

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**M' Bousemat Abdeallah**

**M' Benmiloud Ahmed**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : Biotechnologie et valorisation des plantes**

**THÈME**

Les effets antibactériens des différents espèces de l'huile  
essentielle du girofle  
« Eugénol et acétyl eugénol » sur les différents souches  
*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus  
aureus*

DEVANT LE JURY

|            |                          |     |               |
|------------|--------------------------|-----|---------------|
| Président  | M. Dahmouni Said         | MAA | U. Mostaganem |
| Encadreur  | Mme Bengharbi Zineb      | MCB | U. Mostaganem |
| Examineurs | M. Benabdemoumen djilali | MCA | U. Mostaganem |

Année universitaire 2020 - 2021

# REMERCIEMENTS

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

Avant tout nous remercions **ALLAH** le tout puissant de son aide et la patience pour achever ce travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur Mme« *bengherbi zineb* » son précieux de votre conseil et son aide durant toute la période du travail malgré leur charge professionnelles. Pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être menée au bon part.

« Merci pour votre confiance, votre disponibilité et vos encouragements »).

Nos remerciements s'adressent à **M.Dahmouni Saïd** qui a fait l'honneur de nous orienter judicieusement par ces précieux conseils et son aide efficace dans réalisation de ce mémoire, et d'avoir d'accepter de présider ce jury.

Nous sommes honorés de la présence de **M. Benabdelmoumene Djilali** qui par ses conseils judicieux et sa bonne humeur communicative nous a permis d'atteindre ces résultats, et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons aussi nos sincères remerciements à l'ensemble des ingénieurs du laboratoire Mme **Amir** qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience.

Enfin nous tenons à remercier toute personne ayant contribué à la réalisation de ce mémoire de prés ou de loin.

# Dédicace

Une chance m'a été offerte aujourd'hui pour parler des personnes qui sont très chères. je dédie ce modeste travail à ceux qui les plus chers :

A mes chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements par leurs énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui on ce qu'ils mon fait toujours aimé me voire à la hauteur. je le remercie pour tout celle qui ma comblé d'amour d'affection et d'encouragement et éducation.

A à ma chère grand- mère qui aurait été fière de ma réussite. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

*« Tes sourires, tes petites phrases, et Tes gestes, tes paroles, ta voix restera dans nos mémoires ».*

A mes frères : Mohamed et Ahmed 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 mon cher binôme et frère « **Ahmed** » pour les bons moments passés ensemble et à toute sa famille.

Mes fideles et très chers amis : Yagoub ismail , Regig ysaad oussama , Benamrane yacin Boucherb nadjim, Zagai mohamed , Houna adel, Bencheikh reda, Atou amir , Mohamed hamidat.

A tout mes cher (e)s collègues de la promotion de biologie SNV.

En fin à tous ceux et celles qui m'aiment.

**Abdellah**

## Dédicaces

Je dédie ce travail a ma chère mère la source de joie grâce a ton amour, tes prières, tes sacrifices et tes encouragements que je suis là. J'espère que je réalise aujourd'hui un de tes rêves. Qu'ALLAH te bénisse et t'alloue bonne santé, bonheur et longue vie afin que je puisse à mon tour te combler.

A mon frère Abderahmane. Je ne te souhaite que du succès et du bonheur. Que dieu te protège pour nous.

A ma petite sœur Sarra que dieu te protège. je te souhaite ma réussite dans ton parcours et dans ta vie.

A Assia qui ma aidé, conseillé et encouragé dans ce travail.

À mon collègue et mon binôme Abdellah pour son soutien moral, sa patience sa compréhension tout au long de ce projet.

A mes partenaires au cours de ce travail et mes amis Yacine, Reda et Nabil pour l'ambiance conviviale que nous avons vécue tout le long du travail, que dieu vous donne ce que vous souhaitez.

Enfin a tous mes amis et ma famille. À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

**Ahmed**

# Résumé

---

Le potentiel pharmacologique des huiles essentielles issues de plantes notamment du girofle (*Syzygium aromaticum L*) a été très souvent étudié en révélant l'effet antibactériens synergiques de ses deux espèces connues l'eugénol et l'acétyle eugénol. Dans ce contexte et en tenant compte du savoir médicinal des autochtones, nous avons tracé notre objectif qui est de tester séparément le potentiel antibactérien vis-à-vis (*Pseudomonas areuginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*). de chaque espèces pures et dilués. Dans cette optique, nous avons procédé à l'extraction par entraînement à la vapeur de l'huile essentielle suivi par une séparation et purification de ces deux espèces par extraction liquide-liquide qui a montré un rendement de 7% d'eugénol, et 75% d'acétyle eugénol. Leurs activités antibactériennes (l'eugénol et l'acétyle eugénol pures et dilués) ont été estimées par inhibition sur gélose MH, et ont tracé des diamètres d'inhibition variant entre 12 mm et 13 mm pour toutes les souches bactériennes cibles de notre étude. Ceci révèle un effet antibactérien par action bactéricide ou inhibitrice très intéressent.

L'eugénol et l'acétyle eugénol pures et ou dilués présentent d'excellents alternatives aux antibiotiques de synthèses pour lutter contre les infestations bactériens causées par *E. coli* et *S. aureus*, nous permettant ainsi de faire face aux problèmes d'antibiorésistance et des effets secondaires dramatiques de la consommation excessive des antibiotiques de synthèse.

**Mots clés:** *Syzygium aromaticum*, huile essentielle, activité antibactérienne, antibiorésistance

## *Abstract*

---

The pharmacological potential of essential oils from plants, especially clove (*Syzygium aromaticum* L), has been studied many times, revealing the synergistic antibacterial effect of its two known species, eugenol and acetyl eugenol. In this context and taking into account the medicinal knowledge of the natives, we traced our objective which is to test separately the antibacterial potential towards (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) of each pure and diluted species. In this perspective, we proceeded to the extraction by steam entrainment of the essential oil followed by a separation and purification of these two species by liquid-liquid extraction which showed a yield of 7% of eugenol, and 75% of acetyl eugenol. Their antibacterial activities (pure and diluted eugenol and acetyl eugenol) were estimated by inhibition on MH agar, and showed inhibition diameters ranging between 12 mm and 13 mm for all the target bacterial strains of our study. This reveals a very interesting antibacterial effect by bactericidal or inhibitory action.

Pure and or diluted eugenol and acetyl eugenol present excellent alternatives to synthetic antibiotics to fight bacterial infestations caused by *E. coli* and *S. aureus*, allowing us to face the problems of antibiotic resistance and dramatic side effects of excessive consumption of synthetic antibiotics.

**Key words:** *Syzygium aromaticum*, essential oil, antibacterial activity, antibiotic resistance

## ملخص

تمت دراسة الإمكانيات الدوائية للزيوت الأساسية التي يتم الحصول عليها من النباتات ، وخاصة القرنفل من خلال الكشف عن التأثير المضاد للبكتيريا التآزري لنوعيه المعروفين ، الأوجينول والأسيتيل الأوجينول. في هذا السياق ومع الأخذ في الاعتبار المعرفة الطبية للسكان الأصليين ، حددنا هدفنا وهو اختبار الإمكانيات المضادة للبكتيريا بشكل منفصل مقابل

(*Pseudomonas aeruginosa* , *staphylococcus aureus* , *Escherichia coli*).

لكل نوع نقي ومخفف. مع وضع هذا في الاعتبار ، شرعنا في الاستخراج عن طريق التجريد بالبخار للزيت العطري متبوعاً بفصل وتنقية هذين النوعين عن طريق الاستخلاص السائل-السائل الذي أظهر عائداً بنسبة 7% يوجينول ، و 75% أسيتيل يوجينول. تم تقدير أنشطتها المضادة للبكتيريا (الأوجينول النقي والمخفف وأسيتيل الأوجينول) عن طريق تثبيط أجار مولر هينتون ، وتراوحت أقطار التثبيط بين 12 مم و 13 مم لجميع السلالات البكتيرية المستهدفة في دراستنا. هذا يكشف عن تأثير مضاد للجراثيم من خلال عمل مثبط.

يقدم الأوجينول النقي و / أو المخفف والأسيتيل الأوجينول بدائل ممتازة للمضادات الحيوية مما يمكننا من التغلب

*S.* و *E. coli* بدائل للمضادات الحيوية الاصطناعية لمحاربة العدوى البكتيرية التي تسببها بكتيريا على مشاكل مقاومة المضادات الحيوية والآثار الجانبية الدراماتيكية للاستهلاك المفرط للمضادات *aureu* الحيوية الاصطناعية

**الكلمات المفتاحية:** ، زيت عطري ، نشاط مضاد للجراثيم ، مقاومة المضادات الحيوية

## *Liste de tableaux*

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : les principaux constituants de <i>s.aromaticum</i> . .....  | 7  |
| <b>Tableau 2</b> : principale propriétés physiques des huiles essentielles.....  | 14 |
| <b>Tableau 3</b> : Rendement en huile essentielle de girofle .....   | 38 |
| <b>Tableau 4</b> : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) démontrant la sensibilité des souches étudiées à l'amoxicilline\acide clavulanique. ....   | 40 |
| <b>Tableau 5</b> : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) démontrant la sensibilité des souches à l'ampicilline.....   | 41 |
| <b>Tableau 6</b> : Diamètres des zones d'inhibition en (mm), marquant la sensibilité des souches étudiées à l'eugénol pure. ....   | 43 |
| <b>Tableau 7</b> : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité des souches étudiées à l'acétate eugénol pure.....  | 44 |
| <b>Tableau 8</b> : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité d'E. Coli à l'eugénol pure et à acétate eugénol diluées à 50% et 75% et aux antibiotiques de références .....           | 46 |
| <b>Tableau 9</b> : Diamètres des zones d'inhibition en (mm).marquant la sensibilité de <i>Ps.aeruginosa</i> a l'eugénol pure et acétate eugénol diluées à 50% et 75% aux antibiotiques de références .....   | 47 |
| <b>Tableau 10</b> : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité de <i>S.aureus</i> à l'eugénol pure et à l'acétate eugénol diluées à 50% et 75%, aux antibiotiques de références ..... | 49 |
| <b>Tableau 11</b> : diamètres des zones d'inhibition en (mm) marqué par la sensibilité des différents souches étudié aux HEs eugénol et acétyle eugénol pure et dilué.....                                   | 50 |



## Liste des figures

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : les feuilles et fleurs du giroflier et quelques boutons. ....   | 3  |
| <b>Figure 2</b> : structure de l'arbre de giroflier. ....   | 4  |
| <b>Figure 3</b> : Exemple de monoterpène néral.....   | 15 |
| <b>Figure 4</b> : Exemple de sesquiterpène 1R,trans calamenène.....   | 12 |
| <b>Figure 5</b> : Principe de la technique d'hydrodistillation .....  | 15 |
| <b>Figure 6</b> : Montage de l'entraînement à la vapeur. ....   | 16 |
| <b>Figure 7</b> : Morphologie des bactéries.....  | 22 |
| <b>Figure 8</b> : Clou de girofle <i>Syzygium aromaticum</i> .....  | 29 |
| <b>Figure 9</b> : Dispositif d'extraction de l'huile essentielle .....  | 30 |
| <b>Figure 10</b> : lavage du distillat par un solvant a l'aide d'une ampoule à décanter .....   | 31 |
| <b>Figure 11</b> : Evaporation du solvant par l'évaporateur rotatif.....  | 32 |
| <b>Figure 12</b> : Les souches bactériennes.....  | 33 |
| <b>Figure 13</b> : Coloration de Gram observation microscopie(X 100).....   | 39 |
| <b>Figure 14</b> : Coloration de Gram observation microscopie (X 100) de <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 39 |
| <b>Figure 15</b> : sensibilité des souches étudiées à l'amoxicilline\acide clavulanique marquée par les zones d'inhibition .....  | 40 |
| <b>Figure 16</b> : sensibilité des souches à l'ampicilline marquée par des zones d'inhibitions.....   | 41 |
| <b>Figure 17</b> : sensibilité des souches étudiées à l'eugénol pure marquée par des zones d'inhibitions ....   | 43 |
| <b>Figure 18</b> : sensibilité des souches étudiées à d'Acétateeugénol pure marquée par des zones d'inhibitions .....   | 44 |
| <b>Figure 19</b> : Comparaison entre la sensibilité d'E. Coli à l'eugénol pure et à acétate eugénol diluées à 50% et 75% et aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions .....       | 45 |
| <b>Figure 20</b> : comparaison de la sensibilité de <i>Ps.aeruginosa</i> a l'eugénol pure et acétate eugénol diluées à 50% et 75% aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions.....  | 47 |
| <b>Figure 21</b> : comparaison de la sensibilité de <i>S.aureus</i> à l'eugénol pure et à l'acétate eugénol diluées à 50% et 75%, aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions ..... | 48 |
| <b>Figure 22</b> : Comparaison des effets antibactériens des différentes espèces pures et diluées de l'huile essentielle du clou de girofle à l'effet des antibiotiques de références sur les.....            | 50 |

## *Liste des abréviations*

---

**AFNOR** : Association français de normalisation

**C°** : Degrée Celsius

**DMSO** : Diméthylsufoxyde

**E. coli** : Escherichia coli

**HCV** : Virus de l'hépatite c

**HE** : Huile essentielle

**MH** : MULER HINTON

**ISO** : International standard organisation

**PS** : Pseudomonas aeruginosa

**ST** : Staphylococcus aureus

**%** : Pourcentage.

**µl** : Microlitre.

## Sommaire

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Présentation de la plante</b> .....                  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Généralités sur les plantes médicinales.....            | 1         |
| 1.2      | La plante « <i>Syzygium aromaticum</i> ».....           | 2         |
| 1.2.1    | Présentation de plante.....                             | 2         |
| 1.2.2    | Histoire de giroflier.....                              | 3         |
| 1.2.3    | Origine et aspect botanique.....                        | 3         |
| 1.2.4    | Classification de la plante.....                        | 4         |
| 1.2.5    | Culture et récolte.....                                 | 4         |
| 1.2.6    | Utilisations des produits du giroflier.....             | 5         |
| 1.2.7    | Huile essentielle du girofle.....                       | 5         |
| 1.2.8    | Les composés des H.E. ....                              | 5         |
| 1.2.9    | Propriétés de clou de girofle.....                      | 7         |
| 1.2.10   | Toxicité de girofle.....                                | 9         |
| <b>2</b> | <b>Les huiles essentielles</b> .....                    | <b>10</b> |
| 2.1      | Généralités et description des huiles essentielles..... | 10        |
| 2.2      | Localisation.....                                       | 10        |
| 2.3      | Fonction.....   | 10        |
| 2.4      | Propriétés chimiques.....                               | 11        |
| 2.5      | Composant des HE.....                                   | 11        |
| 2.5.1    | Les terpénoides.....                                    | 11        |
| 2.5.2    | Les monoterpènes.....                                   | 11        |
| 2.5.3    | Sesquiterpènes.....                                     | 12        |
| 2.5.4    | Composés aromatiques.....                               | 12        |
| 2.6      | Propriétés physiques.....                               | 12        |
| 2.7      | Méthodes d'extraction des huiles essentielles : .....   | 15        |
| 2.7.1    | Hydrodistillation : .....                               | 15        |
| 2.7.2    | Extraction par entraînement à la vapeur.....            | 16        |
| 2.7.3    | Extraction assistée par micro-ondes.....                | 16        |
| 2.7.4    | Extraction par les solvants et les graisses.....        | 17        |
| 2.7.5    | Extraction par fluides supercritique.....               | 17        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.8      | Intérêt et usage des huiles essentielles .....          | 17        |
| 2.8.1    | En agro-alimentaire .....                               | 17        |
| 2.8.2    | En parfumerie et cosmétologie .....                     | 18        |
| 2.9      | Les modes d'administration des huiles essentielles..... | 18        |
| 2.10     | Mode d'action des huiles essentielle.....               | 19        |
| 2.11     | Conservation des huiles essentielles.....               | 19        |
| 2.12     | Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....   | 19        |
| 2.13     | Toxicité des huiles essentielles .....                  | 20        |
| <b>3</b> | <b>Le monde bactérienne .....</b>                       | <b>21</b> |
| 3.1      | Généralité sur microbiologie.....                       | 21        |
| 3.2      | Bactéries .....   | 22        |
| 3.3      | Formes de résistances .....                             | 22        |
| 3.3.1    | La résistance naturelle .....                           | 22        |
| 3.3.2    | Les résistances acquises.....                           | 23        |
| 3.4      | Escherichia coli .....                                  | 23        |
| 3.4.1    | Classification.....                                     | 23        |
| 3.4.2    | Caractères biochimiques.....                            | 23        |
| 3.4.3    | Habitat.....  | 23        |
| 3.4.4    | Pouvoir pathogène .....                                 | 24        |
| 3.5      | Les Staphylococcus aureus.....                          | 24        |
| 3.5.1    | Classification.....                                     | 24        |
| 3.5.2    | Caractère biochimique.....                              | 24        |
| 3.5.3    | Habitat.....  | 25        |
| 3.5.4    | Le pouvoir pathogène .....                              | 25        |
| 3.6      | Les Pseudomonas .....                                   | 25        |
| 3.6.1    | Classification de Pseudomonas .....                     | 26        |
| 3.6.2    | Caractères biochimiques.....                            | 26        |
| 3.6.3    | Habitat.....  | 26        |
| 3.6.4    | Pouvoir pathogène .....                                 | 26        |
| <b>4</b> | <b>Matériel et méthodes .....</b>                       | <b>28</b> |
| 4.1      | Matériels.....  | 28        |
| 4.1.1    | Traitements de la matière végétale.....                 | 28        |
| 4.1.2    | Méthode l'hydrodistillation.....                        | 29        |
| 4.1.3    | Etude microbiologique :.....                            | 33        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4.2       | Méthodes .....  | 34        |
| 4.2.1     | Calcul du rendement d'huile essentielle .....   | 34        |
| 4.2.2     | Méthode de dilution : .....   | 34        |
| 4.2.3     | Identification des souches pures .....  | 34        |
| 4.2.4     | Préparation de l'inoculum.....  | 35        |
| 4.2.5     | Choix et réalisation de l'antibiogramme .....   | 36        |
|           | a-Ensemencement : .....   | 36        |
|           | b-Préparation des disques : .....   | 36        |
|           | c-Incubation .....  | 36        |
|           | d-Lecture des résultats : .....   | 36        |
| <b>5</b>  | <b>Résultats et discussions .....</b>   | <b>38</b> |
| 5.1       | Détermination du rendement d'extraction des deux composants d'intérêt de l'huile essentielle du girofle (Eugénol et acétate d'eugénol) .....                          | 38        |
| 5.2       | Identification des souches .....  | 38        |
| 5.3       | Évaluation de la sensibilité des souches bactériennes étudiées.....   | 40        |
| 5.3.1     | Vérification de la sensibilité des souches étudiées aux antibiotiques de références .....   | 40        |
| 5.3.2     | Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'eugénol et <i>acétyle eugénol</i> . 42   |           |
|           | a-Effet antibactérien de l'eugénol pure sur les souches de bactéries étudiées.....  | 43        |
|           | b-Effet antibactérien de l'Acétate eugénol pure: .....  | 44        |
|           | a-Comparaison entre les effets antibactériens des différents composants d'HE du girofle pur et diluée sur <i>E.Coli</i> et les antibiotiques de références.....       | 45        |
|           | b-Comparaison entre les effets antibactériens des différents composants d'HE étudiés purs et dilués sur <i>Ps.aureginosa</i> et les antibiotiques de références. .... | 46        |
|           | c-Comparaison des effets antibactériens des différents composants étudiés purs et dilués sur <i>S.aureus</i> et les antibiotiques de références. ....                 | 48        |
| 5.4       | Discussion générale .....   | 50        |
| 5.5       | Conclusion générale .....   | 52        |
| <b>6.</b> | <b>Référence bibliographique.....</b>   | <b>54</b> |

