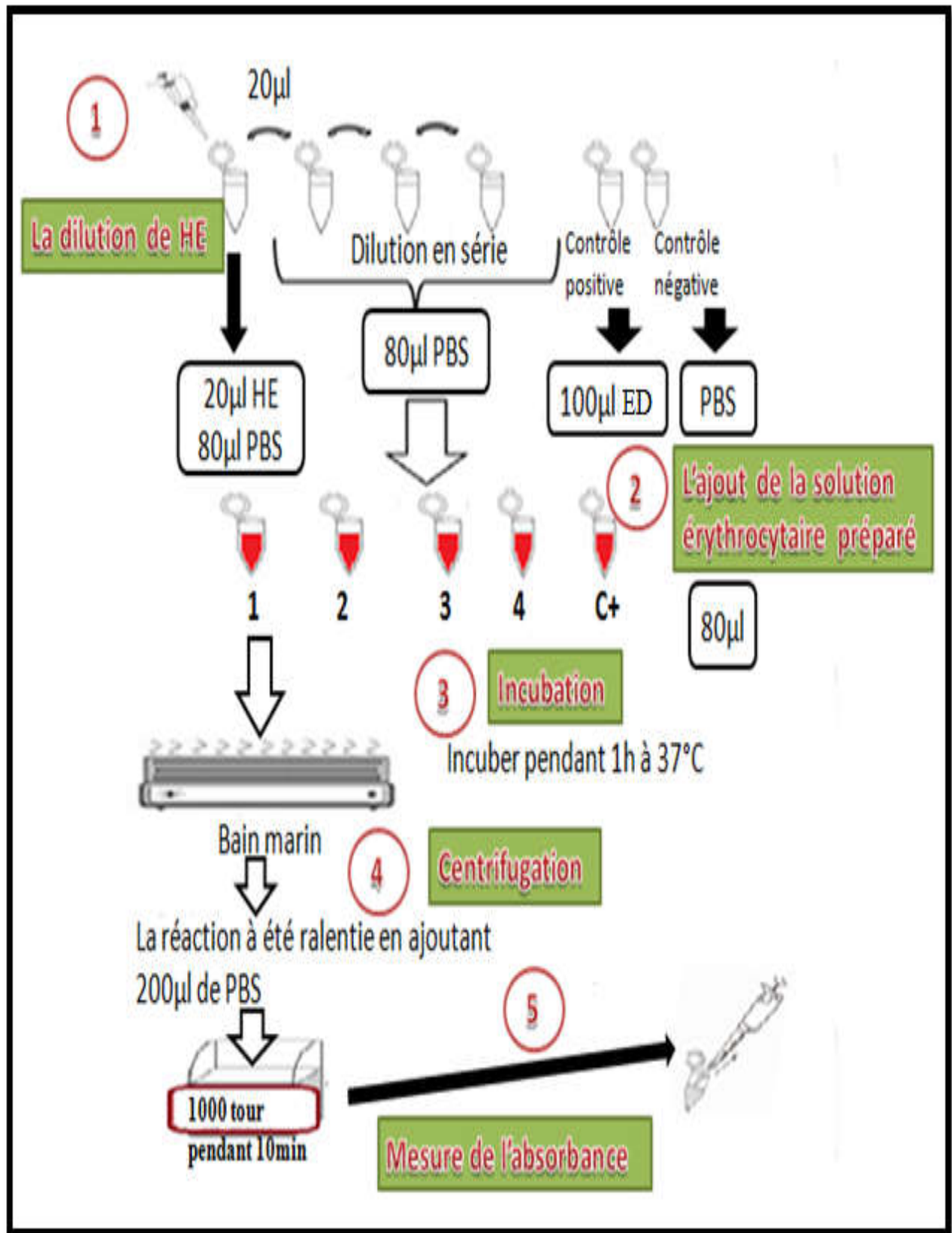
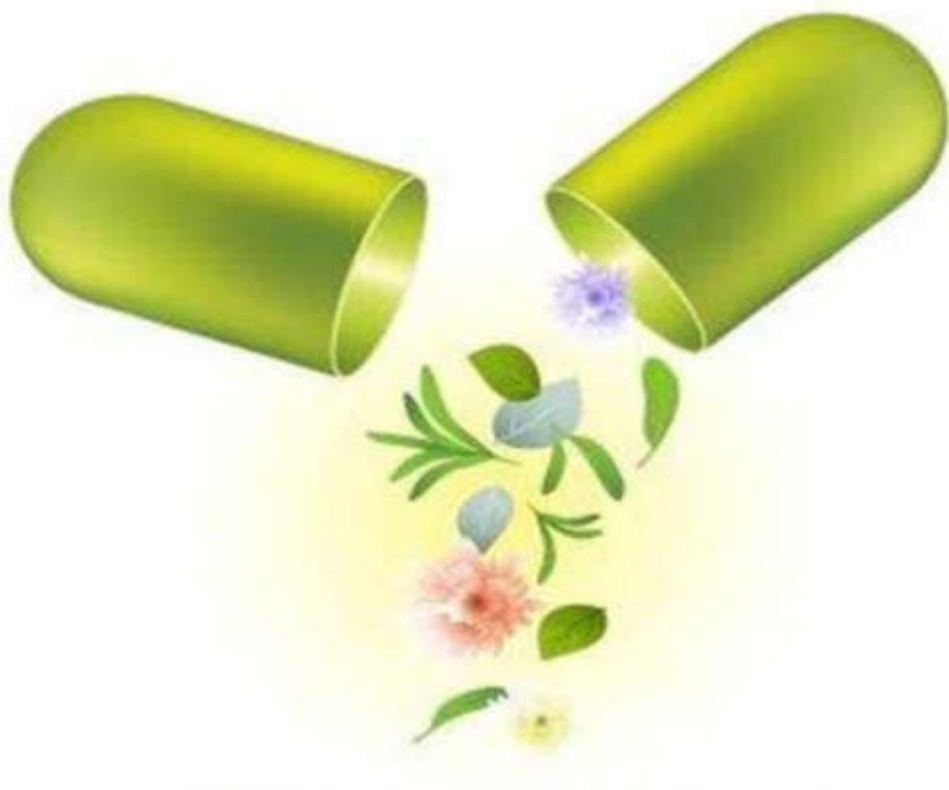


Figure 34: Schéma décrivant les étapes du protocole expérimental pour étudier l'effet hémolytique des huiles essentielles de clou de girofle

Chapitre V



Résultats et discussion

II-Résultat et discussion :**II-1-Description de l'huile essentielle obtenue :**

Le (Tableau v) nous montre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des clous de girofle.

Tableau V:Caractéristique organoleptiques

	Aspect	Couleur	Odeur
Huile Essentielle Etudiée	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Epicée

II-2-Les analyses de l'huile essentielle**1) Rendement en huile essentiel de clous de girofle:**

Les résultats du rendement de l'H E extraite par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire à partir des Clous de girofle :

Le poids du récipient en verre = 55,03g

Poids du conteneur + huile=60 ,81g

Poids de l'huile=5,78g

$$\text{RHE}\% = 5,78 / 50 = 11,56\%$$

Il s'avère que le rendement en H.E. extraite par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire à partir des Clous de girofle est de 11,56 %. Ce résultat coïncide presque avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont procédé par la même technique d'hydrodistillation. ANDREA (2004) a obtenu un résultat de (14 à 20 %) en utilisant la même technique d'hydrodistillation.

Cette petite différence de rendement est probablement due à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et la simplicité de notre dispositif d'hydrodistillation.

Cette différence du rendement de l'huile essentielle est toute a fait normale, puisqu'il dépend de plusieurs facteurs a savoir l'espèce, la période de récolte, les pratiques culturales, la technique d'extraction(Marzouki et al., 2009; Olle, Bender, & Koppe, 2010) .facteurs climatiques (chaleur, froid), la géographie(altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil),et la nature des plantes aromatiques(Descamps-Marie, 2008).

La séparation de l'huile essentielle après sa distillation est déterminée dans une large mesure par son degré de solubilité dans l'eau. C'est ce que nous l'avons remarqué durant l'étape de récupération de l'huile essentielle à partir de l'hydrolysat, ce dernier contient toujours des gouttelettes que nous n'avons pas pu les récupérer ce qui fausserait le rendement.

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

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

2) Le pH :

Selon les analyses, notre pH =6.40 c'est pH acide ; ceci est due à la composition chimique des HES.

Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle. Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes; ce qui permettra à ces huiles essentielles de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires(Hamadou & Touki, 2017).

