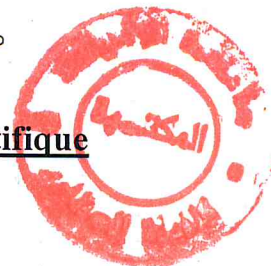


Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

IGHILI Nassima

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : **Chimie des substances naturelles**

Titre

Dosage de l'eugénol dans les clous de girofle
(*Eugenia caryophyllata* Thunb) par spectrométrie IRTF
Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'extrait
des clous de girofle

Soutenu le 27/09/2011, devant le jury composé de :

M. EL HATTAB	MCA	Président
Y. DAGHBOUCHE	Pr.	Examineur
N. AYACHI	MAA	Examineur
N. BOUZIDI	MCB	Rapporteur



Remerciements

Avant tout je remercie ALLAH tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce travail

J'adresse mes remerciements les plus sincères et les plus dévoués à Dr El Hattab M. maître de conférences à l'Université Saad Dahleb de Blida pour m'avoir donné la chance d'être parmi cette meilleure promo de Master

Je remercie spécialement Madame Daghbouche Y., Professeur à l'Université Saad Dahleb de Blida, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux et sa patience qui ont donné vie à ce travail et je suis très reconnaissante de tout ce qu'elle m'a apporté tant du point de vue scientifique que du point de vue personnel

Avec beaucoup de respect, je remercie Dr Bouzidi N. pour la qualité de son encadrement sa confiance, et ses conseils qui ont été pour moi une aide inestimable ; merci profondément pour le temps consacré.

Je tiens à remercier

Docteur El Hattab, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance

Professeur Y. Daghbouche, qui me fait l'honneur de juger ce travail, je vous adresse l'expression de ma sincère reconnaissance

Docteur N. Ayachi, maître assistante à l'Université Saad Dahleb de Blida, pour avoir accepté de juger ce travail

J'adresse un remerciement tout particulier à Mr Ait Yahya Ahmed et Mme Hamza Kahina pour leurs confiances et disponibilités, ses recommandations et ses conseils précieux et pertinents, qui n'ont pas cessés de me prodiguer le long de ce travail

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mr Toumatia Omrane et l'équipe du laboratoire de microbiologie ENS-Kouba, aux personnels de département de Chimie industriel et précisément Mr Zoubir pour son aide

*J'adresse également mes sincères remerciements, à tous mes enseignants, qui m'ont donnée
les bases de la science*

*Je remercie infiniment mes amies : Amina, Hanane, Lilia, Sarah, Safia, Siham, Souraya,
Chabboub Abou bakr, Jilali, Yacin, Samir, Abd el baki, Walid et surtout Khelifi Fares, pour
leurs aides et leurs générosités*

*Je touche aussi par mes remerciements tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors de la
réalisation de ce travail.*

Dédicace

Je dédie ce travail:

A Ma Chère Mère Aouiche Kheira

Les mots me manquent pour exprimer toute ma reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour mon bonheur et ma réussite. Que Dieu te protège et t'accorde-le bonheur, la santé et la longue vie. Pour ton grand amour, ta tendresse et tes longues prières qui m'ont été la meilleure gage de réussite, je t'offre ce travail.

A Mon Père Daifallah

*Nulle expression ne peut traduire le noble sentiment que j'ai à ton égard,
Pour l'amour que tu m'as toujours porté,
Pour ta patience et ta générosité.*

A mes aimables grandes mères, mes chères tantes : Aicha, Hakima, Houria et surtout ma chère Souad

*Pour vos soutiens moraux et matériels que vous avez consentis en ma faveur,
Je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande reconnaissance et mon grand amour.*

A Mes Chères frères Zakaria, Ismail et Hamza

Que dieu vous protège et vous offre tout le bonheur que vous méritez pour votre avenir.

A Mes oncles : Abd Elkader, Abd Elghani, Azzou, Zoubir, Toufik et surtout Fathi

A mes cousines : Safia, Siham, Abir et khouloud.

A Toute ma famille et mes amis

Mes proches et mon entourage, qui n'ont pas arrêté de me pousser et de me soutenir.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus sincère gratitude.

J'espère que j'étais à la hauteur de ce que vous attendez de moi.

Résumé

Cette étude est consacrée au développement d'une méthode analytique, pour la détermination de l'eugénol à partir de l'extrait des clous de girofle (*Eugenia caryophyllata*) en utilisant la spectrométrie IRTF. Les propriétés de solubilité de l'eugénol dans un milieu alcalin et sa capacité de régénération en milieu acide ont été utilisées pour isoler l'eugénol.

L'utilisation de dichlorométhane fournit un rendement d'extraction de 88% d'eugénol.

L'analyse qualitative par CG-SM de l'extrait des clous de girofle a montré qu'il s'agit d'un chémotype riche en phénol, dominé par l'eugénol. Le contenu d'eugénol dans l'extrait d'*Eugenia caryophyllata*, préalablement traité, a été évalué à 35,5% en utilisant les bandes d'absorbance à 1122 cm^{-1} corrigée entre une ligne de base établie entre $1112\text{-}1134\text{ cm}^{-1}$ et à 1148 cm^{-1} avec une ligne de base corrigée entre $1134\text{-}1162\text{ cm}^{-1}$.

Dans cette étude, l'extrait des clous de girofle a été évalué en employant des tests d'activité antimicrobienne et antioxydante. Les souches bactériennes : *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* semblent peu sensible envers l'extrait de clou de girofle, à l'exception de : *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* qui sont avérées plus sensibles. On peut considérer aussi que les levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* et le champignon *Fusarium culmorum* sont très sensibles. L'extrait des clous de girofle possède la capacité de piéger le radical libre DPPH, car il agit à faible dose et dans un intervalle de temps très réduit. En comparaison avec d'autres standards de référence, les pouvoirs de piégeage de ce radicale sont classés dans cet ordre : l'extrait de clous de girofle > vitamine E > vitamine C > BHA > BHT. Cet extrait possède le plus fort potentiel antioxydant, qui est principalement dû à son principal composé eugénol avec un pourcentage majoritaire et probablement à la présence de la vitamine E.

Mots - clés : *Eugenia caryophyllata*, eugénol, spectrométrie IRTF, préconcentration, pouvoir antimicrobien, activité antioxydante, DPPH, EC50.

Abstract

This study is devoted to the development of an analytical method, for the determination of eugenol starting from the extract of the cloves (*Eugenia caryophyllata*) by using spectrometry FTIR. Solubility properties of eugenol in an alkaline medium and its capacity of regeneration in acid medium were used to isolate eugenol. The use of dichloromethane provides an extraction yield of 88% of eugenol. Qualitative analysis by GC-MS of the extract of cloves has shown that is a chemotype rich in phenol, dominated by eugenol. The eugenol content in the *Eugenia caryophyllata* extract, previously treated, has been evaluated at 35.5% by using the absorbance bands at 1122 cm^{-1} corrected with a base line established between $1112\text{-}1134\text{ cm}^{-1}$ and at 1148 cm^{-1} corrected with a base line between $1134\text{-}1162\text{ cm}^{-1}$.

In this study, cloves extract was evaluated by employing various in vitro antibacterial and antioxidant activity. We note Bacterial strains: *Salmonellas enterica*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* seem not very sensitive towards the extract of clove, except for: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus* which are proven more sensitive. We can consider also, that the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and the mushroom *Fusarium culmorum* are very sensitive.

The extract of the cloves has the capacity to trap free radical DPPH, because it acts at low dose and in a much reduced time interval. In Comparison with other standards reference shown that the capacities of trapping of this radical are listed in this order:

Cloves extract > vitamin E > vitamin C > BHA > BHT. This extract possesses the strongest antioxidant potential, which is mainly due to its major compound eugenol with an acceptable percentage and probably to the presence of the vitamin E.

Key words: *Eugenia caryophyllata*, eugenol, FTIR spectrometry, preconcentration, antimicrobial capacity, antioxidant activity, DPPH, EC50

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تطوير أسلوب لإيجاد الأوجينول من مستخلص القرنفل (أوجينيا كريوفيلاتا ثانب) باستخدام المطيافية ما تحت الحمراء بتحويل فوريي . خصائص ذوبان الأوجينول في وسط قلوي و قدرته على التحرر في وسط حامضي استُغلت لعزله . استخدام ثنائي كلور الميثان مكن من توفير مردود 88% من الأوجينول.

و قد أظهر التحليل النوعي لمستخلص القرنفل بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية المزودة مع مطيافية الكتلة انه غني بنوع كيميائي يتمثل في الفينول و الذي يغلبه الأوجينول.

فُدر الأوجينول المحتوى في مستخلص أوجينيا كريوفيلاتا و المعالج مسبقا ب 35.5 %، باستخدام طول الموجات الخاصة عند 1122 سم⁻¹ و عند 1148 سم⁻¹ مع قواعد مصححة بين 1112-1134 سم⁻¹ و بين 1134-1162 سم⁻¹ على التوالي. في هذه الدراسة، تم تقييم مستخلص القرنفل باختبار فعاليف المضادة للمكروبات و المضادة للأكسدة. السلالات البكتيرية التالية : سلمونيلا اونترিকা، باسيليس سبتليس و بسودوموناس ابروجنوزا ، اظهرت نوعا من الحساسية اتجاه مستخلص القرنفل باستثناء ايشريشيا كولي، ميكروكوكيس ليتوس و ستافيلوكوكيس اوريبوس اللائي أبدین حساسية اكبر. يمكن أيضا اعتبار كل من الخمائر سكاروميس سرفيزيا ، كونديدا البكنز وكذا الفطر فيزاريوم كلموريوم أنها جد حساسة اتجاه مستخلص القرنفل.

مستخلص القرنفل يمتلك القدرة على تفخيخ الجذر الحر DPPH، بجرعات صغيرة و في فترة زمنية قصيرة جدا . بالمقارنة مع المركبات المرجعية، تم ترتيب القدرات على تفخيخ الجذر الحر على النحو التالي:

مستخلص القرنفل < فيتامين ه < فيتامين ج < BHA < BHT.

ملك هذا المستخلص أعلى قدرة مضادة للأكسدة، و التي ترجع أساسا لاحتوائه على الأوجينول و كذا فيتامين ه.