# **Introduction générale**

## **Introduction générale**

Certains les considèrent comme un phénomène de mode, d'autres comme une alternative de choix à la médecine conventionnelle, il n'en demeure pas moins que les huiles essentielles attirent de plus en plus d'adeptes et représentent un marché en plein essor. Ces substances utilisées depuis la nuit des temps et à travers le monde. Cependant leur emploi doit être l'objet de rigoureuses précautions, d'autant plus que la plupart d'entre elles sont disponibles en vente libre. La demande de conseils relatifs à des infections est courante au comptoir. Bien souvent, l'équipe officinale se voit limitée à conseiller un traitement à visée uniquement symptomatique ou des médicaments anti-infectieux disponibles sans ordonnance parfois peu efficaces. Les huiles essentielles, dont certaines se voient attribuer des propriétés anti-infectieuses pourraient alors être un moyen de pallier ce problème. Par extension, il semble possible d'envisager également l'existence d'autres bénéfices à leur emploi notamment dans les domaines de la prévention des infections, de la prise en charge des symptômes associés, voire même dans la lutte contre l'antibiorésistance. C'est pourquoi, il semble intéressant de tenter de déterminer quels peuvent être les intérêts des huiles essentielles, en particulier à l'officine, lors de pathologies infectieuses. Pour cela, il conviendra d'évaluer leur efficacité et le cas échéant déterminer les rôles qu'elles peuvent jouer dans les infections. La première partie de cette thèse consistera en un rappel théorique sur la plante, les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction, ainsi qu'un rappel en microbiologie et agents infectieux et le développement de leurs processus infectieux. Dans un second temps, nous partirons à la découverte de l'aromathérapie par la description de généralités sur les essences et huiles essentielles, leurs modes d'utilisation et par l'étude de leurs mécanismes d'action notamment à travers les notions de ternaire aromatique et de terrain illustrées par l'exemple des travaux de bioélectronique de Louis Claude Vincent. Enfin, pour revenir au cœur du sujet nous mettrons l'accent sur le domaine spécifique de l'aromathérapie en infectiologie. Pour cela, nous étudierons son potentiel anti-infectieux en décrivant les méthodes utilisées pour l'évaluer, les mécanismes mis en œuvre par les huiles essentielles pour agir, les principales molécules supposées être responsables de cette action. Pour terminer, nous tenterons d'apporter une aide à l'exercice de l'aromathérapie à l'officine par la proposition de formules aromatiques utiles à quelques pathologies infectieuses courantes et par l'élaboration de fiches destinées à faciliter l'usage par l'équipe officinale d'une sélection d'huiles essentielles pouvant être conseillées en cas d'infection.

# **CHAPITRE I**

## **Présentation de la plant**



# **1 Présentation de la plante**

## **1.1 Généralités sur les plantes médicinales**

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des valeurs thérapeutiques. Récemment l'acceptation de la médecine traditionnelle aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (**Nostro et al., 2009**) et en raison d'une prise de conscience des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes naturels sans effets secondaires par la santé humaine (**Schechter, 1998**).

Depuis toujours les plantes ont constituées la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bienfaisantes des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des relations sociales, notamment à partir du néolithique (8000 ans). Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes qu'à travers une démarche progressive, facilitée par l'organisation des relations sociales, notamment à partir du Néolithique (il y a 8000 ans). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au fil du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de trouver la plante qui soigne et enfin de la maladie (**Fouché et al., 2000**).

Dans de la civilisation chinoise, indienne (médecine ayurvédique) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisation médicinale très ancienne. Le premier livre de matière médicinale, le *Shen Ben Cae jing* (Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung), fut rédigé vers 2900 ans avant J-C. Les populations babéliennes et sumériennes utilisant les plantes pour soigner: 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrit par les Egyptiens (**Fouché et al., 2000**). Le soin de la peau a commencé 3000 ans avant la naissance du Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (**Dweek, 2002**).

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne). Tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7 et 9 siècles). Les arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie:

Abou Bakr al-Razi ou Razès (865-925), fut l'un des grandsmédecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit le « canon de la médecine ». Ce livre sera de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn Baytar (1197-1248) rédigea le très complet *sommes des simples*: ce livre contenait 1400 préparations (**Fouché et al., 2000**).

Une plante aromatique est une plante dont utilise une partie (les feuilles en général) que l'on ajoute aux aliments afin dans les parfumer, les aromatiser telque (le laurier, le thym, la menthe (**Polse & Simon, 2001**). Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité dans la médecine traditionnelle et dans la préservation des aliments. Toute fois leur prescription par voie oral, guidée par des examens bactériologiques est relativement récente (**Belaiche, 1979**). Selon Clément(1981) les plantes sont utilisées pour l'arôme qu'elle dégage, grâce à la présence d'aromate dans ses tissus. Parmi les plantes aromatiques, les épices et les herbes aromatiques qui sont constituées par des parties de plantes apportant une odeur et saveur destinées à améliorer un bien-être lors de leur émanation (**Teusher et al., 2004**).

## **1.2 La plante « Syzygium aromaticum »**

### **1.2.1 Présentation de plante**

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 12eme 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 (**Krishna & Banerjee, 1999**).*Syzygium aromaticum* est une épice utilisé depuis longtemps par les guérisseurs traditionnels ayurvédiques de l'Inde (**Saeed & Tariq, 2008**) pour soigner les affections respiratoires et digestives (**Aggarwal & Shishodia, 2006**).



**Figure 1** : les feuilles et fleurs du giroflier et quelques boutons (Bruneton, 1999).

### 1.2.2 Histoire de giroflier

Le girofle est une épice connue depuis des lustres. Il est d'abord enregistré à la période des Han chinois (220 ans 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 (Kumar *et al.*, 2011). Autour du 16eme siècle, les Portugais ont brisé l'arabe monopole du commerce des épices en mer (François, 1936). Au début du 17eme siècle, la direction hollandaise enlève des girofliers de toutes les îles sauf Amboina anterne, afin d'en augmenter le prix (Charles, 2013). Jusqu'au 18eme siècle où le contrôle sur la production était encore plus drastique pour maintenir artificiellement les prix (Razafimamonjison *et al.*, 2014). La Compagnie Française des Indes missionna-t-elle Pierre Poivre pour aller chercher ce fameux clou de girofle. Lors d'un premier voyage, il transporta clandestinement quelques plants de muscadier de Timor à l'île de France, sans résultat (Ranoarisoa, 2012). En 1773, il réussit à obtenir quelques plants des épices séquestrées par les hollandais qui furent plantés dans l'île de La Réunion (Mazerolles, 2008).

### 1.2.3 Origine et aspect botanique

Le giroflier est originaire d'Indonésie (l'île Moluques) et il est aujourd'hui cultivé à Madagascar, Caraïbes et en Amérique Sud. C'est un arbre à feuillage persistant pouvant atteindre 12 à 15 cm. le clou de giroflier (*Eugenia caryophyllus* ou *Syzygium aromaticum*) s'obtient en récoltant les boutons floraux avant leur épanouissement (figure2). La corolle dont les pétales sont repliés au sommet du clou de girofle s'appelle « tête de clou » (Kim *et al.*, 1998 ; Ghedira *et al.*, 2010).



**Figure 2** : structure de l'arbre de giroflier (Wichtl & Anton, 2003).

### **1.2.4 Classification de la plante (Goetz et al., 2010).**

**Règne** : Plantae

**Embranchement** : Magnoliophyta (Phanérogames)

**Sous-embranchement** : Magnoliophytina (-Angiospermes).

**Classe** : Magnoliopsida (=Dicotyledones)

**Sous\_classe** : Rosidae

**Ordre** : Myrtales

**Famille** : Myrtaceae

**Genre** : Syzigium

**Espèce** : S.aromaticum(L)

#### **1.2.4.1 Noms vernaculaire (Goetz et al., 2010) .**

**Nom Commun** : Giroflier,Laung

**Nom Français** : Clou de girofle ; ouarabe au clou

**Nom Anglais** : Clove,buds.

**Nom Arabe** : Kourounfoul

### **1.2.5 Culture et récolte**

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

simultanée (les branches basses fleurissent plus tôt que les branches hautes), il faut procéder à plusieurs passages pour un même arbre **(Bois, 1999)**.

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

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

### **1.2.6 Utilisations des produits du giroflier**

Le *Syzygium aromaticum* est un anesthésique local, notamment pour les douleurs dentaires. Il soulage les douleurs musculaires, les rhumatismes et possède des propriétés anti-inflammatoires, Il redonne de l'énergie et aide à lutter contre la fatigue. Il est également un antidépresseur.

Le clou de girofle est connu dans les écrits ayurvédiques, où il est utilisé contre la douleur, la sciatique, les problèmes rhumatologiques, comme antibactérien et antifongique et anesthésique local dans le soin des plaies et des odontalgies. **(Barbelet, 2015)**.

### **1.2.7 Huile essentielle du girofle**

Elle est extraite des clous du giroflier, c'est à dire des inflorescences à l'état de bouton, par distillation à la vapeur d'eau. Les clous renferment à l'état frais environ 15 à 20% d'huile essentielle (HE), dont 78 à 98% d'eugénol. Selon la pharmacopée européenne, l'HE de clous de girofle est un liquide jaune, limpide, virant au brun lorsqu'il est exposé à l'air. En ce qui concerne la composition, la Pharmacopée définit des intervalles de quantité recommandée pour chaque constituant **(Maisonneuve, 2004)**: 75,0 et 88,0 % pour l'eugénol, 5,0 et 14,0 % pour le  $\beta$ -caryophyllène et 4,0 à 15,0 % pour l'acétyleugénol (acétate d'eugényle).

### **1.2.8 Les composés des H.E.**

La plante élabore des molécules spécifiques (métabolites primaires et métabolites secondaires)(Tableau 1). Il existe deux voies principales de biosynthèse :

- la voie des terpènes
- la voie des phénylpropanes**(Staub & Bayer,2013)**.

### **1.2.8.1 Les Terpènes**

Les terpènes sont des molécules très courantes dans le règne végétal et animal. Ces sont de grosses molécules, et lors de la distillation, elles sont trop lourdes pour être emportées dans le dans le distillat. Ils ne sont donc pas quantitativement majoritaires dans les huiles essentielles (**Couderc, 2001**).

### **1.2.8.2 Les sesquiterpènes**

Les sesquiterpènes Ce sont les terpènes formés en  $C_{15}H_{24}$ , sesqui- se référant à un rapport de 1,5, un monoterpène étant en  $C_{10}H_{16}$ , et un diterpène en  $C_{20}H_{32}$ . Le suffixe -ène signifie que ces molécules possèdent des doubles liaisons de carbone. 61 Les sesquiterpènes sont des molécules calmantes et anti-inflammatoires (**Mailhebiau, 1989**).

En effet, leur action stabilisatrice sur la membrane des cellules basophiles, permet de réguler la libération d’histamine, diminuant ainsi les manifestations inflammatoires (démangeaisons, irritations) (**Werner et al., 2008**).

Le  $\beta$ -caryophyllène constitue un exemple de sesquiterpène présente dans l’HE de giroflier (5 à 14%).

### **1.2.8.3 Les Phénylpropanoïdes**

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

L’eugénol appartient aux phénylpropanoïdes (molécules dérivées du phénylpropane), mais il est rattaché au groupe des phénols monoterpéniques car ses propriétés s’en rapprochent. Par ailleurs l’eugénol peut être obtenu par le biais des deux voies de synthèse (**Werner et al., 2008**).

Il s’agit de composés fortement anti-infectieux (bactéricides, virucides et parasitocides), ils sont également immunostimulants. Il faut les employer avec précaution du fait de leur caractère irritant pour les muqueuses, et hépatotoxique à fortes doses et doses répétées. Ils seront toujours dilués dans une huile végétale avant d’être appliqués sur la peau (**Mailhebiau et al., 1992**).

### 1.2.8.4 Les esters aromatiques

Un ester est le produit de la combinaison chimique d'un alcool aromatique et d'un acide. L'ester d'une huile essentielle proviendra en général de l'alcool qu'elle contient. Dans le cas de l'H.E. de clou de girofle, l'ester est l'acétate d'eugénol, issu de l'eugénol (**Mailhebiau, 1989**).

**Tableau 1** : les principaux constituants de s.aromaticum (**Goetz et al., 2010**).

| Famille de constituants   | Détail des constituants  |
|---------------------------|--|
| <b>Huile essentielle</b>  | -Eugénol (80 à 90%)<br>-Acétate d'Eugénol (5 à 10%), alpha et<br>-béta caryophyllène (5 à 12 %), cétones<br>Aliphatiques   |
| <b>Tanins (12%)</b>       | -Tanins galique et ellagique, acide<br>gallique, acide protacatéchique,<br>eugénime, casuarictine, 1,3-di-O-<br>galloyl-4,6-(S)<br><br>-hexahydroxydiphényl-béta-D<br>glucopyranose, tellimagrandine |
| <b>Flavinoïdes (0,4%)</b> | -Quercétine, kaempferol, rhamnétine,<br>eugénitine   |
| <b>Chromones</b>          | -Biflorine, isobiflorine, hétérosides<br>de Chromone   |
| <b>Corps gras</b>         | -Stérols, glycosides stéroliques,<br>huile<br>grasse (10%)   |
| <b>Autres</b>             | -Acides phénols, triterpènes   |

## 1.2.9 Propriétés de clou de girofle

### 1.2.9.1 Activité antibactérienne

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

**1.2.9.2 Activité antifongique**

L'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes, comme le *Candida albicans*, le *Cryptococcus neoformans* ou *Aspergillus fumigatus*. Elle a été particulièrement efficace sur un modèle expérimental de vaginite murine sur un modèle animal. (Goetz *et al.*, 2012).

**1.2.9.3 Activité antivirale**

L'huile essentielle de *S. aromaticum* a un effet inhibiteur sur : herpès simplex virus, elle exerce aussi des effets sur les virus plusieurs niveaux : sur la fusion des cellules virales, anti HCV protéase dans le traitement de l'hépatite virale, inhibition de la synthèse de l'ADN viral. (Goetz *et al.*, 2012).

**1.2.9.4 .2.9.4. Activité anti inflammatoire**

Cette l'huile provoque une réduction de l'inflammation (induite par injection de carragénine au niveau de la patte du rat), inhibition des prostaglandines, leucotriène, du chimiotactisme des leucocytes ainsi une inhibition de la synthèse des radicaux libres par les leucocytes (Goetz *et al.*, 2012).

**1.2.9.5 Anti cancérigène**

L'huile essentielle de clou de girofle a été étudiée comme un agent potentiel anti cancérigène. (Zheng *et al.*, 1992).

**1.2.9.6 Anesthésiant et cautérisant pulpaire**

Le clou de girofle est utilisé beaucoup en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique local (Kozam, 1977) et pour ses propriétés analgésiques (Pauli, 2006).

**1.2.9.7 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 et al., 2014**) .elle a une activité analgésique ,avec des propriétés antibactérienne (**Mittal et al., 2014**) .

### **1.2.9.8 Propriétés pharmacologiques**

L'eugénol présente également des effets inhibiteurs sur la biosynthèse de la thromboxane et d'autres propriétés de neuroprotection (**Wie et al., 1997**).des effets antilischémiques .antihistaminiques et antil anaphylactiques (**Wie et al., 1997**).