3) Résultats de l'analyse d'HPLC

Le chromatogramme d'HPLC obtenu après l'analyse de l'échantillon de l'huile fixe de girofle on utilisant la méthode d'HPLC, montrent des pics sans interférence.

Selon la bibliographie disponible, il n'existe pas de travaux déjà réalisés sur la détermination de la composition de l'huile essentielle d'*S. aromaticum* par la chromatographie à haute performance(HPLC), pour cela, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour les autres auteurs. En utilisant la liste des Indices de rétention pour les composés fréquemment rapportés des huiles essentielles végétales.

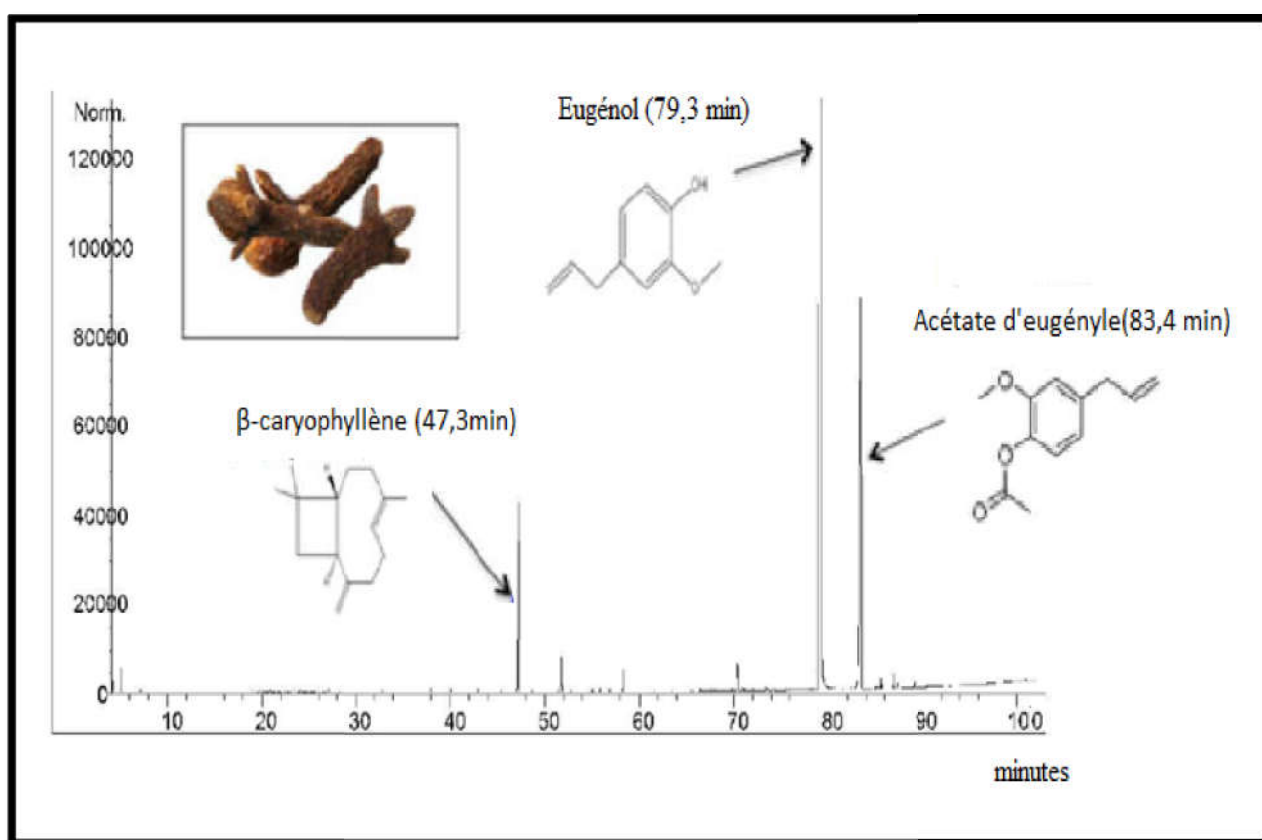


Figure 35:Chromatogramme de l'échantillon d'huile essentielle de girofle

Cette étude démontre que l'huile brute de girofle contient des composés phénoliques : Eugénol (85,92%), acétate d'eugényle (8,90%), β-caryophyllène (3,04%), détectés à des temps de rétention différents.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant ;

Tableau VI: Résultats de la composition d'huile essentielle de girofle

Pics	Temps de rétention (min)	constituants	%
1	5,0	ACETONE	0,09
2	6,9	2-METHYLBUTANAL	0,01
3	7,0	ISOVALEDEHYDE	0,01
4	7,2	ETHANOL	0,01
5	20,1	LIMONENE	0,01
6	20,8	1,8-CINEOLE	0,01
7	23,4	CIS- β -OCIMENE	0,01
8	24,0	TRANS- β -OCIMENE	0,01
9	27,1	ACETATE DE 7-METHYL-2 OCTYLE	0,01
10	29,3	4,8 -DIMETHYL-1, 3,7-NONATRIENE	0,01
11	38,0	α -CUBEENE	0,03
12	40,1	α -COPAENE	0,04
13	43,0	LINALOL	0,02
14	45,4	α -TRANS-BERGAMOTENE	0,01
15	47,3	β-CARYOPHYLLENE	3,04
16	51,4	SESQUITERPENE	0,01
17	51,8	α -HUMULENE	0,38
18	52,9	γ -MUUROLENE	0,01
19	54,9	α -MUUROLENE	0,01
20	55,1	α -SELINENE	0,01
21	55,9	α -FARNESENE	0,03
22	56,9	δ -CADINENE	0,02
23	58,3	SALICYLATE DE METHYLE	0,25
24	66,5	Cis-JASMONE	0,03
25	67,6	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,01
26	68,0	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,01
27	69,8	OXYDE D'ISOCARYOPHYLLENE	0,02
28	70,4	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,35
29	70,9	METHYLEUGENOL	0,04
30	71,2	EPOXYDE SUSQUITERPINIQUE	0,02
31	72,0	NEROLIDOL	0,01
32	72,1	HUMOLOL	0,01
33	73,4	Epoxy-6,7-HUMULENE	0,06
34	73,6	SESQUITERPENOL	0,02
35	74,3	CUBENOL	0,01
36	78,0	SESQUITERPENOL	0,02
37	79,3	EUGENOL	85,92
38	80,7	SESQUITERPENOL	0,01
39	82,4	SESQUITERPENOL	0,01
40	83,4	ACETATE D'EUGENYLE	8,90
41	85,1	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,02
42	85,4	CARYOPHYLLADIENOL ISOMERE	0,03
43	85,6	CARYOPHYLLA-3,7-DIEN-6-OL	0,13
44	86,9	CHAVICOL	0,17
45	87,3	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,05
46	87,9	ISOEUGENOL	0,01
47	89,2	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,06
48	100,9	BENZOATE DE BENZYLE	0,03
		TOTAL	99,99

II-3-L'activité antibactérienne :

Dans le but d'estimer le potentiel microbien de notre l'huile essentielles (*syzygium aromaticum*).le choix s'est porté sur plusieurs souches cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

D'après les expériences effectuées par la méthode de diffusion en puits qui permet de mesurer la capacité de notre l'huile à inhiber la croissance microbienne in vitro ; et déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé (huile essentielle) qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI).

1) L'effet de l'huile essentielle de *syzygium aromaticum* sur la croissance des souches bactériennes :

Les résultats des tests antimicrobiens sont regroupés dans les tableaux, et illustrés par les figures.

Tableau VII: Les diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance des souches bactériennes comparé au DMSO

La souche bactérienne	Diamètre en mm	Témoin négative DMSO
	1/2(0,5µg/ml)	
<i>E.coli</i> ATCC 25921	24 (ES)	00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	26 (ES)	00
<i>Entérocooccusfaecalis</i> ATCC 49452	42 (ES)	00

R : Résistant (croissance microbiennes) ; Ns : Non sensible (croissance microbiennes)

Ts : Très sensible (pas de croissance microbiennes) ; S : Sensible (pas de croissance microbiennes).

