



République Algérienne Démocratique Et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère De L'Enseignement Supérieure et De La Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Djilali Bounaama de Khemis-Miliana

جامعة الجيلالي بونعاما خميس مليانة

Faculté des Science de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département de : Biologie

Mémoire de Fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum L*

Présenté par : Boukartaba Halima

Hammoum Karima

Soutenu le : 17/07/2019

Devant le jury composé de :

Promotrice : Mme Abdelli W..... MAB UDBK

Président : Mr Aoun O..... MCA UDBK

Examineur : Mme Zouadi N..... MAA UDBK

Année Universitaire : 2018-2019

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

À ceux qui ont légué un sens à mon existence, en me donnant une éducation irréprochable, ceux qui m'ont appuyé nuit et jour durant mon parcours ; à vous mes très chères parents, qui se sacrifient pour moi et pour lesquels je dois le mérite, pour ce qui je suis devenu aujourd'hui.

A mes chers, mon mari, frères et soeurs : pour votre soutien moral et encouragements vous m'avez appris la patience et la concentration sur mon travail. Je vous souhaite un avenir plein d'amour, de bonheur et de succès. Je vous aime beaucoup.

A mes amis (es) : A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

A mon binôme Karima Je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail, Je vous dédie le fruit de nos efforts.

HALIMA



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A ma mère, mon père et mon mari

En reconnaissance des sacrifices qu'ils se sont imposés pour ma réussite dans les études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde affection.

A mes sœurs, mes frères et mes amis

Pour tout le soutien matériel et moral qu'elles ne cessent de m'apporter. A eux, j'exprime ici toute ma gratitude et ma franche reconnaissance.

A mon binôme Halima

Je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail, Je vous dédie le fruit de nos efforts

KARIMA



Remerciements

Nos remerciements vont tout premièrement à Dieu tout puissant pour la santé, la volonté et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces années d'études.

*Nos remerciements et nos profondes considérations vont d'une façon toute particulière à notre encadreur **Mme Abdelli W** de nous avoir accordé l'honneur de diriger ce travail en donnant des critiques et des commentaires sur ce mémoire avec lesquelles nous éclairer. Veuillez agréer, l'expression de notre profond respect.*

*Un grand et respectueux remerciement à **Mr Aoun O** d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.*

*Un grand remerciement à **Mme Zouadi N** pour leur présence nécessaire et utile au sein du jury et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous remercions l'ensemble de l'équipe des laboratoires pédagogiques pour leur aide et leur disponibilité qui nous a facilité l'intégration dans le milieu de la pratique, nous leur exprimons notre sincère gratitude.

Et enfin, un grand merci à tous ceux qui nous ont aidé de loin ou de près pour accomplir ce modeste travail.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري من *Syzygium aromaticum* . كشف الزيت المستخلص بواسطة التقطير المائي عن مردود قدره 2.96%.

أظهر Antibiogram أنه من بين المضادات الحيوية الثمانية المستخدمة، كان فقط الجنتاميسين ، والبوليمكسين B والكلورامفينيكول ، فعالين ضد السلالات البكتيرية الثلاث التي تم اختبارها *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 و *Bacillus cereus* ATCC 10876 . وقد تبين أن هذه الأخيرة هي الأكثر حساسية. تم تسجيل أكبر قطر منطقة تثبيط في 35 مم.

أظهر Antifongigram أن *Candida albicans* ATCC 10231 كانت شديدة الحساسية للإيكونازول وكلوتريمازول بأقطار 22 مم و 15 مم.

أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري ل *Syzygium aromaticum* بطريقة الأروماتوغرام أنه كان له تأثير مثبط على جميع السلالات الميكروبية. الأكثر حساسية هي *Candida albicans* ATCC 10231 و *Bacillus cereus* ATCC 10876 ، وأقطار مناطق تثبيط 35 ملم و 30 ملم، على الترتيب .

الكلمات المفتاحية :

Syzygium aromaticum ، زيت عطري ، التقطير المائي، نشاط مضادات الميكروبات ، الأروماتوغرام.

Résumé

Ce travail vise à évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. L'huile extraite par hydrodistillation a révélé un rendement de 2.96%

L'antibiogramme nous a permis de constater que parmi les huit antibiotiques utilisés, seuls la gentamicine, la polymyxine B et le Chloramphénicol, étaient actifs contre les trois souches bactériennes testées *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 et *Bacillus cereus* ATCC 10876. Cette dernière s'est avérée être la plus sensible. Le plus grand diamètre de zone d'inhibition a été enregistré à 35 mm.

L'antifongogramme a montré que *Candida albicans* ATCC 10231 était très sensible à l'éconazole et au clotrimazole avec des diamètres respectifs de 22 mm et 15 mm.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* par la méthode d'aromatogramme, a montré qu'elle avait exercé un effet inhibiteur sur toutes les souches microbiennes. Les plus sensibles sont *Candida albicans* ATCC 10231 et *Bacillus cereus* ATCC 10876, les diamètres des zones d'inhibition sont de 35mm et 30mm, respectivement.

Mots clés :

Syzygium aromaticum, huile essentielle, hydrodistillation, activité antimicrobienne, aromatogramme.

Abstract

This work aims to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. The oil extracted by hydrodistillation revealed a yield of 2.96%

The antibiogram showed that among the eight antibiotics used, only gentamicin, polymyxin B and Chloramphenicol, were active against the three bacterial strains tested *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 and *Bacillus cereus* ATCC 10876. This last proved to be the most sensitive. The largest inhibition zone diameter was recorded at 35 mm.

Antifungigram showed that *Candida albicans* ATCC 10231 was highly sensitive to econazole and clotrimazole, with respective diameters of 22 mm and 15 mm.

The evaluation of the antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* essential oil by the aromatogram method, showed that it had an inhibitory effect on all microbial strains. The most sensitive one are *Candida albicans* ATCC 10231 and *Bacillus cereus* ATCC 10876, the diameters of the inhibition zones are 35mm and 30mm, respectively.

Keywords :

Syzygium aromaticum, essential oil, hydrodistillation, antimicrobial activity, aromatogram.



Remerciements

Nos remerciements vont tout premièrement à Dieu tout puissant pour la santé, la volonté et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces années d'études.

*Nos remerciements et nos profondes considérations vont d'une façon toute particulière à notre encadreur **Mme Abdelli W** de nous avoir accordé l'honneur de diriger ce travail en donnant des critiques et des commentaires sur ce mémoire avec lesquelles nous éclairer. Veuillez agréer, l'expression de notre profond respect.*

*Un grand et respectueux remerciement à **Mr Aoun O** d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.*

*Un grand remerciement à **Mme Zouadi N** pour leur présence nécessaire et utile au sein du jury et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous remercions l'ensemble de l'équipe des laboratoires pédagogiques pour leur aide et leur disponibilité qui nous a facilité l'intégration dans le milieu de la pratique, nous leur exprimons notre sincère gratitude.

Et enfin, un grand merci à tous ceux qui nous ont aidé de loin ou de près pour accomplir ce modeste travail.

Table des matières

Table des matières

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction général	
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Généralités sur Les huiles essentielles	
I.1- définition	2
I.2- Localisation et lieu de synthèse	2
I.3- Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	4
I.4- Rôle physiologique	5
I.5-Composition chimique	5
I.5.1- Composés terpéniques	5
I.5.2- Les composés aromatiques	6
I.5.3-Les composés d'origines diverses	7
I.5.4- Le chémotype	7
I.6- Les facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles	7
I.7- Domaines d'application	7
I.7.1- Agroalimentaire et agriculture	7
I.7.2- médecine (aromathérapie)	8
I.7.3- Pharmacie	8
I.7.4- Cosmétologie et parfumerie	9
I.8- Méthodes d'extraction des huiles essentielles	9
I.8.1- La distillation	9

I.8.1.1- Hydrodistillation	10
I.8.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau	10
I.8.2- Hydrodiffusion	11
I.8.3- Extraction à froid	12
I.8.4- Extraction par les solvants organiques	12
I.8.5- L'enfleurage	13
I.8.5.1- L'enfleurage à froid	13
I.8.5.2- L'enfleurage à chaud	13
I.8.6- Extraction assistée par micro-ondes	14
I.8.7- Extraction par du CO2 supercritique	14
Chapitre II : <i>Syzygium aromaticum</i>	
II- La famille des Myrtacées	16
II.1- Le genre <i>Syzygium</i>	16
II.1.1- Le clou de girofle (<i>Syzygium aromaticum L</i>)	16
II.1.1.1- Description morphologique	16
II.1.1.2- Classification	19
II.1.1.3- Nomenclature de la plante	19
II.1.1.4- Habitat	20
II.1.1.5- Répartition géographique	20
II.1.1.6- Composition chimique	20
II.1.1.7- Usages de <i>Syzygium aromaticum L.</i>	21
II.1.1.7.1- Usages anciens et actuels	21
II.1.1.7.2- Intérêt en phytothérapie	21
II.1.1.7.3- Usage médical	21
II.1.1.7.3.a- Traitement buccodentaire	21
II.1.1.7.3.b- Antispasmodique	21
II.1.1.7.3.c-Stimulant physique et intellectuel	21

II.1.1.7.4- Autres utilisations	22
Chapitre III :	
Activités biologiques des huiles essentielles	
III- Activités biologiques des huiles essentielles	23
III.1- Activité antibactérienne	23
II.1.1- Mode d'action antibactérien des huiles essentielles	24
II.1.2- Activité antifongique	25
III.1.2.1- Mode d'action anti fongique	25
III.2- Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de clou de girofle	25
III.2.1-Activité antibactérienne	25
III.2.2-Activité antifongique	26
PARTIE EXPERIMENTALE	
Chapitre I :	
Matériel et méthode	
I.1- Matériel végétal	27
I.2- Huiles essentielles	27
I.2.1- Technique d'extraction	27
I.2.2 Calcul du rendement	28
I.3- Procédés d'étude microbiologique	29
I.3.1- Souches testées	29
I.3.2- Milieux de culture utilisés	29
I.3.3. Préparation de l'inoculum	29
I.3.4- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques	30
I.3.5- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle	30
I.3.5.1- Technique d'aromatogramme (méthode de Vincent)	30
Chapitre-II-	
Résultats et discussions	

II.1- Description de l'huile essentielle de <i>syzygium aromaticum</i>	32
II.2- Rendement en huile essentielle	32
II.3- Etude de l'activité antimicrobienne	33
II.3.1- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens	33
II.3.2- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle du clou de girofle	36
Conclusion général	41
Références bibliographiques	43
Annexes	52

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
1	Cellule sécrétrice d'une huile essentielle dans un rhizome de gingembre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe) au microscope électronique à balayage	2
2	Poils sécréteurs présents sur la face inférieure d'une feuille de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) au microscope électronique à balayage	2
3	Poches schizogènes d'une feuille d'eucalyptus citronné vues en microscopie électronique à balayage	3
4	Exemple de composés terpéniques	5
5	Exemple de composés aromatique	6
6	Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	10
7	Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau	11
8	Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion	12
9	Schéma du principe de la technique d'extraction assistée par micro-ondes	14
10	Le montage d'extraction par le CO ₂ supercritique	15
11	Allure d'un giroflier de Madagascar	17
12	Feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleur verte du giroflier	17
13	Structure de Giroflier	18
14	Boutons floraux et fleurs (de giroflier)	18
15	<i>Syzygium aromaticum</i> . (Girofle)	18
16	Mode d'action antibactérien des huiles essentielles	24
17	Les clous de girofle utilisés pour l'extraction de l'huile essentielle	27
18	Dispositif d'extraction des huiles essentielles de type Clevenger	28
19	Les résultats de l'antibiogramme de <i>Bacillus cereus</i> ATTC 10876	34
20	Les résultats de l'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	35
21	Les résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	35
22	Les résultats de l'antifongigramme de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	36

23	La sensibilité de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	37
24	la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	38

Liste des tableaux

1	Liste des souches microbiennes testées	29
2	La liste des antibiotiques utilisés	30
3	Description de l'huile essentielle	32
4	Rendement en huile essentielle	32
5	Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques exprimés par le diamètre de la zone en mm	33
6	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du clou de girofle exprimés par le diamètre de la zone en mm	36

Liste des abréviations et symboles

% : Pourcentage

µl : microlitre

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC: American Type Collection Culture

HE: huile essentielle

MH: milieu de Mueller Hinton

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards.

O.M.S : Organisation Mondiale de la santé

RESALA : Recherche en Sciences Appliquée Alimentation

UFC : Unité Formant des Colonies

Introduction

Introduction

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire **(OMS, 2002)**. Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine, et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies, ont été constatés. Aussi, l'émergence de la résistance microbienne aux antibiotiques suite à l'utilisation massive et parfois abusive de ces derniers, est devenue un réel problème de santé publique **(Hemaiswarya et al., 2008)**. Ceci a poussé les recherches thérapeutiques vers des solutions alternatives, notamment la pharmacologie phytofilère et, en particulier, l'aromathérapie, source importante de médicaments potentiels grâce à leur richesse en métabolites secondaires (huiles essentielles, alcaloïdes, polyphénols...etc) **(Girard, 2010)**.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au giroflier (*Syzygium aromaticum*). Cette plante médicinale est utilisée traditionnellement, sa richesse en métabolites secondaires et plus spécifiquement en huile essentielle, confère plusieurs effets biologiques dont les activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticancéreuses et antioxydantes, cependant, peu de personnes connaissent ses véritables propriétés. Les recherches sur l'histoire de cette plante montrent que les clous de girofle avaient autrefois beaucoup plus de valeur, dès leur essor durant les Grandes découvertes qui ont engendré le commerce des épices. Cette épice a su motiver plusieurs nations à partir à sa conquête et cela pendant plusieurs siècles **(Kacemi, 2017)**.

Notre travail a pour objectif d'extraire l'huile essentielle de l'espèce *Syzygium aromaticum* et d'évaluer son activité antimicrobienne. Ce travail est scindé en deux parties. La première est une compilation des connaissances bibliographiques, elle-même, composée de trois chapitres. Le premier présente des généralités sur les huiles essentielles, le deuxième s'intéresse à la description botanique de la plante étudiée, tandis que le troisième, aborde les activités biologiques des huiles essentielles. La deuxième partie du travail est expérimentale. Elle est composée de deux chapitres. Le premier illustre le matériel et les méthodes utilisés, le second présente et discute l'ensemble des résultats obtenus. Enfin, ce manuscrit est achevé par une conclusion générale et des perspectives pour l'ensemble du travail.