### **1.2.10 Toxicité de girofle**

Une utilisation excessive des clous de girofle peut devenir toxique. De grandes quantités doivent être évitées pendant la grossesse. Les clous de girofle peuvent être irritants pour le tractus gastro-intestinal et devraient être évités chez les personnes souffrant d'ulcères gastriques ou du syndrome du côlon irritable.

Syndrome du côlon irritable. En cas de surdosage, les clous de girofle peuvent provoquer des nausées, des vomissements diarrhée et des saignements digestifs sévères.

Une surconsommation peut entraîner une insuffisance rénale, des modifications de la fonction hépatique, une dyspnée, et dyspnée, une perte de conscience et même la mort. L'huile de girofle, riche en eugénol, peut irriter la peau et les muqueuses. En usage externe, elle est potentiellement dermo-caustique. En usage interne, elle est un toxique neurologique à très haute dose.

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

Son utilisation dépend de la dose ; on mentionne 100g de clous de girofle en une seule fois toxique (**Aouadhi, 2010**).

**Chapitre II**  
**LES HUILES ESSENTIELLES**

## 2 Les huiles essentielles

### 2.1 Généralités et description des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides que l'on trouve naturellement dans diverses parties des plantes. Elles sont très concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la dégradation sous l'effet de la chaleur. Actuellement, leur usage en parfumerie et en alimentation est considérable, c'est pourquoi certains organismes de normalisation, AFNOR et ISO, ont défini de manière beaucoup plus précise les huiles essentielles. Une huile essentielle est un extrait obtenu par hydrodistillation. L'huile essentielle est isolée de la phase aqueuse par des traitements physiques. Cette définition permet de réserver d'une part les produits odorants d'origine animale, et d'autre part les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction (**Hammoudi, 2008**).

### 2.2 Localisation

On trouve les huiles essentielles au niveau du cytoplasme de certaines cellules végétales. Ces cellules sécrétrices peuvent se trouver dans tous les organes de la plante, tels que les poils sécréteurs ou les cellules à essences (**Salle, 1991**).

Dans le cas le plus simple, les huiles volatiles se forment dans le cytosol des cellules, soit elles se rassemblent en gouttelettes comme la plus part des substances lipophiles, soit elles s'accumulent dans les tissus épidermique (**Richter, 1993**).

### 2.3 Fonction

Les huiles essentielles émises par les plantes sous forme de vapeur ont des fonctions multiples dans la nature (**El Abed & Kambouche, 2003**).

Il est établi que les essences sont des déchets du métabolisme cellulaire et n'ont aucune influence sur les phénomènes d'assimilation. Elles sont cependant utiles pour la plante contre certains ennemis (**Kaabache, 1998**).

Elles constituent un moyen de défense contre les prédateurs (micro-organisme, champignons, insectes herbivores), de même qu'elles inhibent la croissance et la germination (**Belaiche, 1979; Bruneton, 1990**).

L'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques a été rattaché à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes exposées à des climats désertiques (**Belaiche, 1979**).

## 2.4 Propriétés chimiques

Ce sont des mélanges complexes et variables de composants qui relèvent presque exclusivement de deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquent d'autre part. Le poids moléculaire des composés est assez faible, généralement compris entre 150 et 200 (**Couderc, 2001**).

## 2.5 Composant des HE

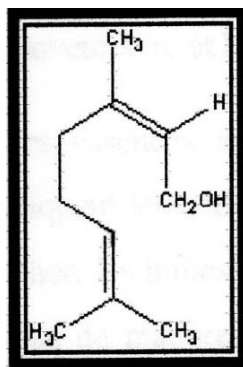
Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles de faible masse moléculaire. Il en est de même pour huiles essentielles lorsqu'ils sont entraînés par la vapeur d'eau. Des chaînes linéaires elles portent différentes fonctions (**Chakou B, 2007**).

### 2.5.1 Les terpénoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, les terpénoïdes les plus volatiles (masse moléculaire la moins élevée : monoterpènes et sesquiterpènes) sont les plus concernés. Porteurs de fonctions dont le degré d'oxydation est variable, ils donnent naissance à des milliers de substances différentes (**Couderc, 2001**).

### 2.5.2 Les monoterpènes

Les carbures sont généralement très nombreux. Ils sont acycliques, monocycliques ou bicycliques (figure 3). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (térébenthine) (**Couderc, 2001**).



**Figure 3** : Exemple de monoterpène néral

### 2.5.3 Sesquiterpènes

$C_{15}H_{24}$  soit une fois et demi (sesqui) la molécule des terpènes (figure4). Elles peuvent être également acycliques, monoacycliques et bicycliques (**Belaiche, 1979**). Elles constituent le plus souvent un mélange de carbures: alcools, cétones, à côté des aldéhydes et des esters (**Bruneton, 1993**).

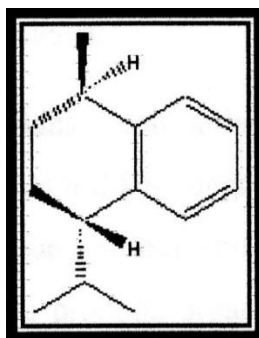


Figure 4 : Exemple de sesquiterpène 1R, trans calamenéne

### 2.5.4 Composés aromatiques

Dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ), ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Un noyau aromatique est couplé à une chaîne de trois carbones (**Bruneton, 1993**).

### 2.6 Propriétés physiques

Ce sont des produits huileux, volatils et odorant, incolores ou jaunâtres, s'altérant facilement à l'air (**Yahioche, 1990**). A la température de  $15^{\circ}C$ , toutes les essences sont liquide ou au moins en partie, car ils en existent qui précipitent même à température ordinaire (**Yaici, 1987**).

Le degré de fluidité est variable. Les essences vieilles sont plus consistantes que celles fraîchement distillées par suite d'une résinification partielle due à l'action de l'oxygène de l'air (**yaici, 1987**)

Les essences fraîchement extraire ont généralement une odeur moins forte que celles qui ont été exposées pendant quelque temps à l'air (**Yahioche, 1990**).

Les essences oxygénées ont une saveur plus forte, plus aromatique que celles dépourvues d'oxygène, les essences renferment du soufre et de l'azote se distinguent par une saveur acre et brulante (**Yaici, 1987; Boussalah, 1990**).

Les essences sont peu solubles ou insolubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans l'alcool à divers degrés ainsi que dans l'éther, les huiles fixes et les autres solvants organiques. A leur tour se sont des dissolvants de matières grasses de résines et de plusieurs produits organiques. Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C et leur densité est de 0,75 à 1,096. Elles sont dextrogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée (**Valnet, 1983; Kaabache, 1988**).

Les HE se caractérisent aussi par un point de congélation (**AFNOR, 1982**) qui définit par «La température constante ou maximale observée pendant la phase de libération de la chaleur latente se solidifiant, lorsque cette HE est à l'état liquide et refroidie».

Tableau 2 : principale propriétés physiques des huiles essentielles (bruneton, 1999).

| <u>Paramètre</u>   | <u>Etat</u>   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• A température ambiante</li> </ul>                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Liquides</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• A température 35°C</li> </ul>                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Très inflammable</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Couleur</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rarement colorées</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Odeur</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ celle d'une eau aromatisée florale.</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Densité</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0.795-1.096.</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilité avec l'eau</li> </ul>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peu soluble.</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilité avec l'alcool,éther,les huilles fixes</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Soluble.</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sous l'effet de la chaleur</li> </ul>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Volatiles.</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indice de réfraction a 20°C</li> </ul>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1.467_1.474.</li> </ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• D'autre caractéristique</li> </ul>                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Entrainable à la vapeur.</li> <li>▪ Dextrogyres ou lévogyres.</li> <li>▪ Obtenue par distillation à l'aide d'un solvant</li> </ul> |

## 2.7 Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement par la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la plus adaptée se fait en fonction de la nature du matériel végétal à traiter, des caractéristiques physicochimiques de l'essence à extraire, de l'utilisation de l'extrait et de l'arôme du matériel de départ lors de l'extraction (Samate, 2001). Selon Piochon (2008), il existe trois procédés différents utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et la distillation à la vapeur (Pierron, 2014).

### 2.7.1 Hydrodistillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et, par conséquent, la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est plongé directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, puis porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérateur et l'H.E. se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité. L'H.E. étant plus léger que l'eau, il flotte sur l'hydrolysât. Cependant, l'hydrodistillation a ses limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant provoque la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005).

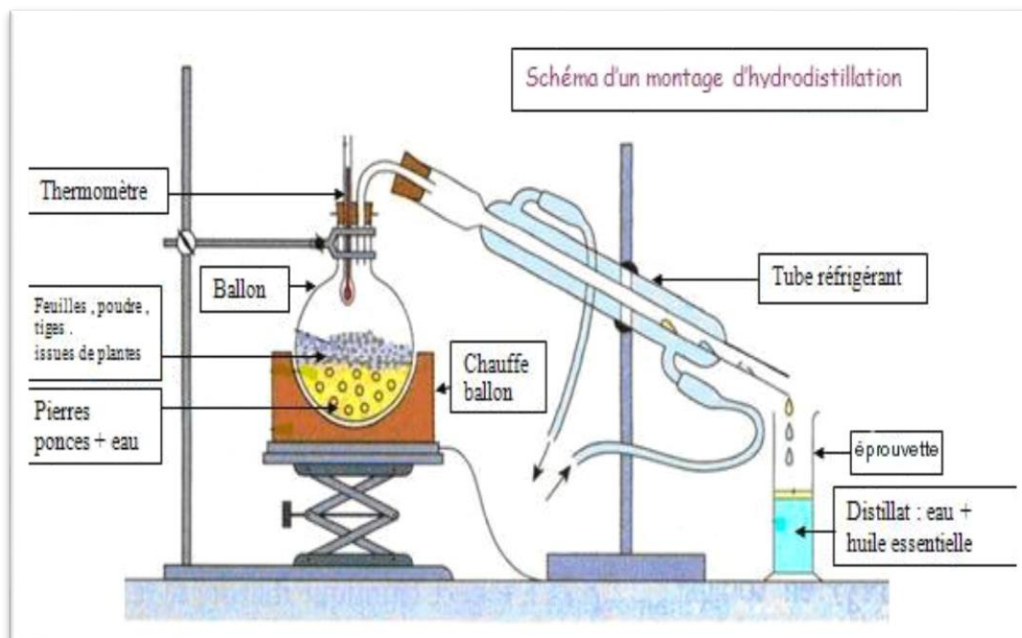


Figure 5 : Principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).



### 2.7.2 Extraction par entrainement à la vapeur

L'entrainement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles des plantes aromatiques. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (**Lagunez Rivera, 2006; Florence, 2012**).

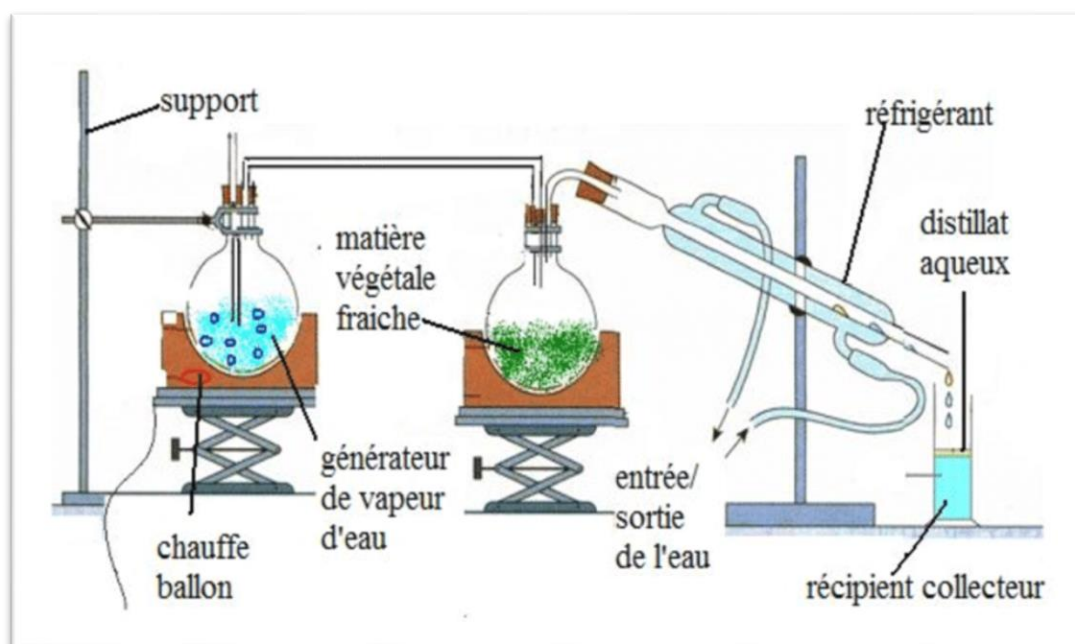


Figure 6 : Montage de l'entrainement à la vapeur (**Hameurlaine, 2009**).

### 2.7.3 Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes avec d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, le matériel végétal est chauffé par des micro-ondes dans une chambre fermée dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont emportés par la vapeur formée par l'eau de la plante. Ils sont ensuite récupérés par des procédés classiques de condensation, de refroidissement et de décantation. Les études montrent que cette technique présente plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, l'utilisation de petites quantités de solvant et un rendement d'extraction élevé (**Lucchesi, 2004 ; Hemwimon et al., 2007**).

### 2.7.4 Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une H.E. L'extraction & l'aide de solvants organiques pose de problème de toxicité et de solvants résiduels (Hernandez Ochoa, 2005).

### 2.7.5 Extraction par fluides supercritique

Extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y'est réduit. Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique (P73,8 bars T 31,1°C), le CO<sub>2</sub> possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (Piochon, 2008).

## 2.8 Intérêt et usage des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie ou elles sont considères comme étant des éléments de base ainsi que dans le domaine de l'aromathérapie. Elles sont aussi utilisées pour apporter de la saveur et des arômes. Enfin elles ont des applications importantes en médecine, soit pour leurs qualités odorantes, soit pour soulager la douleur ou pour leur efficacité physiologique (Bachelot *et al.*, 2006).

### 2.8.1 En agro-alimentaire

Les HE constituent un élément primordiale dans l'industrie agro alimentaire, elles assurent le gout et l'arôme pour ces qualités gustatives (Braneton, 1999). L'activité antimicrobienne des extraits des plantes dans l'assaisonnement des aliments, a été connue depuis longtemps, on

pense de plus en plus à utiliser ces extraits dans la conservation des denrées alimentaires (Lattaoui, 1989). Elles servent aussi à aromatiser les confiseries et entrent dans la préparation des boissons alcoolisées ou non alcoolisées produits laitiers, produits carnés soupes... etc.(Bensalah & Aribi, 2007).

### 2.8.2 En parfumerie et cosmétologie

C'est le débouché principal des huiles essentielles, des concrètes, des absolues et autres rétinoides fournis par ces drogues. Les HE ont longtemps intéressé les industries de cosmétique et parfumerie pour leurs différentes propriétés (Nouri & Bekhedda, 2006).

La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène emploient des essences dans les rouges à lèvres, les shampooings, les dentifrices. Les produits chimiques spécifiques qui sont utilisés en parfumerie peuvent être isolés à partir des HE, habituellement par distillation parfois, ils servent à leur tour de base en vue d'obtenir d'autres produits chimiques de parfumerie. Certaines catégories d'huiles essentielles rentrent dans la fabrication de nombreux produits cosmétiques comme éléments parfumant et comme agents conservateurs. Cependant, la littérature scientifique rapporte que, le large usage des huiles essentielles en cosmétique et parfumerie, suscite de nombreux travaux sur leur toxicité par application locale : pouvoir irritant, sensibilisant et phytotoxique (Bruneton, 1999; El-Abed et Kambouche, 2003).

### 2.9 Les modes d'administration des huiles essentielles

Les HE peuvent être utilisés par voie interne ou par voie externe Leur mode de préparation varie en fonction de la voie d'administration.

- **Par inhalation** : Excellente pour soigner les affections des voies respiratoires, les inhalations utilisent les effets de vapeur d'eau chaude mélangé à l'arome des substances volatiles.
- **Par compresses**: Elles stimulent les tissus et les organes au travers de la peau, on les utilise, en cas de blessures ou de contusions.
- **Par bains de bouche et gargarismes**: Elles sont recommandées pour les affections de la bouche et de la gorge. On peut tout à fait employer de l'huile essentielle d'herbes antiseptiques pour soigner l'hygiène buccale, matin et soir (Aili, 1999).

### 2.10 Mode d'action des huiles essentielle

L'activité des HE est liée à la structure chimique et physique de ses composants:

- Action pharmacologique est ciblée, utilisation de l'huile essentielle à dose pondérale pour une action physiologique (par ex: l'effet expectorant du 1.8 cineole) ou pour une action toxique sur une bactérie pathogène ou un parasite
- Action énergétique, par frictions, massages, diffuseurs.
- Action informationnelle, réaction psychologique, réaction psycho euro-endocrinienne, réaction liée a la culture, la mémoire ou le vécu antérieur (**henrioud, 2005**).

### 2.11 Conservation des huiles essentielles

L'instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation difficile ce qui entraîne la modification de leurs propriétés (oxydation, polymérisation et résiniforme), ainsi, (**Salle & Pelletter, 1991**), préconisent leurs conservations à 3°C ou 4°C, dans des petits flacons en verre fumé fermés par des bouchons hermétiques, donc pour une bonne conservation il est possible de recourir à l'adjonction d'antioxydants, pour que l'huile essentielle soit à l'abris de l'air et de la lumière (**Bruneton, 1999 Nouri ; Bekhada, 2006**).