كلمات مفتاحية : أوجينيا كريوفيلاتا، الأوجينول، المطيافية ما تحت الحمراء بتحويل فوريي ، القدرة المضادة للمكروبات، القدرة المضادة للأكسدة، DPPH، EC50.

Liste des abréviations

ABREVIATION	SIGNIFICATION
ABTS	2,20-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
°C	Degré Celsius
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CG-SM	Chromatographie Gazeuse – Spectrométrie de Masse
D.O	Densité Optique
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
eV	Electron Volt
H.E	Huile (s) Essentielle (s)
IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
T_R	Temps de Rétention
UV	Spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultra-violet/visible
W	Weight : poids
LLDPE	Linear Low Density PolyEthylene
IRTF-ATR	Infrarouge à Transroformée de Fourier - Réflexion Totale Atténuée

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Culinaire : Qui a rapport à la cuisine. → Gastronomique. *Art culinaire. Préparations culinaires.* Etym. 1546 ◇ latin *culinarius*, de *culina* « cuisine », de *coquere*. Famille étymologique δ cuire.

Pathogène : étym. 1865 ◇ de patho- et -gène. Famille étymologique δ genèse. **Méd.** Qui peut causer une maladie. *Agent, bactérie, microbe pathogène.* □ **Fig.** Qui est cause d'un trouble mental, d'une attitude anormale.

Amphibiens : étym. 1822 ◇ de *amphibie*. ■ Zool. Classe d'animaux vertébrés tétrapodes amphibies dont la peau nue, molle, humide, est criblée de glandes à sécrétion visqueuse, dont la respiration est surtout cutanée, et qui subissent une métamorphose. → Batracien; anoure, apode, urodèles. *Au sing. La grenouille est un amphibien.*

Biol. Capable de vivre à l'air ou dans l'eau, entièrement émergé ou immergé. *La grenouille est amphibie. Végétal amphibie*, dont le passage de la vie aquatique à la vie terrestre s'accompagne de modifications morphologiques.

▫ **Par ext.** Qui vit ordinairement à la surface de l'eau (ex. phoque), ou dans l'eau à l'état larvaire et hors de l'eau à l'état adulte (ex. crapaud). N. m. (1653) *Un amphibie*.

Les rongeurs : N. m. pl. Ordre de mammifères aux incisives en ciseaux, à croissance continue. *Les rongeurs sont divisés en trois sous-ordres : celui des castors, celui des écureuils et celui des hamsters, rats et souris.* Sing. *Le porc-épic est un rongeur.*

La tuberculose : Maladie infectieuse et contagieuse, inoculable, causée par le bacille de Koch, commune à l'homme et à certains animaux (bovidés), dont la lésion caractéristique est le tubercule, et qui affecte le plus souvent le poumon.

Carminatif : ETYM. XV^e ◇ latin médiéval *carminativus*, de *carminare* « nettoyer ». Qui a la propriété de faire expulser les gaz intestinaux. « *Un clystère carminatif* » (Molière).

Antiémétique : ETYM. 1795 ◇ de l. anti- et émétique, ■ **Méd.** Propre à arrêter les vomissements. N. m. *Un antiémétique*.

Nausée : ETYM. 1495 ◇ latin *nausea*; grec *nautia* « mal de mer », de *nautês* « navigateur » Envie de vomir. → Malaise, haut-le-cœur. « *Et elle fut prise d'une nausée si soudaine qu'elle eut à peine le temps de saisir son mouchoir* » (Flaubert). *Avoir la nausée, des nausées :* avoir mal au cœur.

Stomachique : ETYM. 1694; « de l'estomac » 1537 ◇ latin stomachicus, de stomachus.

■ Méd. Qui facilite la digestion gastrique.

Tonique : ETYM. 1538 « qui présente de la force, de l'élasticité » méd. ◇ grec tonikos « qui se tend », Qui fortifie, stimule les forces de l'organisme. *Médicament tonique*. → réconfortant, reconstituant, tonifiant.

Drogue : Ingrédient, matière première employée pour les préparations médicamenteuses confectionnées en officine de pharmacie.

Hernie : ETYM. 1490 ◇ latin hernia, Tuméfaction formée par un organe totalement ou partiellement sorti (par un orifice naturel ou accidentel) de la cavité qui le contient à l'état normal. → -cèle. *Hernie de la moelle épinière*. → **Spina-bifida**. *Hernie du foie* (→ **hépatocèle**). *Hernie discale*, d'un disque intervertébral.

Spécialt, plus cour. *Hernie abdominale*. *Hernie interne*, à l'intérieur de la cavité abdominale. *Hernie hiatale**. *Hernie étranglée*, où le resserrement du col d'un sac herniaire entraîne la constriction de l'organe hernié.

Herpès : ETYM. XIII^e *erpès* ◇ latin et grec herpes, Affection cutanée caractérisée par une éruption de petites vésicules transparentes, groupées en nombre variable sur une tache congestive, provoquée par un virus. *Herpès génital, labial*. *Vésicule d'herpès sur la lèvre* (cf. Bouton de fièvre*).

Epilepsie : Maladie nerveuse chronique caractérisée par de brusques attaques convulsives avec perte de connaissance. → **Comitialité** (cf. Mal comitial*). *Attaque, crise d'épilepsie*. *Épilepsie essentielle* (autrefois appelée le haut mal, le mal sacré). « *Était-ce la véritable épilepsie, ou quelqu'une des formes nerveuses qui l'imitent ?* » (Suarès). N. EPILEPTOLOGUE. *Un neurologue-épileptologue*.

Antiphlogistique : ETYM. 1793 ◇ de 1. anti- et phlogistique, ■ Méd. (**Vieilli**) Qui combat les inflammations. → **Anti-inflammatoire**. Ex : *La glace est un antiphlogistique*.

Antihistaminique : ETYM. 1939 ◇ de 1. anti- et histaminique. ■ Biol. Qui combat les effets de l'histamine.

Flaveur : ETYM. v. 1970 ◇ anglais flavour, du latin fla- « odeur » (cf. fleurier) et savor.

■ Didact. ou littér. Sensation provoquée conjointement par le goût et l'odeur d'un aliment.

Epanouissement : étym.1611; espanissement XV^e ◊ de épanouir. Déploiement de la corolle.
L'épanouissement des roses. → Éclosion, floraison; anthèse.

Panacée : **ETYM.** 1550; hapax 1213 ◊ latin panacea; grec panakeia, de pan- et akos « remède ». ■ Remède universel, agissant sur toutes les maladies.

Lamblia : **ETYM.** 1927 ◊ de lamblia « protozoaire parasite de l'intestin humain ». ■ **Méd.** Ensemble de troubles causés par un protozoaire flagellé parasite de l'intestin humain.

Liste des Tableaux

- p. 10- Tableau 1.1 : *Composition chimique de l'huile essentielle des clous de girofle*
- p. 22- Tableau 2.1 : *Propriétés organoleptiques de l'extrait des clous de girofle*
- p. 25 - Tableau 2.2 : *Composition chimique de l'extrait lipidique des clous de girofle*
- p. 29 - Tableau 2.3 : *Comparaison des droites de calibration de l'eugénol préparé directement dans le CH_2Cl_2 et après purification et dilution dans le même solvant*
- p. 31 - Tableau 2.4: *Taux de l'eugénol dans l'extrait des clous de girofle*
- p. 36 - Tableau 3.1: *Références, figures et pathologies des souches utilisées*
- p. 39 - Tableau 3.2: *Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches*
- p. 41 - Tableau 3.3: *Produits et standards utilisés, leurs marques et degrés de pureté*
- p. 44 - Tableau 3.4: *Diamètres des zones d'inhibition du développement des bactéries gram négatif, en fonction des différentes concentrations en extrait des clous de girofle (milieu de culture ISP2)*
- p. 45 - Tableau 3.5: *Diamètres des zones d'inhibition du développement des bactéries gram positif, en fonction des différentes concentrations en extrait des clous de girofle (milieu de culture ISP2)*
- p. 45 - Tableau 3.6: *Diamètres des zones d'inhibition du développement des bactéries gram négatif ensemencées sur : (*) Muller Hinton, (**) Cétrimide agar base*
- p. 46 - Tableau 3.7: *Diamètres des zones d'inhibition du développement des bactéries gram positif ensemencées sur Muller Hinton*
- p. 50 - Tableau 3.8: *Diamètres des zones d'inhibition du développement des levures testées, en fonction de différentes concentrations en extrait de clous de girofle (milieu de culture ISP2)*

- p. 49 - Tableau 3.9: *Diamètres des zones d'inhibition du développement des champignons testés en fonction de différentes concentrations en extrait des clous de girofle (milieu de culture ISP2)*
- p. 50- Tableau 3.10: *Diamètres des zones d'inhibition du développement de C.albicans, ensemencées sur Sabouraud*
- p. 51- Tableau 3.11: *Etude comparative entre les résultats d'activité antimicrobienne obtenus d'E.coli et de C. albicans*
- p.54- Tableau 3.12 : *Comparaison de l'activité antibactérienne de l'extrait étudié et de l'huile essentielle [84] vis-à-vis de différentes souche*
- p.54- Tableau 3.13 : *Milieux de culture sélectifs dans l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait étudié et l'huile essentielle [84] des clous de girofle*
- p.57- Tableau 3.14 : *Variation du taux de piégeage (I%) du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des clous de girofle*
- p.58- Tableau 3.15 *Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des étalons d'antioxydants*
- p.58- Tableau 3.16 *Valeurs EC50 de l'extrait des clous de girofle et les standards antioxydants*