Partie
bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les huiles essentielles

I- Les huiles essentielles

I.1- Définition

Les huiles essentielles désignent les composants liquides, odorants et hautement volatiles des plantes. Elles sont obtenues à partir de différentes parties de la plante telles que, les feuilles, les bourgeons, les fleurs, les graines, les écorces, les racines et les fruits, mais aussi, à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres et parfois des troncs même (**Kone, 2001**).

L'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 2000**), a défini les huiles essentielles comme étant des produits obtenus à partir de matières premières d'origine végétale, soit par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir de l'épicarpe par des procédés mécaniques et qui sont séparés, ensuite, de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires composés en moyenne de 20 à 60 composés peu complexes, contenant plusieurs familles biochimiques. Elles ne contiennent aucun corps gras et n'ont de commun avec les huiles fixes ou végétales que leur aspect physique et leur comportement apolaire (**Bastien, 2008**).

I.2- Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis dans une cinquantaine de familles botaniques parmi lesquelles les Lamiacées, les Astéracées, les Rutacées, les Cannelacées, les Lauracées, les Myrtacées et les Zingibéracées (**Bruneton, 1999**). Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes: fleurs (rose), feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vetiver), rhizomes (curcuma, gingembre), fruits (anis, badiane) et graines (muscade). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des (Lauracées ou des et Zingibéracées), poils sécréteurs (Lamiacées, Geraniacées et Rutacées), poches sécrétrices (Myrtacées, Auranthiacées et Rutacées), canaux sécréteurs des (Apiacées, Ombelliferacées et Astéracées) (**Sangw et al., 2001**).

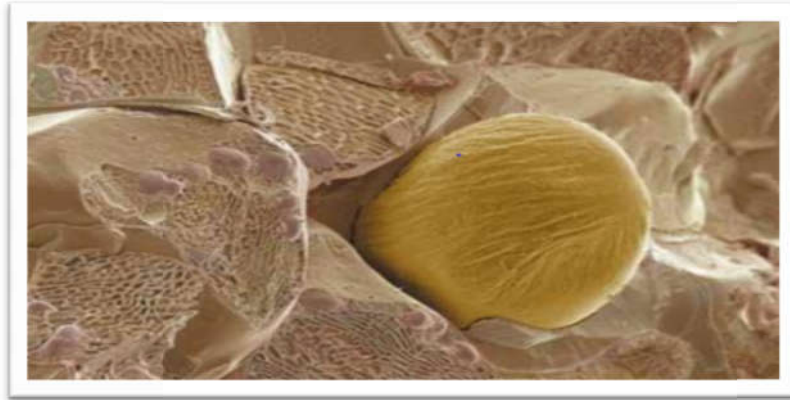


Figure n°1 : Cellule sécrétrice d'une huile essentielle dans un rhizome de gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe) au microscope électronique à balayage (x813) (Svoboda, 2000)



Figure n°2 : Poils sécréteurs présents sur la face inférieure d'une feuille de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) au microscope électronique à balayage (x504) (Howard, 2007)

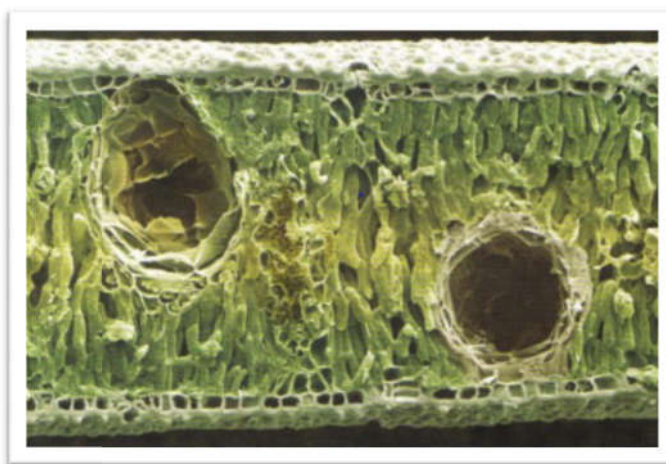


Figure n°3 : Poches schizogènes d'une feuille d'*Eucalyptus* citronné vues en microscopie électronique à balayage (x204) (Svoboda, 2000)

I.3- Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante. Il existe cependant des exceptions, par exemple, l'huile est visqueuse chez la myrthe, pâteuse pour le bois de gaïac, solide pour le cèdre de Virginie ou parfois la rose, ou encore, un mélange solide-liquide lorsqu'elle est extraite de la badiane (**Fernandez et al., 2012**).

Les huiles essentielles sont lipophiles et donc très peu solubles dans l'eau, certains composants le sont cependant, comme par exemple la verbénone du romarin. Certains composants sont même très hydrosolubles et favorisent l'apparition d'émulsion dans le produit de distillation lors de l'extraction. C'est, entre autre, le cas de l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan. Par ailleurs, la solubilité des huiles essentielles est très grande dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques, et est totale dans les huiles grasses (**Franchomme et al., 2001**).

Les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les rend entraînaibles à la vapeur et particulièrement odorantes. Ce caractère les différencie des huiles végétales grasses ou « fixes ». Si ces dernières laissent des taches indélébiles, la trace laissée par une huile essentielle tendra à disparaître plus ou moins rapidement. La volatilité étant très liée à la composition chimique, les monoterpènes sont par exemple beaucoup plus volatiles que les sesquiterpènes (**Kaloustian et al., 2012**).

La densité d'une huile essentielle est très souvent inférieure à 1 sauf pour les huiles essentielles de saffran (*Sassafras albidum*), de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) et de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) (**Bruneton, 1999 ; Desmares et al., 2008**).

La plupart des huiles essentielles ont une couleur jaune presque imperceptible. Elles foncent au court de leur vieillissement (oxydation). Dans certains cas extrêmes, les huiles essentielles vieilles et oxydées présentent un risque toxique important (**Franchomme et al., 2001 ; Kaloustian et al., 2012**).

Les huiles essentielles sont actives sur la lumière polarisée de manière très variable en fonction de la nature et de la concentration des différentes molécules chirales qu'elles contiennent (**Faucon, 2012 ; Fernandez et al., 2012**). L'indice de réfraction est généralement élevé. On peut donner comme exemple, l'huile essentielle d'écorce de cannelier (*Cinnamomum verum* J.Presl.) dont l'indice de réfraction est compris entre 1,573 et 1,591 (**Franchomme et al., 2001 ; Fernandez et al., 2012**).

I.4-Rôle physiologique

L'existence des huiles essentielles dans les végétaux, même si leur fonction n'est pas toujours précisément connue, répondrait aux besoins d'une protection spécifique des espèces en fonction de leur environnement (**Couic-marinier, 2013 ; Laurent, 2017**). En effet, en raison de leur immobilité, les plantes utiliseraient ces métabolites pour repousser les parasites et assurer leur protection contre certaines maladies et ce, grâce à leurs propriétés antifongiques, antivirales, antibactériennes ou insectifuges. Elles se défendent également contre d'autres plantes, par exemple, *Erica cinerea*, la bruyère cendrée diffuse des substances télotoxiques afin d'éviter la pousse d'autres végétaux à proximité (une lande de bruyère ne comporte aucune autre végétation). Elles attirent, au contraire, les insectes pollinisateurs (fleurs parfumées, fécondées par certains insectes butineurs) et permettent ainsi, à la plante d'assurer sa reproduction. Elles aideraient à guérir diverses blessures et attaques auxquelles elles y sont soumises (**Dunstan et al., 2013**).

Les huiles essentielles pourraient également permettre aux plantes de communiquer entre elles. Par exemple, une plante attaquée par un herbivore pourrait envoyer des signaux d'alerte (substances volatiles comme hexénal ou l'ocimène) aux autres plantes du secteur pour lesquelles déclenchent des mécanismes de défense et représentent aussi une réserve d'énergie mobilisable (ex: en cas de conditions climatiques défavorables) (**Dunstan et al., 2013**).

I.5- Composition chimique

D'une manière générale, les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants appartenant à différentes familles chimiques. Les plus couramment représentées sont les terpénoïdes et les composés aromatiques, mais on y trouve également des constituants aliphatiques issus de la synthèse des acides gras et plus rarement d'autres composants d'origines diverses (dérivés soufrés, nitriles, thiocyanates...etc) (**Nyegue, 2005**).

I.5.1- Composés terpéniques

Les terpènes sont largement rencontrés dans les huiles essentielles qu'ils aient des structures très diverses, ils sont tous formés par la réunion d'unités isopréniques (C_5H_8) (**Buchbauer, 2010**). On distingue ainsi selon le nombre de carbone constituant les molécules de ce groupe: les hémiterpènes (1 unité: C_5), les monoterpènes (2 unités: C_{10}), les sesquiterpènes (3 unités: C_{15}), les diterpènes (4 unités: C_{20}), les sesterpènes (5 unités: C_{25}), les triterpènes (6 unités: C_{30}), les tétraterpènes (8 unités: C_{40}) et les polyisoprènes (n unités: C_{5n}). Les terpènes

les plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée tels que les mono (C_{10}) et les sesquiterpènes (C_{15}) (Couic-Marinier, 2013 ; Lobstein, 2013). Les (C_{10}) constituent à eux seuls environ 90% des huiles essentielles (Bakkali *et al.*, 2008) .

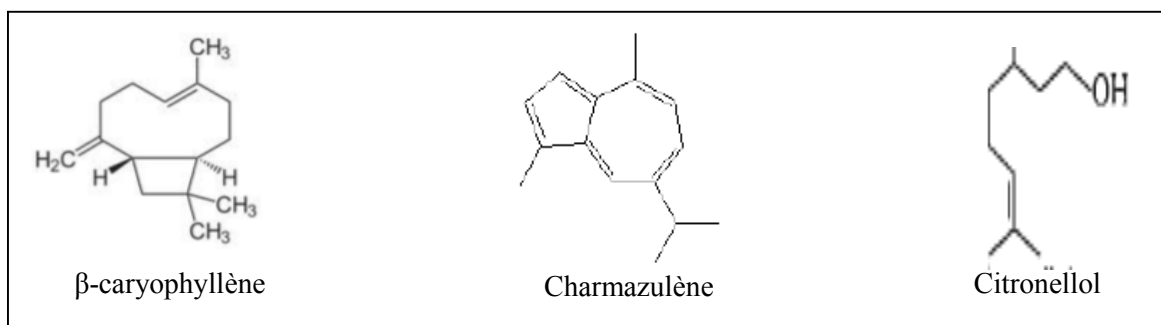


Figure n° 4 : Exemples de composés terpéniques (Bakkali *et al.*, 2008)

Les dérivés oxygénés des terpènes sont appelés terpénoïdes. Une grande variété de structures les caractérisent selon le nombre de carbones présents, le caractère saturé ou insaturé des liaisons, la configuration spatiale (forme de chaise, bateau...) et la nature du groupe fonctionnel (Bakkali *et al.*, 2008).

I.5.2- Les composés aromatiques

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane C_6-C_3 . Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et peuvent comprendre des phénols (chavicol, eugénol), des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des dérivés méthoxy (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, saffrole) (Bakkali *et al.*, 2008).

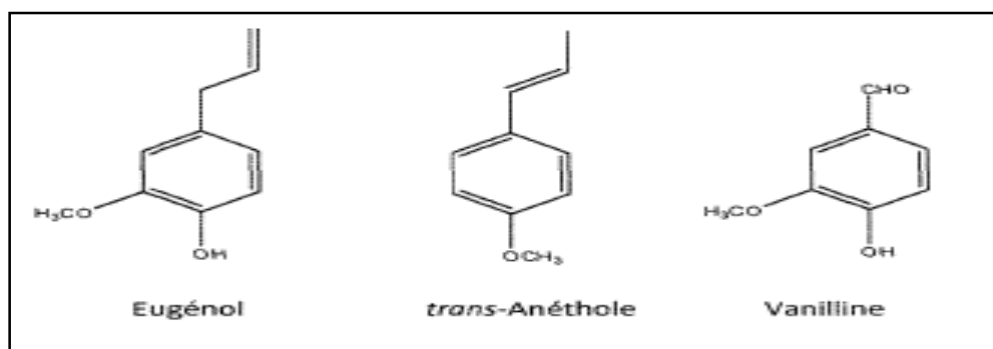


Figure n°5: Exemples de composés aromatique (Bakkali *et al.*, 2008)

I.5.3- Les composés d'origines diverses

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés (**Teisseire, 1991**). Les alcools (menthol, géraniol, linalol) ; les aldéhydes (géraniol, citronellal), les cétones (camphre, pipéritone), les phénols (thymol, carvacrol), les esters (acétate de géranyle), les acides (acide gérannique) et les oxydes (1,8-cinéole). Des composants azotés ou soufrés tels que les glucosinolates ou des dérivés d'isothiocyanate sont également caractéristiques des métabolites secondaires de diverses plantes. A titre d'exemple, les composés soufrés sont majoritairement présents dans les huiles essentielles des plantes de la famille des Alliées (**Iranshahi, 2012**). On trouve aussi des composés issus de la dégradation d'acides gras tels que les irones cétones en C₁₄ (**Georgetti et al., 2003**).

I.5.4- Le chémotype

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris*. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire qui peut être soit le géraniol, l'exterpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol ou le thymol (**Thompson et al., 2003**). Ce polymorphisme chimique existe aussi pour d'autres espèces: *Origanum vulgare* (**Mockute et al., 2001**), *Mentha spicata* (**Edris et al., 2003**).

I.6- Les facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement dans une même plante selon différents facteurs tels que, les organes (feuilles, fleurs, fruits, bois), le stade végétatif, le site et la saison de récolte, les conditions de culture (ensoleillement, humidité, fertilité du sol), le chémotype (**Fantino, 1990**) mais aussi, selon les méthodes d'extraction utilisées et les conditions de stockage et de séchage (**Carette, 2000**).

I.7- Domaines d'application

I.7.1- Agroalimentaire et agriculture

Les huiles essentielles ou leurs composés actifs peuvent être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (**Zambonelli et al., 1996**), et les

microorganismes envahissant les denrées alimentaires Les huiles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétale-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs. En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores, les rongeurs et les insectes ravageurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles (**Kumar et al., 2011**).