Tableau VIII: Les résultats de diffusion d'huile comparé au DMSO

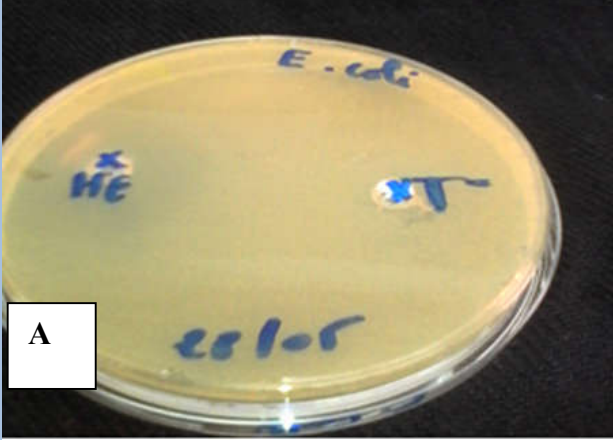
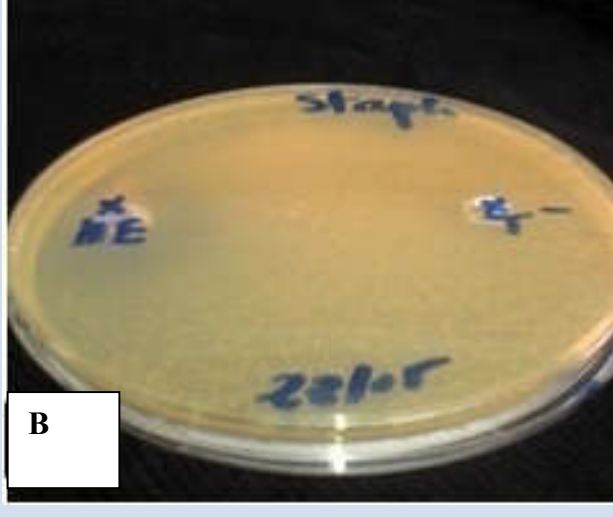
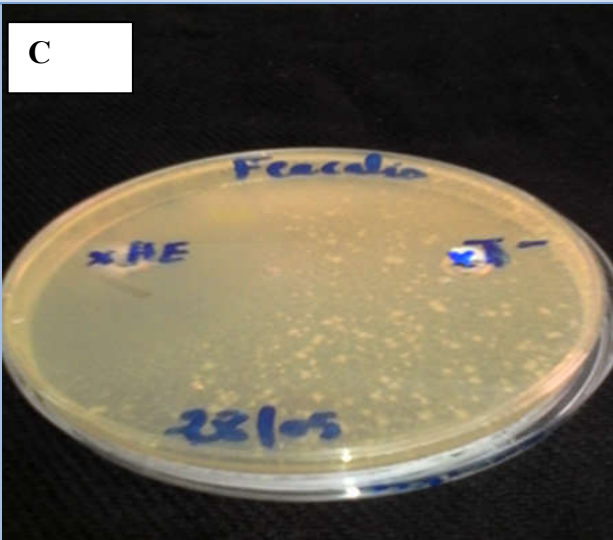
La souche	Les résultats
<i>Esherishia .coli</i>	
<i>Staphylococcus auerus</i>	
<i>Entéroccoccus faecalis</i>	

Tableau IX: L'effet de concentrations décroissantes de *syzygium aromaticum* sur la croissance des bactéries

Les souches bactériennes	Diamètre en mm				
	La dilution µg/ml				
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
<i>E.coli</i> ATCC 25921	18 (Ts)	16 (Ts)	14 (S)	12 (S)	
<i>Staph aureus</i> ATCC29213	26 (Es)	18 (Ts)	14 CMI	00	
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 49452	40 (Es)	28 (Es)	26 (Es)	16 (Es)	00

S : résistant (croissance microbiennes) ; Ns : non sensible (croissance microbiennes)

Ts : très sensible (pas de croissance microbiennes) ; S : sensible (pas de croissance microbiennes).

La méthode de diffusion des puits nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des clous de girofle vis-à-vis des bactéries testées. Selon la classification de (Ponce et al., 2003), toutes les souches sont sensibles à l'huile essentielle de *S.aromaticum*.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de clou de girofle exhibent une activité contre trois souches bactériennes testés en dépit de leur morphologie et de leur Gram. En effet l'HE de *S.aromaticum* exerce une forte activité sur les bactéries à Gram positif, comme on peut le voir dans le Tableau N°VI, *E.feacalis* ATCC49452 est la souche extrêmement sensible avec une zone d'inhibition maximale de 42 mm, suivie de *S.aureus* ATCC25922 avec 26 mm et une zone de 24 mm pour *E .coli* ATCC2594 à la dilution 1 /2 (**Tableau VII**).

Les diamètres des halos d'inhibition montrent que le pouvoir antimicrobien est inversement proportionnel à la dilution, c'est-à-dire l'effet diminue avec l'augmentation de la dilution de l'huile essentielle. La différence dans la sensibilité des espèces microbiennes enregistrée suggère la susceptibilité des différents microorganismes aux divers composants de l'huile essentielle.

2) Détermination des CMI:

Les résultats de l'évaluation des CMI résumés dans le **Tableau x** montrent que les valeurs de la CMI varient en fonction de trois paramètres : la souche testée, la nature de la fraction et la dose.

Tableau X: Les CMI de l'HE vis à vis des trois souches testées et leur pouvoir bactériostatique ou bactéricide

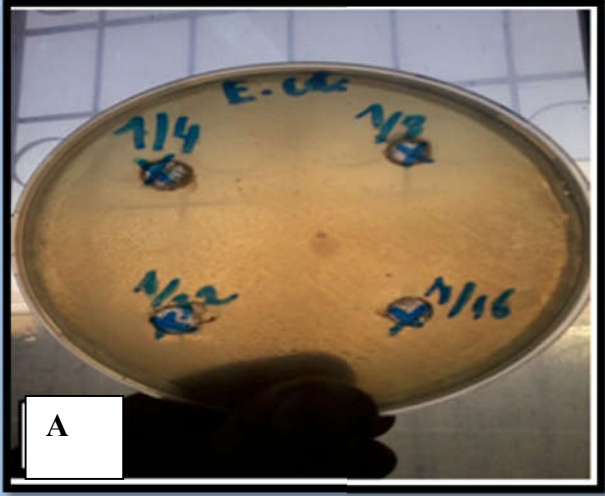
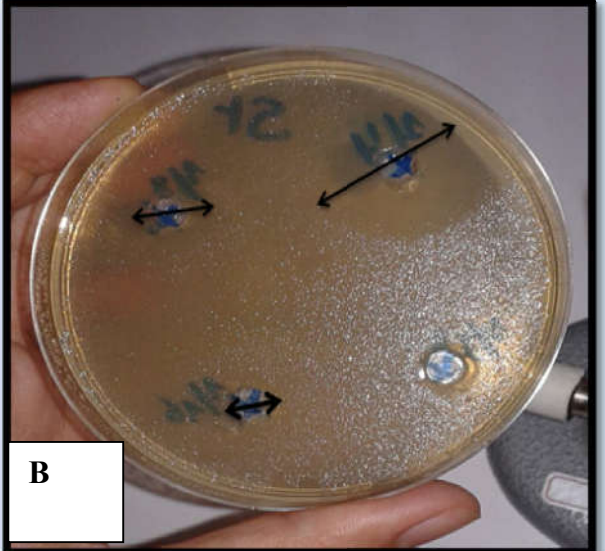
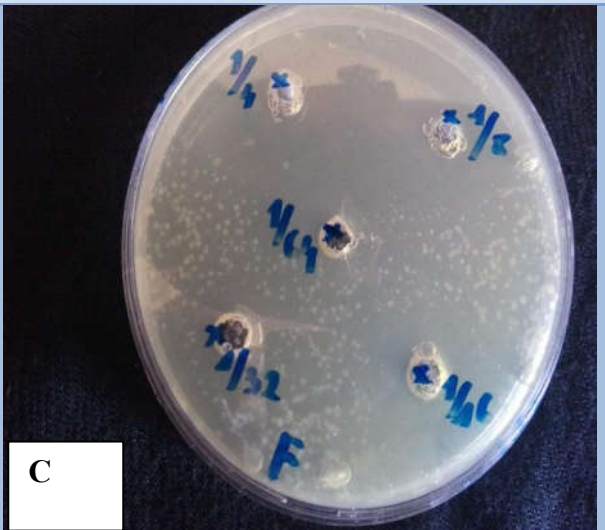
Les bactéries	Valeur de CMI (μl /ml)	pouvoir
<i>E.coli</i> ATCC 25921	ND	ND
<i>Staph aureus</i> ATCC29213	0,0625 (1 /16)	bactéricide
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 49452	0,0312 (1/32)	bactéricide

ND : non déterminé

La valeur de CMI de l'HE des Clous de girofle vis-à-vis de *S. aureus* est de 1/16 ; et pour *E. faecalis* est de 1 /32(dans laquelle on n'observe aucun développement microbien).