Liste des figures

- P.6- Figure 1.1 Voies responsables de la biosynthèse des métabolites secondaires (les sesquiterpènes et les phénylpropènes)*
- p.7- Figure 1.2 Structure chimique de l'eugénol*
- p.8- Figure 1.3 Différentes parties de giroflier*
- p.14- Figure 1.4 Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier*
- p.20- Figure 2.1 Montage de flux utilisé pour la détermination de l'eugénol par IRTF*
- p.21- Figure 2.2 Boutons floraux secs du giroflier*
- p.21- Figure 2.3 Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale sèche*
- p.23- Figure 2.4 Procédé de purification de l'eugénol*
- p.24- Figure 2.5 Purification de l'eugénol par CCM*
- p.25- Figure 2.6 Chromatogramme de l'extrait lipidique des clous de girofle*
- p.26- Figure 2.7 Représentation de la composition chimique de l'extrait des clous de girofle*
- p. 27- Figure 2.8 Spectre IRTF de l'eugénol préparé directement dans CH_2Cl_2 (10 mg.mL^{-1})*
- p. 28- Figure 2.9 Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de l'eugénol préparée directement dans CH_2Cl_2*
- p. 28- Figure 2.10 Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de l'eugénol traitée et diluée dans CH_2Cl_2*
- p.30- Figure 2.11 Spectres IRTF des extraits de clous de girofle avant purification préparé directement dans CH_2Cl_2 (13.33 mg.mL^{-1}) (a), après purification et dilution dans CH_2Cl_2 (5.29 mg.mL^{-1}) (b) et de l'eugénol préparé directement dans CH_2Cl_2 (5 mg.mL^{-1}) (c)*

- p.31- Figure 2.12 *Spectre d'absorbance de l'extrait de clous de girofle après purification et dilution dans CH₂Cl₂*
- p.37- Figure 3.1 *Représentation de l'étude du pouvoir antimicrobien effectuée, en adoptant la méthode d'antibiogramme*
- p.38- Figure 3.2 *Autoclave*
- p.38- Figure 3.3 *Agitation des précultures avec un vortex*
- p.38- Figure 3.4 *Disques imbibés par différentes concentrations d'extrait*
- p.38- Figure 3.5 *Stérilisation des disques sous UV*
- p.39- Figure 3.6 *Gélose fusionné dans des boites de pétri*
- p.40- Figure 3.7 *Préparation des disques*
- p.42- Figure 3.8 *Différentes étapes du test au DPPH*
- p.44- Figure 3.9 *Aromatogramme de S.enterica avec l'extrait de clous de girofle*
- p.44- Figure 3.10 *Aromatogramme d'E.coli avec l'extrait de clous de girofle*
- p.45- Figure 3.11 *Aromatogramme de B.subtilis avec l'extrait de clous de girofle*
- p.45- Figure 3.12 *Aromatogramme de M. luteus avec l'extrait de clous de girofle*
- p.47- Figure 3.13 *Aromatogramme d'E. coli (*) avec l'extrait de clous de girofle*
- p.47- Figure 3.14 *Aromatogramme de S. aureus avec l'extrait de clous de girofle*
- p.49- Figure 3.15 *Aromatogramme de S. cerevisiae avec l'extrait de clous de girofle*
- p.49- Figure 3.16 *Aromatogramme de C. albicans avec l'extrait de clous de girofle*

- p.50- Figure 3.17 *Aromatogramme de F. culmorum avec l'extrait de clous de girofle*
- p.50- Figure 3.18 *Aromatogramme de M. ramannianus avec l'extrait de clous de girofle*
- p.51- Figure 3.19 *Aromatogramme de C. albicans avec l'extrait de clous de girofle*
- p.52- Figure 3.20 *Histogramme de la moyenne des diamètres d'inhibition d'E.coli et C.albicans en utilisant les deux protocoles d'aromatogramme*
- p.54- Figure 3.21 *Histogramme représentant l'étude comparative de l'activité antimicrobienne de l'extrait étudié et l'huile essentielle [84] des clous de girofle*
- p.55- Figure 3.22 *Forme libre et réduite du DPPH [104]*
- p.56- Figure 3.23 *Evolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de l'extrait de clous de girofle*
- p.56- Figure 3.24 *Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de clous de girofle en fonction des différentes concentrations*
- p.58- Figure 3.25 *Variation du taux de piégeage du DPPH par la vitamine C, vitamine E, BHT, BHA en fonction des différentes concentrations*
- p.59- Figure 3.26 *Comparaison des valeurs EC50 de notre extrait et les antioxydants standards*
- p.59- Figure 3.27 *Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de clous de girofle en fonction du temps*

Table des matières

REMERCIEMENT	
DEDICACE	
RESUME (français, anglais, arabe)	
LISTE DES ABREVIATIONS	
GLOSSAIRE	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
TABLES DES MATIERES	

Introduction générale	1
------------------------------	----------

CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique

1.1 Généralités.....	5
1.1.1 Les plantes aromatiques et les huiles essentielles.....	5
1.1.2 Phénols	7
1.2 Espèce étudiée : <i>Eugenia caryophyllata</i>	8
1.2.1 Classification	8
1.2.2 Description	9
1.2.3 Composition chimique	10
1.2.4 Propriétés pharmacologiques et emplois	10
1.3 Techniques d'analyses	12
1.3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	12
1.3.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).....	12
1.3.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	13
1.4 Activités biologiques des huiles essentielles et des extraits de clou de girofle	15

CHAPITRE 2 : Dosage de l'eugénol dans les clous de girofle par spectrométrie

Infrarouge à transformée de Fourier

2.1 Introduction	18
2.2 Partie expérimentale	18
2.2.1 Appareillages et réactifs.....	18
2.2.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	18
2.2.1.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).....	19
2.2.1.3 Spectrométrie IRTF.....	19
2.2.1.4 Réactifs.....	20
2.3 Procédure générale	21
2.3.1 Traitement des échantillons.....	21

2.3.1.1 Préparation de l'extrait.....	21
2.3.1.2 Purification de l'eugénol	22
2.3.2 Dosage de l'eugénol par CG-SM.....	23
2.3.3 Détermination de l'eugénol par spectrométrie IRTF.....	23
2.4 Résultats et discussions	24
2.4.1 Purification de l'eugénol par CCM	24
2.4.2 Etude analytique de l'extrait des clous de girofle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	25
2.4.3 Spectre IRTF de l'eugénol	26
2.4.4 Comparaison des caractéristiques analytiques obtenues pour la détermination de l'eugénol dans CH ₂ Cl ₂ avant et après purification.....	27
2.4.5 Détermination du taux de l'eugénol dans l'extrait des clous de girofle.....	30

CHAPITRE 3 : Etude des activités antibactériennes et antioxydantes de l'extrait lipidique des clous de girofle

3.1 Introduction.....	34
3.2 Etude du pouvoir antimicrobien.....	34
3.2.1 Matériels utilisés.....	34
3.2.2 Procédure générale	36
3.2.2.1 Protocole (I).....	37
3.2.2.1.1 Préparation du milieu de culture.....	37
3.2.2.1.2 Préparation des précultures.....	37
3.2.2.1.3 Préparation des dilutions.....	38
3.2.2.1.4 Dépôt des disques.....	38
3.2.2.1.5 Lecture.....	39
3.2.2.2 Protocole (II).....	39
3.2.2.2.1 Préparation des milieu de culture.....	39
3.2.2.2.2 Obtention des précultures.....	40
3.2.2.2.3 Dépôt des disques	40
3.2.2.2.4 Lecture.....	41
3.3 Estimation du pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique des clous de girofle par la méthode de pigeage du radical libre DPPH.....	41
3.3.1 Appareillage et réactifs.....	41
3.4 Résultats et discussions	43
3.4.1.1 Activité antibactérienne.....	43
3.4.1.2 Activité antifongique.....	48
3.4.1.3 Etude comparative des résultats d'aromatogrammes de la bactérie <i>E.coli</i> et de la levure <i>C.albicans</i>	51
3.4.1.4 Etude comparative entre nos résultats d'activité antimicrobienne et ceux obtenus avec l'huile essentielle de clous de girofle [84].....	52

3.4.2 Evaluation de l'activité antioxydante (test au DPPH).....	55
Conclusion générale	61
Références bibliographiques	63
Annexe	73

Introduction générale

Introduction générale

Depuis la nuit des temps, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales ainsi que les épices [1-3].

Une plante médicinale et plus précisément la drogue végétale, répond elle aussi à la définition du médicament. Elle est à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention des préparations galéniques ou de substances actives [4].

Parmi les grandes familles de métabolites secondaires des plantes qui sont douées d'activités pharmacologiques et toxicologiques, on trouve les phénols [4, 5]. Parmi les phénols simples, l'eugénol constitue le composant majoritaire de l'huile essentielle des clous de girofle connu par sa grande activité thérapeutique [6-8].

L'amélioration des performances des techniques d'analyse a provoqué un prodigieux bond à la recherche dans diverses disciplines, tel que le domaine de la recherche dans les plantes médicinales. Pour pouvoir garantir la qualité pharmaceutique d'une drogue végétale, elle doit répondre notamment au contrôle d'activité. Pour vérifier ce critère on fait recours au dosage des principes actifs quand ils sont connus [4], d'où la nécessité de développement de nouvelles méthodes d'analyse appropriées. Ces méthodes élaborés peuvent être orientées vers la recherche ou la synthèse de nouvelles substances d'intérêt thérapeutique et pharmacologique, la chimiotaxonomie et l'étude de la variation de la composition chimique que ce soit saisonnière ou géographique, qualitative ou quantitative.

Notre étude s'inscrit dans ce cadre de recherche qui vient contribuer au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et offre un outil complémentaire surtout disponible facile à manipuler et rapide aux utilisateurs travaillant dans différentes disciplines.

L'objectif de ce travail étant double :

- Dosage de l'eugénoL dans les clous de girofle (*Eugenia caryophyllata* Thunb) par spectrométrie IRTF après traitement de purification.
- Evaluation in vitro, des activités pharmacologiques (antifongique, antibactérienne et antioxydante) de l'extrait lipidique des clous de girofle.

Chapitre 1: Synthèse Bibliographique

1.1 Généralités

1.1.1 Plantes aromatiques et huiles essentielles

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires [9].

H.B. Heath, spécialiste anglais des épices et des aromates, a tenté de regrouper les plantes aromatiques en fonction de leurs propriétés organoleptiques. Il souligne la difficulté d'une telle entreprise car certaines d'entre elles sont uniques et ne rentrent dans aucune catégorie. On cite à titre d'exemple ; épices contenant de l'eugénol à odeur phénolique : clou de girofle, feuille de cannelle, et les écorces aromatiques riches en aldéhyde cinnamique, à odeur balsamique : cannelle et cassia (cannelle de chine) [1]. Une telle classification peut paraître arbitraire ; elle a le mérite d'essayer de regrouper les plantes présentant une certaine parenté de saveur [1].