### 2.12 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Bien qu'ils aient permis l'un des progrès les plus spectaculaires de la médecine du XXe siècle, les antibiotiques qualifiés de médicaments miracles perdent leur efficacité à un rythme inquiétant. La lutte contre les maladies infectieuses n'est plus une question de choix de molécule, de stratégies vaccinales et d'allocation de ressources comme le laissait croire la période faste des années 1960, riche en développement et en mise sur le marché de médicaments anti-infectieux dans les pays industrialisés. Ce phénomène n'est pas homogène dans le monde. A côté d'une surconsommation et de mauvais usages, une multiplicité de facteurs interviennent. La sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques est due à l'usage généralisé des antibiotiques et à la forte adaptabilité des souches bactériennes. L'hôpital est un écosystème idéal pour ce type de bactéries: les antibiotiques y sont utilisés massivement- environ 15 à 20 % des patients hospitalisés sont en permanence sous antibiotiques. Si ceux-ci préviennent les infections nosocomiales, ils augmentent par leur utilisation le risque

d'émergence des bactéries résistantes. La prévalence de bactéries multi-résistantes est un facteur de risque d'infections nosocomiales, car les individus porteurs de bactéries de ce type ne sont pas protégés par les antibiothérapies. En cas d'infections, il faut avoir recours à l'utilisation des antibiotiques les plus actifs, souvent les plus récents et les plus coûteux, et prendre le risque incontournable de l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance (Regnier, 2005).

### 2.13 Toxicité des huiles essentielles

Les HE sont des médicaments. Elles sont toxiques à fortes doses et peuvent induire des troubles très graves (coma, cirrhose hépatique, épilepsie...) (Durafford, 1997). Elles renferment certains constituants toxiques, des cétones monoterpéniques telles que thuyone, la pinoanphone et le complexe, sont toxiques de système nerveux central et induisent des crises et des troubles psychiques (Ghesten *et al.*, 2001), et peuvent présenter une toxicité aiguë, si elles sont absorbées à une quantité importante par voie orale (Wild, 1996).

La littérature scientifique rapporte que le large usage des HE en cosmétologie et en parfumerie suscite de nombreux travaux sur leur toxicité par leur application locale pouvoir irritant, sensibilisant et phototoxique (Bruneton, 1999).

# **Chapitre III**

## **Le monde bactérien**

## 3 Le monde bactérienne

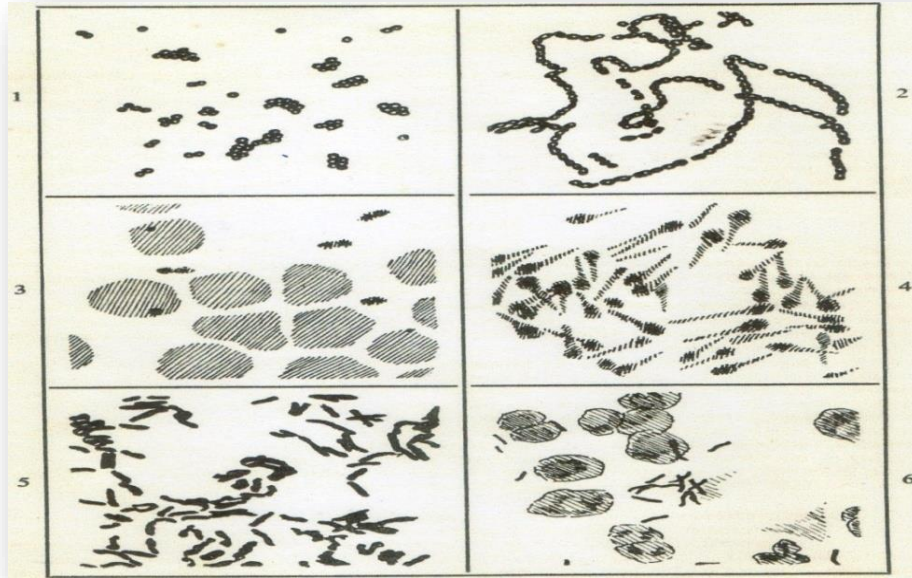
### 3.1 Généralité sur microbiologie

Les maladies infectieuses sont dues à des organismes vivants infiniment petits qu'on désigne sous le nom de microbes. Cette notion, fructueuse entre toutes, est née des travaux de Pasteur. Chimiste et biologiste, Pasteur a fondé les assises de la microbiologie, de la bactériologie, en appliquant une rigoureuse méthode expérimentale dans ses divers travaux.

Étudiant d'abord les fermentations du lait, des vins et de la bière, il démontre que les ferments ne représentent pas le résultat de la putréfaction de la substance organique, mais qu'ils sont des êtres vivants, capables de se reproduire et de se multiplier.

Le rôle des ferments établi, Pasteur recherche leur origine, combat la théorie de la génération spontanée et précise que les poussières véhiculées par l'air constituent le vecteur habituel de ces ferments.

Les bactéries sont de taille extrêmement petite: quelques dixièmes de (le est le millième de millimètre) de diamètre, de 1 à 1.5 u de longueur. Elles affectent des aspects géométriques simples (figure7), ce sont comme les protozoaires, des êtres unicellulaires mais dépourvus de noyau (**André, 1958**).



**Figure 7 : Morphologie des bactéries (André, 1958).**

1. Staphylocoque. \_\_2. Streptocoques. \_\_3. Pneumocoques. \_\_4. Bacilles du tétanos.  
5. Bacilles de la diphtérie. \_\_6. Bacilles de Koch.

### 3.2 Bactéries

Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur terre elles peuvent être isolées du sol, des eaux, de l'air de la peau et surtout dans les intestins des animaux. Tels que les salmonelles, *streptococcus*, *staphylococcus*, *Escherichia coli*.

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet. Il semblerait qu'en règle générale, les bactéries à gram négative soient plus résistantes à l'huile essentielle (hermal, 1993).

### 3.3 Formes de résistances

Les résistances observées chez les bactéries peuvent être naturelles ou acquises.

#### 3.3.1 La résistance naturelle



La résistance naturelle est une caractéristique de tous les individus bactériens, elle est programmée dans leur génome. Cette résistance est fixe et constante et, à ce titre, constitue un critère d'identification (**Pibri, 2005**).

### 3.3.2 Les résistances acquises

Les résistances acquises consécutives à des modifications de l'équipement génétique (chromosomiques ou plasmiques) sont l'expression d'une ou de plusieurs gènes de résistance (**Pibri, 2005**).

## 3.4 Escherichia coli

Escherichia coli est l'espèce type du genre Escherichia appelée communément (colibacille) cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram négatif aérobies (**Barnard, 2002**).

### 3.4.1 Classification (Pillet *et al.*, 1986)

|                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| <b>Règne</b>         | <i>Bateria</i>              |
| <b>Embranchement</b> | <i>proteobacteria</i>       |
| <b>Classe</b>        | <i>Gamma proteobacteria</i> |
| <b>Ordre</b>         | <i>enterobacteriales</i>    |
| <b>Famille</b>       | <i>enterobacteriaceae</i>   |
| <b>Genre</b>         | <i>escherichia</i>          |
| <b>Espèce</b>        | <i>coli</i>                 |

### 3.4.2 Caractères biochimiques

Quelques-uns des tests biochimiques les plus communément utilisés sont le type de fermentation formique, l'utilisation du lactose et du citrate, la production d'indole à partir de tryptophane, l'hydrolyse de l'urée et la production de sulfure d'hydrogène, pour identifier le genre Escherichia (**Barnard, 2002**).

### 3.4.3 Habitat

Escherichia coli c'est une bactérie commensale du colon de l'homme et des animaux

Chez l'homme les colibacilles constituent l'espèce dominante de la flore bactérienne aérobie du colon ils sont présents également mais à un taux plus faible au niveau de l'intestin grêle (Pillet *et al.*, 1986).

### 3.4.4 Pouvoir pathogène

*E. Coli* peut être responsable de gastro-entérites ayant des traductions cliniques variables : diarrhées d'allure, diarrhées sanglantes, diarrhées coliformes ; elle peut aussi causer des infections de méningites ou une septicémie (Olin, 2000).

### 3.5 Les *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*.

C'est l'un des germes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. Il est présent aussi bien en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier, et se place au deuxième rang des infections nosocomiales après *Escherichia coli* et au deuxième rang des intoxications alimentaires après les salmonelles. Il concerne un très grand nombre de sites infectieux et peut être isolé en laboratoire à partir de tous types d'échantillons. Il peut être retrouvé dans les infections locales et invasives avec une issue clinique. (Guillaume, 2014).

#### 3.5.1 Classification (Delarras, 2007).

**Domaine (règne):** Bacteria.

**Division:** Firmicutes.

**Classe :** Bacilli.

**Ordre :** Bacillales.

**Famille :** Staphylococcaceae.

**Genre :** *Staphylococcus*.

**Espèce :** *Staphylococcus aureus*

#### 3.5.2 Caractère biochimique

La capacité unique de *S.aureus* de provoquer la coagulation est connue depuis plus d'un siècle (Dougnon *et al.*, 2018). La Staphylocoagulase c'est un marqueur de l'identification de

*S. aureus* (Alioua, 2015). La coagulase libre est une enzyme extracellulaire qui réagit avec le facteur CRF (une substance ressemblant à la thrombine dans le plasma) pour former un complexe coagulase-CRF. Ce complexe convertit indirectement le fibrinogène en fibrine formant un caillot. Donc la production de la coagulase est considérée comme une indication de pathogénicité chez les espèces de *Staphylococcus* (Da Silva *et al.*, 2018).

### 3.5.3 Habitat

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont ubiquitaires, peu exigeantes et capables de vivre dans de nombreux sites. Elles sont soit saprophytes de l'environnement extérieur, soit commensales des épithéliums cutané et muqueux des hommes et des animaux (Wertheim, 2005).

### 3.5.4 Le pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est relié à l'expression des gènes de virulence portés par le chromosome. Des études scientifiques ont prouvé que chez l'espèce de *Staphylococcus aureus* qui possède des facteurs structuraux responsables de cette activité pathogénique, les facteurs de virulences tels que la capacité de sécréter les toxines, le pouvoir invasif et la capacité d'adhésion et la production d'enzyme hydrolytique sont les facteurs qui déterminent le pouvoir pathogène (Da Silva *et al.*, 2018).

## 3.6 Les Pseudomonas

Les *Pseudomonas* appartiennent aux Gamma- Protéobactéries. Ce groupe englobe la majorité des espèces de bactéries phytopathogènes. Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonaceae*, il comprend une soixantaine d'espèces. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *Pseudomonas fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différentes biovars. Le groupe de *Pseudomonas* se compose de bactéries sous forme de bâtonnets, Gram négatifs, mobiles par ciliature polaire (sauf *Pseudomonas mallei*), non sporulant, elles sont aérobies obligatoires. Les *Pseudomonas* ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe, peu exigeantes, et incapable de fermenter le glucose, se caractérisent par la pluralité des substances hydrocarbonées utilisées comme source de carbone et d'énergie, produisant des pigments, la plupart étant saprophytes et pouvant coloniser les cellules corticales mortes des racines (Frey *et al.*, 2006).

### 3.6.1 Classification de *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont classé selon la hiérarchie suivante (**Palleroni, 1984**) :

**Règne** : Bacteria

**Embranchement** : Prokaryota

**Division** : Proteobacteria

**Classe** : Gammaproteobacteria

**Ordre** : *Pseudomonadales*

**Famille** : *Pseudomonadaceae*

**Genre** : *Pseudomonas*

### 3.6.2 Caractères biochimiques

*Pseudomonas aeruginosa* est caractérisé par un métabolisme oxydatif. Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (**Boudouda, 2015**). Il possède aussi une nitrate réductase (réduction des nitrates pouvant aller jusqu' au stade de N gazeux), une arginine – dihydrolase, une lécithinase (qui ne peut être révélée qu'en milieu liquide) (**Palleroni , 1984**).C'est une bactérie dépourvue d'enzymes dégradant le lactose et dégageant une odeur de raisin ou seringa (**Pouneh, 2009**).

### 3.6.3 Habitat

Le genre de *Pseudomonasse* retrouve dans des habitats naturels comme le sol, l'eau douce, les eaux marines etc., mais il a également été isolé des instruments cliniques, des solutions aseptiques, des cosmétiques et produits médicaux (**Franzetti, 2007**).

### 3.6.4 Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) résulte de nombreux facteurs de virulence liés à la bactérie mais également aux réactions secondaires engendrées chez l'hôte. Sa prévalence ne cesse d'augmenter dans les infections nosocomiales ; son intérêt est aussi souligné par la gravité des infections chez l'immunodéprimé et par l'augmentation de sa résistance aux antibiotiques. Les gènes impliqués dans la synthèse des facteurs de virulence sont pour la plupart d'origine chromosomique et leur expression est inconstante : c'est le cas des gènes de la synthèse de l'alginate. Ce polysaccharide n'est produit que dans certaines circonstances en réponse à un environnement inapproprié au développement bactérien. Cette production d'alginate retrouvée lors d'infections chroniques est à l'origine d'importantes

modifications du métabolisme bactérien. La synthèse et les effets de l'alginate ont été particulièrement bien étudiés dans la mucoviscidose, aussi celle-ci nous servira de support (**Charles Soler, 2001**).

# **Chapitre IV**

## **Matériel et méthode**

## 4 Matériel et méthodes

- **Présentation du lieu de l'étude expérimentale**

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie et de microbiologie à l'Université Abdelhamid Ibn Badiss, Mostaganem.

- **Objectif de travail :**

Cette présente étude vise particulièrement à Procéder à l'extraction de l'huiles essentielle de *Syzygium Aromaticum* (clous de girofle) par l'utilisation de l'hydro -distillation, de calculer par la suite le rendement du girofle en l'huile essentielle. Séparer l'eugénol et l'acétyle eugénol par la méthode d'extraction liquide- liquide afin d'étudier l'activité antibactérienne de ces deux composants différents et de leurs différentes dilutions sur des germes pathogènes à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et des bactéries à Gram positif, *staphylocoques aureus*.

### 4.1 Matériels

#### 4.1.1 Traitements de la matière végétale

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, nous nous sommes intéressés aux les clous girofle, plante réputée par son usage en médecine traditionnelle et en chirurgie dentaire en vue de sa richesse en principe actifs, notamment en huiles essentielles, dont les vertus thérapeutique sont reconnues depuis l'antiquité.

Des clous de girofle, on peut extraire une huile essentielle contenant de l'eugénol (entre 75 et 85 % en masse) et de l'acétyle eugénol (de 4 à 10 % en masse), L'eugénol a de nombreuses propriétés médicinales : il est anti-inflammatoire, antiseptique ; c'est également un anesthésiant local.

Notre objectif donc, est de tester l'effet anti bactrien des composants d' huiles essentielles du girofle sur des souches cibles de notre étude à savoir des bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et des bactéries à Gram positif, *staphylocoques aureus*.

On a procédé dans un premier temps à l'extraction des huiles essentielles du girofle par hydrodistillation puis à la séparation d'eugénol et de l'acétyleugénol par la méthode d'extraction liquide-liquide.



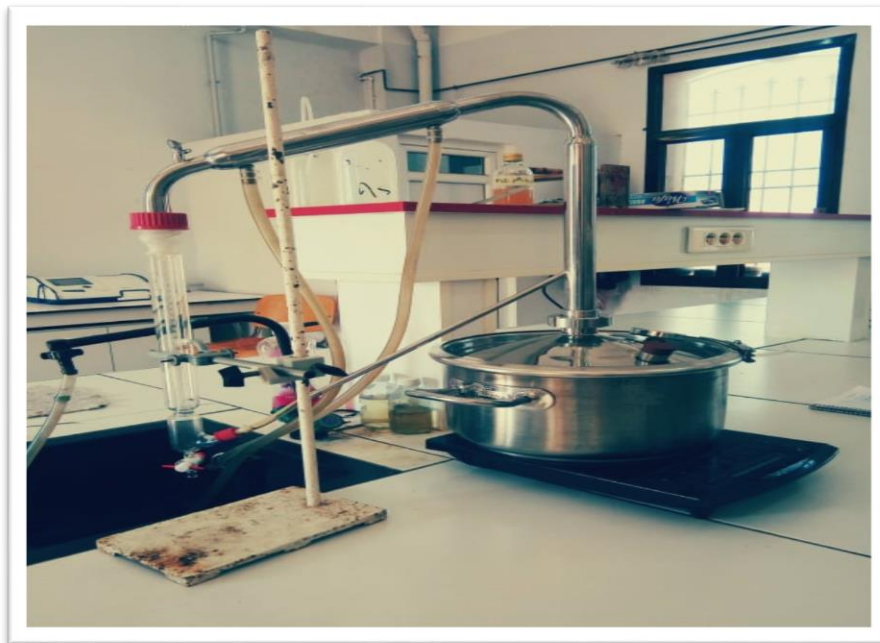
**Figure 8** : Clou de girofle *Syzygium aromaticum*.

#### **4.1.2 Méthode l'hydrodistillation**

##### **4.1.2.1 Principe et mode opératoire**

Afin d'optimiser la quantité d'huile essentielle nous avons utilisé un appareil d'hydrodistillation constitué d'une cocotte à minute en Aluminium de 15 L de capacité, 25 cm de diamètre et 22 cm de hauteur, où l'on place 500 g de matériel végétal et deux litre d'eau distillée. Ce dispositif est placé sur une plaque chauffante, et relié au condenseur. Ce dernier est formé d'un serpentín de cuivre plongé dans un bac de refroidissement où circule l'eau fraîche en permanence, ceci permet la condensation de la vapeur et des huiles essentielles. L'ensemble est porté à ébullition après 120 min, les vapeurs chargées d'huile essentielle traversant le tube de cuivre (condenseur) se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, après décantation on obtient deux phase (huile essentielle et eau florale), l'eau et l'huile se séparent par différence de densité (Figure9).