Selon nos résultats, *E.feacalis* était la souche la plus sensible à l'action de l'huile essentielle avec une CMI de l'ordre de 0,0312 $\mu\text{L}/\text{ml}$.

Tableau XI: Les résultats de CMI par les dilutions

La souche bactérienne	Résultat
<i>Escherishia .coli</i>	
<i>Staphylococcus auerus</i>	
<i>Entéroccocus faecalis</i>	

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que :

L'action de l'antimicrobien 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-, et d'autre part de la composition de l'huile essentielle elles-mêmes qui leur confère un pH acide (pH= 6,40)(Mouas et al., 2017).

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 et à leurs groupes fonctionnels et aux interactions synergiques possibles entre les composants.

Parmi les constituants majeurs de l'HE de *syzygium aromaticum* est l'eugénol (appartient à la classe des phénols), Il est très actif contre les micro-organismes testés. Les membres de cette classe sont connus pour être des agents bactéricides ou bactériostatiques, selon la concentration utilisée.

L'activité élevée des composants phénoliques peut être expliquée plus en détail à propos de la substitution alkyle dans le noyau phénol, qui est connue pour renforcer l'activité antimicrobienne des phénols(De Billerbeck, 2007).

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* et *faecalis* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe.

Les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes sont des substances antibactériennes importantes. L'HPLC a révélé sa présence, dans notre HE, ce qui peut expliquer l'efficacité de l'huile de *syzygium aromaticum*(Cahuzac-Picaud, 2012).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire(Guinoiseau, 2010).

Premièrement, les molécules de l'huile essentielle vont attaquer la membrane de la bactérie. Cette membrane, qui est constituée de glycérophospholipides, est répartie en double couche : une qui est hydrophobe et l'autre qui est hydrophile. Cette membrane est semi-perméable et fait passer des molécules polaires ainsi que des gaz. Dans le cas présent, l'eugénol va entraîner une perte de cette perméabilité sélective en changeant ses propriétés physiques, grâce à une coexistence de parties hydrophiles et hydrophobes. Cette augmentation de perméabilité fera perdre à la bactérie ses constituants cellulaires.

Deuxièmement, 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.

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cette huile diffère d'une bactérie à une autre. cependant, *E. feacalis* est la plus sensible à l'huile testée puis *S. aureus*. Ces résultats sont en accord avec la littérature selon lesquelles les bactéries à Gram⁺ montrent la plus grande sensibilité par rapport aux bactéries à Gram⁻ (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008; Burt, 2004; Holley & Patel, 2005; Russell, 1991; Souza, Stamford, Lima, Trajano, & Barbosa Filho, 2005).

Comme il a été rapporté auparavant, le mode d'action principal des huiles essentielles consiste en la lyse de la paroi bactérienne du fait de leurs propriétés lipophiles. Chez les bactéries à Gram⁻, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes (Nikaido, 2003) alors que les bactéries à Gram⁺ sont moins protégées parce que la paroi est formée d'une couche de peptidoglycane seulement qui n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50 KD. Les antibiotiques sont, également, plus actifs sur les bactéries à Gram⁺ que sur les bactéries à Gram⁻ (Hogan & Kolter, 2002).

L'effet bactéricide de l'Eugénol semble être dû à son caractère hydrophobe responsable de sa pénétration dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire des bactéries, conduisant à une altération de la membrane cytoplasmique voire même une augmentation de sa perméabilité non-sélective et une perte de l'intégrité membranaire et par conséquent une fuite des constituants intracellulaires (protéines, ions) aboutissant finalement à la mort cellulaire. Plusieurs études ont montré qu'une synergie d'action existe lorsque l'Eugénol est associé à d'autres antibiotiques tels que la vancomycine, bêta-lactame, streptomycine et pénicilline (Lucchesi, 2005).

II-4-L'effet de différentes températures sur l'activité antibactérienne du clou de girofle:

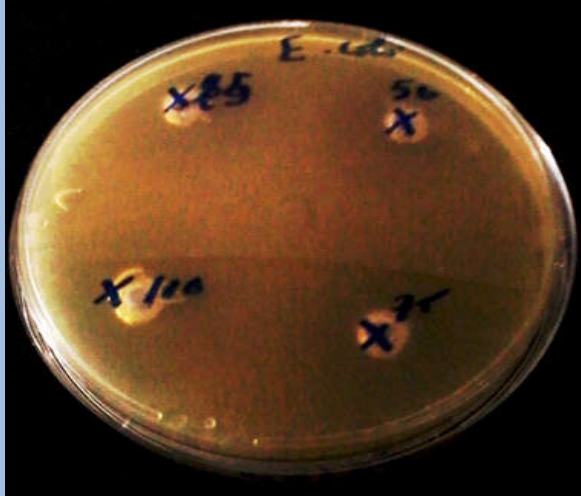
L'effet de la température sur l'activité antibactérienne d'huile essentielle de clous de girofle contre les bactéries d'*E. Coli* et de *S. aureus* et *E. faecalis* a été déterminé.

L'activité antibactérienne de l'HE des clous de girofle a été retrouvée inchangée à toutes les températures appliquées (**Tableau XII**), ce résultat concordant avec celui de Md. Et.al (2008), suggérant que les composants actifs de l'HE n'ont pas été détruits à hautes températures même avec le traitement de 30 min à 100C°.

Tableau XIII:L'effet des différentes températures sur l'activité antibactériennes du clou de girofle

Bactéries	Zones d'inhibition \ Température (C°)			
	25 C°	50 C°	75 C°	100 C°
<i>E. coli</i>	24	24	24	24
<i>S. aureus</i>	26	26	26	26
<i>E. faecalis</i>	42	42	42	42

Tableau XIV: Résultats de l'effet de différentes températures sur l'activité antibactérienne

La souche bactérienne	Les résultats
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Entérocooccus faecalis</i>	

II-5-L'activité hémolytique

Les tests d'activité hémolytique ont été réalisés sur HE de *S.aramaticum*. Pour exclure la possibilité de cytotoxicité associée de l'huile de clou de girofle, l'activité hémolytique sur les érythrocytes humains a été étudiée. Les globules rouges humains constituent un outil pratique pour les études de toxicité des composés, car ils sont facilement disponibles, leurs propriétés membranaires sont bien connues et leur lyse est facilement contrôlée en mesurant la libération d'hémoglobine (Marya, Satija, Nagpal, Kapoor, & Ahmad, 2012). Le test hémolytique in vitro est un outil de dépistage possible pour évaluer la toxicité in vivo des cellules hôtes (Sayes, Reed, & Warheit, 2007).

D'après, les résultats obtenus des HE de *S. aramaticum* nous avons constaté que l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration d'HE.

La figure 36, présente les taux d'hémolyse, par pourcentage après 60 minutes dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations en HE (0,25µl/ml, 0,625µl/ml, 0,0156µl/ml et 0,00390 µl/ml) de *S. aramaticum*, par rapport au tube d'hémolyse totale contenant de l'eau distillé.