L'utilisation des plantes aromatiques et des huiles essentielles en thérapeutique remonte aux temps les plus anciens [10]. Chaque fois que, après avoir écrasé un pétale de fleur, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée [11].

Les huiles essentielles (HE) sont les produits odorants et volatils du métabolisme secondaire de plantes aromatiques, normalement formés dans les cellules ou les groupes spéciaux de cellules, sont bien connus par leurs bienfaits comme agents antimicrobiens qui pourraient être employés pour commander la détérioration de nourriture et les bactéries pathogènes portées par les aliments [12, 13].

Les huiles essentielles peuvent être obtenues par expression, mais la méthode de distillation par la vapeur est la plus utilisée généralement pour leur production commerciale [14].

La composition chimique d'une HE est assez complexe, on y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques: les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phénylpropène. La figure 1.1 illustre la biosynthèse de ces métabolites secondaires. Les acides organiques, les cétones de faible poids moléculaire et les coumarines volatiles entrent également en faible proportion dans la constitution des HE [15].

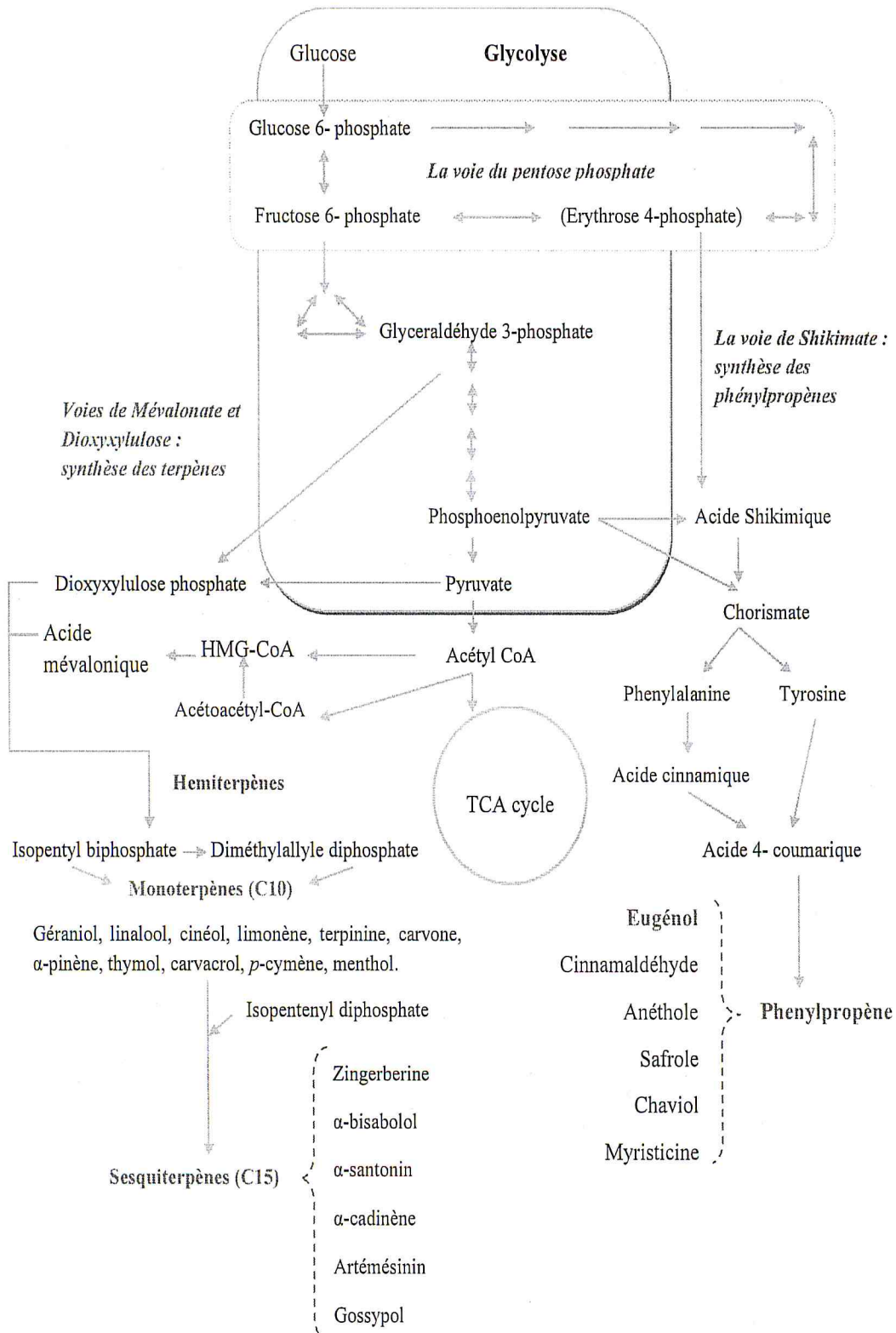


Figure 1.1 : Voies responsables de la biosynthèse des métabolites secondaires (Les sesquiterpènes et les phénylpropènes) [16].

Cependant, cette complexité de la composition chimique des HE suscite plusieurs remarques:

-A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes, ce qui conduit à admettre l'existence de 29 chémotypes chimiques (exemple: Thym à thymol, à géraniol, à carvacrol, à linalool, etc.). [15].

- La composition chimique des HE varie avec le milieu et l'époque de la végétation. Elle peut aussi se modifier au cours de l'extraction et durant la conservation [17, 18].

-Il n'existe pas de solvant type pour réaliser une extraction, car chaque cas est particulier, mais la nature du solvant conditionne l'impact physiologique de l'extrait [19].

1.1.2 Phénols

Les phénols forment un groupe très vaste de substances qu'il est souvent difficile de définir correctement (tableau 1, annexe 1). Ils contiennent dans leurs structures un noyau benzénique auquel est lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction éther, ...

Les composés phénoliques sont obtenus par deux grandes voies d'aromagenèse : La voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, mais peuvent être également obtenus par une biogenèse mixte avec la participation du shikimate et de l'acétate (le cas des flavonoïdes, stilbène, pyrones, xanthonés, ...) ou par le mévalonate avec le shikimate dans la biosynthèse d'autres dérivés mixte (le cas de certaines quinones ou comme le furano- et les pyranocoumarines). Les notions biosynthétiques évoquées permettent de bien cerner la notion de composé phénolique : dérivé non azoté dont le cycle aromatique est principalement issu du métabolisme de l'acide shikimique ou/et de celui d'un polyacétate [20].

- **Eugénol**

L'eugénol est un composé aromatique dérivé de la voie de biosynthèse du phénylpropène, généralement, il est extrait du *cinnamom* en tant que produit mineur, aussi de clou de girofle comme commandant [21].

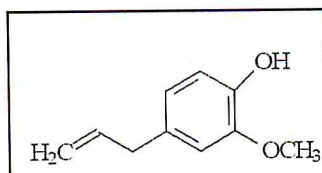


Figure 1.2 : Structure chimique de l'eugénol.

L'eugénol est un phénol autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) comme ingrédient alimentaire. La valeur ADI (Acceptable Daily Intake) a été fixée à 2,5 mg/kg. A plus fortes doses, lorsque la capacité détoxifiante du foie est manifestement dépassée, l'huile essentielle ainsi que l'eugénol conduisent à des dommages hépatiques. Non diluée, l'huile essentielle est irritante pour les tissus et neurotoxique. Des sujets présentant des eczémas aux mains et des allergies aux cosmétiques ou aux parfums, réagissent souvent positivement à l'eugénol, l'isoeugénol, et à l'huile essentielle de girofle lors de tests épicutanés [22].

Il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique local [23-26], ainsi que pour l'anesthésie des poissons [27-31]. Il a été également testé pour produire une anesthésie chez les amphibiens et les rongeurs [26-33]. Chez les rats et les souris, par contre, le méthyleugénol, un dérivé de l'eugénol, présente quelques caractéristiques plus intéressantes que l'eugénol [34]. Outre cette propriété d'anesthésique local, l'eugénol était déjà utilisé au siècle dernier comme anti-infectieux contre la tuberculose et la gangrène bronchique [35]. Depuis d'autres propriétés lui ont été découvertes, comme par exemple l'effet anti-inflammatoire [36], l'effet antibactérien [37], des propriétés neuroprotectrices [38], anti-cancers [39] antihistaminiques [40], anti-anaphylactiques [41], anti-oxydantes [42] et antifongiques contre *Candida albicans* [43, 44].

1.2 Espèce étudiée : *Eugenia caryophyllata*

1.2.1 Classification

Règne : *Plantae*.

Sous-règne : *Trachéophyte*.

Embranchement : *Spermatophytes ou Phanérogames*.

Sous embranchement : *Angiospermes*.

Classe : *Dicotyledonae*.

Sous classe : *Rosidae*.

Ordre : *Myrtales*.

Famille : *Myrtaceae*.

Genre : *Eugenia*.

Espèce : *Eugenia caryophyllata* Thunb.

Nom commun : Giroflier.

Nom en anglais : Clove.

Autres désignations botaniques: *Syzygium aromaticum* (L.)

Merril & Perry; *Eugenia caryophyllus* Bull. & Harr. [1, 45].

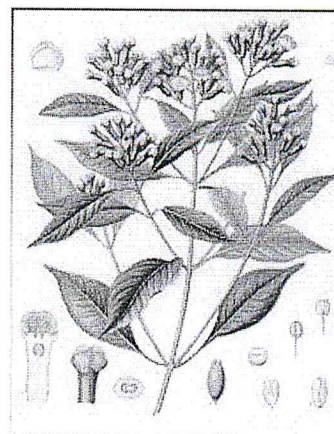


Figure 1.3 : Différentes parties de giroflier.

1.2.2 Description

Les *Myrtaceae* – 3800 espèces dont 500 *Syzygium* – sont caractérisées par la présence, dans leurs tissus, des poches sécrétrices d'huiles essentielles, qui leur confèrent assez souvent des propriétés antiseptiques qu'exploite l'industrie du médicament [45].