Les huiles essentielles et leurs composants peuvent également être utilisés comme arôme alimentaire, et sont pour la plupart classés comme GRAS « généralement reconnu comme sains » (generaly recongnized as safe), aussi bien dans le secteur salé, que sucré (alcools, boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, produits carnés, sauces, soupes, snacks, produits de boulangerie). Elles font partie des préparations aromatisantes naturelles pour conférer une odeur et un goût aux denrées alimentaires (**Mascret, 2010**). Elles peuvent aussi être utilisées pour conserver les aliments et diminuer leur altération et pour prévenir et contrôler la croissance des microorganismes (**Tajkarimi et al., 2010**). Par exemple, les huiles essentielles du clou de girofle et de l'origan appliquées directement sur les filets de poulet ou sur les films comestibles des poulets ont montré leur efficacité comme agents contre les entérobactéries, les bactéries psychrophiles, les bactéries lactiques et les bactéries mésophiles (**Fernández et al., 2014**).

I.7.2- médecine (aromathérapie)

Les huiles essentielles sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Maruyama et al., 2005**). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation (**Peana et al., 2002**). Les huiles peuvent prévenir l'apparition du cancer, l'ail et le curcuma étant le parfait exemple (**Béliveau et al., 2006**). Elles sont également utilisées pour soigner, atténuer ou prévenir les infections par inhalation ou bien par application sur la peau à travers des massages pour le traitement du stress, des crampes, de la douleur, de la circulation sanguine, de la cellulite ...etc (**Gérault et al., 2008**).

I.7.3- Pharmacie

L'industrie pharmaceutique emploie également les huiles essentielles sous un nombre grandissant de formes (complexes à vaporiser, pastilles, gélules, dentifrices...etc). Ces

préparations répondent à la réglementation des médicaments à base de plante. De plus, elles sont enregistrées sous le statut de complément alimentaire, réglementairement moins contraignant.

Les huiles essentielles peuvent également être de simples excipients dans d'autres médicaments et servir par exemple d'arôme pour masquer le goût d'un principe actif (**Kaloustian et al., 2012**), comme agent de pénétration percutanée ou encore, comme source de précurseur d'hémisynthèse. C'est le cas des citrals qui servent à la production de la vitamine A (**Franchomme et al., 2001**).

I.7.4- Cosmétologie et parfumerie

Partout dans le monde les huiles essentielles sont utilisées pour leur parfum. L'exemple le plus notable, est celui de l'eau de Cologne dont la formule, mise au point par Jean-Marie Farina au début du 18ème siècle, comportait principalement des huiles essentielles d'agrumes (fleur d'oranger, cédrat, bergamote) et d'aromates (romarin, thym) complétées par des extraits de fleurs (huiles essentielles de lavande et de rose double, eau de mélisse et extrait de jasmin). (**Fernandez et al., 2012**).

Les huiles essentielles sont classées en fonction de leurs odeurs, ainsi, les huiles de citron, de bergamote ou encore, de lavande constituent la note la plus éphémère, dite note de tête. Des essences fleuries comme celles de rose ou de néroli participent à l'élaboration de la note de cœur. Enfin, la note de fond, la plus durable des trois, comporte plutôt des essences boisées ou épicées comme le santal ou la cannelle (**Fernandez et al., 2012**).

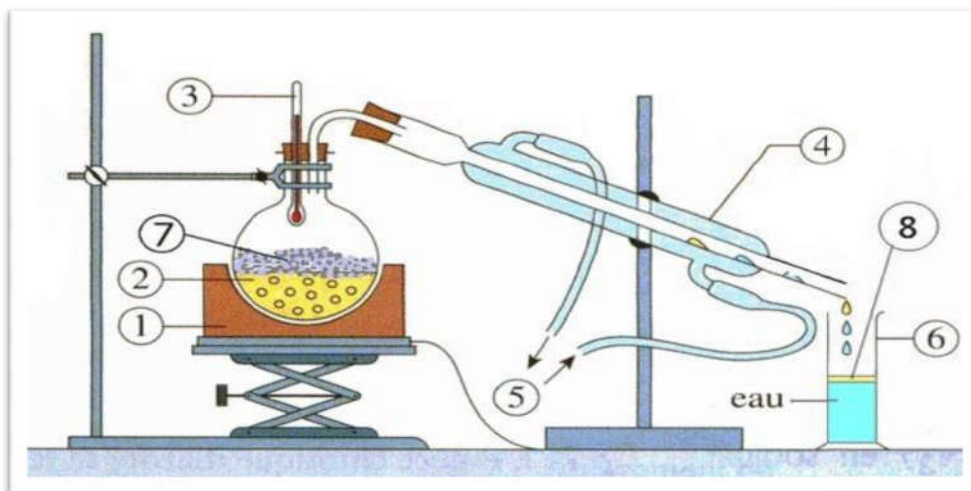
I.8- Méthodes d'extraction des huiles essentielles

I.8.1- La distillation

La distillation est une technique de séparation de liquide dans un mélange. Ce procédé est basé sur la nature volatile des composants aromatiques pour les séparer du reste de la plante. Les liquides sont vaporisés les uns à la suite des autres par ordre de température d'ébullition croissante. Ainsi, la distillation du mélange eau-essence végétale s'effectue à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique normale, minimisant les dénaturations de l'huile essentielle qu'une température supérieure ne manquerait pas de provoquer. Il existe deux types de distillation : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau (**Solène, 2012**).

I.8.1.1- Hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible (**figure n°6**). Les composants d'un tel mélange, se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange (**Fauchère et al., 2002**). c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation,...etc, qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation (**El-bahai et al., 2000**).



- 1- Chauffe ballon ; 2- Ballon ; 3- Thermomètre ; 4- Réfrigérant ; 5- Entrée et sortie d'eau ;
6- Erlenmeyer ; 7- Matière à extraire l'essence ; 8- Couche d'huile essentielle.

Figure n°6: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005)

I.8.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau

C'est le procédé le plus anciennement utilisé et le mieux adapté pour extraire l'huile essentielle des végétaux (**Mailhebiau, 1989**). Il s'agit d'une méthode douce qui respecte les végétaux. Ces derniers ne sont pas plongés directement dans l'eau bouillante car cela risquerait d'altérer les différents composants. Le principe consiste à chauffer l'eau à basse pression afin que ses vapeurs traversent et imprègnent la matière végétale (**figure n°7**). Les vapeurs se

chargent alors en molécules aromatiques et les entraînent ensuite dans le serpentin réfrigérant. Une fois dans celui-ci, les vapeurs se condensent et constituent l'eau florale et l'huile essentielle récoltées dans le florentin. Deux phases se forment: une phase aqueuse (l'hydrolat) et une autre phase contenant l'huile essentielle (Faucon, 2012).

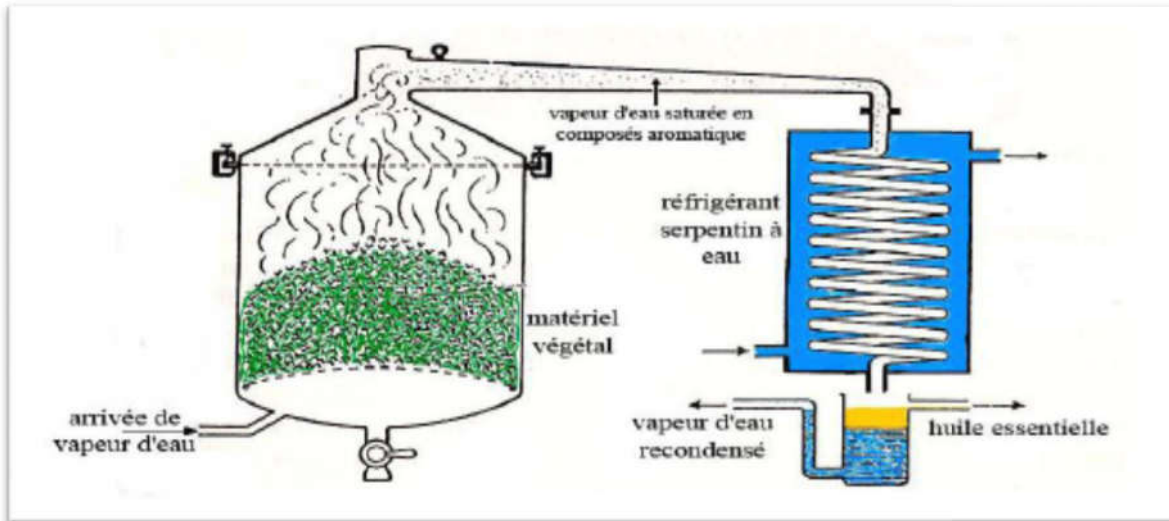


Figure n°7: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau (Lucchesi, 2005)

I.8.2- Hydrodiffusion

Comme dans le cas de l'entraînement à la vapeur sèche, le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau mais avec la vapeur. Cependant le principe consiste à faire circuler celle-ci de haut en bas au travers du végétal. Dans ces conditions, les cellules végétales sont soumises à une action "osmotique" du flux de vapeur d'eau. L'extrait associé à l'eau condensée au contact du végétal s'écoule vers un collecteur. Le problème soulevé par cette technique est la récupération des composés aromatiques. On privilégie en effet l'extraction des constituants les plus polaires et on doit faire appel à la centrifugation (Figure n°8), voire à une extraction liquide-liquide. En revanche, ce procédé évite un grand nombre d'artéfacts liés à une température excessive. Il donne des produits de qualité, riches en composés oxygénés, même de faible volatilité, qui sont généralement les plus recherchés (Ganou, 1993).

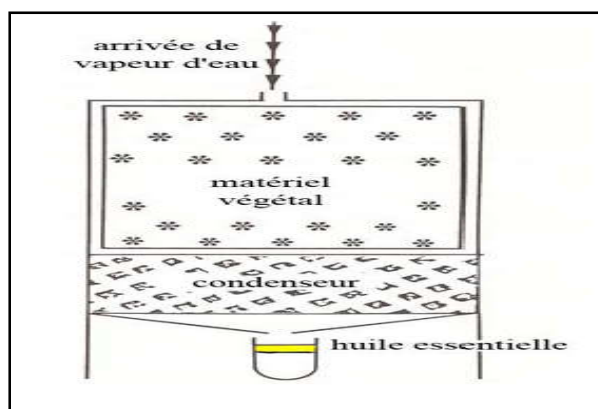


Figure n°8 : Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion (Lucchesi, 2005)

I.8.3- Extraction à froid

Ce procédé, le plus simple et celui qui conserve le mieux l'intégrité de l'essence, est également le plus limité. En effet, il ne peut s'appliquer qu'à une famille botanique, celle des *Rutaceae*, pour extraire l'essence du zeste de ses fruits. La méthode consiste à déchirer mécaniquement les poches à essence que l'on trouve en grande quantité sur l'épiderme de ces fruits, puis à séparer le produit d'extraction de la matière végétale solide. Aujourd'hui, la méthode la plus couramment employée, permet une extraction simultanée du jus et de l'huile essentielle, par pressage vertical des fruits entiers à l'aide de coupelles métalliques, et ces deux éléments sont par la suite séparés par centrifugation (Couecou *et al.*, 2001).

I.8.4- Extraction par les solvants organiques

L'extraction par les solvants est un procédé inspiré de l'enfleurage qui utilise des solvants non aqueux. Il peut s'agir de l'hexane, d'éthers de pétrole, d'huiles, de gaz... Le solvant idéal devant répondre aux critères suivants (Garneau, 2005):

- Être sélectif : extraire les molécules aromatiques mais pas les molécules indésirables comme les pigments ;
- Avoir une température d'ébullition basse, pour permettre une élimination simple ;
- Être chimiquement inerte vis-à-vis des substances à extraire ;
- Ne pas être miscible à l'eau, qui rendrait la purification de l'extrait plus délicate ;
- Être peu coûteux ;
- Ne pas présenter de contre-indication dans les domaines d'application de l'extrait obtenu ;

- Ne pas être inflammable ;
- Présenter la plus faible toxicité possible. Aucun solvant ne remplit la totalité de ces conditions, mais le plus utilisé est l'hexane. L'intérêt de ces solvants est leur pouvoir d'extraction des parfums très supérieur à celui de l'eau. Cependant, ils n'entraînent pas seulement les composés volatils.

Le point négatif des solvants organiques est leur toxicité. Cela réduit les champs d'application des extraits obtenus (appelés « concrètes »), notamment dans les domaines pharmaceutiques et agroalimentaires (**Piochon, 2008**).

I.8.5- L'enfleurage

I.8.5.1- L'enfleurage à froid

Ce processus d'extraction rarement utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures. Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délayer de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer davantage la senteur. L'enfleurage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité (**Möller, 2008**).

I.8.5.2- L'enfleurage à chaud

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60 degrés. Les plantes y sont incorporées et détremées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la graisse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (**Möller, 2008**).

I.8.6- Extraction assistée par micro-ondes

Dans cette méthode la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation (**Figure n°9**). Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante (**Mengal et al., 1993**).

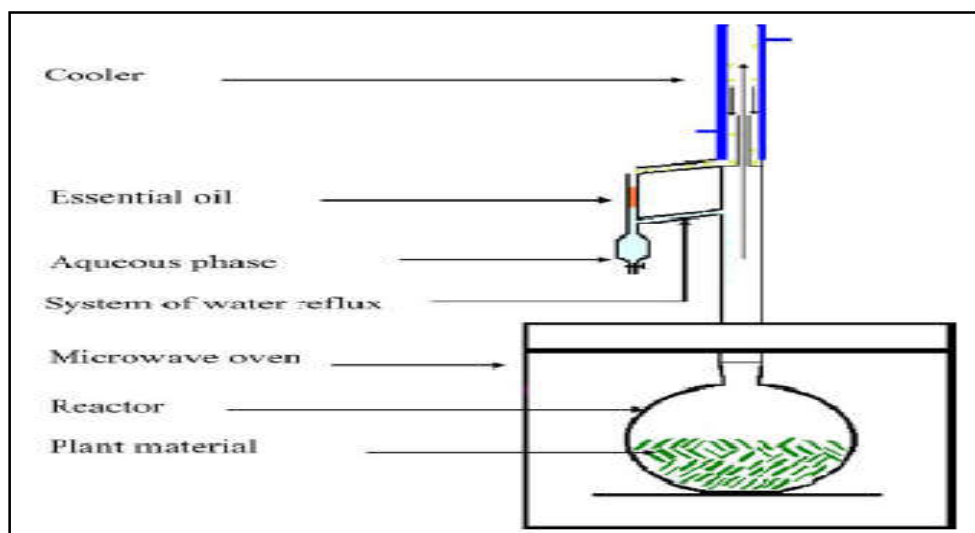


Figure n°9: Schéma du principe de la technique d'extraction assistée par micro-ondes
(Lucchesi et al., 2004)

I.8.7- Extraction par du CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique (P = 73,8 bars et T = 31,1 °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression (**Figure n°10**). Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son

installation (Pellerin, 1991). Cette technique est considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité (Wenqiang *et al.*, 2007).