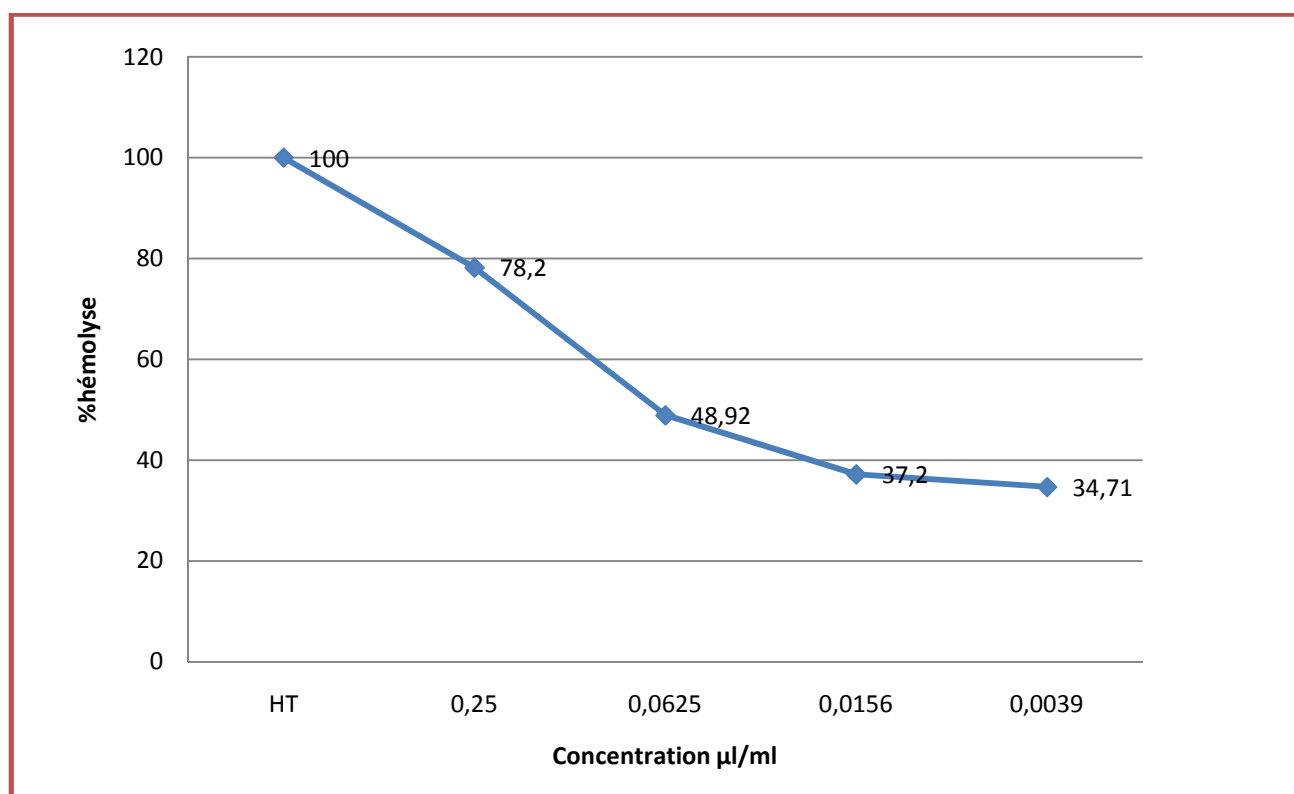


Figure 36: Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'huile de *S.aromaticum* après 60min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale

Les résultats obtenus montrent que lorsque en diminuer les concentrations de huile le pourcentage hémolyse diminue.

D'après la figure 36, la concentration de 0,0039µl/mL d'HE de *S. aromaticum* a enregistré le plus faible taux d'hémolyse de contact frôlant les 34,71% suivi par le taux de 0,0156µg/mL en atteignant 37,2%.

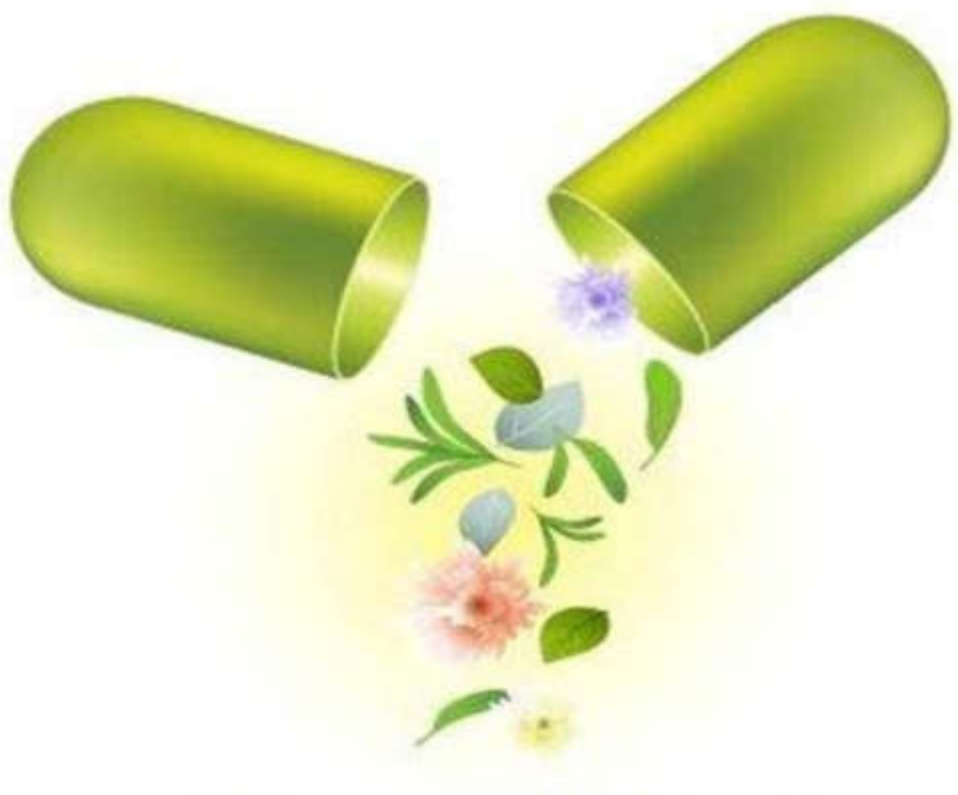
La concentration de 0,25µl/mL a donné une importante hémolyse en frôlant 78,2% après 60 min de contact.

Les tests de la toxicité permettent d'évaluer les risques liés à l'exposition à une substance chimique particulière, et l'obtention des informations sur les caractéristiques de cette substance (Li & Liu, 2008).

D'après les résultats présentés dans la figure 36, nous avons noté des taux d'hémolyses très bas d'ordre de 34,71%, 37,2% et 48,92%, par rapport à l'hémolyse total pour les concentrations 0,0039 ; 0,0156 et 0,0625 µl/ml, respectivement. Ce taux est moyennement élevé (d'ordre de 78,2%) à une concentration de 0,25µl/ml d'huile étudié, par rapport au témoin positif (hémolyse totale).

Sur la base de ces résultats, l'étude peut extrapoler les valeurs d'hémolyse et estimer la IC50 de 3,56 µl / ml pour l'huile essentielle.

Selon Dob et al (2006), la caractéristique principale de l'huile essentielle de girofle est sa grande richesse en composants terpéniques tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes. Ces constituants sont reconnus pour leur effet hémolytique lorsqu'ils sont présents à forte concentration, en induisant une lyse cellulaire par l'augmentation de la fluidité de la membrane. De plus, les composés terpéniques pourraient déclencher divers mécanismes, y compris les interactions avec la membrane cellulaire, qui surviennent lors de l'hémolyse induite par les terpènes.(Mendanha, Moura, Anjos, Valadares, & Alonso, 2013).



Conclusion

Conclusion :

Les plantes médicinales resteront toujours une source fiable de principes actifs d'intérêt thérapeutique. Face à la phobie des molécules de synthèse chimique, leur utilisation est en progression constante.

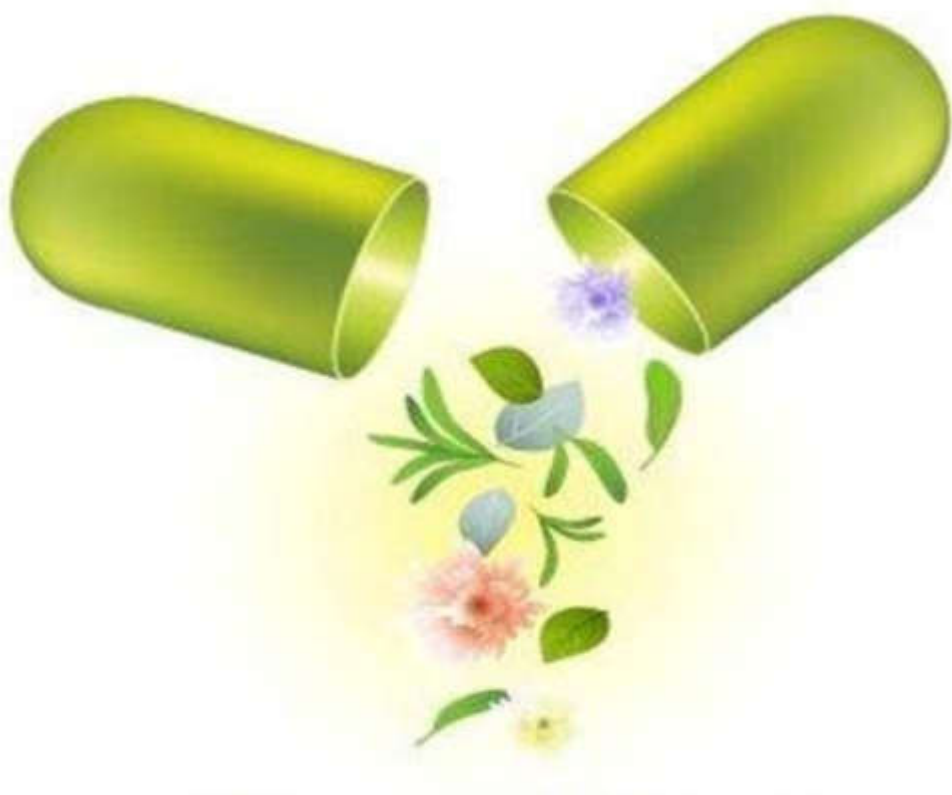
Les plantes médicinales malgré leurs effets thérapeutiques doivent être utilisées avec la plus grande prudence car elles peuvent avoir un risque de toxicité [Fouché et al, 2000].