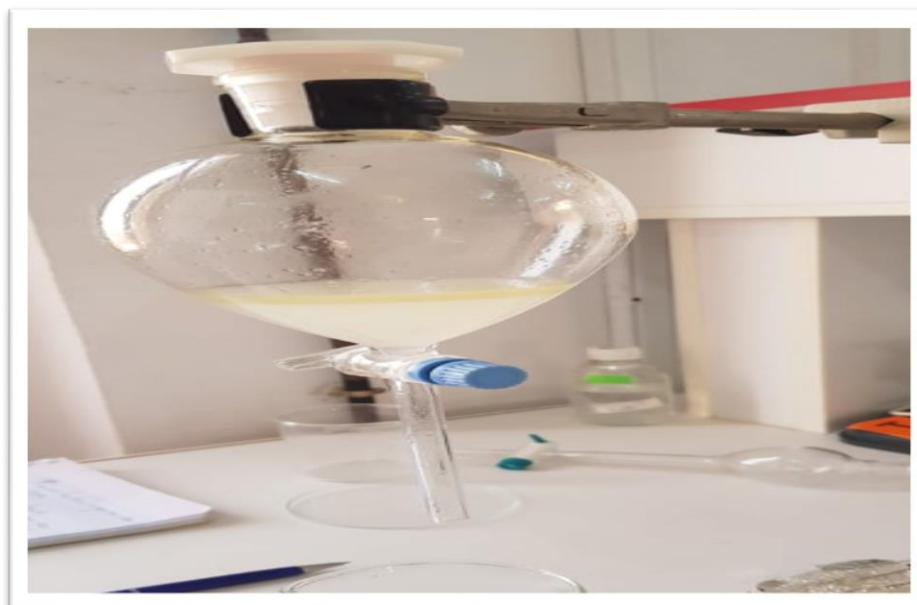
**Figure 9** : Dispositif d'extraction de l'huile essentielle

#### 4.1.2.2 Relargage

On pratique ensuite un premier traitement appelé décantation ou extraction par solvant permettant de séparer l'huile essentielle de l'eau. Pour cela, il suffit de mélanger le distillat obtenu avec un solvant apolaire.

1. Verser le distillat dans l'ampoule à décanter, on ajoute une solution saturée de Na Cl et 15 ml d'un solvant (**dichlorométhane**).
2. Agiter l'ampoule à décanter (à purger régulièrement au moment de l'agitation), laisser reposer puis séparer la phase organique (la phase supérieure) qui contient les huiles essentielles du girofle de la phase aqueuse en évacuant d'abord celle-ci .cette opération est répétée trois fois (figure10).

Après récupération de la phase organique contenant l'huiles essentielle du girofle, on ajoute une pincée de Mg So<sub>4</sub>, afin d'éliminer toutes traces d'eau restante.



**Figure 10** : lavage du distillat par un solvant à l'aide d'une ampoule à décanter

#### 4.1.2.3 Séparation de l'eugénol et de l'acétyl'eugénol par méthode d'extraction liquide-liquide

Pour séparer, l'eugénol et de l'acétyl'eugénol nous allons effectuer une extraction liquide-liquide en réalisant l'hydrolyse basique de l'eugénol. Verser dans l'ampoule à décanter qui a été vidée, la phase organique précédente obtenue lors de l'extraction de l'huile essentielle du girofle contenant les deux espèces recherchées dans notre études qui sont, l'eugénol et l'acétyl'eugénol extraite suivant les procédés cités et expliqués plus haut . Ajouter à cette phase 15 ml de la solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ( $\text{Na}^+ (\text{aq}) + \text{HO}^- (\text{aq})$ ) (ou soude) de concentration  $10^{-1}\text{M}$ . Agiter, laisser décanter et récupérer la phase aqueuse. La phase aqueuse contient " l'eugénol " transformé. En effet, les ions  $\text{HO}^-$  – apportés par la solution de soude ont transformé la fonction phénol de l'eugénol en ion eugénate, soluble dans l'eau.

On agite et on dénazifie, l'eugénol se transforme en génoilate et migre vers la phase aqueuse.

Par contre l'acétyl'eugénol reste dans la phase organique

On remet la phase organique dans l'ampoule et on ajoute une deuxième fois 15ml de  $\text{NaOH}$  et refaire les mêmes opérations, afin de récupérer la totalité de l'eugénol

On rassemble les phases aqueuses, on régénère l'eugénol par l'ajout d'une solution d'acide chloridrique de concentration  $10^{-1}\text{M/l}$ .

On remet tout dans l'ampoule à décanter pour extraire l'eugénol avec le dichlorométhane en trois fois, on récupère la phase organique

Puis on sèche on ajoutant du  $\text{MgSO}_4$ , et -en dernier en élimine le solvant par séchage au rotavapeur.

On aurait ainsi récupérer notre eugénol.

De la phase aqueuse, on récupère notre acétyle eugéol par les mémés procédées, et se terminent par séchage a  $MgSO_4$  et au rotavapeur.

Régénération de l'eugéol se fait en effectuant une extraction liquide-liquide pour cette régénération Dans la phase aqueuse précédente située dans le bécher, introduire la solution concentrée d'acide chlorhydrique jusqu'à obtenir un pH acide, évalué avec un papier pH. Mettre cette solution dans l'ampoule à décanter. Ajouter 15 ml de dichlorométhane, agité, recueillir la phase organique. Vider et rincer l'ampoule puis y introduire la phase organique de dichlorométhane. Laver cette phase à l'eau. La recueillir dans un bécher propre et la sécher sur un peu de sulfate de magnésium anhydre. Le produit final obtenu est l'eugéol.

#### 4.1.2.4 L'évaporation

C'est une opération fondamentale qui a pour but de concentrer une solution d'un soluté solide ou liquide, par élimination du solvant sous forme vapeur, ébullition a la pression ou sous vide (**Richard et al., 1992**).

Le mélange est ensuite évaporé au Rotavapor (figure11 ) porté a la température d'ébullition du solvant ( entre 35a 40°C) afin de séparer le solvant de l'eugéol et de l'acétyle eugéol.



**Figure 11** : Evaporation du solvant par l'évaporateur rotatif

### 4.1.3 Etude microbiologique :

#### Evaluation de l'activité antibactérienne

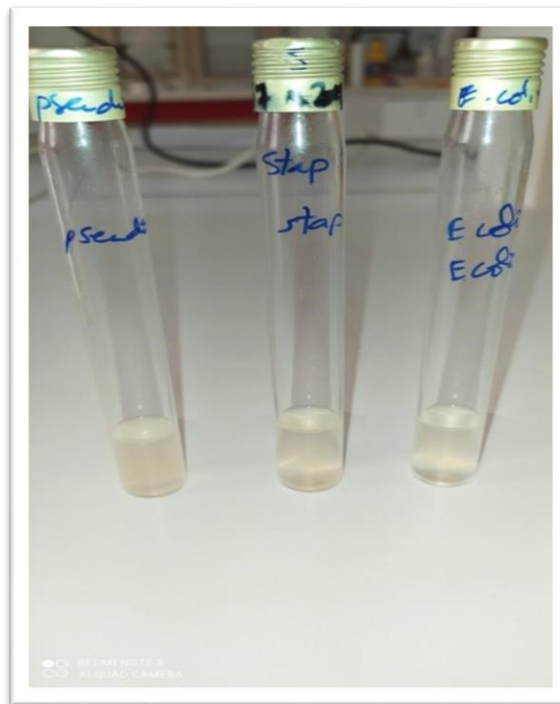
##### Etudes préliminaires

###### Les souches étudiées :

En a choisir 3 souches pathogènes (Figure 12), qui sont souvent responsables de problèmes majeurs de santé publique, et ont développé une antibiorésistance aux antibiotiques prescrits dans le cadre de traitement ou de prévention.

On a sélectionné 2 groupes de bactéries :

- Des bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.
- Des bactéries à Gram positif : *staphylocoques aureus*.



**Figure 12** : Les souches bactériennes

## **4.2 Méthodes**

### **4.2.1 Calcule du rendement d'huile essentielle**

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (R), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (m) et la masse de la matière végétale utilisée (m<sub>0</sub>). Il est donné par la formule suivante :

$$\mathbf{R=m/m_0 \times 100}$$

R : rendement d'huile essentielle obtenue.

m : masse d'huile essentielle obtenue

m<sub>0</sub> : la masse des clous utilisés.

### **4.2.2 Méthode de dilution :**

Cette démarche met en évidence les effets de l'activité antimicrobienne de l'eugénol et de l'acétylégénol, purs et dilués dans du DMSO à 50% et à 70% respectivement.

### **4.2.3 Identification des souches pures**

#### **Coloration de Gram :**

En zone aseptique, on a préparé un frottis d'une culture à gram<sup>+</sup> et un frottis d'une culture à gram<sup>-</sup> (Delarras C, 2007) on suivant les étapes suivantes

- Couler sur le frottis réalisé le violet de Gentiane et laisser réagir 30 secondes
- Égoutter le violet de Gentiane et rincer avec de l'eau distillée
- Ajouter quelques gouttes de Lugol et laisser réagir 1 mn
- Décolorer avec de l'alcool
- Rincer la lame à nouveau avec de l'eau distillée
- Couler la Fuchsine et laisser réagir 20 secondes
- Rincer à l'eau distillée et laisser sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen.
- Observer les frottis sous microscope optique à l'objectif x100 à l'immersion.

Les bactéries qui apparaissent en violet sont à Gram positif, et celles qui apparaissent en rose sont à Gram négatif. L'examen microscopique nous permet aussi d'identifier chaque souche bactérienne reconnue par leurs différentes formes.

**Vérification de la sensibilité des souches cibles de notre étude aux antibiotiques de références :**

Afin de vérifier la possibilité de développement de toute résistance par nos souches pathogènes étudiées, aux différents antibiotiques de références largement utilisés et prescrits à des fins préventives ou comme traitements. Nous avons procédé à un test de sensibilité préliminaire de *E.Coli*, *Ps.aeruginosa*, *S.aureus* à ampicilline et à amoxicilline\acide clavulanique sous le nom commercial Augmentin

**4.2.4 Préparation de l'inoculum****a-Préparation de pré-culture**

Les tests de la méthode antibactérienne sont effectués avec un échantillon de cultures jeunes (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est réalisée par inoculation de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (bouillon nutritif). Après avoir incubé pendant 24 heures à 37°C

**b-Préparation de la suspension bactérienne**

A partir des jeunes cultures sur bouillon nutritif. Mettre une suspension bactérienne dans un tube contenant 7 ml de bouillon nutritif stérile, vortexer pendant quelques secondes.

Puis calculer la densité optique de la solution bactérienne contenue dans de l'eau physiologique en sachant que la densité optique bactérienne est comprise entre 0,08 -0,1.

Avant

- il faut régler le spectrophotomètre à une fréquence 620nm.
- Puis calculer la densité optique de l'eau physiologique contenue dans une cuve comme témoin.

Après déposez une autre cuve contenant de la solution bactérienne contenue dans de l'eau physiologique afin de calculer sa densité optique qui sera comprise entre 0,08 -0,1.

Une fois les densités optiques de la solution bactérienne sont ajustées par rapport à l'intervalle de 0,08 -0,1, On commence l'ensemencement des ces solutions bactériennes contenues dans de l'eau physiologique dans le milieu gélosé solide MH.

### **4.2.5 Choix et réalisation de l'antibiogramme**

Afin de tester la sensibilité de différentes souches de bactéries pathogènes cibles de notre étude à l'eugénol et à l'acétate d'eugénol ont adopté l'antibiogramme sur un milieu gélosé MH, qui consiste à déposer des disques imbibés d'un volume de 2ul de nos principes actifs, purs et dilués à 50 %, 75% dans le DMSO sur la gélose préalablementensemencée par une culture bactérienne dans le bouillon nutritif des souches pures étudiées(Brodsky ,1976) .

#### **a-Ensemencement :**

L'ensemencement doit se faire en étalon une goutte de la suspension bactérienne, sur la surface de la gélose MH avec un écouvillon stérile

Pour se faire, frottez l'écouvillon sur la totalité de la surface sèche de la gélose, de haut en bas, en formant des stries serrées.

Répétez la même opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire tourner l'écouvillon sur lui-même.

Terminez l'ensemencement en frottant l'écouvillon à la périphérie de la gélose.

#### **b-Préparation des disques :**

Les disques sont préparés en utilisant du papier Wattman №40 par une perforation à 2 trous du papier, de 5 mm de diamètre. Puis ces disques sont déposés en un tube à essai, autoclavés, et conservés à température ambiante.

Prélève à l'aide de pince stérile les disques stérilisés, Ce dernier est imbibé avec HEs pendant 30s, Puis déposer dans la boîte de pétrie 04 disques imbibés sur le milieu MHensemencé.

Laisser reposer ces boîtes de pétrie pendant 30 mn jusqu'à fixation des disques sur le milieu MH solidifié.

#### **c-Incubation**

Incubez les boîtes de pétrie dans l'étuve à 37°C pendant 24heures.

#### **d-Lecture des résultats :**

La lecture des résultats, permettant d'estimer la sensibilité des souches étudiées à l'eugénol et à l'acétate d'eugénol est réalisée par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition. Ces derniers sont mesurés à l'aide d'une règle et exprimés en (mm) (en incluant le diamètre du disque de 5 mm).

La sensibilité à l'huile essentielle a été classée en fonction des diamètres des halos d'inhibition selon l'échelle suivante (**PONCE *et al.* , 2003**).

- Non sensible (-) ou résistant : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

- Analyses statistiques

Les données collectées dans ce travail aléatoire ont été soumises à une analyse de variance (**Cary, 2008**). Le test des plages multiples de Duncan a été utilisé pour distinguer les moyennes des traitements. Un contraste à un seul degré de Liberté a été adopté pour estimer les impacts significatifs de L'acclimatation thermique et de la supplémentation alimentaire en graines de lin. Le niveau de  $p < 0,05$  a été considéré pour la signification.



# **Chapitre V**

## **Résultats et discussion**

## 5 Résultats et discussions

### 5.1 Détermination du rendement d'extraction des deux composants d'intérêt de l'huile essentielle du girofle (Eugénol et acétate d'eugénol)

Les résultats en pourcentage représentés dans le tableau 3 nous montre clairement que le rendement moyen de la proportion l'acétate d'eugénol qui était de 76% du rendement total du l'huile essentielle du girofle dépasse celle d'eugénol de 10,85 fois. Cette dernière qui était de 7% par apport du rendement total d'HE du girofle et ne représente que 5,32% de la quantité de l'acétate d'eugénol.

**Tableau 3 :** Rendement en huile essentielle de girofle

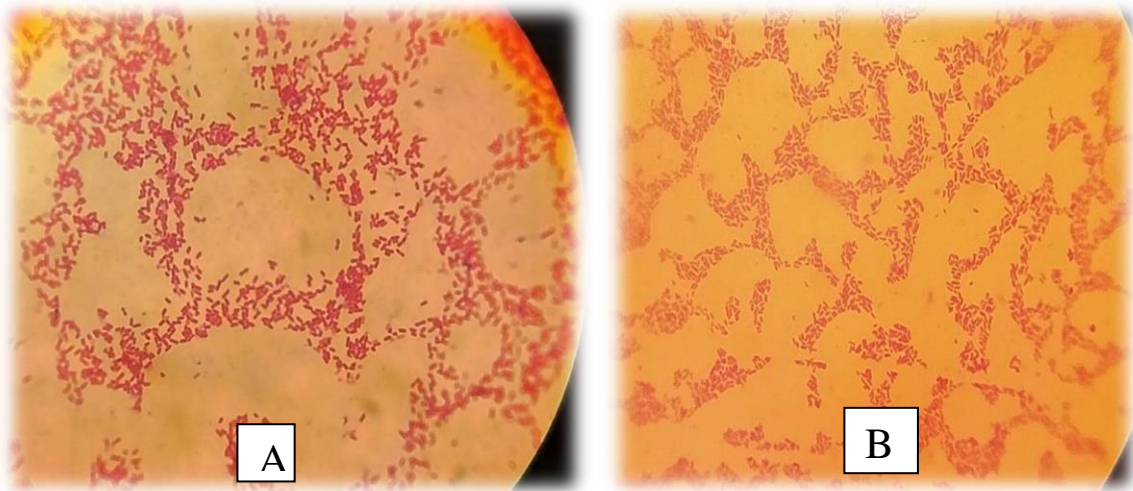
|               | HEs d'Eugénol | HEs d'acétate d'eugénol |
|---------------|---------------|-------------------------|
| Rendement (%) | 7%            | 76%                     |

### Discussions

Le rendement calculé des différents composants de l'huile essentielle extraite de clou de girofle, ciblées dans notre étude est en accord avec les données bibliographiques pour 4,0 à 15,0 % l'eugénol, et 75,0 et 88,0 % pour l'acétyl'eugénol (**Maisonneuve, 2004**).