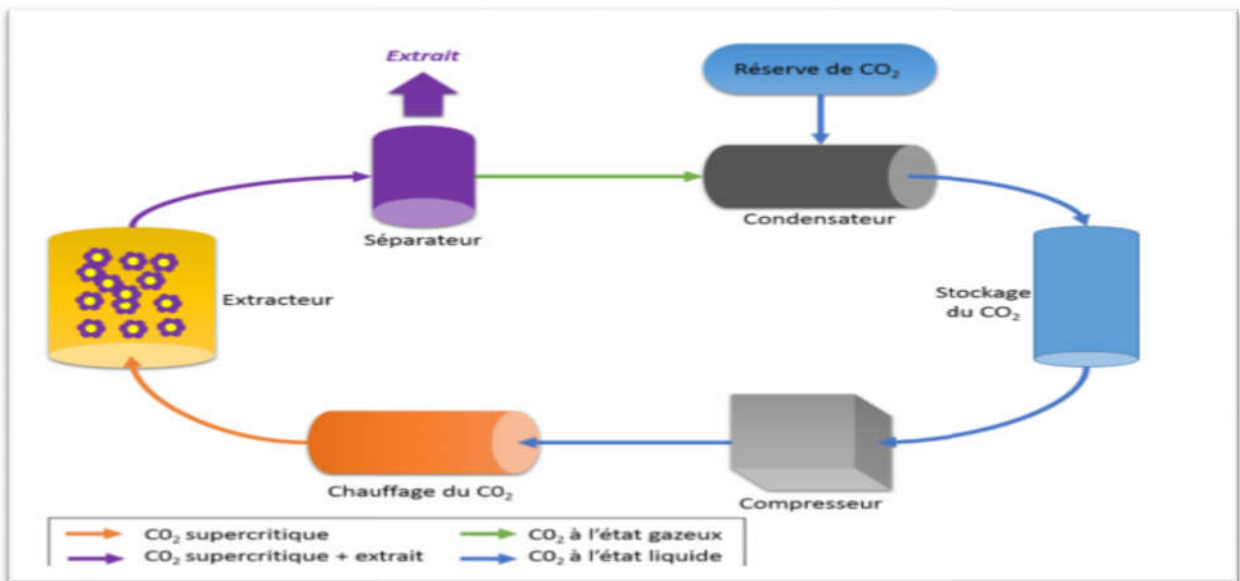


Figure n°10 : Le montage d'extraction (Deschepper, 2017)

Chapitre II
Syzygium aromaticum

II- La famille des Myrtacées

La famille des Myrtacées regroupe 155 genres et 4000 espèces dont la grande majorité est distribuée dans de nombreux pays tropicaux (Amérique du Sud, Australie et Asie du sud-est). (Muhamed *et al.*, 2018). Les genres les plus répandus sont *Melaleuca*, *Eucalyptus*, *Pimenta*, *Myrtus* et *Syzygium* (Vermeulen *et al.*, 2011 ; Dupont *et al.*, 2012).

Les Myrtacées sont des arbustes à feuilles entières et opposées, et à fleurs axillaires hermaphrodites dotées de calice cupuliforme. Elles possèdent de très nombreuses étamines insérées avec les pétales au sommet du tube calycinal. Le pistil est infère ou semi-infère à 5 carpelles uniloculaires, à nombreux ovules et à placentation axile. Le fruit est bacciforme bleuâtre, globuleux de 5 à 8 mm de diamètre (Quezel *et al.*, 1963).

La famille se dénote par la présence de poches sécrétrices schizogènes visibles par transparence et localisées dans le limbe des feuilles. Ces points translucides appelés également lacunes sécrétrices, ou encore glandes aux huiles essentielles, produisent des composés aromatiques tels que les terpénoïdes, l'eucalyptol, le caryophyllène et l'eugénol, ce qui explique leur intérêt en aromathérapie, et leur action ciblée sur les organes respiratoires (Botineau, 2010 ; Vermeulen *et al.*, 2011 ; Dupont *et al.*, 2012). Les plantes possèdent également plusieurs activités comme l'activité anticholinestérase, antibactérienne et cytotoxique (Muhamad *et al.*, 2018).

II.1- Le genre *Syzygium*

Le nom botanique *Syzygium* provient du grec syn: avec, et zygon : joug, car les pétales sont soudées ensemble, est une altération latine tardive de Caryophyllum, transcription des grec Karyophyllon, désignant clou de girofle, Le terme de clou est dû à la forme caractéristique du bouton floral séché (Salvatori, 2005). Ce genre englobe 400 à 500 espèces d'arbres et d'arbustes aromatiques, persistants, vivants dans les sous-bois et les forêts humides de toutes les régions tropicales (Iserin, 2007).

II.1.1- Le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*)

II.1.1.1- Description morphologique

Syzygium aromaticum est un petit arbre touffu, au port quasi conique, colonnaire, fortement aromatiques avec 15 m d'hauteur (figure n°11) (Boullard, 1997). Ses feuilles, de 8 à 10 cm de long, sont persistantes et coriacées, elles sont positionnées de manière opposée, pétiolées, ovales, aux limbes lancéolés, à la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert

sombre, légèrement ponctué. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. Le pétiole portant le limbe mesure entre 0,5 et 1cm de long. Les nervures sont nombreuses mais ne se voient pas beaucoup et la marge de la feuille est lisse (**Barbelet, 2015**). A l'état adulte, les feuilles sont vert foncé luisant, mais lorsqu'elles se développent elles sont de couleur rose et comme saupoudrées d'or (**figure n°12**).

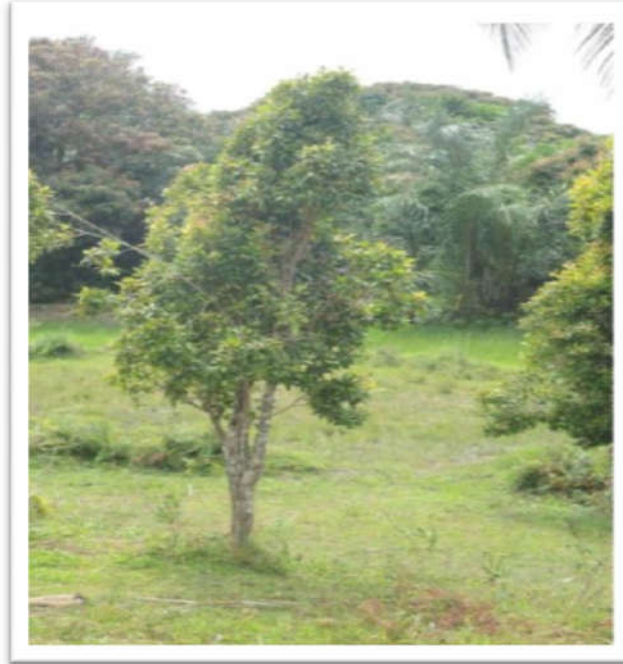


Figure n° 11 : Allure d'un giroflier de Madagascar (Barbelet, 2015)

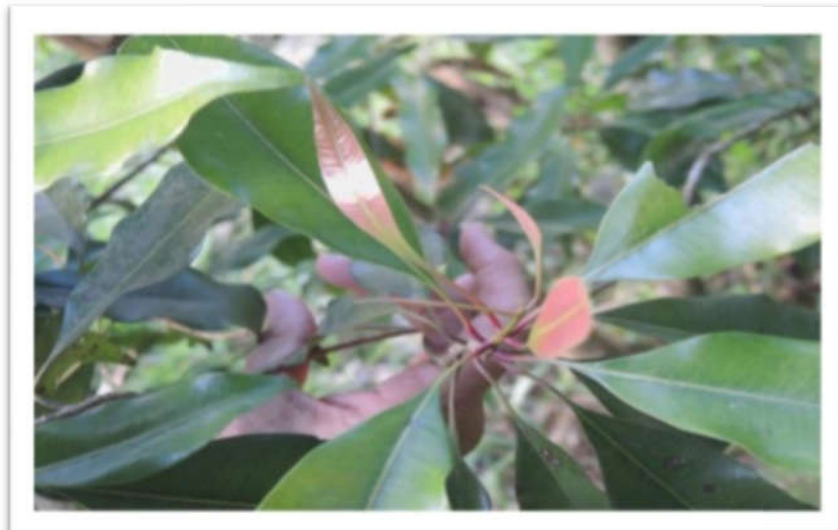


Figure n°12 : feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleur vert du giroflier (Barbelet, 2015)

Les fleurs sont disposées en cymes terminales (**figure n°13**) de 25 fleurs environ, et formant 3 fourches (**figure n°14**) (**Max et Robert, 2003**). Elles se présentent sous la forme d'un long pédoncule, petite fleur à l'extrémité des rameaux, à 4 pétales (blanc-rosé) pompon duveteux d'étamines blanches saillantes, les fleurs à 4 pétales blanc rosé sont caractérisées par leurs sépales rouges persistants (**Rakotoatimanana et al., 1999**).



Figure n°13 : Structure du giroflier
(Benzeggouta, 2015)



Figure n°14: Boutons floraux et fleurs
du giroflier (Barbelet, 2015)

Les boutons floraux brun foncé à allure de clou (**figure n°15**), de 12 à 17 mm de long, possèdent un calice inférieur (hypanthe) pouvant atteindre 4 mm d'épaisseur, surmonté par 4 lobes coriaces et divergents constitués par les 4 sépales charnus, étalés en croix. Les 4 pétales non étalés, plus clairs, de couleur brun-jaune, forment une coiffe (rangée du milieu) recouvrant nombreuses étamines recourbées et un style court dressé sur un disque nectarifère à la base. Le tube réceptaculaire formant l'ovaire infère biloculaire est un peu anguleux, ride, et renferme de plusieurs graines (**Max et robert, 2003**).



Figure n°15 : *Syzygium aromaticum* (Girofle) (Teuscher et al., 2005)

Le giroflier fleurit deux fois par an (**Amit et Parul, 2011**). Le moment le plus favorable à la récolte des boutons floraux ou clous de girofle, est avant l'épanouissement de la corolle (**Ghedira et al., 2010**), quand ils commencent à prendre une teinte rosée. Les clous de girofle sont mis ensuite sur des claies au soleil ou à feu doux pour les sécher. Au cours du séchage, les clous perdent entre 67 et 72 % d'eau (**Benzeggouta, 2015**).

Le giroflier peut vivre jusqu'à 150 ans (**Barbelet, 2015**). La production des clous de girofle commence à l'âge de 20 ans et reste active pendant une cinquantaine d'années (**Iserin, 2007**).

II.1.1.2- Classification

La classification a été réalisée selon (**Barbelet, 2015**) et elle est comme suit :

- Embranchement : Spermatophytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : *Dicotyledonae*
- Sous classe : *Rosidae*
- Ordre: Myrtales
- Famille : *Myrtaceae*
- Genre : *Syzygium*
- Espèce : *Syzygium aromaticum*

II.1.1.3- Nomenclature de la plante

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum* (**Faucon, 2012**).

- *Caryophyllus aromaticus* L. (1753);
- *Eugenia caryophyllata* Thunb. (1788);
- *Eugenia caryophyllus* Spreng. (1825);
- *Eugenia aromatica* (L.) Baill. (1876) *Jambosa caryophyllus* (Thunb.) Nied. (1893) ;
- *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, (1939).

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés (**Pulikottil et Nath, 2015**). Le nom commun est clove (**Amit et Parul, 2011**). Elle est appelée en arabe: Koronfil (قرنفل), en français: Clou de girofle, arbre au clou et en anglais: Clove buds (**Ghedira et al., 2010**).

II.1.1.4- Habitat

Le giroflier, comme beaucoup d'autres plantes de la famille des Myrtacées, est habitué aux climats tropicaux. Il nécessite beaucoup d'ensoleillement sinon il ne donnera pas de clou, cependant, à l'état de jeune plante, il faut légèrement l'ombrager durant les premiers mois. Il a également besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse qui ne dépasse pas les 300 mètres. Les climats marins semblent favoriser son développement **(Bois, 1999)**.

Bien qu'il nécessite une humidité atmosphérique de 80%, l'eau stagnante est nuisible aux racines. Il se plaît sur les terrains qui s'écoulent bien et sur les pentes basses des collines. En revanche, les sols très argileux et sableux ne lui conviennent pas **(Ranoarisoa, 2012 ; Ministère de l'agriculture de République de Madagascar, 2014)**.

Dans l'idéal, le giroflier a besoin d'un sol volcanique (ou sédimentaire), au bord de mer (surtout pour l'altitude), avec une forte pluviométrie bien répartie sur l'année, et un ensoleillement plus marqué à l'apparition des inflorescences **(Ramarijaona, 1985 ; Mailhebiau, 1989)**.

II.1.1.5- Répartition géographique

Originaire des Moluques, le giroflier est largement cultivé dans les régions tropicales. Feuilles persistantes opposées et fleurs en petites cymes **(Shauenberg et Paris, 2005)**, elles furent l'une des premières épices à faire l'objet d'un commerce florissant dès l'Antiquité **(Iserin, 2007)**. Les girofliers sont cultivés en Tanzanie, Madagascar, Seychelles, ile Maurice, Antilles ainsi que, dans l'ouest de l'Inde et au Brésil **(Brickell et al., 2004)**.

II.1.1.6- Composition chimique

Le clou de girofle est riche en substances bioactive telle que l'huile essentielle (environ 15 à 20%). Celle-ci contient selon la Pharmacopée européenne, de l'eugénol (75 à 88% de l'huile), de l'acétate d'eugénol (4 à 15%), de l'alpha- et bêta-caryophyllène (5 à 14%) **(Direction de la qualité du médicament du conseil de l'Europe, 2004)**.