Le giroflier est un arbre de plus de 12 m de haut (peut atteindre 20 m [46]), (figure 1.a, annexe 1). A feuilles persistantes étroites elliptiques, rosâtres (jeunes) à vert-noir (à maturité) [47], glabres et luisantes qui rappellent celles du laurier; elles présentent de petites ponctuations à peine visibles à l'œil nu qui correspondent à des glandes riches en huile essentielle [45].

L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales (figure 1.b, annexe 1). Ils sont cueillis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée [48].

La pharmacopée européenne (3^{ème} édition) précise que la drogue est constituée par " le bouton floral entier séché jusqu'à ce qu'il présente une coloration brune-rouge. Il contient au minimum 150 ml/kg d'huile essentielle " [45]. Les clous de girofle sont très caractéristiques: odeur aromatique phénolée agréable, saveur brûlante, forte âcre et piquante, morphologie typique [45, 48].

Le giroflier est connu depuis fort longtemps des Chinois, ainsi que des Arabes en commerce avec ceux-ci [49]. Il est originaire des îles Moluques (Indonésie), maintenant cultivé en Asie tropicale, Afrique, Amérique tropicale etc... Telle que: Penang (en Malaisie), Zanzibar et Pemba (en Tanzanie), Madagascar... [46]. Il s'adapte particulièrement bien aux climats chauds et humides [1].

Ibn El-Baytar¹, El Ghassani² et Abderrezaq El-Djazaïri³ le désignent sous le nom de qaranfoul, qui est une transcription du grec Karuôphullon [50], car il est cité sous ce nom chez le médecin grec Galien et Caryophyllon chez le naturaliste Romain Pline⁴. Le nom botanique *Eugenia* du giroflier est dédié au prince Eugène de Savoie, protecteur de la botanique [49].

¹Naturaliste et auteur andalou vers 1248.

²Auteur maghrébin et médecin d'un sultan Saâdien 16^e siècle 1578-1603.

³Médecin maghrébin, auteur d'un traité de matière médicale arabe 18^e siècle.

⁴Naturaliste romain, auteur de l'histoire naturelle, ouvrage en 37 vols, les 15^e au 27^e consacrés à la botanique.

1.2.3 Composition chimique

Les clous de girofle contiennent entre 15 à 18 % d'huile volatile (pas moins de 15 % v/w d'huile [6]), les tiges entre 4 à 6 % et les feuilles ont un rendement de 2 à 3 % [47]. Ils renferment des hétérosides de chromones [45], glucosides des stérols (sitostérol, stigmastérol et campestérol), acide oléanolique, camphérol, 6 % protéines, 20 % lipides, 61 % carbohydrates, vitamines et autres [47].

D'après la pharmacopée européenne (3^{ème} édition), l'huile essentielle des clous de girofle contient de 75 à 88 % d'eugénol, de 5 à 14 % de β -caryophyllène, et de 4 à 15 % d'acétate d'eugényle [45].

Quelques caractéristiques de l'huile essentielle: un liquide clair, jaune pâle (devient foncé avec le temps [46]), odeur et goût du girofle, saveur d'épice brûlante. Poids par millilitre: 1.041 à 1.054 g [6].

Le tableau 1.1 illustre la composition chimique approximative de l'huile essentielle des clous de girofle.

Constituants	Pourcentages (*)
Eugénol	91.2
β -caryophyllène	4.1
α -humulène	0.6
Eugényl acétate	2.9
β -caryophyllène époxyde	0.5

Tableau 1.1: Composition chimique de l'huile essentielle des clous de girofle [51].

(*) Pourcentage d'identification est de: 99.3 %.

1.2.4 Propriétés pharmacologiques et emplois

Epice orientale chargée d'histoire, le clou de girofle est largement employé par l'art culinaire [45], et notamment pour assurer la conservation de la viande par son effet antimicrobien [19]; la parfumerie, la cosmétologie et la savonnerie, considéré autrefois comme la panacée presque universelle par les médecins, continu à l'heure actuelle, à être utilisé pour ses diverses propriétés médicinales et autres [1].

Traditionnellement, les clous de girofle servent dans une moindre mesure de carminatif, antiémétique (le thé issu des clous était pris contre les nausées), de stomachique et de tonique, le plus souvent en mélange avec d'autres drogues [19].

En médecine chinoise, l'huile essentielle était donnée dans le cas de diarrhée, d'hernie, et de mauvaise haleine. En Allemagne, les préparations à base de girofle (ou d'huile essentielle), sont utilisées en bain de bouche en cas d'inflammation de la bouche ou de la gorge [45, 47].

Les activités pharmacologiques du clou de girofle, de son huile essentielle et de ses composants, ont fait l'objet d'études importantes au cours des dernières années, comme par exemple les propriétés antivirales, surtout vis-à-vis du virus de l'herpès [52, 53], et inhibitrices vis-à-vis des bactéries responsables de la formation de la plaque dentaire [54, 55]. L'eugénol inhibe la cyclooxygénase-2 (COX-2) [56].

L'huile de clous de girofle exerce un effet répulsif sur les insectes [57]. Sur la souris, des propriétés convulsivantes ont été constatées, ce qui peut nous orienter vers la compréhension d'une utilisation courante de la drogue en Iran contre l'épilepsie [58]. Son activité antiphlogistique est connue depuis longtemps [59].

L'huile essentielle est plus utilisée comme correcteur d'autres médicaments (U.S.P)⁵. Elle est antihistaminique et spasmolytique (musculotropique), cette dernière propriété est due probablement à la présence d'eugényl acétate. Elle possède également une large activité antimicrobienne, de même qu'elle est anthelminthique et larvicide [47, 51, 60-64]. L'activité antibactérienne de l'eugénol a été aussi étudiée sur plusieurs souches [51, 60, 61, 64, 65].

Malgré ses effets bénéfiques, il est rapporté que l'huile des clous de girofle cause des irritations de la peau et une sensibilité chez l'Homme [47].

Signalons enfin que l'huile essentielle, et plus précisément l'eugénol, possèdent des effets déprimeurs puissants sur le système nerveux central, dus à leur toxicité [19, 45].

⁵U.S.P. = United State Pharmacopoeia.

1.3 Techniques d'analyses

Depuis une vingtaine d'années, l'état de nos connaissances a fait un prodigieux bond, grâce à l'amélioration constante des performances des techniques d'analyse. La chromatographie en phase gazeuse (CG), extrêmement bien adaptée à l'analyse des constituants volatils, est devenue un outil de routine très sophistiqué. Les colonnes capillaires en silice fondue avec phase greffée possèdent une bonne résistance thermique et d'excellents pouvoirs de résolution (plusieurs milliers de plateaux théoriques au mètre) [1].

Les techniques d'analyse spectrales (spectrométrie de masse, spectrométrie infrarouge, ...) ont également fait des progrès considérables. Chaque année, les limites de la sensibilité sont améliorées [1].

1.3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie (CCM) est une méthode d'analyse chimique qualitative permettant la séparation et l'identification des espèces chimiques d'un mélange. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La chromatographie d'adsorption est basée sur la différence d'affinité existant entre ses composés. La phase mobile « l'éluant » est un solvant ou un mélange de solvant qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composé de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant [66, 67].

Dans le cas de substances colorées, on visualise plusieurs taches traduisant une séparation. Dans le cas de substances non colorées, il faut les rendre visible, trois solutions s'offrent : Placer la plaque sous lampe UV, utiliser de la vapeur d'iode pour colorer les taches ou utiliser un révélateur chimique [68].

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale R_F avec : $R_F = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$. Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_F avec un témoin [68].

1.3.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible [69]. Elle permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon [70]. Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse [70, 71], cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges

complexes à l'état de traces. Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formation ainsi des ions fragments, ces derniers sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et /ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. La spectrométrie de masse est utilisée dans l'analyse élémentaire et dans l'analyse isotopique. Cette dernière est très utilisée dans le domaine pharmaceutique, ou dans celui de l'étude de croissance des plantes [70].

Le couplage chromatographique en phase gazeuse- spectrométrie de masse (CG-SM) est devenu un outil de routine. L'analyse de la composition qualitative d'une huile essentielle, qui, il y a seulement vingt ans, demandait des mois, voire des années, peut s'effectuer en moins d'une heure, grâce à l'informatisation (utilisation de banques de données et traitement des résultats par ordinateur). Ainsi, la liste des constituants volatils identifiés à l'intérieur d'une huile essentielle ne fait que croître en fonction du temps [1].

Nous avons noté que les huiles essentielles de différentes parties de clou de girofle ont fait l'objet de plusieurs études et ont mené à l'identification de la composition chimique, ainsi que différentes activités biologiques [72-74].

1.3.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructif basé sur l'étude de l'absorption (ou la réflexion), par l'échantillon, des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 100 μ m. Cette bande spectrale est elle-même divisée en proche I.R (1 à 2.5 μ m), en moyen I.R (2.5 à 25 μ m) et en lointain I.R au delà. La partie la plus riche en information est celle du moyen I.R [75, 76]. Tous les spectromètres I.R conduisent à un document de base, appelé spectre I.R qui représente, pour chaque longueur d'onde, le rapport, des intensités transmises, avec ou sans échantillon. Ce rapport, appelé transmittance T, peut être remplacé par son pourcentage (%T) ou par l'absorbance, $A = \log(1/T)$. Il est fréquent d'exprimer les longueurs d'onde λ sous forme de nombre d'ondes γ (cm^{-1}) sachant que $\gamma = 1/\lambda$.

Il existe beaucoup d'instruments commerciaux qui diffèrent dans leurs conceptions. Dans les appareils séquentiels, les absorptions lumineuses sont mesurées les unes après les autres, en balayant la région spectrale dans un ordre séquentiel (spectre à filtre optique, à monochromateur). Dans les spectromètres multiplexés, le capteur photosensible reçoit simultanément l'information correspondante à plusieurs longueurs d'onde. Les signaux sont donc acquis à l'aide d'un capteur unique. Un système de codage permet d'obtenir les spectres à partir des signaux ainsi obtenus. Les instruments à transformée de Fourier sont

des exemples de systèmes multiplexés. Les spectromètres multicanaux ont plusieurs capteurs photosensibles qui peuvent enregistrer indépendamment l'absorption de la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques. Les systèmes à barrette de diodes et les caméras appartiennent à ce type [77].