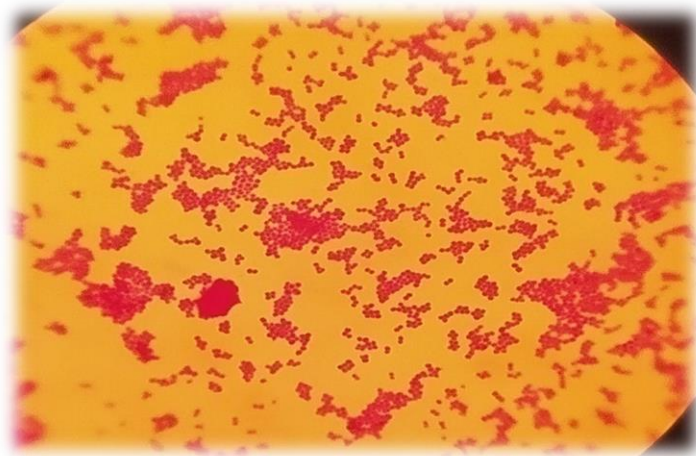
### 5.2 Identification des souches

L'observation macroscopique des colonies, après la réalisation de la coloration de Gram pour les souches isolées, nous a permit d'identifier des bactéries en rose nous confirmant qu'il s'agit bien de bactéries Gram négatif. Ces dernières sont de formes Coccobacilles pour *E. Coli* et Bacilles pour *Ps.aeruginosa* (figure 13), et celles en violet nous confirmant qu'il s'agit bien de bactéries Gram positif de formes de Cocus en grappes de raisins pour les *S. aeurues* (figure 14).



**Figure 13** : Coloration de Gram observation microscopie(X 100).

**A:** *Escherichia Coli*, **B:** *Pseudomonas aeruginosa*,



**Figure 14** : Coloration de Gram observation microscopie (X 100) de *Staphylococcus aureus*

5.3 Évaluation de la sensibilité des souches bactériennes étudiées

5.3.1 Vérification de la sensibilité des souches étudiées aux antibiotique de références

5.3.1.1 Sensibilité des souches à l'amoxicilline\acide clavulanique

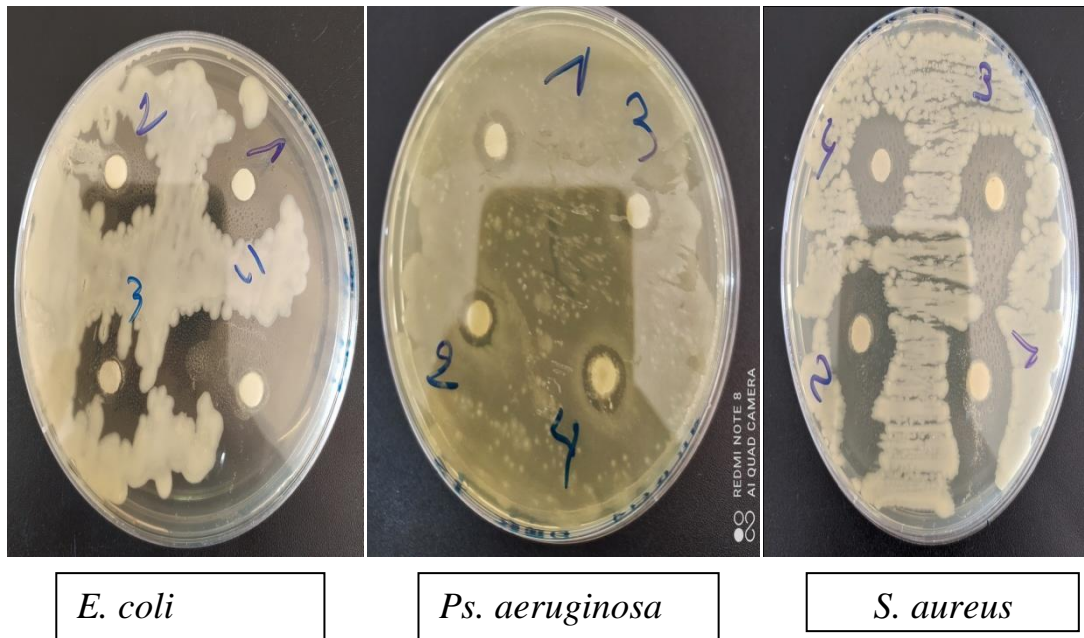


Figure 15 : sensibilité des souches étudiées à l'amoxicilline\acide clavulanique marquée par les zones d'inhibition

Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) démontrant la sensibilité des souches étudiées à l'amoxicilline\acide clavulanique.

| Les Souches                | <i>E. coli</i>          | <i>Ps. aeruginosa</i>  | <i>S. aureus</i>       |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Diamètre d'inhibition (mm) | 18,16±3,97 <sup>b</sup> | 11,5±3,17 <sup>a</sup> | 17,5±2,71 <sup>c</sup> |
| Sensibilité                | ++                      | +                      | ++                     |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

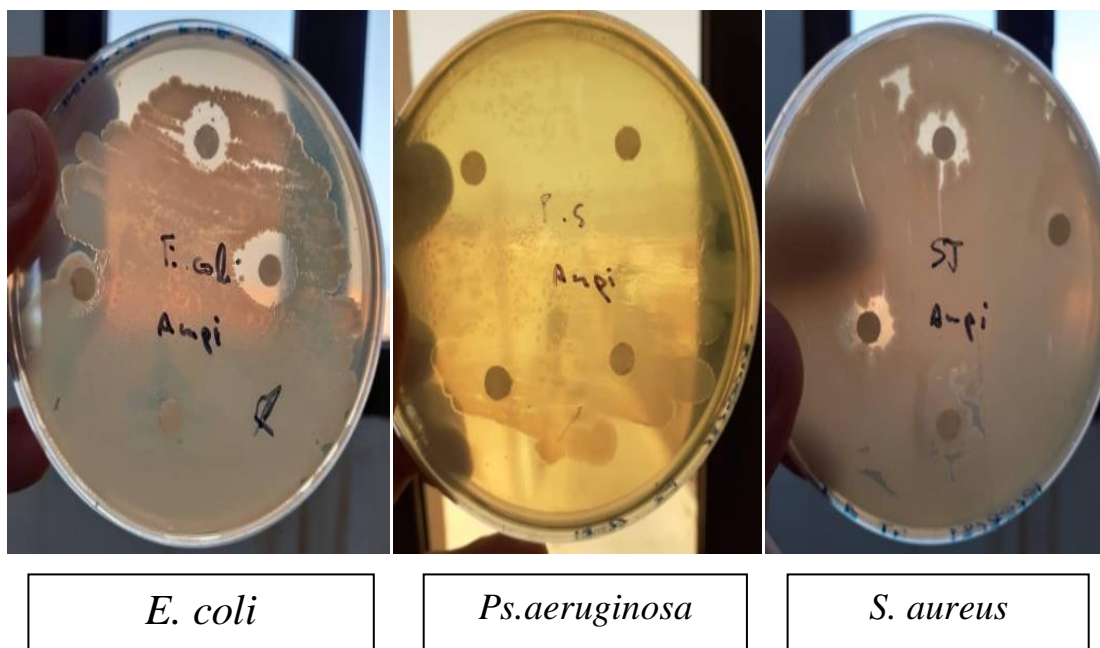
Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Les diamètres des zones d'inhibitions délimités par l'amoxicilline pour les trois souches se révèlent très importante d'E. Coli 18,16±3,97significativement plus importante que celle de S. aureus 17,5±2,71. Celle de *Ps. Aeruginosa* 11,5±3,17significativement moindre que celles des autres souches.

**Discussion**

Pour une antibiotique de référence et malgré que les diamètres d'inhibition paraissent intéressant du point de vu théorique et en chiffres numériques, mais restent loin des attentes thérapeutiques. On dirait même qu'il y a régression en cours de la sensibilité des trois souches étudiées à l'amoxicilline/acide clavulanique

**5.3.1.2 La sensibilité à l'ampicilline :**



**Figure 16 :** sensibilité des souches à l'ampicilline marquée par des zones d'inhibitions

**Tableau 5 :** Diamètres des zones d'inhibition en (mm) démontrant la sensibilité des souches à l'ampicilline.

| Les Souches                | <i>E. coli</i>          | <i>Ps. Aeruginosa</i>  | <i>S. aureus</i>      |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| Diamètre d'inhibition (mm) | 10,75±2,49 <sup>d</sup> | 9,08±3,26 <sup>a</sup> | 8,5±2,50 <sup>d</sup> |
| Sensibilité                | +                       | +                      | -                     |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$ écart type

Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Les diamètres de zones d'inhibition sont enregistrés plus importants pour *E. Coli*  $10,75 \pm 2,49$  suivie par celle de *Ps. Aeruginosa*  $9,08 \pm 3,26$  avec une différence entre les deux valeurs très significative. Par contre le diamètre d'inhibition marqué par ampicilline pour *S. aureus* qui était de  $8,5 \pm 2,50$  significativement inférieur à ceux marqué pour *E. Coli* et *Ps. Aeruginosa*

### Discussion

Les résultats des tests préliminaires de la sensibilité des souches pathogènes cibles de notre étude ; nous montrent bien que pour un antibiotique de référence prescrit comme stratégie thérapeutique, la sensibilité des différentes souches étudiées n'était pas à son niveau extrême recherché. *Ps. aeruginosa* a manifesté un très bas niveau de sensibilité à l'amoxicilline, et à l'ampicilline, antibiotiques sensés être de référence pour cette souche.

*E. Coli* aussi a montré une très faible sensibilité à son antibiotique de référence qui est l'ampicilline.

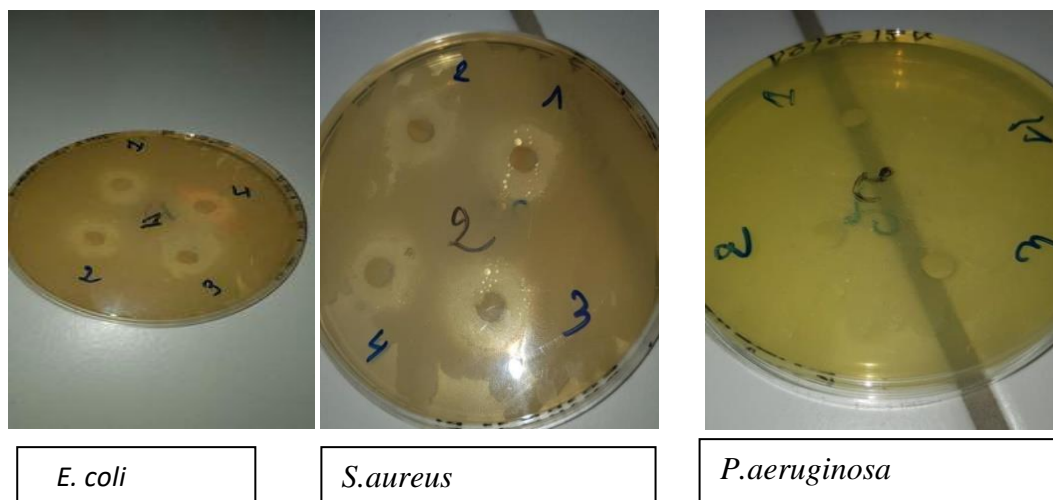
Par contre la *S. aureus* a manifesté un développement d'une résistance très importante bien au même antibiotique

### 5.3.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'eugénol et acétyle eugénol.

#### 5.3.2.1 Activité antibactérienne des huiles essentielles pures d'eugénol et acétyle eugénol

L'effet des HEs d'eugénol et acétyle eugénol, sur la croissance des souches bactériennes étudiées : *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* dans notre expérimentation, sont estimés par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions exprimés en mm. Les valeurs des diamètres sont décrites dans les tableaux et les figures suivant :

## a-Effet antibactérien de l'eugénol pure sur les souches de bactéries étudiées



**Figure 17** : sensibilité des souches étudiées à l'eugénol pure marquée par des zones d'inhibitions

**Tableau 6**: Diamètres des zones d'inhibition en (mm), marquant la sensibilité des souches étudiées à l'eugénol pure.

| Les Souches                | <i>E. coli</i>          | <i>P. Aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i>        |
|----------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Diamètre d'inhibition (mm) | 19,08±2,96 <sup>a</sup> | 8±1,04 <sup>b</sup>  | 18,25±3,70 <sup>a</sup> |
| Sensibilité                | ++                      | -                    | ++                      |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition

(a,b,c,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative ( $P < 0.05$ )

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++), Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

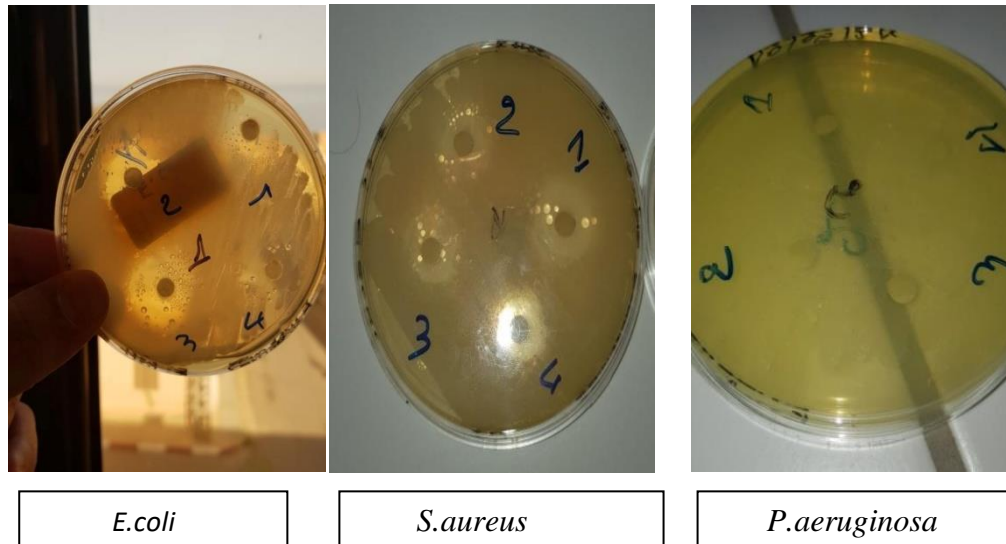
Eugénola tracé des diamètres d'inhibitions très importants qui étaient respectivement de 19,08±2,96 et 18,25±3,70 en inhibant la croissance d'*E. Coli* et de *S. aureus* d'une façon hautement significative. Par contre la même substance a marqué un diamètre significativement moins important pour *P. Aeruginosa* qui était de 8±1,04.

### Discussion

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Rhayour *et al.*, (2002) qui ont démontré que l'eugénol, composant de l'huile essentielle du Girofle est fortement antibactérienne. Il semble que l'eugénol a inhibé la croissance des bactéries *Escherichia coli* et de *S. aureus*, qui se sont montrées très sensibles à ce composé. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Valero et Giner

en 2006. Par contre pour la souche *Pseudomonas auroginosa*, trouvée très sensible par Rhayour, 2002, s'est manifestée dans notre essai très résistant à l'eugénol.

**b-Effet antibactérien de l'Acétate eugénol pure:**



**Figure 18** : sensibilité des souches étudiées à d'Acétateeugénol pure marquée par des zones d'inhibitions

**Tableau 7** : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité des souches étudiées à l'acétate eugénol pure

| Les Souches                | <i>E. coli</i>       | <i>P. Aeruginosa</i>   | <i>S. aureus</i>        |
|----------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| Diamètre d'inhibition (mm) | 17±3,71 <sup>a</sup> | 6,33±0,89 <sup>c</sup> | 16,42±1,98 <sup>a</sup> |
| Sensibilité                | ++                   | -                      | ++                      |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

(a,b,c sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++), Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Acétate eugénol a tracé des diamètres d'inhibitions très importants qui étaient respectivement de 17±3,71et de 16,42±1,98 en inhibant la croissance d'*E.Coli* et de *S. aureus* d'une façon hautement significative. Par contre la même substance a marqué un diamètre significativement moins important pour *P. Aeruginosa* qui était de 6,33±0,89

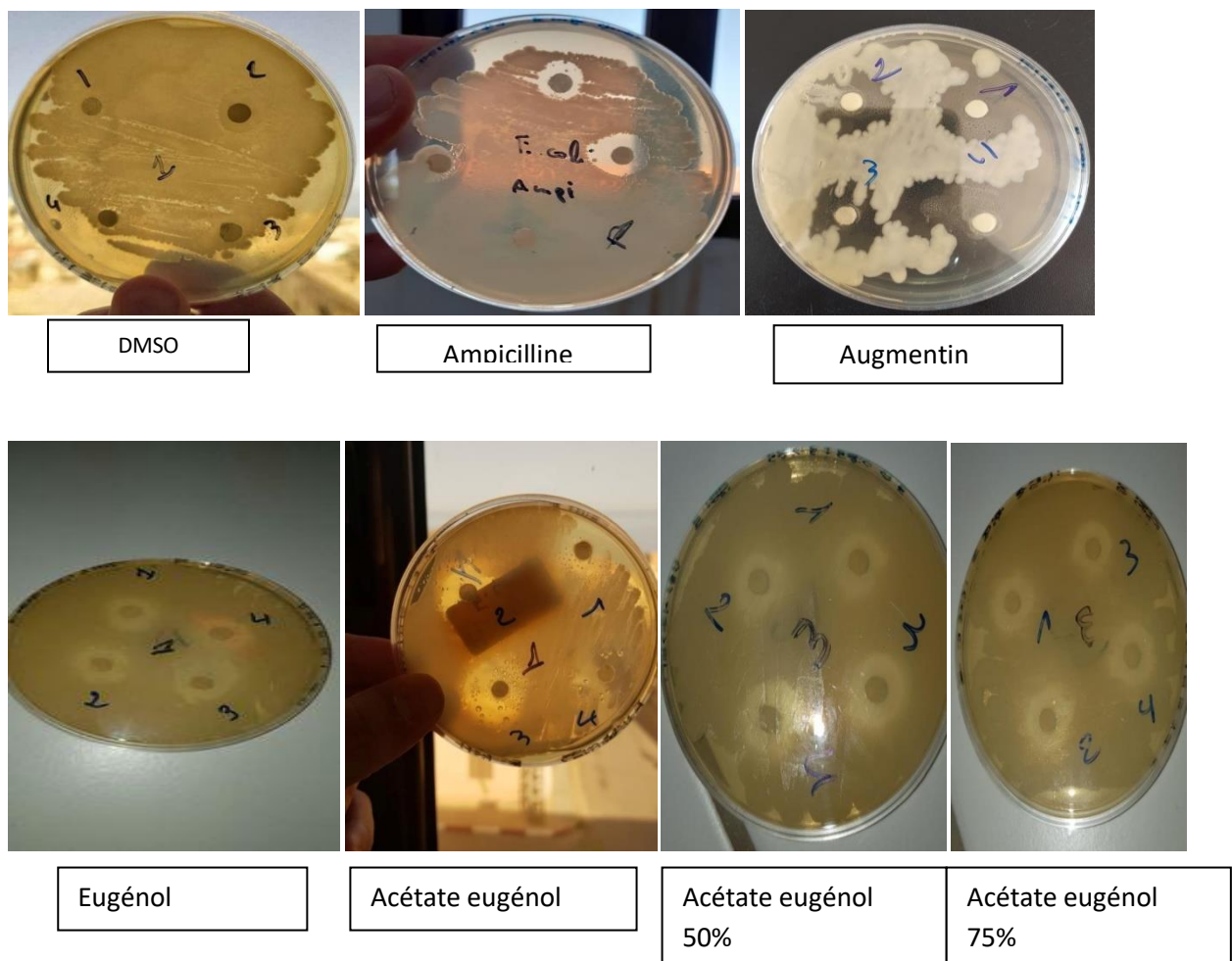


**Discussion**

Les souches *E. Coli* et *S. aureus* ont manifesté une très grande sensibilité à l'acétate eugénole répliquée par des zones d'inhibitions jugées très importantes. Par contre *P. Aeruginosa* a manifesté une grande sensibilité à la même substance naturelle.