Dans un premier volet de ce travail, nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle et à la détermination du rendement de la plante. Nous avons noté un bon rendement d'HE de la plante étudiée.

Dans un deuxième volet, nous avons étudié l'activité antibactérienne in vitro des huiles essentielles de clous de girofle (*Syzygium aromaticum*) et de l'effet de la température sur l'activité antibactérienne.

Dans un troisième volet, nous avons étudié les propriétés biologiques des huiles essentielles réalisées sur les érythrocytes. L'activité hémolytique des HE a démontré un grand effet sur les érythrocytes de l'huile essentielle d'*S. aromaticum* avec un taux d'hémolyse de (78,2%).

L'ensemble de ces propriétés biologiques démontrées expérimentalement confèrent aux HE des espèces végétales étudiées un statut de médicament naturel dénué de toute suspicion et des bénéfices santé qu'elles peuvent nous procurer. En perspective, il serait fort intéressant de compléter cette étude in vitro par une expérience In vivo, à même capable de vérifier les propriétés biologiques de cette huile essentielle et de s'en assurer de l'innocuité totale chez un modèle animal de choix. Il serait, également, très instructif d'explorer l'effet isolé et synergique des différents constituants des HE de ces espèces.



Références bibliographique

Les références bibliographiques :

Abdullah, B. H., Hatem, S. F., & Jumaa, W. (2015). A comparative study of the antibacterial activity of clove and rosemary essential oils on multidrug resistant bacteria. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3(1), 18-22.

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

Alma, M. H., Ertas, M., Nitz, S., & Kollmannsberger, H. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources*, 2(2), 265-269.

Aneja, K. R., & Joshi, R. (2010). Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* and its bud oil against dental cares causing microorganisms. *Ethnobotanical Leaflets*, 14, 960-975.

Aouadhi, S. (2010). Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. *Mém. Mas. en toxicologie. Faculté de médecine de Tunisie*.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

Bao, L. M., Nozaki, A., Takahashi, E., Okamoto, K., Ito, H., & Hatano, T. (2012). Hydrolysable tannins isolated from *syzygium aromaticum*: Structure of a new C-glucosidic ellagitannin and spectral features of tannins with a tergalloyl group. *Heterocycles*, 85(2), 365-381.

Barakat, H. (2014). Composition, antioxidant, antibacterial activities and mode of action of clove (*Syzygium aromaticum* L.) buds essential oil. *British Journal of Applied Science & Technology*, 4(13), 1934.

Baudry, C., & Brézellec, H. (2006). *Microbiologie, immunologie*: Wolters Kluwer France.

Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6(3), 153-159.

Bhowmik, D., Kumar, K. S., Yadav, A., Srivastava, S., Paswan, S., & Dutta, A. S. (2012). Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(1), 13-23.

Biyiti, L., Meko'o, D., Tamze, V., & Amvam Zollo, P. (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr*, 13, 11-20.

Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., . . . Jehl, F. (2017). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie *Recommandations*.

Bouhdid, S., Abrini, J., Baudoux, D., Manresa, A., & Zhiri, A. (2012). Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan: pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. *Journal de Pharmacie Clinique*, 31(3), 141-148.

Boukhobza, F., & Goetz, P. (2014). *Phytothérapie en odontologie-Editions CdP*: Initiatives Santé.

Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., . . . Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.

Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., & Chaabouni, M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *J. Soc. Chim. Tunis*, 10, 119-125.

Breazeale, K. (2009). MEMOIRS OF PIERRE POIVRE: THE THAI PORT OF MERGUI IN 1745. *Journal of the Siam Society*, 97.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

Cahuzac-Picaud, M. (2012). Épices, herbes et aromates: usages culinaires et recettes. *Phytothérapie*, 10(2), 109-116.

Charles, D. J. (2013). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*: Springer Science & Business Media.

Chevalet, P., Fournel, S., Giraud, N., Gros, F., Laurenti, P., Pradère, F., & Soubaya, T. (2010). *Biologie: tout le cours en fiches: Licence, CAPES, Prépas*: Dunod.

Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(2), 90-96.

Coustes, T. (2016). *Loi d'avenir agricole, réglementation du médicament vétérinaire et lutte contre l'antibiorésistance*.

Danthu, P., Penot, E., Ranoarison, K. M., Rakotondravelo, J. C., Michel-Dounias, I., Michels, T., . . . Jahiel, M. (2014). Le giroflier à Madagascar: une «success story»... à l'avenir incertain. *Bois et forêts des tropiques*, 35.

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

De Cliff, S., & Harerimana, P. C. (2013). Extraction de l'Huile Essentielle Complète des Fleurs de *Cananga Odorata* de la Plaine de l'Imbo: Vers la Vulgarisation d'une Nouvelle Filière de Plante Industrielle au Burundi. *Revue de l'Université du Burundi-Série Sciences Exactes N° 28*, S. De Cliff et PC Harerimana (Extraction de l'huile essentielle...).

De, M., Krishna De, A., & Banerjee, A. (1999). Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytotherapy research*, 13(7), 616-618.

Descamps-Marie, C. (2008). *visa pour le PCEMI:biologie*. Paris: Dunod

El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., & Alaoui, T. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied biosciences*, 82(1), 7481-7492.

Fontanay, S., & Mougenot, M.-E. (2015). Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *HEGEL [ISSN 2269-0530]*, 2015, 02.

François, E. (1936). Giroflier et Girofle. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 16(180), 589-608.

Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy research*, 21(10), 989-994.

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898-904.

Ghedira, K., Goetz, P., & Le Jeune, R. (2010). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie*, 8(1), 37-43.

Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*: Springer Science & Business Media.

Guinoiseau, E. (2010). *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action*. Université de Corse.

Gupta, D., & Kaur, P. (2015). Study of Essential Oil of Few Species with High Antioxidant Potential. 5(3), 216-224.

Gupta, M., Singh, D., Gularia, P., & Gupta, S. (2015). GCMS analysis and identifications of chemical constituents of *Syzygium aromaticum*, *Brassica campestris* and cow ghee. *J. Chem. Pharm. Res*, 7(1), 568-572.

Hamadou, F., & Touki, S. (2017). *Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices: Girofle, Poivre Noir*.

Hart, T., & Shears, P. (1997). *Atlas de poche microbiologie*: Flammarion.

Hernandez Ochoa, L. R. (2005). *Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné «solvant/actif» d'origine végétale*. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Hogan, D., & Kolter, R. (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current opinion in microbiology*, 5(5), 472-477.

Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6303-6307.

Johnson, G. B., Raven, P. H., Losos, J. B., Bouharmont, J., & Singer, S. R. (2011). *Biologie-Version luxe*: De Boeck Supérieur.

Joseph, B., & Sujatha, S. (2011). Bioactive compounds and its autochthonous microbial activities of extract and clove oil (*Syzygium aromaticum* L.) on some food borne pathogens. *Asian Journal of Biological Sciences*, 4(1), 35-43.

Kalembe, D., Matla, M., & Smętek, A. (2012). Antimicrobial activities of essential oils *Dietary Phytochemicals and Microbes* (pp. 157-183): Springer.

Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M.-F. (2008). Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160-164.

Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2013). *La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*: Springer Science & Business Media.

Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981.

Kapadiya, S., & Desai, M. A. (2017). Isolation of essential oil from buds of *Syzygium aromaticum* using hydrodistillation: multi-response optimization and predictive modelling. *Int. J. Adv. Res. Sci Eng.*, 6, 405-418.

Karkosh, A. (2012). Study of in vitro antibacterial activity of the essential oils of Cloves (*Syzygium aromaticum*) and the effect of temperature on antibacterial activity. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 4, 15-19.

Khebichat, A. (2014). *Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des cendres de bois du chêne vert «Kourriche ou Ballout»(Quercus ilex)*.