Les boutons floraux, les pédoncules fructifères et les fruits sont spécialement riches en essence de girofle, en eugénol et en bêta-caryophyllène **(Brickell et al., 2004)**. D'autres constituants sont également présents dans le giroflier tels que les flavonoïdes (environ 0,4%), les tanins (environ 12%), l'acide phénolique, les stérols et triterpènes, les glucides, les sels minéraux et les chromons **(Max et robert, 2003 ; Shauenberg et Paris, 2013)**.

II.1.1.7- Usages de *Syzygium aromaticum* L.

II.1.1.7.1- Usages anciens et actuels

Les usages du clou de girofle sont très variés. C'est d'abord une épice utilisée dans de nombreuses cuisines orientales ou occidentales (ingrédients de la plupart des currys, du pain d'épices ou de la choucroute) (Teuscher *et al.*, 2005). Le clou est connu pour ses propriétés antiseptiques et anesthésiques ; il est utilisé depuis très longtemps en dentisterie, en cosmétique et en parfumerie, mais la majeure partie de la production mondiale et en particulier, le tout-venant malgache, sert à la fabrication des kreteks, cigarettes traditionnelle indonésiennes composées d'un mélange de tabac et de girofle (Teuscher *et al.*, 2005 ; Duclos, 2012).

II.1.1.7.2- Intérêt en phytothérapie

Les clous de girofle sont efficaces en cas d'acné, d'ulcère cutanés, de plaies et d'orgelets, préviennent la nausée. Ils sont également très utilisés pour atténuer les maux de dents et les indigestions (Bremness *et al.*, 2011). En Asie tropical, ils furent souvent recommandés en cas de paludisme, de choléra, de tuberculose, de la gale et de certaines affections virales (Iserin, 2007).

II.1.1.7.3- Usage médical

a. Traitement buccodentaire

L'eugénate est composé d'eugénol, il est présent dans les huiles essentielles du clou de girofle et d'oxyde de zinc, il est utilisé comme pâte pour la reconstitution des dents.

L'eugénol est aussi utilisé, comme anesthésiant et cautérisant pulpaire en cas d'alvéolite après extraction dentaire (Lamendin *et al.*, 2004).

b. Antispasmodique

Les clous de girofle soulagent les troubles digestifs tels que les flatulences et les coliques. Ils apaisent aussi la toux, les spasmes musculaires lors de leur application locale (Iserin *et al.*, 2001).

c. Stimulant physique et intellectuel

Le clou de girofle a une action stimulante aussi bien dans les cas d'asthénie intellectuelle (perte de mémoire), que corporelle, considéré comme aphrodisiaque, il stimule et augmente également les contractions de l'utérus lors de l'accouchement (Iserin *et al.*, 2001).

II.1.1.7.4- Autres utilisations

En agriculture, l'huile essentielle possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les champignons (**Alice, 2011**) et un effet insecticide sur les charançons nuisibles des graines en stocks. Les clous de girofle entiers, mais aussi en poudre, servent à aromatiser les conserves de légumes, le chou rouge ou la choucroute, les compotes de pommes et autres fruits (**Georgetti , 2003**).

Chapitre III
Activités biologiques
des huiles essentielles

III- Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent un très large champ d'activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-tumorale, anti-inflammatoire...etc. Ces différentes propriétés sont souvent réduites à l'activité de leurs composés majoritaires et minoritaires (**Lahlou, 2004**).

De nombreuses recherches ont démontré que les huiles essentielles pouvaient agir contre une large gamme de microorganismes et ce, en inhibant la croissance aussi bien des bactéries et des levures (**Duarte et al., 2005**), que des moisissures pathogènes et opportunistes (**De Bellerbeck, 2002**). De même, elles sont très efficaces contre les germes résistants aux antibiotiques, c'est le cas du staphylocoque doré qui est sensible à l'huile essentielle du thym, origan et sarriette (**Caillet et al., 2009**).

Elles sont également grand intérêt lorsqu'elles sont utilisées pour préserver les aliments des effets toxiques des oxydants (**Miguel, 2010**). Certaines sont même plus efficaces que les antioxydants synthétiques (**Hussain et al., 2010**). Cette activité est due principalement à la présence de phénols tels que l'eugénol, le thymol et le carvacol (**Tepe et al., 2005**).

Par ailleurs, des effets anti-inflammatoires ont été démontrés pour certaines huiles. Ces derniers s'avèrent être similaires à ceux des médicaments de synthèses, avec l'avantage, d'être efficaces et d'avoir très peu d'effets secondaires (**Ndoye Foe et al., 2016**). Ces propriétés sont attribuées généralement aux esters et aux aldéhydes monoterpéniques (**Gauriat, 2015**). Certaines huiles essentielles telles que celles de l'ail et du curcuma présentent une activité anti-tumorale intéressante. Celle-ci est particulièrement mise en évidence dans le cas du cancer de la prostate et du glioblastome (**Fogang et al., 2014**).

III.1- Activité antibactérienne

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, ces dernières paraissent moins sensibles à leur action que les bactéries Gram positives (**Reynolds, 1996**). C'est le cas par exemple, de l'huile essentielle de *Lavandula* qui est beaucoup plus active contre *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis* que sur *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Cette résistance est attribuée à la présence des lipopolysaccharides dans la paroi cellulaire qui constitue une barrière pour l'huile essentielle (**Bezic et al., 2013**).

Ce sont généralement des composés tels que les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées (**Kalemba et Kunicka, 2003**). De même, les composés phénoliques peuvent agir en tant qu'agents antimicrobiens et ce, à des spectres variables. En effet, certains quinones, par exemple, n'exercent un effet bactériostatique que sur les bactéries Gram positives (**Pibiri, 2006**).

III.1.1- Mode d'action antibactérien

Les huiles essentielles sont des molécules à caractère lipophile, ce qui leur permet de se répartir dans les lipides des membranes cellulaires bactériennes et de les désorganiser, augmentant de ce fait leur perméabilité (**Oussalah, 2006**). L'action est légèrement différente pour les bactéries Gram négatives ; les composés hydrophobes des huiles sont capables de gagner leur périplasma directement par les porines (**Helander 1998**). On observe alors chez les bactéries, un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire perturbant ainsi, le transport membranaire des substances nutritives, et provoquant une très importante perte d'électrolytes comme le potassium et le sodium et la coagulation du contenu protéique des cellules, ainsi qu'une sensibilité accrue aux changements de pH de leur milieu de culture (**Lambert, 2001 ; Burt, 2004**).

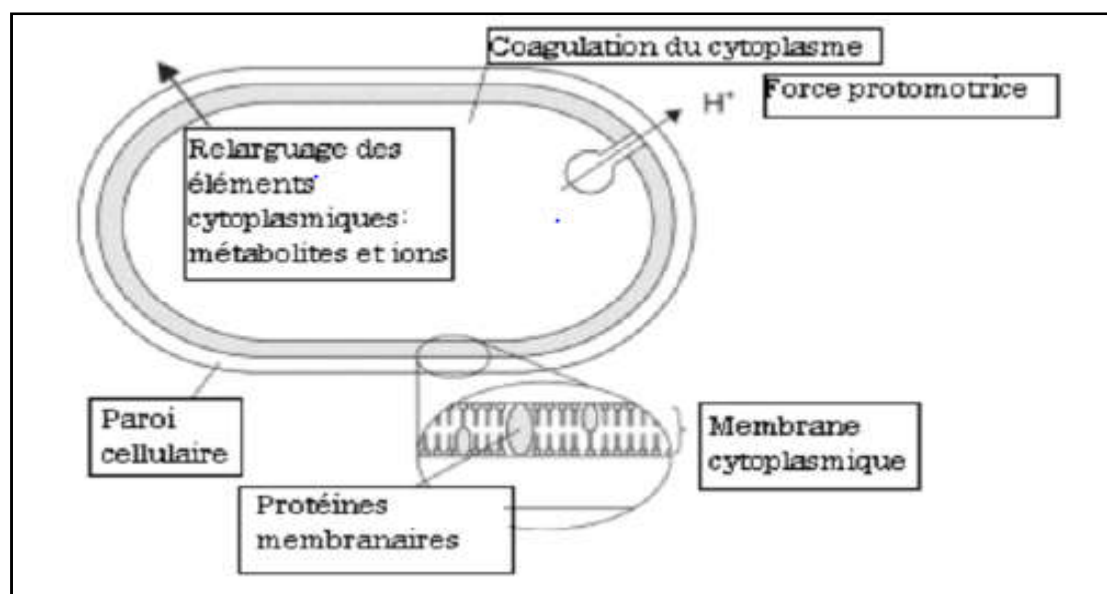


Figure n°16: Mode d'action antibactérien des huiles essentielles (**Burt, 2004**)

III.1.2- Activité antifongique

Les huiles essentielles sont actives contre diverses levures et moisissures. Les plus étudiées dans la littérature appartiennent à la famille des Labiées : thym, origan, lavande, menthe, romarin...etc (Voukouet *et al.*, 1988) mais aussi, à la famille des Rutacées tel que le *Citrus*, aux Cistacées tel que le *Cistus* (Fisher et Phillips, 2008), aux Myrtacées tels que l'*Eucalyptus* et le clou de girofle (Jaset-Dongmo *et al.*, 2008). Parmi les espèces fongiques ayant déjà montré une sensibilité envers les huiles essentielles, nous citons, *Candida albicans* vis-à-vis de l'huile d'origan, de cannelle et de thym vulgaire, *Trichophyton mentagrophytes* vis-à-vis de l'huile de sarriette et d'arbre à thé ou encore, *Pityriasis versicolor* vis-à-vis de l'huile de lemongrass (Laurent, 2017).

L'activité antifongique des composés aromatiques semble être liée à la présence de phénols monoterpéniques et aromatiques, des alcools monoterpéniques, des aldéhydes aromatiques et monoterpéniques et des lactones (Ultee *et al.*, 2002 ; Laurent, 2017).

III.1.2.1- Mode d'action antifongique

Les huiles essentielles ont une activité anti fongique, car elles agissent sur l'élongation du mycélium et la toxicogénèse chez les moisissures et sur la biomasse et la production du pseudomycélium chez les levures et aussi elles inhibent la germination des spores (Hulin *et al.*, 1998). Cette activité peut se faire selon deux mécanismes différents ; certains constituants peuvent provoquer une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie de sa rupture entraînant ainsi, une fuite des électrolytes et l'épuisement des acides aminés et des sucres, d'autres peuvent s'insérer dans les lipides membranaires et par conséquent, induire la perte des fonctions membranaires (Suppakul *et al.*, 2003).

III.2- Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de clou de girofle

III.2.1- Activité anti bactérienne

L'huile essentielle du clou de girofle est active aussi bien contre les bactéries gram positives, telles que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter* sp et *Helicobacter pylori* que contre les bactéries gram négatives, telles que *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité pourrait être attribuée essentiellement à l'eugénol qui est un phénol et le composé majoritaire de l'huile essentielle (Rhayour, 2002 ; Oussalah, 2007).

Ce dernier n'est pas le seul à être actif, l'eugényle acétate, présent généralement à 10% environ, possède également des propriétés bactéricides (**Musthafa, 2015**).

III.2.2- Activité antifongique

L'huile essentielle du clou de girofle possède une puissante activité contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes, tels que les levures du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*) mais aussi, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* L'huile est particulièrement connue pour son efficacité dans le traitement des candidoses cutano-muqueuses telle que, la candidose vulvo-vaginale. L'activité antifongique de l'huile est attribuée essentiellement à son composé majeur l'eugénol (**Pinto et al., 2009**).

Partie Expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I- Matériel et méthodes

I.1- Matériel végétal

L'espèce *Syzygium aromaticum* a été procurée chez un herboriste de la région de Khemis Miliana (Ain Defla).

Notre choix s'est porté sur cette plante en raison de sa disponibilité sur le marché tout au long de l'année, et pour son importance majeure et son usage quotidien dans la cuisine Algérienne ou en médecine traditionnelle

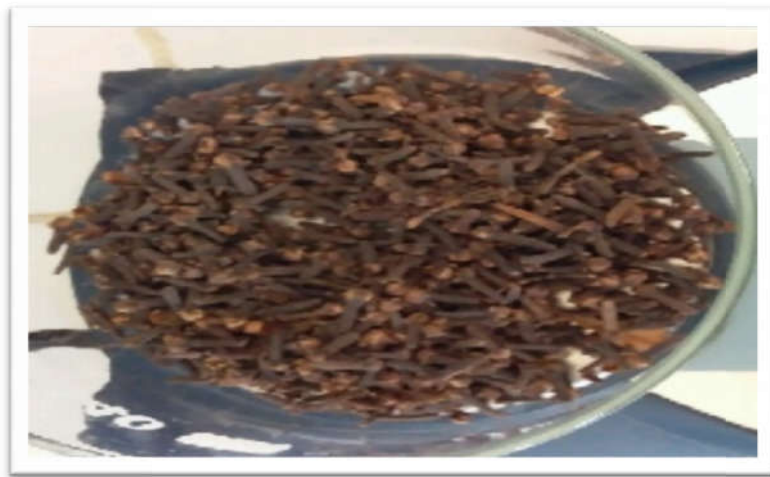


Figure n°17 : les clous de girofle utilisés pour l'extraction de l'huile essentielle

I.2- Huiles essentielles

I.2.1- Technique d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (**figure n°18**). Pour ce faire, 100 g de matière végétale sèche a été mise dans un ballon à fond rond additionné d'un volume de 500 ml d'eau distillée. Le tout est porté à ébullition pendant 1H30 à 2H. Les vapeurs chargées d'huile essentielle sont entraînées et condensées dans un réfrigérant. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec des gouttes d'huile essentielle. Après repos du liquide, l'huile se sépare de l'eau par différence de densité. Elle est ensuite récupérée et conservée à 4°C dans un tube en verre opaque, fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière.