**5.3.2.2 Comparaison des effets antibactériens des HEs pures et diluées aux effets des antibiotiques de références**

**a-Comparaison entre les effets antibactériens des différents composants d'HE du girofle pur et diluée sur *E.Coli* et les antibiotiques de références.**



**Figure 19** : Comparaison entre la sensibilité d'*E. Coli* à l'eugénole pure et à acétate eugénole diluées à 50% et 75% et aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions

**Tableau 8 :** Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité d'E. Coli à l'eugénol pure et à acétate eugénol diluées à 50% et 75% et aux antibiotiques de références

|                | Eugénol                 | Acétate eugénol pure | Acétate eugénol 50%     | Acétate eugénol 75%     | Amoxicilline            | Ampicilline             |
|----------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>E. coli</i> | 19,08±2,96 <sup>a</sup> | 17±3,71 <sup>a</sup> | 16,08±2,31 <sup>a</sup> | 19,08±3,55 <sup>a</sup> | 18,16±3,97 <sup>a</sup> | 10,75±2,49 <sup>b</sup> |
| Sensibilité    | ++                      | ++                   | ++                      | ++                      | ++                      | +                       |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition

(a,b,c,d) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

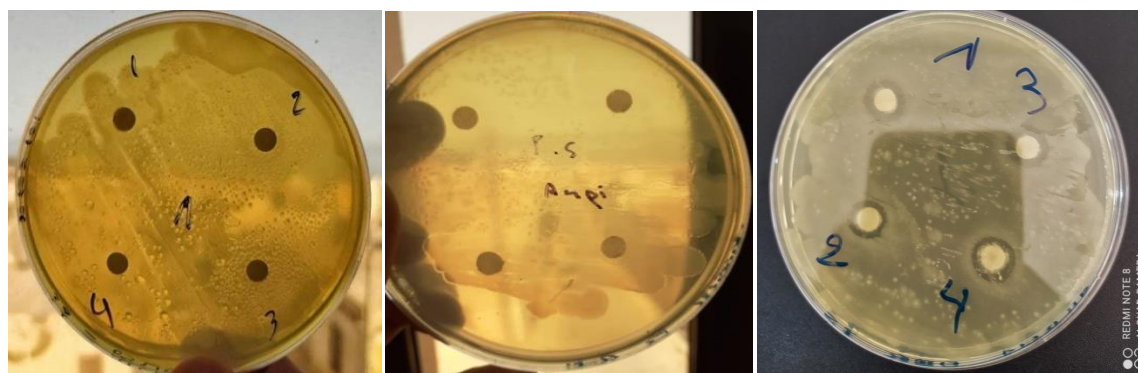
Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Les diamètres des zones d'inhibitions enregistrés 19,08±2,96, 17±3,71, 16,08±2,31, 19,08±3,55, 18,16±3,97 respectivement d' Eugénol, d'Acétate eugénol pure, Acétate eugénol 50%, Acétate eugénol 75% et Amoxicilline, marquées par l'effet antibactérien de ses composants sur *E. Coli* révèlent une différence non significative entre l'effet antibactérien des différents composants de l'huile essentielle du girofle et aussi entre ces extraits étudiés et l'antibiotique de référence l'amoxicilline. Ce même effet qui était significativement plus faible pour l'ampicilline 10,75±2,49

**Discussion**

Les résultats obtenus montrent bien qu'E.coli manifeste bien une grande sensibilité presque égale pour tous les composants d'huile essentielle du girofle, pure et dilués. Cette même comparable à celle à l'amoxicilline. Par contre l'effet antibactérien de l'ampicilline très inférieur d'une façon significatif, celui de l'eugénol, et de l'acétyle eugénol pure et dilué.

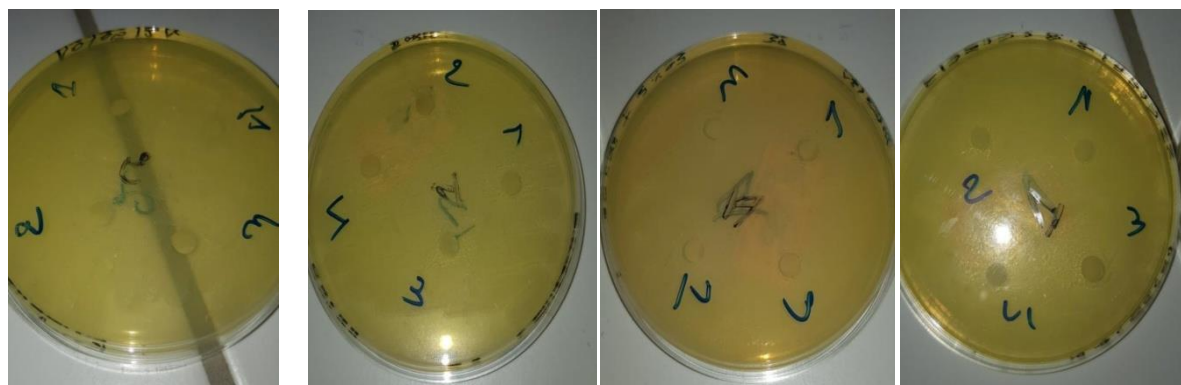
**b-Comparaison entre les effets antibactériens des différents composants d'HE étudiés purs et dilués sur Ps.aureginosa et les antibiotiques de références.**



DMSO

Ampicilline

Augmentin



Eugénol

Acétate eugénol

A. eugénol 50%

A. eugénol 75%

**Figure 20** : comparaison de la sensibilité de *Ps.aeruginosa* a l'eugénol pure et acétate eugénol diluées à 50% et 75% aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions

**Tableau 9** : Diamètres des zones d'inhibition en (mm).marquant la sensibilité de *Ps.aeruginosa* a l'eugénol pure et acétate eugénol diluées à 50% et 75% aux antibiotiques de références

|                      | Eugénol             | Acétyle eugénol 100%   | Acétyle eugénol 50%    | Acétyle eugénol 75%     | Amoxicilline           | Ampicilline           |
|----------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>Ps.aeruginosa</i> | 8±1,04 <sup>b</sup> | 6,33±0,89 <sup>c</sup> | 6,67±1,07 <sup>c</sup> | 12,83±7,57 <sup>a</sup> | 11,5±3,18 <sup>a</sup> | 9,1±3,26 <sup>b</sup> |
| Sensibilité          | -                   | -                      | -                      | +                       | +                      | +                     |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

(a,b,c) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

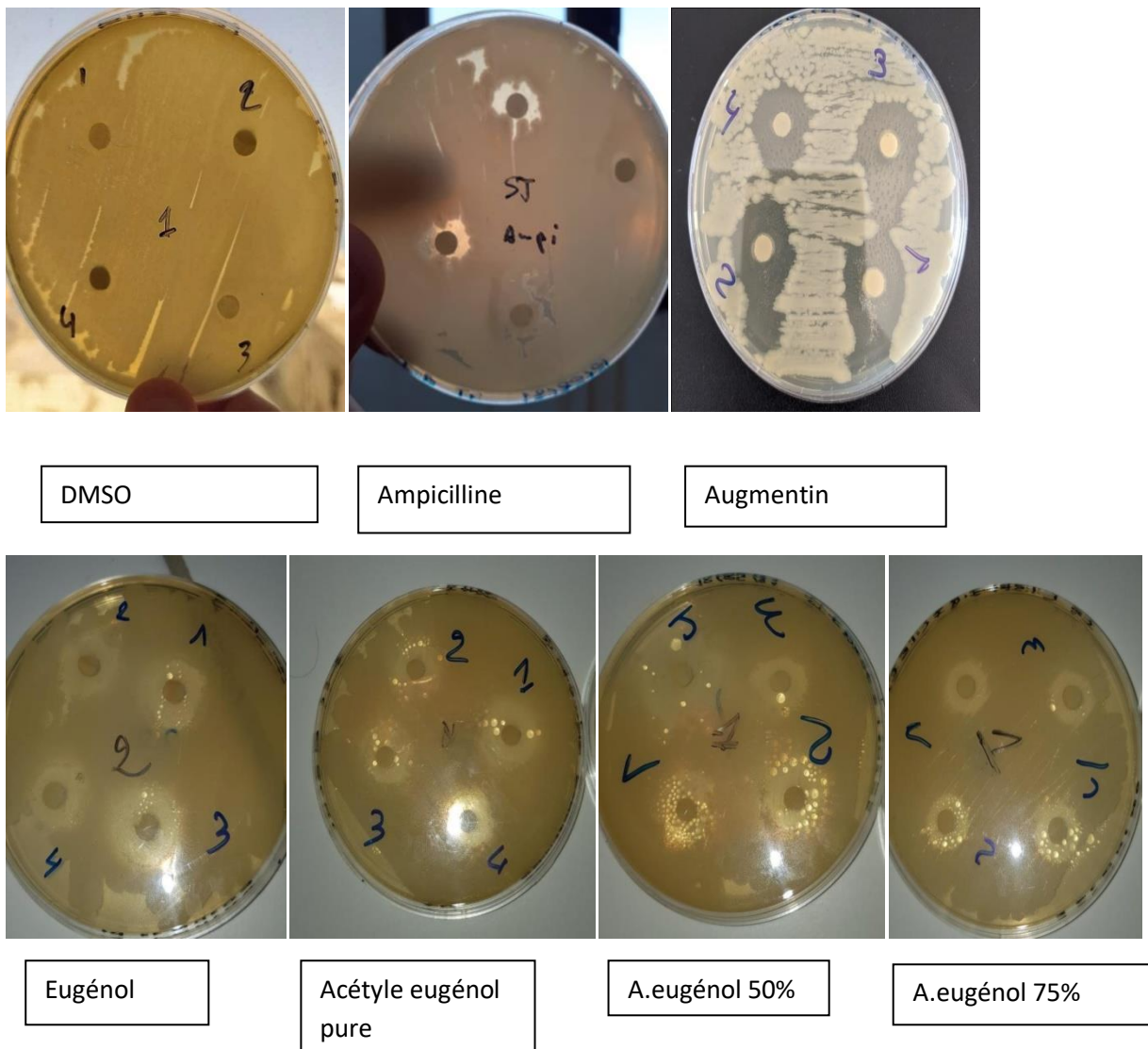
Sensible (+), Très sensible (++), Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Les diamètres en mm des zones d'inhibitions enregistrés qui étaient de 6,33±0,89, 6,67±1,07respectivement marqué par une résistance égale de *Ps.aeruginosa* à l'Acétyle eugénol pure, et dilué à 50% . Cette résistant et significativement moindre pour l'eugénol pure marquée par un diamètre d'inhibition égale à 8±1,04mm. Par contre les zones d'inhibitions étaient nettement plus importantes 6,67±1,07, 11,5±3,18, 9,1±3,26 sans différences significatives pour l'Acétyle eugénol 75% et l'Amoxicilline , et significativement inférieur pour l'ampicilline.

**Discussion**

Manifestement *Ps.aeruginosa* semble avoir une résistance à l'EugénoL, Acétyle eugénoL 100% et à Acétyle eugénoL 50%. Par contre la *Ps.aeruginosa* a manifesté une sensibilité à Acétyle eugénoL 75% plus importante que celle à l'amoxicilline et à l'Ampicilline de manière inégale.

**c-Comparaison des effets antibactériens des différents composants étudiés purs et dilués sur *S.aureus* et les antibiotiques de références.**



**Figure 21** : comparaison de la sensibilité de *S.aureus* à l'eugénoL pure et à l'acétate eugénoL dilués à 50% et 75%, aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions

**Tableau 10** : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité de *S.aureus* à l'eugénol pure et à l'acétate eugénol diluées à 50% et 75%, aux antibiotiques de références

|                 | Eugénol                 | Acétyle eugénol pure    | Acétyle eugénol 50%     | Acétyle eugénol75%      | Amoxicilline           | Ampicilline           |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>S.aureus</i> | 18,25±3,70 <sup>a</sup> | 16,42±1,98 <sup>a</sup> | 18,83±3,83 <sup>a</sup> | 16,92±2,75 <sup>a</sup> | 17,5±2,71 <sup>a</sup> | 8,5±2,51 <sup>b</sup> |
| Sensibilité     | ++                      | ++                      | ++                      | ++                      | ++                     | -                     |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

(a,b,c,d) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative ( $P < 0.05$ )

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Nos résultats enregistrent des zones d'inhibitions de diamètres très important marquées par les effets d'Eugénol, Acétyle eugénol pure, Acétyle eugénol 50%, Acétyle eugénol75% reportés respectivement 18,25±3,70, 16,42±1,98, 18,83±3,83, 16,92±2,75 comparable a celle marquée par l'amoxicilline 17,5±2,71 sans aucune différence significative. Par contre la zone d'inhibition marquée par l'ampicilline qui était de 8,5±2,51 significativement inférieur a celle relevées pour les substances naturelles.

### Discussion

Dans notre essai *S.aureus* a manifesté une très grande sensibilité à l'eugénol et à Acétyle eugénol pure et dilué a différentes concentrations qui peut dépasser quelques fois sa sensibilité a l'amoxicilline. Par contre le développement d'une résistance de *S.aureus* à l'Ampicilline nous parait très net.

5.4 Discussion générale

**Tableau 11** : diamètres des zones d'inhibition en (mm) marqué par la sensibilité des différents souches étudié aux HEs eugénoles et acétyl eugénoles pure et diluées.

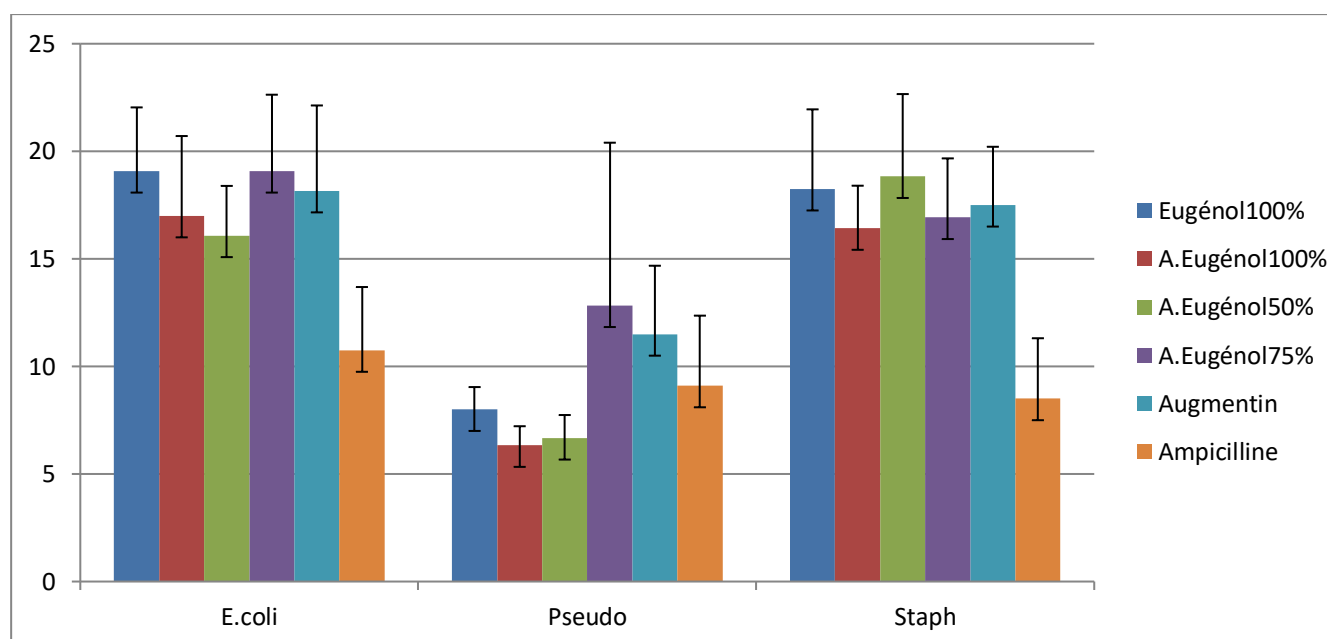
|                      | Eugénoles pure          | Acétate pure            | Acétate 50%             | Acétate 75%             | Amoxicilline            | Ampicilline             |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>E. coli</i>       | 19,08±2,96 <sup>a</sup> | 17±3,71 <sup>a</sup>    | 16,08±2,31 <sup>a</sup> | 19,08±3,55 <sup>a</sup> | 18,16±3,97 <sup>a</sup> | 10,75±2,49 <sup>b</sup> |
| <i>Ps.aeruginosa</i> | 8±1,04 <sup>b</sup>     | 6,33±0,89 <sup>c</sup>  | 6,67±1,07 <sup>c</sup>  | 12,83±7,57 <sup>a</sup> | 11,5±3,18 <sup>a</sup>  | 9,1±3,26 <sup>b</sup>   |
| <i>S.aureus</i>      | 18,25±3,70 <sup>a</sup> | 16,42±1,98 <sup>a</sup> | 18,83±3,83 <sup>a</sup> | 16,92±2,75 <sup>a</sup> | 17,5±2,71 <sup>a</sup>  | 8,5±2,51 <sup>b</sup>   |

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

(a,b,c,d) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)



**Figure 22:** Comparaison des effets antibactériens des différentes espèces pures et diluées de l'huile essentielle du clou de girofle à l'effet des antibiotiques de références sur les souches étudiées

nos résultats obtenus montre clairement l'effet bactéricide sur *E. Coli* de l'eugénol pure et de l'acétyl eugénol délué à 75% qui dépasse d'une façon très marquée l'effet de l'ampicilline. Cette même effet est aussi plus intéressant comparé à celui de l'amoxicilline.