L'infrarouge à transformée de Fourier correspond à un montage à simple faisceau, qui diffère de celui des appareils séquentiels. Le monochromateur étant remplacé par un interféromètre –souvent de type Michelson- placé entre la source et l'échantillon. Le spectre est produit suite à une opération mathématique appelée « transformée de Fourier » (voir figure 1.4).

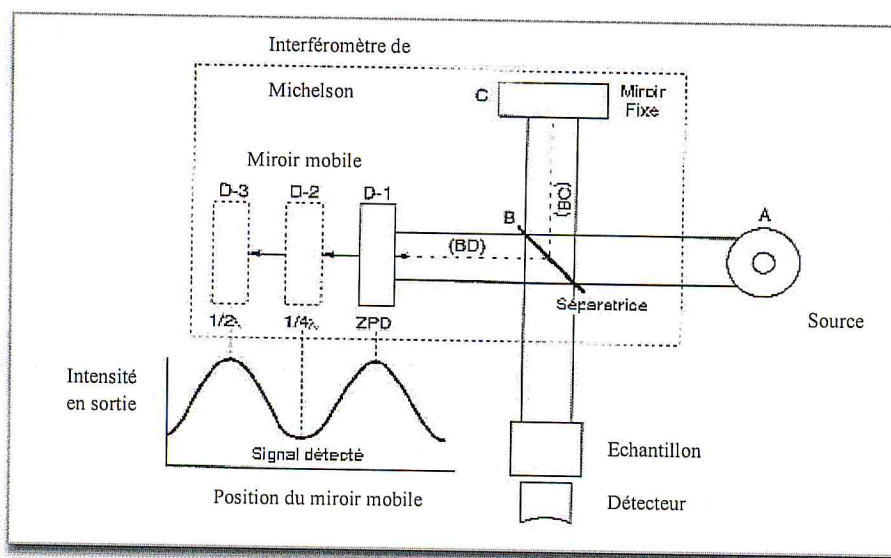


Figure 1.4: Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

Cette méthode a bouleversé les méthodes traditionnelles car elle présente plusieurs avantages : pas de lumière parasite, car le détecteur reçoit plus d'énergie [78, 79]. Le rapport signal /bruit de fond est bien supérieur à celui de la méthode séquentielle ainsi que les longueurs d'onde sont calculées avec une grande précision. La résolution est constante sur tout le domaine étudié.

Bien que la spectrométrie IRTF est devenue l'une des méthodes d'analyse quantitative utilisée dans le plus grand nombre de disciplines scientifiques, elle présente des limitations relatives particulièrement à la faible sensibilité de cette technique, ce problème est particulièrement important dans le cas des analyses des échantillons aqueux [68].

1.4 Activités biologiques des huiles essentielles et des extraits de clou de girofle

Les bactéries ne sont pas seulement nuisibles pour l'homme et l'animal, mais d'autres produits, substances ou matériaux peuvent être détruits ou altérés sous l'effet de leurs multiplications. Les moyens de lutte sont nombreux, les agents physiques (température,...), les agents chimiques (alcools, chlore et dérivés, ...) sont très actifs mais nocifs, aussi bien pour les bactéries que pour les cellules humaines ou animales. Mais il y a d'autres agents, possédants une "toxicité sélective" et sont utilisés pour cette raison en thérapeutique, ce sont les antibiotiques [80] et lorsque ces derniers n'agissent plus ou que la sensibilité de la personne aux infections devient chronique, le praticien peut avoir recours à l'aromatogramme. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues. Cette technique datant de 1950 et a été perfectionnée depuis lors [81].

Le chémotype, également appelé chimiotype, permet de définir la ou les molécules biologiquement actives majoritairement présentes dans les essences aromatiques. La précision du chémotype permet la compréhension précise du mode d'action des huiles essentielles. Les phénols entraînent des lésions irréversibles sur la membrane des microorganismes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation. L'eugénol est responsable de l'activité fongicide [44] et bactéricide des huiles essentielles qui le contient [7]. Dans cette partie on s'est intéressé à répertorier l'ensemble des travaux biologiques menés sur le clou de girofle.

Les huiles essentielles de clous de girofle ont montré une importante activité inhibitrice sur quatre bactéries Gram⁻ (*Escherichia coli*, *Klebsilla pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) et vis-à-vis de deux bactéries Gram⁺ (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) [82-84], (annexe 2). Des études ont montré que l'huile essentielle des clous de girofle possède une forte activité antifongique contre *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* [82, 85].

Des travaux actuels ont montré que l'eugénol et l'huile essentielle des clous de girofle ont le potentiel d'agir en tant qu'agents thérapeutiques contre la lambliaze [74], ainsi que contre la croissance de parasites (des changements d'ultra-structure principalement au niveau du noyau ont été observés sous le microscope électronique à balayage et à transmission) [86].

L'activité antioxydante est la capacité de capter ou de piéger les radicaux libres, produits spontanément, et d'une façon continue dans l'organisme vivant. Les radicaux libres sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, protéines cellulaires, les acides

nucléiques, et ainsi provoquant la mort cellulaire [87, 88]. Des études effectuées sur les huiles essentielles de différentes parties de l'arbre de clou de girofle, ainsi que l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des bourgeons de clous de girofle ont montré qu'elles sont très actives, puisqu'elles manifestent un potentiel antioxydant puissant dans différentes analyses in vitro, comprenant la puissance de réduction des radicaux libres : DPPH, ABTS, anion super-oxyde, et hydrogène peroxyde, par rapport aux antioxydants commerciaux et standards tels que le BHA, BHT, α -Tocophérol et Trolox (utilisés généralement dans la nourriture et l'industrie pharmaceutique) [8, 72, 73, 89], même à faible concentration [90].

CHAPITRE 2 :

DOSAGE DE L'EUGENOL DANS LES CLOUS DE GIROFLE PAR SPECTROMETRIE IRTF

CHAPITRE 2 :
DOSAGE DE L'EUGENOL DANS LES
CLOUS DE GIROFLE PAR
SPECTROMETRIE IRTF

2.1 Introduction

Le grand développement de la technique infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est dû à son emploi tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative et pour l'étude des structures chimiques.

L'analyse qualitative se réalise généralement en deux étapes : identification des groupements fonctionnels de la substance, confirmation de la structure moléculaire par comparaison de la totalité du spectre avec celui d'un composé connu.

L'analyse quantitative par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est devenue très utilisée dans le domaine des substances naturelles [68, 91], elle est mise à profit pour le dosage des mélange de composés organiques présentant une grande similitude, ou pour l'analyse des composés minoritaires dans des mélanges complexes [92].

Toutefois, il existe peu de travaux sur l'analyse et la purification de l'eugénol [93] ou la spectrométrie infrarouge a été utilisée comme méthode complémentaire pour l'analyse qualitative. La détermination de la diffusion d'eugénol à travers le polymère LLDPE, en utilisant la technique FTIR-ATR avec une cellule de flux en comparaison avec la chromatographie liquide à haute performance [94] représente la seule application de la spectrométrie infrarouge dans ce domaine

L'objectif principal de cette étude a été le développement d'une nouvelle procédure pour la détermination du taux de l'eugénol dans l'extrait des clous de girofle (composé majoritaire) par spectrométrie IRTF après séparation, en utilisant l'extraction liquide-liquide. Néanmoins la CCM et la CG-SM ont été utilisées pour effectuer l'analyse qualitative de la composition chimique de l'extrait des clous de girofle.

2.2 Partie expérimentale

2.2.1 Appareillages et réactifs

2.2.1.1 Chromatographie sur couche mince

La CCM est effectuée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice Si 60 (de marque Merck). L'élution est réalisée avec un mélange binaire acétate d'éthyle/cyclohexane 1/5 : (v/v). La révélation est faite sous une lampe UV 254 nm, puis au diiode.

2.2.1.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-SM

L'analyse qualitative de la composition chimique de l'extrait des clous de girofle a été réalisée par CG-SM (figure 1, annexe 3).

L'analyse est effectuée sur Hewlett Packard Agilent 6890N chromatographe en phase gazeux piloté par Chemstation (NIST98), dans les conditions chromatographiques suivantes :

- ✓ Colonne capillaire HP5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).
- ✓ Débit du gaz vecteur (Hélium) : 1 ml/min.
- ✓ Injection de 0.2 μ l en mode Splitless pendant 0.3 min.
- ✓ Température de l'injecteur : 250°C.
- ✓ Programmation de température : 60°C pendant 5 min ; 6°C/ min jusqu'à 250°C pendant 20 min.

Le spectromètre de masse du model Agilent 5973, dans les conditions suivantes :

- ✓ Température : interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C).
- ✓ L'énergie d'ionisation est de 70 eV.

2.2.1.3 Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

✓ Un spectrophotomètre à transformée de Fourier IRTF de marque Jasco type IRTF-8900 (figure 2, annexe 3), équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré (DTGS), d'un rayonnement de laser, d'une séparatrice de radiation en KBr et d'une fente type global et ce, dont l'infrarouge moyen entre 400 et 4000 cm^{-1} a été employé. Les fenêtres utilisées sont en fluorure de calcium (CaF_2), et une entretoise en téflon de 0.5 mm. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de balayage égal à 10 spectres.

✓ L'introduction des solutions se fait par écoulement bloqué « stop flow ». Pour cela une cellule conventionnelle a été modifiée au niveau de notre laboratoire en une cellule de flux. L'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles, de minimiser la consommation des solvants organiques et de réduire le temps d'analyse (15 à 20 s).

✓ L'échantillon est introduit dans la cellule à l'aide d'une pompe péristaltique de marque Desaca (Heidelberg, Allemagne). Le chargement est réalisé en utilisant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm et des tubes de téflon de diamètre intérieur de 0.8 mm, en fixant un débit de 1.5 ml mn^{-1} , comme le montre le montage de la figure 2.1. Le flux est stoppé momentanément, une fois la cellule est remplie. À ce moment un spectre correspondant à l'échantillon est enregistré entre 400 et 4000 cm^{-1} .