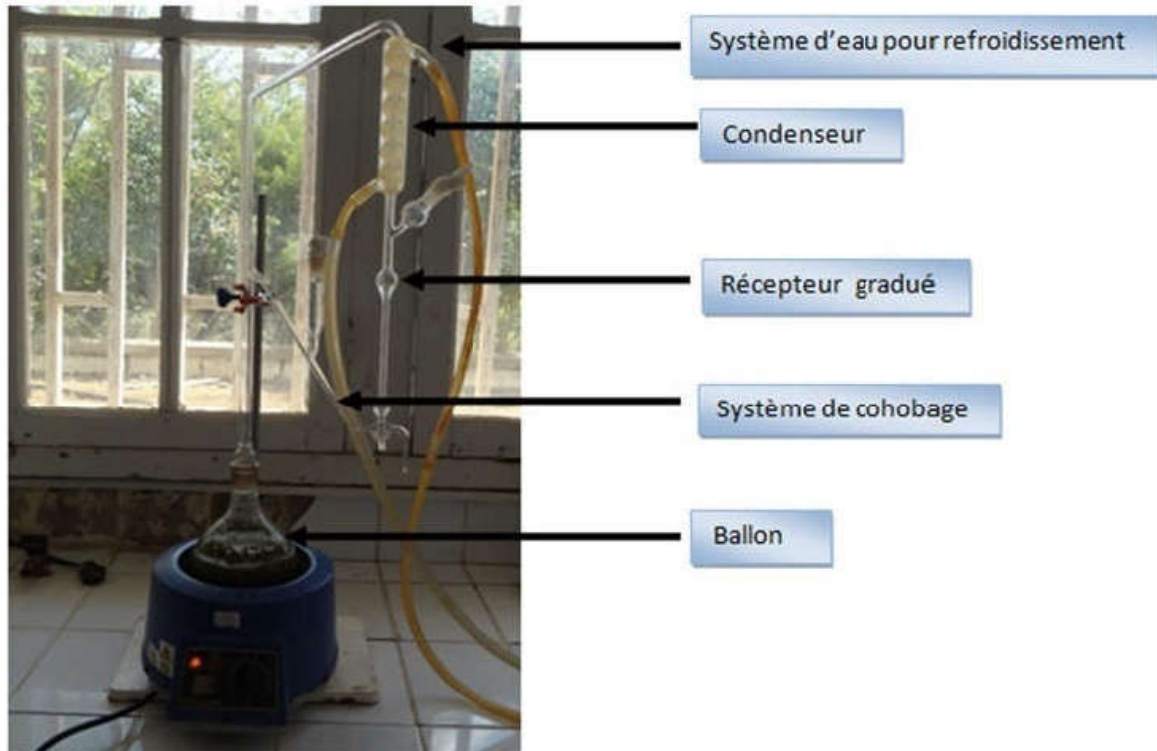


Figure n°18: Dispositif d'extraction des huiles essentielles de type Clevenger

I.2.2- Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de la matière végétale utilisée et la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (AFNOR, 2000). Il est calculé selon la formule suivante :

$$R_{HE}(\%) = \frac{MHE}{Ms} \cdot 100$$

Avec :

R: rendement en huile essentielle.

MHE : la masse d'huile essentielle en gramme.

Ms : la masse de la matière végétale en gramme.

I.3- Procédés d'étude microbiologique

I.3.1- Souches testées

Pour notre étude, nous avons testé quatre souches microbiennes de référence provenant de l'institut Pasteur d'Alger (**tableau n°2**). Le choix des souches a été porté sur la base de leur importance en tant qu'agents infectieux dans le domaine de la santé.

Tableau n°1 : Liste des souches microbiennes testées

La souche microbienne	Code	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Négative
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Positive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Négative
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	

ATCC: American Type Culture Collection

I.3.2- Milieux de culture utilisés

Suivant la méthode employée et les souches étudiées, les milieux de culture utilisés sont les suivants (**annexe 1**) :

- Bouillon nutritive (BN) ;
- Gélose nutritive (GN) ;
- Gélose Muller-Hinton (MH);
- Sabouraud.

I.3.3- Préparation de l'inoculum

Les inoculums sont préparés à partir d'une culture jeune en milieu liquide (bouillon nutritif) de 18 H pour les bactéries et de 48 H pour la levure et ce, en les diluant dans de l'eau physiologique stérile de façon à avoir des suspensions de 10^8 UFC/ml de bactéries et 10^6 UFC/ml de levures.

La turbidité de cette suspension est ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre de type Genesys 10UV par la mesure de la densité optique. Celle-ci doit être comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de 625 nm pour les bactéries (**Baser et Buchbauer, 2010**), et entre 0.12 et 0.15 à une longueur d'onde de 600 nm pour les levures (**Haddouchi et al., 2009**).

I.3.4- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques

La technique utilisée est la méthode de diffusion de disques sur milieu gélosé (NCCLS, 2001). Des milieux de culture (Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure) coulés en boîtes de Pétri sont ensemencés par écouvillonnage avec une suspension bactérienne de 10^8 UFC/ml et fongique de 10^6 UFC/ml.

Des disques d'antibiotiques et des disques imprégnés d'une solution d'antifongique sont ensuite placés sur les milieux de culture à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes de Pétri ont été fermées, et maintenues à la température du laboratoire pendant 30 min afin de laisser diffuser, avant d'être incubées à 37° C pendant 24 H pour les bactéries et à 28 ° C pendant 24 et 48 H pour la levure. Les essais sont effectués trois fois.

Les différents antibiotiques testés sont présentés dans le **tableau n°2**. Concernant les antifongiques, seules deux solutions à 1% ont été utilisées: éconazole et clotrimazole.

Tableau n°2: la liste des antibiotiques utilisés

Antibiotique	Sigle	Charge du disque
Acide clavulanique	AUG	30 µg
Ampicilline	AMP	10 µg
Chloramphénicol	C	30 µg
Erythromycine	E	15 µg
Gentamicine	CN	30 µg
Oxacilline	OX	5 µg
Pipéracilline	PRL	30 µg
Polymyxine B	PB	100 IU

I.3.5- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle

I.3.5.1- Technique d'aromatogramme (méthode de Vincent)

Cette technique, fiable et reproductible, est souvent la plus utilisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Elle repose sur le principe de l'antibiogramme (NCCLS, 2001). Elle consiste à déposer des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre contenant 10 µl d'huile essentielle à la surface du milieu Mueller-Hinton pour les bactéries et du milieu Sabouraud pour la levure. Ces derniers ont été préalablement ensemencés par écouvillonnage avec une suspension de 10^8 UFC/ml de bactéries et de 10^6 UFC/ml de levures.

Les boîtes de Pétri ont été fermées et maintenues à la température du laboratoire pendant 30 min afin de laisser diffuser, avant d'être incubées à 37° C pendant 24 H pour les bactéries et à 28 ° C pendant 24 et 48 H pour la levure. Les essais ont été effectués trois fois.

L'obtention d'un halo clair autour du disque montre la zone où les germes n'ont pas pu se développer. Le diamètre de la zone d'inhibition, qui dépend de la sensibilité à l'huile essentielle, est mesuré en mm traduisant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (**Benkeblia, 2004; Hanif et al., 2011**).

Chapitre II

Résultats et discussion

II- Résultats et discussion

II.1- Description de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

L'huile essentielle de l'espèce *Syzygium aromaticum* a été obtenue par la technique d'hydrodistillation. Le **tableau n°3** présente les caractéristiques de l'huile, à savoir, l'aspect, la couleur et l'odeur en comparaison avec les normes établies par **AFNOR (1992)**.

Tableau n°3 : Description de l'huile essentielle

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR 1992	Liquide mobile limpide parfois, légèrement visqueux	Jaune très clair	Epicée caractéristique de l'eugénol
Huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Epicée

II.2- Rendement en huile essentielle

Le rendement de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation à partir des boutons de clous de girofle est présenté dans le **tableau n°4**.

Tableau n°4 : Rendement en huile essentielle

	Huile essentielle du clou de girofle	Norme AFNOR 1992
Rendement (%)	2.96%	De 5% - 8%

Les résultats indiquent que l'espèce *Syzygium aromaticum* renferme un taux de 2.96% d'huile essentielle. Cette valeur est inférieure comparée à la norme établie par **AFNOR (1992)** (**tableau n°4**). Un résultat similaire au nôtre, a été obtenu par **Atmani et Baira (2015)**, en effet, leur rendement est de 3%. Il en est de même pour **Boukhatem (2017)** dont le taux a été de 3.3%.

Le rendement en huile essentielle peut être influencé par divers facteurs, tels que le génotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte, le climat, les propriétés physico-chimiques du sol ainsi que, la méthode d'extraction employée, les parties végétales utilisées et les conditions de séchage (**Naili, 2013**).

II.3- Etude de l'activité antimicrobienne

II.3.1- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens

L'activité antimicrobienne des antifongiques a été évaluée sur une levure (*Candida albicans*) et des antibiotiques sur une bactérie Gram positive (*Bacillus cereus*) et deux bactéries Gram négatives (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), et ce, par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau n°5**.

Tableau n° 5 : Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques exprimés par le diamètre de la zone en mm

Les agents antimicrobiens	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Oxacilline (OX)	0	0	0	–
Ampicilline(AMP)	0	0	0	–
Gentamicine (CN)	30± 4.61	24± 1.73	25± 4.02	–
Erythromycine (E)	35	10	0	–
Pipéracilline(PRL)	11	0	6± 0.58	–
Acide clavulanique (AUG)	0	0	0	–
Chloramphénicol(C)	30	32	8	–
Polymyxine B (PB)	15	16± 0.58	18± 0.58	–
Econazole	–	–	–	22
Clotrimazole	–	–	–	15

ATCC: American Type Culture Collection

Cette étude est basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition de la croissance microbienne vis-à-vis des agents antimicrobiens

Selon le diamètre obtenu, la sensibilité des germes est classée dans l'une des catégories suivantes:

$D < 8 \text{ mm}$: Souches résistante (-).

$9 \text{ mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$: Souches sensible (+).

$15 \text{ mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$: Souches très sensible (++)

$D > 20 \text{ mm}$: Souches extrêmes sensible (+++) (**Ponce et al., 2003**).

D'après les résultats obtenus, nous constatons d'une part, que l'espèce *Bacillus cereus* ATCC 10876 est extrêmement sensible à la gentamicine (CN), l'érythromycine (E) et le Chloramphénicol (C), mais l'est nettement moins envers la Polymyxine B (PB) et la Pipéracilline (PRL), les diamètres des zones d'inhibition obtenus varient de 11mm à 35mm.

D'autre part, la souche est résistante aux trois autres antibiotiques testés, à savoir, l'oxacilline (OX), l'ampicilline (AMP) et l'acide clavulanique (AUG). En effet, aucune inhibition n'a été notée pour ces derniers (**figure n°19**).

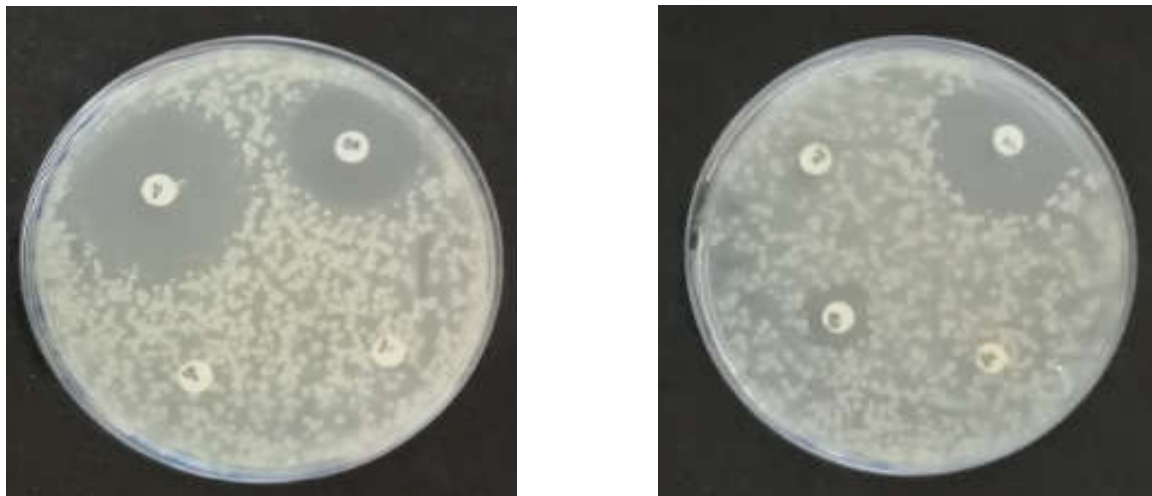


Figure n°19 : Les résultats de l'antibiogramme de *Bacillus cereus* ATCC 10876

L'espèce *Escherichia coli* ATCC 25922 s'est montrée très sensible à l'action de la gentamicine (CN), l'érythromycine (E), chloramphénicol (C) et polymyxine B (PB), les diamètres des zones d'inhibition varient de 10 mm à 32 mm. Par contre, elle est résistante à l'oxacilline (OX), ampicilline (AMP), pipéracilline (PRL) et acide clavulanique (AUG) (**figure n°20**).



Figure n°20 : Les résultats de l'antibiogramme d'*Escherichia coli* ATCC 25922

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est très sensible à la gentamicine (CN) et à la polymyxine B (PB), mais l'est beaucoup moins vis-à-vis du chloramphénicol (C), les zones d'inhibition ont des diamètres respectifs de 25 mm, 18 mm et 8 mm.

Comme *Escherichia coli* ATCC 25922, la souche est résistante à l'oxacilline (OX), l'ampicilline (AMP), la pipéracilline (PRL) et l'acide clavulanique (AUG), mais l'est de plus, envers l'érythromycine (E) (**figure n° 21**).