La dilution des deux espèces réduit d'une façon négligeable l'effet inhibiteur des deux molécules à *E. coli*.

Alors que pour la souche *Ps aeruginosa*, l'acétyl eugénol à 75% a manifesté un effet antibactérien moins important que ce exercer sur *E. Coli*, mais qui dépasse d'une façon intéressante l'effet des deux antibiotiques de référence. Cette souche a manifestement développé une résistance accrue à ces substances chimiques.

Manifestement cette même souche exprime une sensibilité très faible à toutes les espèces contenues dans l'huile essentielle de girofle pures ou diluées.

Cette sensibilité est nettement révélée et marquée par les résultats insatisfaisants points de vue effet antibactériens recherché pour la souche *Ps aeruginosa*

Quand à l'effet antibactérien qu'il soit bactéricide ou inhibiteur de nos substances naturelles contenues dans l'huile essentielle du girofle sur *S. aureus*; manifestement l'eugénol et l'acétyl eugénol pures et diluées peuvent présenter un excellent alternatif aux antibiotiques de synthèse longtemps adoptés dans des stratégies thérapeutiques et préventives.

Cette intérêt est justifié par l'effet antibactérien sur la souche *S. aureus* qui dépasse d'une façon très marquée l'ampicilline qui manifestement a perdu son efficacité antibactérienne optimal à cause du développement d'une résistance de cette souche à cette antibiotique chimique.

Néanmoins, cet effet reste comparable à celui de l'amoxicilline. On en déduit que l'eugénol et l'acétyl eugénol pures et ou dilués présentent d'excellents alternatifs aux antibiotiques de synthèses pour lutter contre les infestations bactériens causées par *E. Coli* et *S. aureus*; nous permettant ainsi de faire face aux problèmes d'antibiorésistance d'une part et des effets secondaires dramatiques de la consommation excessive des antibiotiques de synthèse.

### 5.5 Conclusion générale

Les substances naturelles constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit. Le présent travail a porté sur l'effet antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* clou de girofle, notamment ces deux constituants principaux l'Eugénol et l'acétate eugénol. Pour l'obtention nos différents principes actifs, deux méthodes d'extractions ont été adoptées. La première l'hydrodistillation suivie par une extraction liquide-liquide dans le but de séparer les composants de l'huile essentielle du girofle. Il paraît que ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques. L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de *Syzygium Aromaticum* par la méthode des disques sur milieu solide MH a révélé que l'eugénol et l'acétyle eugénol possèdent un effet antibactérien qu'il soit lytique ou inhibant sur *les trois souches* : *E. coli* et *P. aeruginosa* et *S.aureus* marqué par zone d'inhibition importante révélant une très grande sensibilité des très souches cibles à nos substance naturelles. Cette sensibilité dépasse quelque fois celle aux antibiotiques de référence très souvent prescrits comme traitement en cas d'infestations bactériennes par ces souches pathogènes. Il serait donc intéressant et important de poursuivre les investigations en se focalisant sur d'autres extraits de cette épice miracle, voir même l'extraction de substances qui sous tendent les diverses activités détectées. De plus, des études approfondies concernant l'identification des composés par des méthodes plus performantes (CPG, CPG/SM) nous permettant d'optimiser leurs effets antibactériens et autres seront nécessaires. Et d'autres méthodes microbiologiques nous permettant une meilleure évaluation de l'activité Antibactérienne, d'autres études in Vitro et in Vivo s'avèrent intéressantes, et il serait souhaitable de faire d'autres essayes afin de dévoiler les autres activités biologiques de clou de girofle.



# **Référence bibliographique**

## 6. Référence bibliographique

- AFNOR, 1982** : Détermination des caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles Paris.P28
- Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006)**. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71(10), 1397-1421.
- Aili S**, se soigner par les plantes, Edition BERTI 1999 p 101.
- Alioua, M.A. (2015)**. Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Métricilline. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences. Université Badji Mokhtar – Annaba, Algérie. 223p
- André B et Jean\_paul. 1958**. Manuel de l'élève \_ infirmière. Edition médicales flammarion paris. P7-19.
- Aouadhi, S. (2010)**. Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. *Mém. Mas. En toxicologie, Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bachelot C, Blaise A, Corbel T, Guenie A**. Les huiles essentielles. Travail d'étude semestre 1 License de biologie Bretagne Nord 2006: p 5.
- 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.
- Barbelet., 2015**.le giroflier : historique, description et utilisation de la plante et de ses huiles essentielles. Vol5. P 22-26.
- Barnard J et Alain R.2002**. Entérobactéries systématiques et méthodes de diagnostic
- Belaiche P. traité de phytothérapie et l'aromathérapie, tome 1,l'aromatogramme.Paris Maloine Ed 1979 :136-144.**
- Bensallah R, araibi R**. Technique de séparation : cas de la CCM appliqué aux huiles essentielles de *Pistacia atlantica*. Mémoire de fin d'étude en biologie Université Djilalli Liabes Sidi Bel Abbes 2007 p 16.
- Bois, D., 1999**, Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges : histoire utilisation, culture. Ed. CME, Paris, Vol.3.
- Boudouda R**. « Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa* ». Mémoire de master : Génétique Moléculaire, Constantine: Université des Frères Mentouri Constantine.2015.
- Boussalah f.Z**.Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle d'*Artémisia arborescens* alpha (Chiba) de la région de Tlemcen -1990.
- Brodsky, C. M. (1976)**. The harassed worker. Lexington, MA: Lexington Books.
- Bruneton J** Pharmagnoise, phytochimie plantes médicinales, 2ème édition Lavoisier, technique et document 1993 p56-57.
- Bruneton J**. Pharmagnoise, phytochimie, plantes médicinales 2ème édition Lavoisier, technique et document 1990.
- Bruneton J**.Pharmagnoise, phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition Lavoisier, technique et document 1999 ;p484-479 ,507-511.
- Cahuzac-Picaud, M. (2012)**. Épices, herbes et aromates: usages culinaires et recettes. *Phytothérapie*, 10(2), 109-116.
- Cary.NC.SAS**. Statistical analysis systems user's guide: version 9.2. 2nd édition, SAS Institute, Inc 2008.
- Chacou M.et Bassou K., 2007**. Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata*Lisdue de la

région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: E.coli, Pseudomonasaeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis et Candida albicans. Mémoire de DES microbiologie, Université de Kasdi Merbah Ouargla, P.14-27.

**Chaieb K. , Hajlaoui H., Zmantar T., Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M. Mab-douani K. and Bakhrouf A. (2007)** The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L.Myrtaceae) a short review. *Phytother Res.* 21 501-506.

**Charles Soler, Patrick Gérôme, Stéphane Gidenne, Eric Hernandez, Françoise Ramisse, José Ramirez, Marc Grandadam.** Laboratoire de biologie médicale, Hôpital Bégin, 69, avenue de Paris, 2001.page 240-7.

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

**CLEMENT Pierre1981.** LIRDHIST, université Claude Bernard – Lyon I. PP 36-37.

**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.

**Coudere V.L.** Thèse pur l'obtention le garde de docteur vétérinaire à l'universite Paul-Sabatier de Toulouse 2001 p4-5.

**Da Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C., Silveira, N., Okazaki, M. M., & Gomes, R. A. R. (2018).** Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual. CRC Press.456p

**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.

**Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.

**Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. P, 128, 129-269.

**Dougnon, V. (2018).** Recherche de la Staphylocoagulase libre à partir du plasma d'animaux tropicaux: influence du type d'anticoagulant, de la température et de la durée de conservation Investigation of free Staphylocoagulase from tropical animal plasma: influence of anticoagulant type, temperature and preservation's length.

**Duraffourd J.C.Lapraz,** Séminaire sur l'aromathérapie Monastir, Mai 1997 Tunisie.

**Dweek AC (2002).** Natural ingredients for coloring and styling. *Int. J. Cosmet.. Sci.* 24: 1-16.

Ed. Grancher , 2013. Traité approfondi de phytoaromathérapie : avec présentation de 750 huiles essentielles connues.paris.

**El Abed D, Kambouche N.** Les huiles essentielles. Ed Dar El Gharb Oran 2003.

**Florence mayer (2012).** utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite p.11.

**Fouché J.G.,Marquet A.,et Hambuckers A.,(2000).**Les plantes médicinales de la plante au médicament.observatoire du monde des plantes sart-tilman.

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

**Franzetti L and Scarpellini M (2007).** Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology.* 57(1): 39-47.*Immunol*, 322: 249- 289.*Interface•, Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85.

**Frey, P., Chavatte, M., Clause, M. L., Courier, S., Le Roux, C., Gloria, G., Botelho, R and Ieda cristina, H. (2006).** Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology.* 37:401-416.

- 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.
- Ghedira K., Goetz P. and Le Jeune R. (2010).** *Syzygium Aromaticum* (L.) Merr.& Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie*; 8: 37-43.
- Ghesten A. Seguin-Ssantarmarial L., et al.** Clinical trial of cecropia obtusifolia and marrubium vulgare leaf extracts o blood glucose and serumlipids in type 2 diabetics *Photomedicine*. 2.
- Goetz P. and Le Jeune R. (2010).***Syzygium Aromaticum* (L.) Merr.& Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie* 8:37-43.
- Guillaume VIEU., 2014.** Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants, Université Toulouse, 107p.
- Hamadou, F., & Touki, S. (2017).** Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices: Girofle, Poivre Noir.
- Hameurlaine S. (2009).** Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaïa.
- Hamoudi R., 2008.** Contribution à la mis en évidence de principes actifs de plantes *Teurimpoliu geryriprovonant* de la région Tamanrasset Magister universite Kasdi Merbah Ouargla, P 15-43.
- Henrioud, Lausanne (juillet 2005)**<http://www.se-soigner.net/indexe.htm/> page consultée le 14.04.2010.
- Hermal,1993 in Pibiri M.C.** Assainissement microbiologique de l'aire et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielle, thèse de docteur ès sciences 2005 :161pp.
- Hernandez Ochoa L.R.(2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné solvant/actif » d'origine végétale Thèse de doctorat en agroressources. Institut National Polytechnique. Toulouse.
- Jean-Marie Polese, Simone Devaux., 2001.**Plantes aromatiques et condimentaires .
- Kaabache Z.** Extraction et analyses par chromatographique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Essais de fractionnement thèse d'ingénieur ENP Alger, 1988.
- 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.
- Kim H.M., Lee E.H., Hong S.H., Song H.J., Shin M.K., Kim S.H. and Shin T.Y. (1998).** Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *J. Ethnopharmacol*; 60: 125 131.
- Kozam G. (1977).** The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg Oral Med Oral*
- KrishnaA., & Banerjee, A. (1999).** Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytotherapy research*, 13(7), 616-618.
- Kumar, P., Jaiswal, P., Singh, V. K., Singh, D. K., & Singh, D. (2011).** Medici al, therapeutic ad 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. Thèse de doctorat en agroressources. Institut National Polytechnique. Toulouse.
- Lattaoui, 1989.** Pouvoir antimicrobien des HE trois espèces de thym a profile chimique différent thèse de doctorat 3 siècle en microbiologie.

- Lucchesi M.E. (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en chimie. Faculté des Sciences et Technologies. Université de la Réunion.
- Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja, J. (2004).** Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A*, 1043, 323-327.
- Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja, J. (2004).** Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A*, 1043, 323-327.
- Mailhebiau P, SOULIER JM, AZEMAR J. , 1992** Collège d'aromathérapie Philippe Mailhebiau : étude et prescription de la médecine aromatique ; 163 p.
- Mailhebiau P. ,1989.** La nouvelle aromathérapie : caractérolgie des essences et tempéraments humains. Toulouse : Ed. Nouvelle Vie ; 372 p.
- Maisonneuve S.A ,2004.** DIRECTION DE LA QUALITE DU MEDICAMENT DU CONSEIL DE L'EUROPE. Pharmacopée Européenne. 5e éd. Sainte-Ruffine .
- Mazerolles, C. (2008).** giroflier.
- 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.
- Nostro A, Marino A, Blanco AR, Cellini L, Di Giulio M, Pizzimenti F, Sudano Rocco A, Bisignano G (2009)** In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *J Med Microbiol* 58:791–7.
- Nouri H. Bekhada M.** Contribution à l'étude physicochimique et microbiologique d'huile essentielle de *Lavandula officinalis*. Mémoire d'ingénieur 2006.
- Olin Tudge.2000.** The variety of life, oxford university press.
- Palleroni N.** Manual of Systematic Bacteriology. USA. 1984;141–171.
- Palleroni, N.J.(1984)** .Genus I. *Pseudomonas* Migula 237 AL (n. m. cons. opin. Peix, A., RamírezBahena, M.H., and Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, 9: 1132–1147. *Pathol*: 44: 799-805.
- Pauli A (2006)** .Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils *Med Res Rev* 26-223-268.
- Pibiri M.C.** Assainissement microbiologique de l'aire et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, thèse de docteur ès sciences 2005 :161pp.
- Pierron C. (2014).** Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs. Thèse de doctorat en pharmacie, Université de lorraine, 19-30.
- Pillet J., L.Bourdo B., Toma N., Ball.c.1986.** Bactériologie médicale et vétérinaire.
- Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. & ROURA S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, 36, 679-684.
- Pouneh K.** « Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing ». Thèse de doctorat : Microbiologie: Université de Toulouse. 2009

- Rakotoatimanana, B.V. et al., 1999.** « Contribution à l'optimisation d'une unité de production d'huiles essentielles », mémoire de fin d'études, Département Génie Chimique, Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo ESPA, Université d'Antananarivo.
- 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.
- Regnier, 2005 in Pibiri M.C.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, thèse de docteur es sciences 2005 161 pp.
- Richter G.** Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie presses polytechniques et universitaires Romandes, 1993 p 292.
- Saeed, S., & Tariq, P. (2008).** In vitro antibacterial activity of clove against Gram negative bacteria. *Pak. J. Bot*, 40(5), 2157-2160.
- Salle J, L et Pelletter 1991.** Le totun en phytothérapie approche phytobiothérapie de paris p 9,238.
- Samate, A.D. (2001).** Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina faso :Valorisation.Thèse de doctorat Université Ouagadougou. Burkina Faso.
- Schechter A., (2008).**Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* ; 112 .p3927-38.
- Staub H, Bayer L. 2013.** Traité approfondi de phytoaromathérapie : avec présentation de 750 huiles essentielles connues. Paris: Ed. Grancher ; 750 p.
- Teuscher E., Anton R.,et Lobstein A., (2004).** Plantes aromatiques: Epices, aromates condiments et huiles essentielles. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- Valnet J.** Aromathérapie: traitement des maladies par les essences des plantes. Paris Maloine Ed 1983: p525.
- Werner M, Von Braunschweig R. ,2008.** L'aromathérapie : principes, indications, utilisations. Paris : Ed. Vigot ; 334 p.
- Werthiem H. F. L., Melles D. C., Vos M. C., Van Leeuwen W., Van Belkum A. et Verbrugge H. A., 2005.** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infection. *Lancet Infect. Dis.* 5(12).
- Wichtl, M., & Anton, R. (2003).** Plantes thérapeutiques, EMInter/Tec & Doc éditions, Paris, 119- 121.
- Wie.M.B., Won M.H., Lee K.H, Shin H., Lee J.C., Suh H.W., Song D.K and Kim Y.H. (1997)** Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures *Neurosci. Lett.*; 225: 93-96.
- Wild Wood. C,** L'aromathérapie les bienfaits des HE en quotidien Paris, Ed 1996 :p12,15,19.
- Yaici N.** Extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Thèse d'ingénieur ENP Alger. 1987.
- yhiouche H.** Fractionnement et l'étude analytique d'une huile essentielle d'*eucalyptus globulus*. 1990.
- Zheng, G.Q. Kenny, P.M and Lam K.T., 1992.** Sesquiterpens from clove ( *Eugenita caryophyllata*) as potentiel anticarcinogenic agent, *J.Nat.Prod*, vol 55. p 999-1003.