✓ Les spectres enregistrés sont traités à l'aide d'un macro qui a été construit à partir de l'option « ApPro » développé par Winfirst.

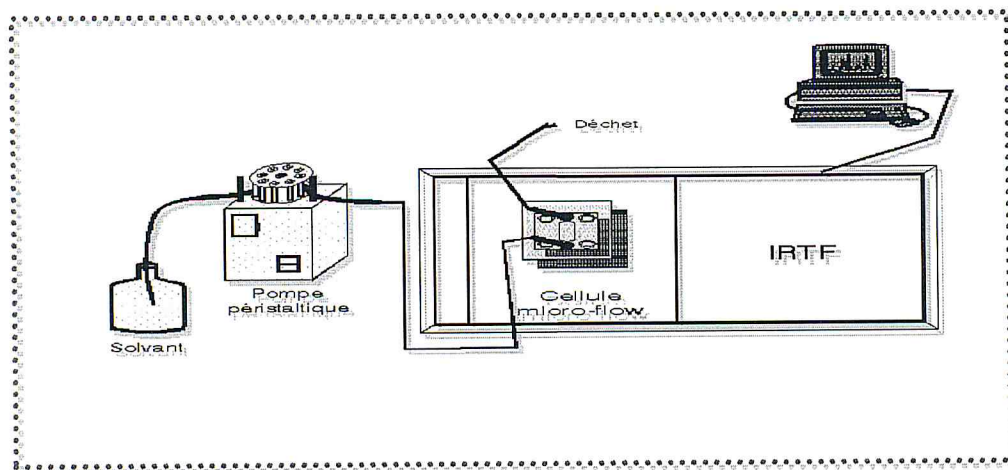


Figure 2.1 : Montage de flux utilisé pour la détermination de l'eugénole par IRTF

2.2.1.4 Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de grade analytique, le dichlorométhane, l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle sont octroyés auprès de Sigma-Aldrich (Allemagne), l'acide chlorhydrique (HCl) et la soude sont octroyés auprès de Panreac (Barcelone, Espagne).

2.3 Procédure générale

2.3.1 Traitement des échantillons

2.3.1.1 Préparation de l'extrait

Le matériel végétal utilisé était composé de boutons floraux secs du giroflier (figure 2.2), acheté chez un apothicaire à Ouled Yaïch (Blida).

L'espèce a été identifiée par Dr Siab Badia, département de botanique, ENSA, El Harrach, Alger.



Figure 2.2 : Boutons floraux secs du giroflier

L'organigramme de la figure 2.3 illustre le procédé d'extraction par solvant utilisé afin d'obtenir un extrait brut à partir des clous de girofle.

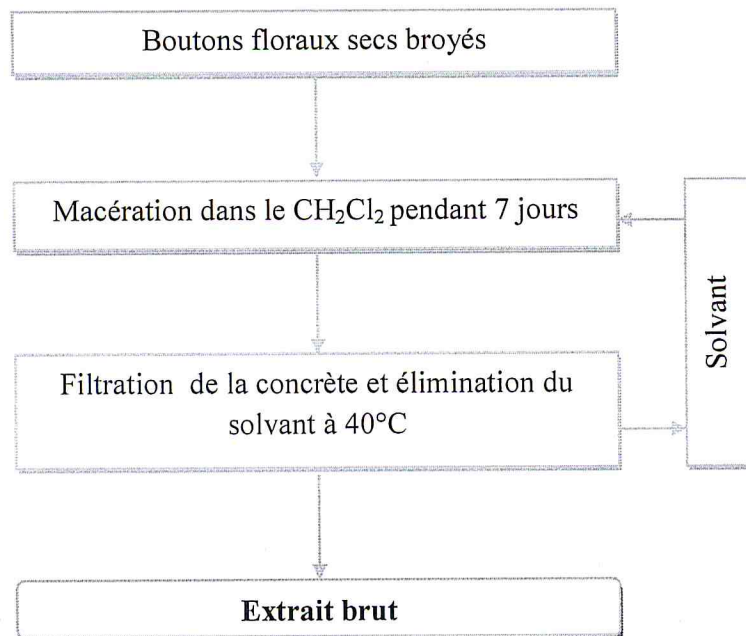


Figure 2.3: Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale sèche

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (M_{\text{extrait}} / M_{\text{mv}}) * 100$$

R (%) : Rendement en extrait (%).

M_{extrait} : masse de l'extrait en gramme.

M_{mv} : masse de la matière végétale en gramme.

Le rendement d'extraction des clous de girofle est de 18.40%. Les caractéristiques organoleptiques de l'extrait obtenu (figure 3, annexe 3), sont représentées dans le tableau 2.1.

Caractères organoleptiques		
Aspect et Couleur Liquide, mobile, verdâtre	Odeur phénolée agréable	Saveur brulante, forte âcre et piquante

Tableau 2.1 : Propriétés organoleptiques de l'extrait des clous de girofle

2.3.1.2 Purification de l'eugénol

La purification de l'eugénol est effectuée par une double extraction liquide-liquide ; elle consiste à transférer l'eugénol d'une phase aqueuse à une phase organique non miscible.

L'eugénol fait partie de la famille des phénols qui se caractérise par un groupement hydroxyle greffé sur le noyau benzénique. Les phénols sont en général plus acides que les alcools car leurs bases conjuguées présentent un nombre de forme résonante plus important. Grâce à cette propriété on pourra extraire l'eugénol de la phase organique avec une solution basique. L'eugénol se retrouvera donc en phase aqueuse sous forme d'ion phénate (l'oxygène du groupe méthoxy contribue à la structure de résonance). De plus, l'acétyl'eugénol (ester) présent reste sous forme moléculaire en milieu basique. On pourra donc éliminer l'acétyl'eugénol de la phase organique.

100 mg d'extrait de clous de girofle sont traitées selon le protocole détaillé dans la figure 2.4.

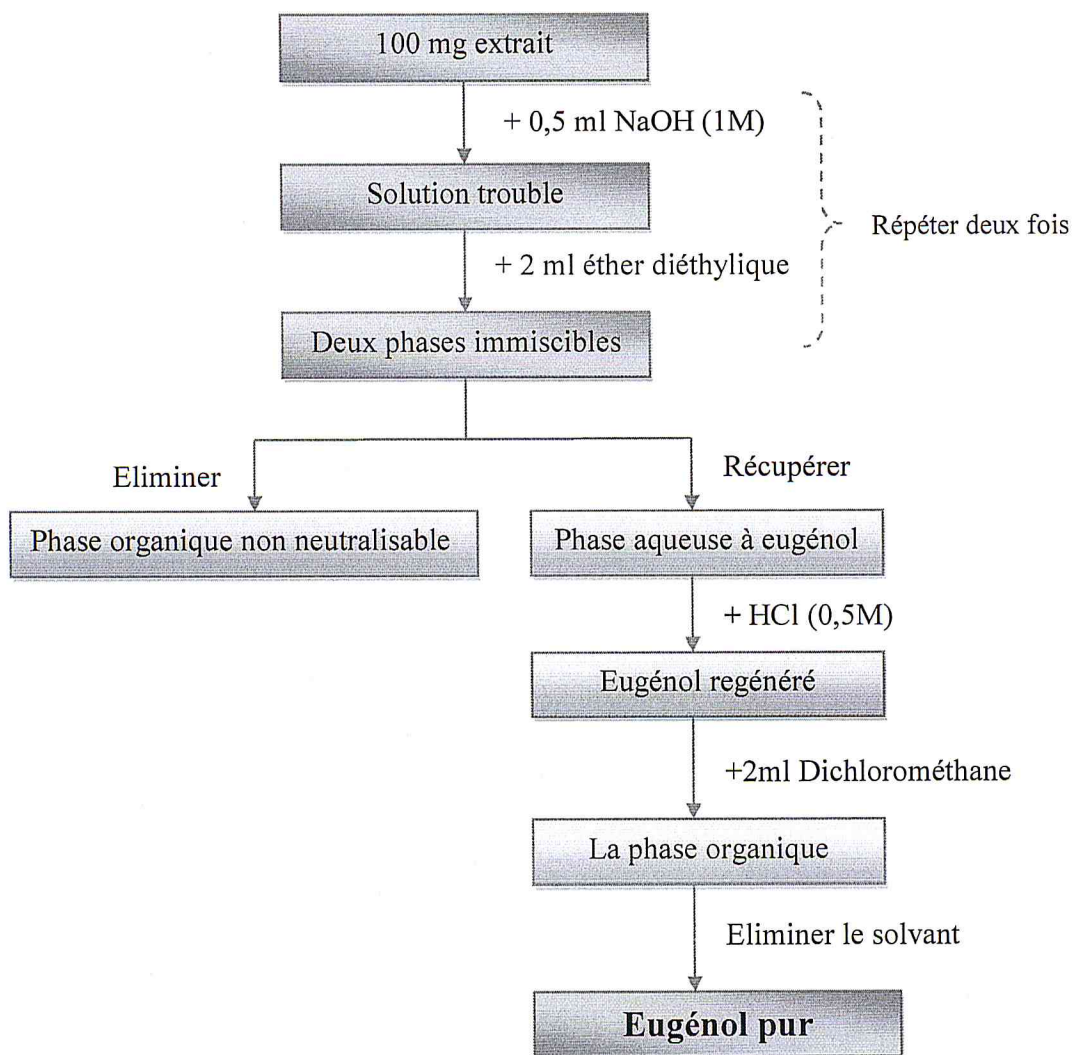


Figure 2.4 : Procédé de purification de l'eugénol

2.3.2 Dosage de l'eugénol par CG-SM

Un volume de 0.2 μ l d'extrait brut de clous de girofle est injecté directement dans le chromatographe CG et soumis à la fragmentation par SM.

2.3.3 Détermination de l'eugénol par spectrométrie IRTF

100 mg d'extrait organique de clous de girofle est traitée selon le protocole décrit dans la section 2.3.1.2, le résidu final est dilué dans le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène jusqu'à un volume de 10 ml.

Les spectres IRTF sont enregistrés par rapport à un background stabilisé (figure 4 et 5, annexe 3), préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie de solvant pur utilisé pour l'élution.