Kim, H. M., Lee, E. H., Hong, S. H., Song, H. J., Shin, M. K., Kim, S. H., & Shin, T. Y. (1998). Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 60(2), 125-131.

Kubitzki, K. (2011). *Flowering Plants. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae* (Vol. 10): Springer Science & Business Media.

Kuete, V. (2017). Chapter 29 - *Syzygium aromaticum Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 611-625): Academic Press.

Kumar, P., Jaiswal, P., Singh, V. K., Singh, D. K., & Singh, D. (2011). Medical, therapeutic and pharmacological effects of *Syzygium aromaticum* (LAU G).

Kumar, Y., Agarwal, S., Srivastava, A., Kumar, S., Agarwal, G., & Khan, M. Z. A. (2014). Antibacterial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) and garlic (*Allium sativum*) on different pathogenic bacteria. *Int. J. Pure App. Biosci*, 2(3), 305-311.

Lagunez Rivera, L. (2006). *Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe.*

Lardry, J.-M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.

Li, G.-X., & Liu, Z.-Q. (2008). The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and chemical toxicology*, 46(3), 886-892.

Lim, T. K. (2014). *Syzygium aromaticum Edible Medicinal and Non Medicinal Plants* (pp. 460-482): Springer.

Lowy, F. D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *New England journal of medicine*, 339(8), 520-532.

Lucchesi, M.-E. (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles.* Université de la Réunion.

Mahmoodzadeh, A., Zarrinnahad, H., Bagheri, K. P., Moradia, A., & Shahbazzadeh, D. (2015). First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 78(10), 574-583.

Marya, C. M., Satija, G., Nagpal, R., Kapoor, R., & Ahmad, A. (2012). In vitro inhibitory effect of clove essential oil and its two active principles on tooth decalcification by apple juice. *International journal of dentistry*, 2012.

Marzouki, H., Elaissi, A., Khaldi, A., Bouzid, S., Falconieri, D., Marongiu, B., . . . Porcedda, S. (2009). Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *Open Natural Products Journal*, 2, 86-91.

Mazerolles, C. (2008). giroflier.

Mendanha, S. A., Moura, S. S., Anjos, J. L., Valadares, M. C., & Alonso, A. (2013). Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 323-329.

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

Mittal, M., Gupta, N., Parashar, P., Mehra, V., & Khatri, M. (2014). Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: a comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(8), 67-72.

Mohammed, N. H., Ahmed, M. H., & Hussien, M. O. (2015). Qualitative analysis of the essential oil of *syzygium aromaticum* (l.) (clove) using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *5*(2), 350-354.

Mouas, Y., Benrebiha, F. Z., & Chaouia, C. (2017). Évaluation de l'activité antibacterienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *rosmarinus officinalis* L., *7*(1), 363-370.

Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, *31*(4), 247-256.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, *67*(4), 593-656.

Olle, M., Bender, I., & Koppe, R. (2010). The content of oils in umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, *8*(3), 687-696.

Oshomoh, E. O., Idu, M., & Udinyiwe, O. C. (2015). Phytochemical Screening and Antimicrobial Sensitivity of Clove Flower (*Syzygium aromaticum*, L. Merrill and Perry) Bud on Dental Pathogens.

Pandey, A., & Singh, P. (2011). Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian journal of plant science and research*, *1*(2), 69-80.

Pibiri, M.-C. (2006). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*.

Ponce, A., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.

Rana, I. S., Rana, A. S., & Rajak, R. C. (2011). Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian journal of microbiology*, 42(4), 1269-1277.

Ranoarisoa, K. M. (2012). Evolution historique et Etat des lieux de la filière girofle à Madagascar.

Razafimamonjison, G., Jahiel, M., Duclos, T., Ramanoelina, P., Fawbush, F., & Danthu, P. (2014). Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3), 224.

Rodrigues, K. A. d. F., Amorim, L. V., Oliveira, J. M. G. d., Dias, C. N., Moraes, D. F. C., Andrade, E. H. d. A., . . . Carvalho, F. A. d. A. (2013). *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-Leishmania agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Russell, A. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: Food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(3), 191-201.

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

Saikumari, D., Rani, S. S., & Saxena, N. (2016). Antibacterial Activity of *Syzygium aromaticum* L.(Clove). 5(11), 484-489.

Sayes, C. M., Reed, K. L., & Warheit, D. B. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicological sciences*, 97(1), 163-180.

Sharma, P., & Baranwal, M. G. (2014). *Effect of Syzygium aromaticum on the growth of cancer cells and microbes*.

Soualeh, N., & Soulimani, R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14(1), 44-57.

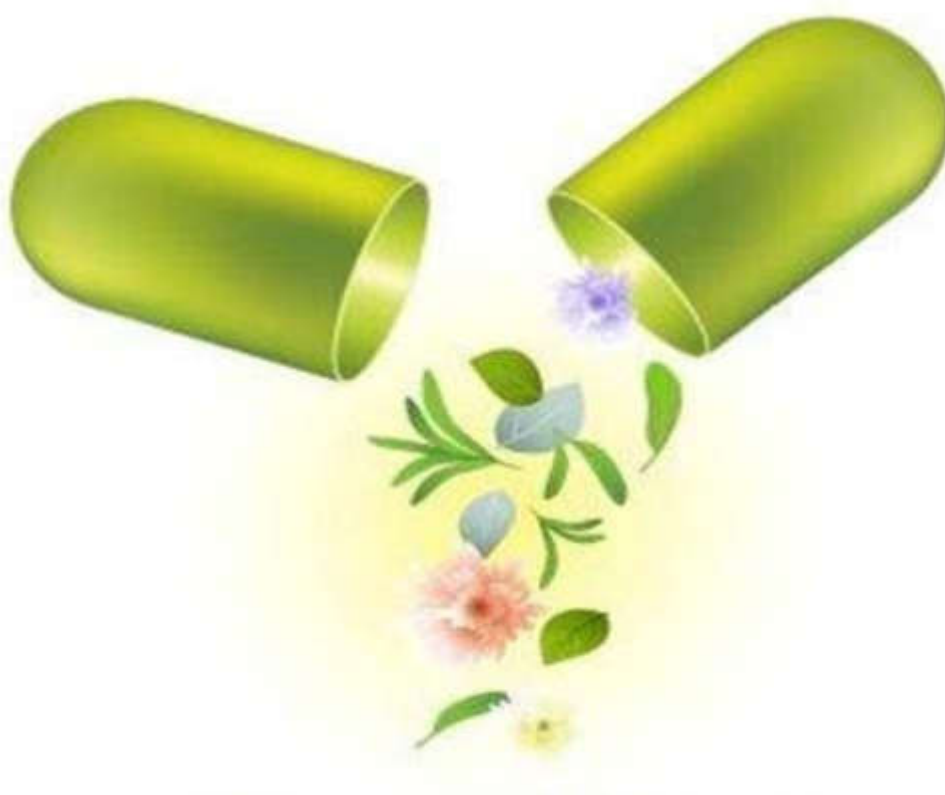
Souza, E. L. d., Stamford, T. L. M., Lima, E. d. O., Trajano, V. N., & Barbosa Filho, J. M. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(4), 549-558.

Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., & Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'Annona senegalensis Pers.(Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*, 58, 4234-4242.

Troglia, P. (2014). *150 fiches visuelles de biologie*. Paris: Dunod.

Wichtl, M., & Anton, R. (2003). Plantes thérapeutiques, . *EMInter/Tec & Doc éditions, Paris*, 119-121.

Yang, Z.-G., Sun, H.-X., & Fang, W.-H. (2005). Haemolytic activities and adjuvant effect of Astragalus membranaceus saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine*, 23(44), 5196-5203.