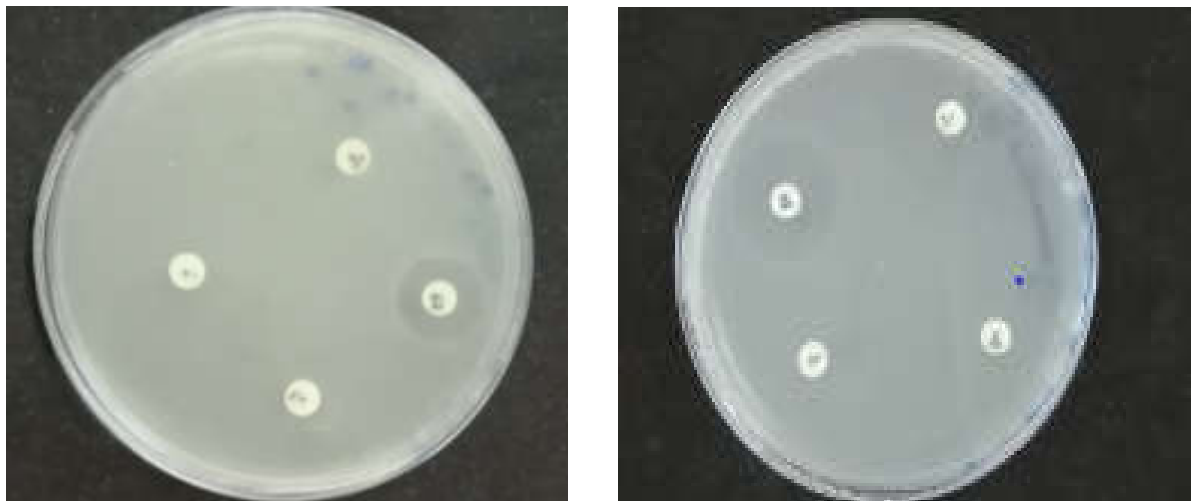


Figure n°21 : Les résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Concernant l'espèce *Candida albicans* ATCC 10231, les résultats indiquent qu'elle est très sensible à l'éconazole et au clotrimazole, les zones d'inhibition ont été enregistrées à des diamètres respectifs de 22 mm et 15 mm (**figure n°22**).



Figure n°22 : Les résultats de l'antifongogramme de *Candida albicans* ATCC 10231

II.3.2- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a été réalisée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau n°6**.

Tableau n°6 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du clou de girofle exprimés par le diamètre de la zone en mm

Souches microbiennes	Huile essentielle
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21± 2,39
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	30± 2,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	14± 3,55
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	35 ± 0.00

ATCC: American Type Culture Collection

Nous constatons d'après les résultats obtenus (**tableau n°6**), que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a été très active contre les quatre souches microbiennes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Candida albicans* ATCC 10231. Cette dernière s'est avérée être plus sensible que les trois premières, avec une zone d'inhibition d'un diamètre maximal de 35 mm (**figure n°23**).

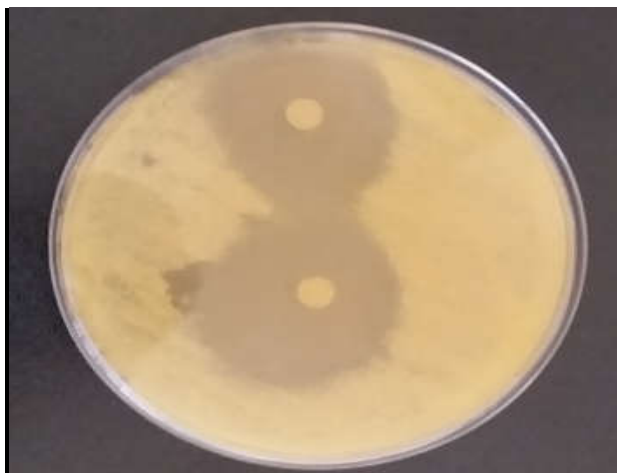


Figure n°23 : La sensibilité de *Candida albicans* ATCC 10231 vis-à-vis de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

Bacillus cereus ATCC 10876 est la deuxième souche la plus sensible à l'huile essentielle avec une zone d'inhibition de 30 mm de diamètre (**figure n°24**), suivie par *Escherichia coli* ATCC 25922 (21 mm de diamètre) et enfin, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec 14 mm de diamètre (**figure n°24**).



Escherichia coli ATCC 25922



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



Bacillus cereus ATCC 10876

Figure n°24: la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

De nombreux travaux antérieurs confirment l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. L'étude faite par **Gupta et al. (2008)** montre que *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* sont très sensibles à l'action de l'huile ; les diamètres respectifs des zones d'inhibition obtenus sont de 17 mm et 24 mm, ces résultats sont légèrement inférieurs comparés aux nôtres (21 mm et 30 mm, respectivement). Un résultat presque similaire au nôtre a été relevé par **Dobre et al. (2011)** concernant *B. cereus* (28 mm de diamètre). En revanche, **Reisi et al. (2016)** ont enregistré des diamètres nettement plus inférieurs que les travaux précités, à savoir, 15 mm pour *B. cereus* et 09 mm pour *E. coli*.

L'étude réalisée par **Sameer et Badri (2017)** et **Simiat et al. (2017)**, montrent que l'huile essentielle a été très active contre *Pseudomonas aeruginosa*, les diamètres des zones d'inhibition sont quasi similaires (22 mm et 21 mm, respectivement). Par comparaison, ces valeurs sont supérieures au nôtre (14 mm de diamètre). **Gupta et al. (2008)** a, par contre, constaté une résistance de la souche envers l'huile essentielle.

Concernant *Candida albicans*, **Sameer et Badri (2017)** ont noté un diamètre de zone d'inhibition de 32 mm, ce qui est presque similaire au nôtre (35 mm). Cependant, ces résultats restent inférieurs à celui trouvé par **Simiat et al. (2017)** (44 mm de diamètre).

Par comparaison entre les résultats d'aromatogramme, d'antibiogramme et d'antifongogramme (**tableau n°5 et n°6**), nous constatons que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est la plus active. En effet, celle-ci a exercé une activité supérieure à celle des

antibiotiques étant donné qu'elle a pu inhiber la croissance de toutes les souches bactériennes testées, alors que certains antibiotiques tels que, oxacilline (OX), ampicilline (AMP) et acide clavulanique (AUG) ont été inactifs. La même observation est faite en comparant l'huile aux antifongiques : éconazole et clotrimazole. En effet, la levure a été plus sensible à l'huile (35 mm de diamètre) qu'à ces derniers (22 mm et 15 mm, respectivement).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* pourrait être attribuée aux phénols et notamment, à son constituant majoritaire l'eugénol (**Rhayour, 2002**). Une étude menée par (**Cillet et Iacroit, 2007**) indique que les huiles essentielles ont majoritairement un effet antibactérien. Cet effet se résume en trois phases générales : Premièrement, les molécules de l'huile essentielle vont attaquer la membrane de la bactérie. Deuxièmement, l'huile essentielle va acidifier l'intérieur de la bactérie pour bloquer la production d'énergie et de composantes de structure. Enfin, si la bactérie survit, l'huile attaquera directement le matériel génétique de cette dernière.

De nombreuses études rapportent que l'effet antibactérien des huiles essentielles contre les souches Gram positives est plus prononcé que contre les souches Gram négatives. Ce qui confirme nos résultats, en effet, *Bacillus cereus* ATCC 10876 a été plus sensible à l'huile essentielle du clou de girofle que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 Ceci est dû à la structure de la membrane externe des bactéries Gram négatives et plus particulièrement, aux lipopolysaccharides. Ces derniers rendent la membrane externe plus hydrophile, ce qui empêche les composés hydrophobes d'y adhérer (**Laszlo, 2000 ; Raeisi et al., 2016**).

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* peut également être liée à la présence de phénols et surtout, à l'eugénol. Une étude faite par (**Pinto et al., 2009**) a démontré que ce composant avait une grande activité fongicide contre *Candida albicans*, ce qui est en accord avec nos résultats.

D'autres composants tels que les alcools monoterpéniques, les aldéhydes aromatiques et monoterpéniques et les lactones, peuvent également être responsables de l'activité antimicrobienne (**Ultee et al., 2002 ; Laurent, 2017**). Il est à noter que les composés minoritaires peuvent avoir une part de contribution. En effet, ces derniers y agissent de manière synergique avec les composés majoritaires (**Lahlou, 2004**).

Par ailleurs, les différents résultats obtenus par les travaux précités comparés aux nôtres, pourrait être liés à de nombreux facteurs écologiques, tels que la température, l'humidité relative, l'insolation, la nature du sol ainsi que, la période de récolte. En effet, ces derniers peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles et de ce fait, leur activité antimicrobienne (**Oliveira et al., 2005 ;Bounatirou et al., 2007**).

Conclusion

Conclusion

La recherche sur les substances naturelles à partir des plantes, participe à l'effort national de conservation des plantes médicinales, et à la valorisation de la médecine traditionnelle car ces plantes restent toujours la source fiable des principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques.

Le présent travail avait pour objectif d'étudier l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*.

L'extraction de l'huile essentielle du clou de girofle par hydrodistillation a révélé un rendement de 2.96%.

Les résultats de l'antibiogramme nous ont permis de constater que *Escherichia coli* ATCC 25922 était sensible à l'action de quatre antibiotiques (gentamicine (CN), erythromycine (E), chloramphénicol (C) et polymyxine B (PB)), Les diamètre des zones d'inhibition varient de 10 mm à 32 mm, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été sensible à trois antibiotiques (gentamicine (CN), chloramphénicol (C), et polymyxine B (PB)) avec des diamètres allant de 8 mm à 25 mm. Quant à *Bacillus cereus* ATCC 10876, elle a été inhibée par cinq antibiotiques (gentamicine (CN), erythromycine (E), chloramphénicol (C), pipéracilline (PRL), polymyxine B (PB)), faisant d'elle la bactérie la plus sensible, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 11 mm et 35 mm.

Par ailleurs, les résultats de l'antifongigramme ont montré que *Candida albicans* ATCC 10231 était très sensible à l'econazole et au clotrimazole, les diamètres des zones d'inhibition sont de 22 mm et 15 mm, respectivement.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a été évaluée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé (aromatogramme). Les résultats montrent que l'huile a exercé un très grand effet inhibiteur sur les quatre souches microbiennes de références, à savoir, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Candida albicans* ATCC 10231, Ces deux dernières souches se sont avérées être les plus sensibles à l'huile essentielle ; le diamètre de leur zone d'inhibition respectif est de 30 mm et 35 mm.

En comparant les résultats de l'aromatogramme avec les résultats de l'antibiogramme et de l'antifongigramme, il est clair que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* possède un pouvoir antimicrobien supérieur à celui des agents antimicrobiens standards utilisés. En effet, les

Conclusion

diamètres des zones d'inhibitions enregistrés sont plus grands. De plus, la croissance de toutes les souches microbiennes a été inhibée par l'huile essentielle ; ce qui n'est pas le cas de tous les antibiotiques.

A partir des résultats obtenus au cours de notre étude, on peut conclure et prédire que l'huile essentielle du clou de girofle pourrait servir comme base de lutte biologique contre les germes responsables des maladies infectieuses et pourrait être de ce fait, une alternative aux antibiotiques et aux antifongiques.

Toutefois, ce travail ne constitue qu'une étape préliminaire dans la recherche des substances naturelles biologiquement actives. Il serait intéressant d'approfondir et de compléter cette étude en :

- Déterminant les concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides de l'huile essentielles ;
- Analysant la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CPG – SM) ;
- Testant d'autres méthodes d'extraction de l'huile essentielle ;
- Evaluant d'autres activités biologiques que l'huile essentielle pourrait posséder, telles que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, insecticide...etc.

Références bibliographiques

AFNOR (Association Française de Normalisation), 1992, Recueil des normes françaises « Huiles essentielles », 4ème édition, Paris

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

Alice D, 2011, Faisabilité de la mise en place d'une indication géographique sur le clou de girofle à Madagascar. *Thèse de Doctorat, Ecole supérieure d'Agro-Développement International ISTOM*, 65 -72p

Amit P., Parul S, 2011, Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1(2), 69-80p

Amshoff G.J.H., Aymonin G.G, 1966, Flore du Gabon: Myrtacées et Thyméléacées. *Vol 11, MNHN, Paris*, 106p

Atmani H., Baira K, 2015, Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères physico-chimique de l'huile essentielle du clou de girofle *Syzygium aromaticum* L, *Mémoire de Master en Biologie et physiologie végétale, Université de Constantine*, 64p

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M, 2008, Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475p

Barbelet S, 2015, Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. *Thèse de Doctorat d'Etat de docteur en pharmacie, Université de Lorraine, France*, 22-24p

Baser K.H.C., Buchbauer G, 2010, Handbook of essential oils: Science Technology and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America, 994p

Bastien F, 2008, Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* a la réunion. *Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France*, 25-26p

Benzeggouta N, 2015, Evaluation des effets biologiques des extraits aqueux de plantes médicinales seules et combinées. *Thèse de Doctorat en Sciences. Université de Constantine*, 46-49p

- Benkeblia N, 2004**, Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, **37**(2), 263–268p
- Bois D, 1999**, Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges : histoire utilisation, culture. *Volume 3, plantes à épices, à aromates, à condiments*, Paris : Ed, CME, 1-11p
- Botineau M, 2010**, Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. *Ed, Tec & Doc, Paris*, 1335p
- Boukhatem F, 2017**, Activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux épices : *Syzygium aromaticum* et *Illicium verum*, *Mémoire de Master, Université de Mostaganem*, 48p
- Boullard B, 1997**, Plantes et champignons: dictionnaire. *ESTEM, Paris*, 398P
- Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Pedro L G, 2007**, Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from tunisian *Thymus capitatus* Hoff et Link. *Food chemistry*, **105**, 146-155p
- Bremness L., Fletcher N., Ward M., Griggs P, 2011**, Plantes aromatiques et médicinales. *Larousse*, 340p
- Brickell C., Mioulane P, 2004**, Royal Horticultural Society (Grande-Bretagne). Encyclopédie universelle des 15 000 plantes et fleurs de jardin. *Larousse, Paris*, 989p
- Bruneton J, 1999**, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. *Ed Tec & Doc, Lavoisier, Paris*, 1120p
- Buchbauer G, 2000**, The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Perfumer & Flavorist* 25, 64–67p
- Burt S, 2004**, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223 – 253p
- Caillet., Lacroix, 2007**, Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. *Laboratoire de recherche en science appliquées a l'alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier*, 1-8p
- Carette A.S, 2000**, La lavande et son huile essentielle. *Thèse De Doctorat, Université de Toulouse, France*, 100p

Couecou B., Lapiere L, 2001, Transformation des fruits exotiques en jus : description des process et optimisation des qualités. *Conférence Cirad flhor. Conservation et transformation des fruits : nouveaux enjeux, nouvelles techniques. France, 62p*

Couic-Marinier F., Lobstein A, 2013, Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques.*

De Billerbeck .V.G., Roques C., Vanière P., Marquier P, 2002, Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène, 10(3), 248-251p*

Deschepper P, 2017, Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. *Thèse de Doctorat, Université de Marseille, France, 172p*

Desmares C., Laurent A., Delerme C, 2008, Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. *AFSSAPS. Anatole, France, 18p*