Annexes

Annexe 1

Constituants chimiques

Les principaux constituants de la drogue sont consignés dans le tableau suivant :

Famille de constituants	Détail des constituants
Huile essentielle 15 à 20 %	Eugénol (80 à 90 %) ; acétate d'eugénol (5 à 10 %), alpha et bêta-caryophyllène (5 à 12 %), cétones aliphatiques
Tanins (12 %)	Tanins gallique et ellagique, acide gallique, acide protocatéchique, eugéniine, casuarictine, 1,3-di- O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphénoyl-bêta-D-glucopyranose, tellimagrandine
Flavonoïdes (0,4 %)	Quercétine, kaempférol, rhamnétine, eugénitine
Chromones	Biflorine, isobiflorine, hétérosides de chromone
Corps gras	Stérols, glycosides stéroliques, huile grasse (10 %)
Autres	Acides phénols, triterpènes

Annexe 2

Pharmacologie

Les principales activités pharmacologiques du clou de girofle figurent dans le tableau suivant:

Domaine d'activité	Mode d'activité	Principes actifs
Activité antimicrobienne	Inhibition des bactéries: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	Eugénol
Activité anti-inflammatoire	Réduction par l'huile essentielle de clou de girofle de l'inflammation	Constituants phénoliques
	Inhibition de la synthèse des radicaux libres par les leucocytes Effet antioxydant	Eugénol
Effet sur les thrombocytes	Limitation de l'agrégation plaquettaire Effet anti-thrombotique	Eugénol
	Inhibition de la cyclooxygénase thrombocytaire	Eugénol Eugénol
Effet neurologique	Effet anesthésique	Eugénol et caryophyllène à forte dose
	Effet anesthésique, par inhibition de la transduction de l'influx nerveux	Eugénol et caryophyllène à faible dose
Activité vasculaire	Inhibition de la vasoconstriction induite par la noradrénaline, par l'histamine.	Eugénol
Effet sur la muqueuse digestive	Effet anti-ulcérogène	Eugénol
Réduction du tabagisme	Effet sur les symptômes du sevrage de tabac	Extrait

Annexe 3 :

Préparation du milieu de culture :

Gélose nutritif (GN)

Dissoudre 20 g de gélose nutritif dans 1 l d'eau distillée, faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète. La solution obtenue est ensuite stérilisée à 121°C dans l'autoclave pendant 15 minutes, avec un pH 7,2.

Mueller Hinton (MH)

Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton. Ce milieu permet la croissance de nombreuses bactéries.

- On pèse 38g de la poudre dans un litre d'eau distillé.
- porter à l'ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou flacons et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Au moment de l'emploi .faire fondre le milieu au bain marie bouillant et le couler en boîtes de pétri .l'épaisseur de la couche de gélose doit être de 4mm. Sécher les boîtes 30 min à 37°C



Figure 1 : Le milieu de Mueller-Hinton

Annexe 4 :

Préparation du phosphate buffered saline (PBS) :

Pour préparer une solution tampon de PBS à $\text{pH}=7,4$, on a utilisé les composés suivants avec des masses qui correspondent : Na_2HPO_4 (1,44g) ; KH_2PO_4 (0,240Mm) ; KCl (0,2g) ; NaCl (8g).

- Dans 800ml d'eau distillé on ajoute les composés mentionnés précédemment avec agitation.
- ajusté le pH à 7,4 avec HCL (préparer).
- Complété le volume par l'eau distillé jusqu'à 1l.

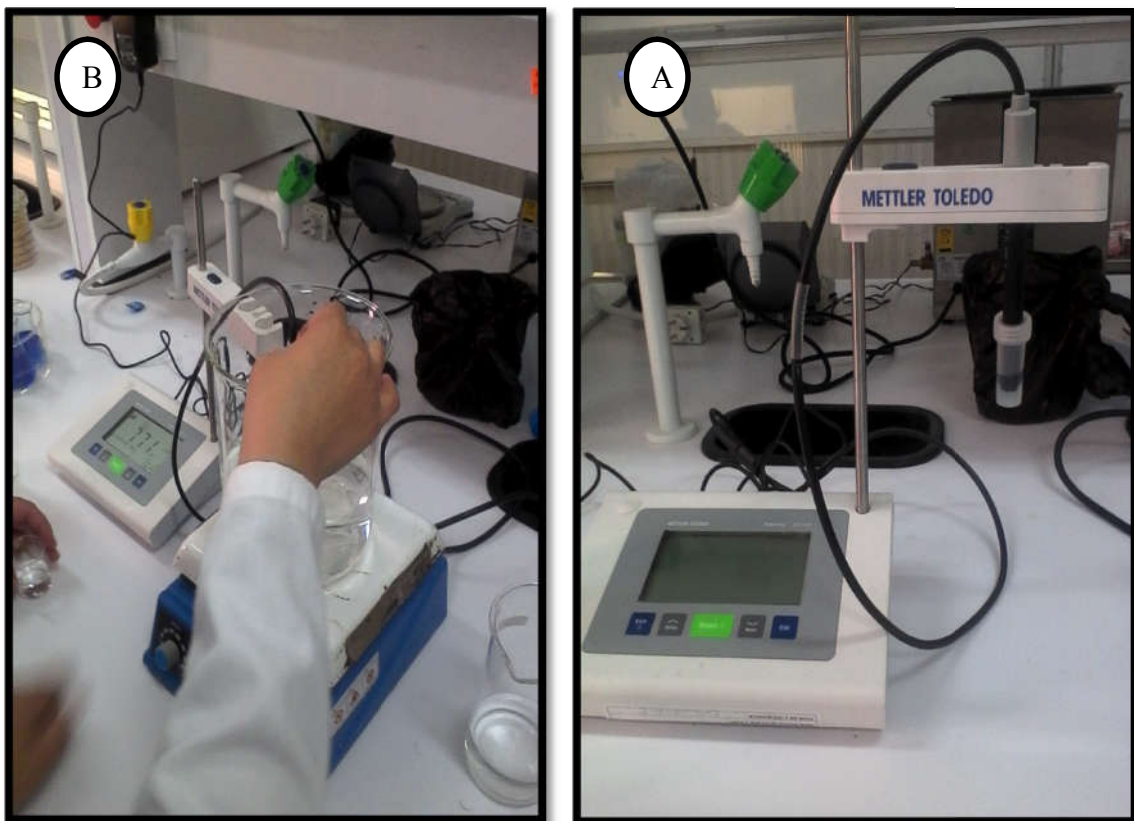


Figure 2: A) le PH mètre ; B) la lecture du PH

Résumé

La présente étude vise à déterminer l'activité antibactérienne de l'huile de girofle contre divers agents pathogènes. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile de clou de girofle contre certaines bactéries pathogènes. L'activité antibactérienne est réalisée par une technique de diffusion sur puits d'agar contre les bactéries pathogènes et la zone d'inhibition est mesurée en mm de diamètre.

L'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) a été obtenue par distillation à la vapeur en utilisant un système de type Clevenger. L'extraction de l'huile a été obtenue à partir de 50 g de fleurs séchées de plantes pendant 3 h avec 500 ml d'eau distillée. La phase aqueuse a été séparée par une ampoule à décanter par séparation simple.

Une méthode de chromatographie liquide à haute performance a été appliquée pour détecter les constituants majeurs d'huiles essentielles de girofle.

L'effet de la température sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de girofle contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Entérococcus faecalis* a été déterminé. Les huiles essentielles des clous de girofle ont montré une activité antibactérienne après traitement à 100 ° C pendant 30 min, ce qui suggère que la température élevée n'affecte pas l'activité d'HE.

Tandis que l'activité hémolytique a été évaluée sur les globules rouges d'un donneur unique et sain. Les résultats obtenus d'effet d'huiles sur des érythrocytes isolés du sang humain, incubés dans un milieu tampon PBS (pH 7,4) à 37°C), ont montré que cette plante présente un effet toxique selon la dose utilisé.

Dans la présente étude, l'huile de clou de girofle s'est avérée tout aussi efficace contre les organismes à Gram positif et à gram négatif. Ainsi, cette étude permet de conclure que l'huile de girofle possède une activité antibactérienne.

Abstract

The present study aims to determine the antibacterial activity of clove oil against various pathogens. The purpose of this study is to evaluate the antibacterial activity of clove oil against certain pathogenic bacteria. Antibacterial activity is achieved by agar well diffusion against pathogenic bacteria and the inhibition zone is measured in mm of diameter.

Clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) was obtained by steam distillation using a Clevenger type system. The extraction of the oil was obtained from 50 g of dried flowers of plants for 3 h with 500 ml of distilled water. The aqueous phase was separated by a separatory funnel by simple separation.

A High-performance liquid chromatography method has been applied to detect major constituents of clove essential oils.

The effect of temperature on the antibacterial activity of clove essential oils against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* was determined. Clove essential oils showed antibacterial activity after treatment at 100 ° C for 30 min, suggesting that the high temperature does not affect the activity of E.O.

While hemolytic activity has been evaluated on the red blood cells of a single, healthy donor. The results obtained from the effect of oils on erythrocytes isolated from human blood, incubated in PBS buffer medium (pH 7.4) at 37 ° C.), showed that this plant has a toxic effect according to the dose used.

In this study, clove oil was found to be equally effective against gram-positive and gram-negative organisms. Thus, this study concludes that clove oil has antibacterial activity.