Dobre A.A., Gagi V., Petru N, 2011, Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. *Romanian Biotechnological Letters, 16 (6), 119-125p*

Duarte M.C., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L., Delarmelina C, 2005, Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol, 97(2), 305-311p*

Dunstan H., Florentine S K., Calvino-Cancela M., Westbrooke M.E., Palmer G.C., 2013, Dietary characteristics of Emus (*Dromaius novaehollandiae*) in semi-arid New South Wales, Australia, and dispersal and germination of ingested seeds. *CSIRO PUBLISHING, 113, 168-176p*

Dupont F, Guignard J.L, 2012, Botanique: les familles des plantes. *15ème ed. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson, 16p*

Edris A.E, 2007, Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res, 21, 308-323p*

El-Bahai M., Al-Hariru M., Yar T., Bamosa A, 2000, Cardiac inotropic and hypertrophic effects of *Nigella sativa*. *Saudi Arabia University, 1.2.3p*

Fantino N.S, 1990, Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. *Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, France, 41-45p*

- Fauchère J.L., Avril J.L., 2002**, Bactériologie générale et médicale. *Elleipses edition Marketing*, ISBN: 2-7298-0747-0
- Faucon M, 2012**, Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription : monographies : huiles essentielles, huiles végétales, hydrolats aromatiques. *Ed. Sang de la Terre. Paris*, 879p
- Fernandez X., Chemat F, 2012**, La chimie des huiles essentielles. *Editions Vuibert*, 288p
- Fernández-Pan I., Carrión-Granda X., Maté J I, 2014**, Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, **36**(1), 69–75p
- Franchomme P., Pénoël D, 1990**, L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. *Roger Jollois éditeur. Limoges, France*, 445 p
- Franchomme P., Pénoël D, 2001**, L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. *Roger Jollois, Limoges, France*, 445p
- Fisher K., Phillips C, 2008**, Potentiel antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? A review. *Trends in Food Science and Technology*, **19**, 156-164 p
- Ganou L, 1993**, Contribution a l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielle. *Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France*, 273p
- Garneau F.X, 2005**, Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation - *Manuel pratique. Corporation Laseve, Université du Québec à Chicoutimi*, 185p
- Gauriat E, 2015**, Accompagnement d'une rééducation physique posttraumatique par l'aromathérapie. *Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Limoges, France*, 150p
- Gérault G., Mary R, 2008**, Le guide l'aromathérapie. *Ed A. Michel. Paris*
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana E.C.S., Fonseca Maria J.V, 2003**, Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Methode. *AAPS Pharm Sci*, **5**(2), 1-5p
- Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R, 2010**, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (*Myrtaceae*) Giroflier. *Phytothérapie*. **8**, 37-43p

Girard G, 2010, Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaires d'hier à aujourd'hui. *Thèse de Doctorat. Nancy I. France*, 6-8p

Gupta C., Garg A., Uniyal R., Gupta S, 2008, Comparison Of Antimicrobial Activities Of Clove Oil & Its Extract On Some Food Borne Microbes. *The Internet Journal of Microbiology*. 7(1), 1-7p

Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A., Benmansour A, 2009, Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*, 5(2), 246-259p

Hanif M.A., Al-Maskari M.Y., Al-Maskari A., Al-Shukaili A., Al-Maskari A.Y., Al-Sabahi J.N, 2011, Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5), 751–757p

Helander I.M., Alakomi H-L., Latva-Kava K, 1998, Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J Agric Food Chem*, 46(9), 3590-3595p

Hemaiswarya S, Kruthiventi A.K., et Doble M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15, 639-652p

Houari A.D.E, 2015, Effet prophylactique de l'administration d'un extrait de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) chez les rats wistar en croissance intoxiqués au plomb et au manganèse. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale. Thèse de Doctorat en Biologie, Université d'Oran, 52- 63p

Howard L., Tomato leaf (non datée, Dartmouth college, Hanover, États-Unis), Photographie en microscopie électronique à balayage. In Ripple Electron Microscope Facility.

Disponible sur <http://remf.dartmouth.edu/images/TomatoLeafSEM/tomatoleafsemcatalog.html> (consulté le 07/02/2017)

Hulin V., Mathot A G., Mafart P., et Dufossé L, 1998, Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18, 563-582p

Hussain A.I, 2009, Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. *PhD, University of agriculture*, 257p

Iserin P., 2001, Encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparation, soins *1st. Ed. Larousse Bourdasse. Paris*. 155-291p

Iserin P, Masson M., Restellini J, 2001, Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparations, soins. 2^{ème} édition Larousse. Hong Kong, 99-143p

Jaset-Dongmo P M., Tatsadjieu N L., Tchinda Sonwa E., Kuate J., Amvam Zollo P H., Menut C, 2008, Antiradical potential and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4045-4050 p

Kacemi Ben Sultane F, 2017, Activité antioxydante des huiles essentielles du gingembre (*Zingiber officinale*) et du clou de girofle (*Syzgium aromaticum*).

Kalemba D., Kunicka A, 2003, Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*, 10, 813-829p

Kaloustian J., Hadji-Minaglou F, 2012, La connaissance des huiles essentielles. Qualitologie et aromathérapie, *Springer*, 210p

Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., & Mete, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99(18), 8788–8795p

Kone S, 2001, Extraction des huiles essentielles par distillation. *Gate Information Service*. Eschbom, 1-2p

Kumar P., Mishra S., Malik A., & Satya S, 2011, Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802–817p

Kumar P., Mishra S., Malik A., & Satya S, 2012, Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: *Myrtaceae*) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*, 122(2), 212–218p

Lahlou M., 2004, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448p

Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P J, 2001, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*, 91(3), 453-462p

Lamendin H., Toscano G., Requirand P, 2004, Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires. *EMC-Dentisterie, 1*, 179–192p

Laszlo P, 2000, Le savoir des plantes. *Ellipses Marketing, Paris*, 125p

Lucchesi M.E, 2005, Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de Doctorat en Sciences, Université de la Réunion, France*, 146p

Maria J.V, 2003, Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Methode. *AAPS Pharm Sci, 5* (2)1-5p

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

Maruyama N., Sekimoto N., Ishibashi H, 2005, Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of *Geranium* essential oil. *J. of inflammation, 2*(1),1-11p

Mascret C, 2010, La réglementation régissant les huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques, 49*(492), 54–56p

Max W., Robert A, 2003, Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinal, science et thérapeutique. *Ed.2.Paris*, Pp: XXXIX

Mengal P., Behn D., Bellido G.I.L.M., et Monpon B, 1993, VMHD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums, Cosmétiques, Arômes, 114*, 66-67p

Miguel M.G, 2012, Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour. Fragr.J. 25*, 291-312p

Ministère de l'agriculture de la République de Madagascar, 2014, Giroflier [en ligne]. 2014 [consulté le 19.09.14].

Mockute D., Bernotiene G., Judzentiene A, 2001, The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp.vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry 57*, 65-69p

Moller K, 2008, La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. *Editorial UNICO*. 152p

Muhamad I., Zelika M.R., Evelyne N.H., Rika H., and Komar R.W, 2018, Isolation of 5,7-Dihydroxy, 6,8-Dimethyl Flavanone from *Syzygium aqueum* with Its Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitor Activities, *Pharmacognosy Res*, **10**(1), 60–63p

Musthafa K.S, Voravuthikunchai S.P, 2015, Anti-virulence potential of eugenyl acetate against pathogenic bacteria of medical importance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **107**(3), 703-710p

Naili N.E.P., Kesraoui, 2013, Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus leucotrichus*. Mémoire de Master, en Botanique médicale et Cryptogamie

NCCLS “National Committee for Clinical Laboratory Standards”, 2001, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11, Wayne, PA, USA.

Ndoye Foe F.M., Tchingang T.F.K., Nyegue A.M., Abdou J.P., Yaya A.J.G., Tchinda A.T., Essame J.O., Etoa F.X, 2016, Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complement Alternative Medicine*, **7**(16), 117p

Nyegue M.A, 2005, Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelque plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun : Evaluation de leurs activités antiradicalaires, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. *Thèse de Doctorat en chimie organique, minérale, analytique et industrielle, Université de Montpellier, France*, 184p

OMS, 2002, Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N°4, 6 p

Oliveira M .J., Iani F.P.C., Oliveira C.B.A., Santos M.R., Souza P.S., Santos S.C., Seraphin J.C., et Ferri P.H, 2005, Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptissuaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 275-285p

Oussalah M., Caillet S., Saucier L, 2007, Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria : *Escherichia coli* 0157 :H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*.**18**(5) :415-420p.

Perrier de la bâthie H, 1953, Flore de Madagascar et des Comores, 152ème famille, Myrtacées. *Firmin-Didot et Cie, Paris*, 1-2p

Pellerin P, 1991, Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. *Perfum. Flav*, **16**, 37-39p

Pibiri M.C, 2006, Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de Doctorat. Ecol polytechnique fédérale de Lausanne, France*, 28-52p

Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, 2009, Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of medical microbiology*, **58**(11), 1454-1462p

Piochon M, 2008, Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. *Mémoire pour la maîtrise en ressources renouvelables, Université de Québec, Canada*, 5-9p

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

Pulikottil S.J., Nath S, 2015, Potential of clove of *Syzygium aromaticum* in development of a therapeutic agent for periodontal disease. A review, *SADJ*, **70** (3), 108-115p

Quezel P., Santa S, 1963, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ; *Tome II, CNRS, Paris*.

Ranoarisoa K.M, 2012, Evolution historique et état des lieux de la filière girofle à Madagascar Mémoire d'Ingénieur Agronome, Antananarivo : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, 89 p

Ramarijaona rabary B.C, 1985, Le giroflier de Madagascar : conditions de production et différentes utilisations. *Thèse de Doctorat en Chirurgie dentaire. Université de Nancy I, France*, 110p.

Rakotoatimanana B.V, 1999, Contribution à l'optimisation d'une unité de production d'huiles essentielles. *Mémoire de fin d'études, Université d'Antananarivo*.

Raesi M., Hashemi M., Aminzare M., Sadeghi M., Jahani T., Keshavarzi H., Jebelli Javan A., Mirahahidi M., Tepe B, 2016, Comparative Evaluation of Phytochemical,

Antioxidant, and Antibacterial Properties from the Essential Oils of Four Commonly Consuming Plants in Iran. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, **3**,107-113p

Reynold J.E., Martindale K B, 1996, the extra pharmacopoeia 31st edition. Published by the council of royal pharmaceutical society of Great Britain, London , 885: 255-260p

Rhayour K, 2002, Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *E. coli*, *Bacillus Subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de Doctorat. Université de Fès, Maroc*, 170p

Sabahi J.N, 2011, Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(5), 751-757 p

Sameer G.M., Badri A.M, 2017, Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* and *Citrus aurantifolia* essential oils against some microbes in Khartoum, Sudan. *EC Microbiology*, **12**(6) , 253-259p

Salvador C, 2010, L'aromathérapie spirituelle histoire et bienfaits des huiles essentielles pour les maux du corps et de l'âme. *Ed G. Trédaniel. Paris*

Salvatori O, 2005, Botanica encyclopédie de botanique & d'horticulture: plus de 10000 plantes du monde entier. H.F. *Ullmann, Königswinter (Allemagne)*, 1020p

Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S, 2001, Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, **34**, 3-21p

Schauenberg P., Paris F, 2013, Guide des plantes médicinales: analyse, description et utilisation de 400 plantes. *Ed. Delachaux et Niestle, Paris*. 396p

Simiat O.J., Lateefah A A., Kazeem A A., (2017), Phytochemical Screening and Antimicrobial Evaluation of *Syzygium aromaticum* Extract and Essential oil. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, **6**(7), 4557-4567p

Solene J, 2012, La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. *Thèse de Doctorat en pPharmacie, Université de Lorraine. France*, 142p

Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., & dan Bigger S.W 2003, Antimicrobial Properties of basil and Its Possible Application in Food Packaging. *Journal of Agricultural Dan Food Chemistry*, **51**(11) (i), 3197-3207p

Svoboda K.P., Svoboda T.G., Syred A, 2000, Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Microscopix Publications, 60p

Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., & Cliver D.O, 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, **21**(9), 1199-1218p

Talhi Ahlem., Teboula Zeyneb., Boussaha M, 2018, Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des trois plantes médicinales (*Salvia sclarea*, *Syzygium aromaticum* et *Allium cepa*), *Mémoire de Master, Université de Guelma*, 48p

Teisseire P.J, 1991, Chimie Des Substances Odorantes. *Technique documentation Lavoisier*, Paris, 14, 25-30p

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M, 2005, Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, **9**(3), 333-340p

Teuscher E., Antor R., et Lobstein A, 2005, Plantes aromatiques. (Epices, aromates, condiments et huiles essentielles). *Tec & doc, Paris*, 266-477p

Thompson J.D., Chalcha t.J.C., Michet A., Linhart Y.B., Ehlers B, 2003, Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol*, **29**, 859-880p

Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R, 2002, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1561-1568p

Vermeulen F., Johnston M.D.L, 2011, Plants, homeopathic and medicinal uses from a botanic family perspective. *Glasgow : Saltire Books*, **3**, 729-745p

Vokou D., Kokkini S., Bessiere J.M., 1988, *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: distribution, volatile oil yield, and composition. *Econ. Bot*, **42**(3), 483-487p

Wenqiang G.Li. S., Yan R., Tang S., Quan C, 2007, Comparaison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction méthodes. *Food Chemistry*, **101**, 1558-1564p

Zambonelli A., d'Aulerio A.Z., Bianchi A., Albasini A, 1996, Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. *Journal of Phytopathology*, **144**(9-10), 491-494p

Annexe

ANNEXE

Annexe n°1

Milieux de culture

Milieux	Composition des milieux de culture
Gélose nutritive	Extrait de viande.....1g Extrait de levure.....2,5g Peptone.....5g Chlorure de sodium.....5g Agar Agar.....15g Eau distillée.....1000ml pH = 7
Gélose MH	Infusion de viande de boeuf (déshydratée)300 g Hydrolysate de caséine017,5 g Amidon01,50 g Eau distillée1000 ml Agar Agar17,00 g pH = 7,5
Bouillon nutritif	Extrait de viande1g Extrait de levure.....2.5 g Peptone5 g Chlorure de sodium.....5 g Eau distillée.....1000 ml pH = 7

Sabouraud	Peptone.....	10 g
	Glucose	20 g
	Agar	15 g
	Eau distillée.....	1000 ml
	pH = 6	