Les valeurs maximales d'absorbance sont mesurées à 1122 cm^{-1} , 1148 cm^{-1} , 1514 cm^{-1} et à 1637 cm^{-1} corrigées avec des lignes de base stabilisées entre $1112 - 1134\text{ cm}^{-1}$, $1134 - 1162\text{ cm}^{-1}$, $1482 - 1539\text{ cm}^{-1}$ et $1627 - 1645\text{ cm}^{-1}$, respectivement. Les valeurs d'absorbance corrigées sont extrapolées dans les droites de calibration dans le domaine de concentration entre $0.63 - 8.5\text{ mg.ml}^{-1}$ pour des étalons traités de la même manière que les échantillons réels.

2.4 Résultats et discussions

2.4.1 Purification de l'eugénol par CCM

L'objectif de cette manipulation est de vérifier la présence de l'eugénol dans l'extrait de clous de girofle.

L'analyse de la plaque CCM dans les conditions citées dans le paragraphe 2.2.1.1, montre l'apparition de tâches jaunes pour les extraits brut et traité de clous de girofle au même niveau que l'eugénol caractérisées par le même R_f ($R_f = 0.51$), voir figure 2.5.

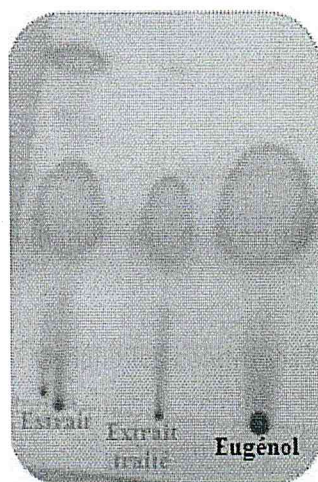


Figure 2.5 : Purification de l'eugénol par CCM

Conditions expérimentales :

CCM : Feuilles d'aluminium recouvertes sur gel de silice Si 60 (de marque Merck).

Eluant : Acétate d'éthyle/cyclohexane 1/5 : (v/v).

Révélation : Lampe UV 254 nm, puis diode.

2.4.2 Etude analytique de l'extrait des clous de girofle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse par CG-SM dans les conditions citées dans le paragraphe 2.2.1.2 a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 2.2, en se basant sur la banque de données spectrales NIST98.L. Le profil chromatographique est présenté sur la figure 2.6.

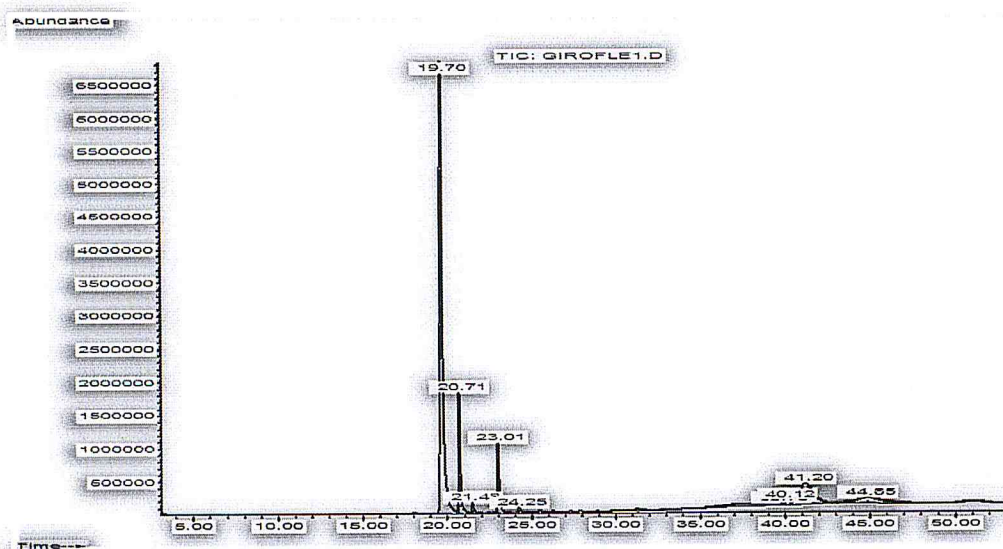


Figure 2.6 : Chromatogramme de l'extrait lipidique des clous de girofle

Ordre d'éluion	T _R (min)	Nom du composé	Formule moléculaire	Air (%)
1	19.70	Eugénol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	58.06
2	20.72	β- caryophyllène	C ₁₅ H ₂₄	8.24
3	21.47	α- caryophyllène	C ₁₅ H ₂₄	0.94
4	23.01	Acétyleugénol	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	6.07
5	24.25	Oxyde caryophyllène	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0.71
6	39.79	Acide 9-octadécénoïque	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	5.03
7	40.12	Bis (2-éthylhexyl) phtalate	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	0.81
8	41.21	Nonadécane	C ₁₉ H ₄₀	13.49
9	44.85	Vitamine E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	6.64

Tableau 2.2: Composition chimique de l'extrait lipidique des clous de girofle

Pourcentage d'identification est de 99.99%.

L'examen du tableau 2.2 montre que la composition chimique de l'extrait est dominée par la présence d'un phénol qui est l'eugénol (58.06 %). On note également la présence du Nonadécane avec un pourcentage de 13.49 à coté des sesquiterpènes : β-caryophyllène (8.24 %) et son isomère l'α- caryophyllène (0.94 %) ainsi que son dérivé l'oxyde de caryophyllène (0.71 %). D'autre composés ont été également identifiés, il s'agit

de l'acétylégénol (6.07 %), l'acide gras 9-octadécénoïque (5.03 %) et quelques traces de bis (2-éthylhexyl) phtalate (0.81 %). La vitamine E est également présente dans notre extrait avec un pourcentage supérieur à 6 %.

La répartition des différentes classes chimiques de l'extrait est représentée par la figure 2.7.

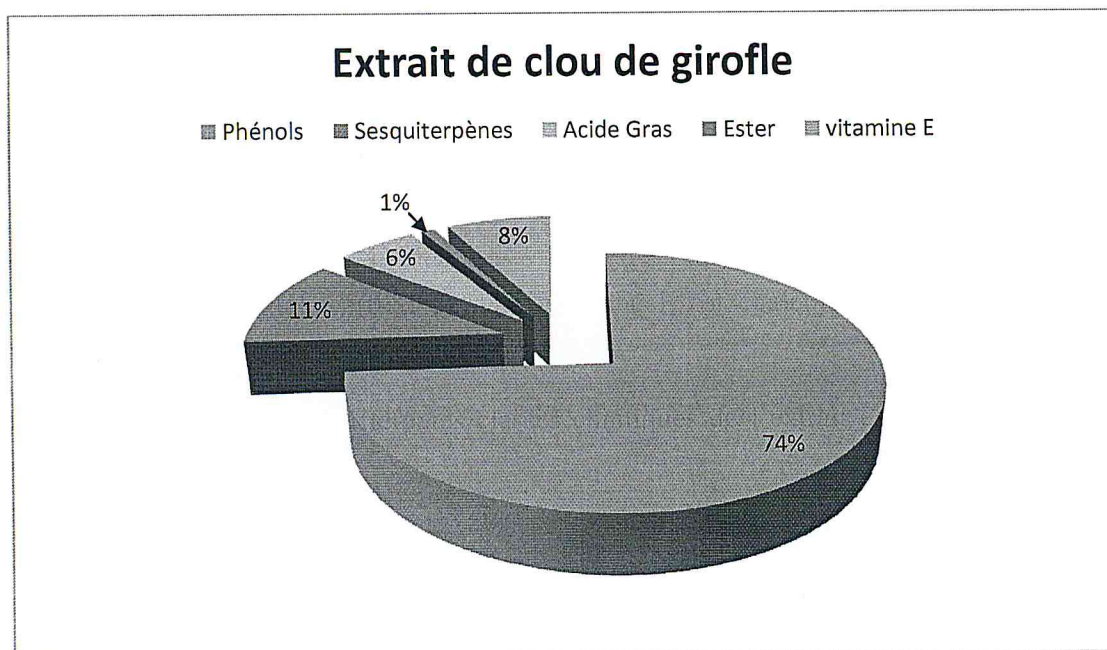


Figure 2.7 : Représentation de la composition chimique de l'extrait des clous de girofle

Des études portées sur l'huile essentielle des clous de girofle [84] ont montré qu'elle est riche en eugénol (87.03 %) mais pauvre en vitamine E. Le β -caryophyllène (7.86%) et l'acétylégénol (5.08%) représentent des taux faibles vis-à-vis de notre extrait. Donc, on conclut que la méthode d'extraction et les conditions de fragmentation influent sur la composition chimique des clous de girofle sans oublier les effets liés aux variations saisonnières et les facteurs écologiques environnementaux et génétiques.

L'analyse par CG-SM de la composition chimique des HE fournit une référence pour l'analyse par spectrométrie IRTF. Etant donné que l'eugénol est un composé majoritaire dans l'extrait lipidique de clous de girofle, alors, ce dernier est un étalon adéquat qui peut être dosé quantitativement par spectrométrie IRTF.

2.4.3 Spectre IRTF de l'eugénol

La figure 2.8 montre le spectre IRTF de l'étalon de l'eugénol préparé directement dans le dichlorométhane. La gamme étudiée s'étale de 4000 à 800 cm^{-1} .

Comme on peut le constater, le spectre de l'eugénole montre des bandes à 3539 cm^{-1} et 3684 cm^{-1} représentant l'élongation de la liaison OH d'un alcool. La région entre 2941 cm^{-1} et 2861 cm^{-1} est caractéristique de l'élongation des groupes CH_2 et CH_3 . Il présente également une bande intense à 1514 cm^{-1} caractéristique de l'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$ aromatique et une bande moyenne à 1637 cm^{-1} correspond à l'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$ d'un alcène. Des bandes à 1183 cm^{-1} et 1368 cm^{-1} correspondent à l'élongation de la liaison OH d'un alcool. Les deux bandes à 1148 cm^{-1} et 1122 cm^{-1} correspondent à l'élongation de la liaison $\text{C}-\text{O}$ et à la déformation de la liaison $\text{O}-\text{H}$ d'un phénol.

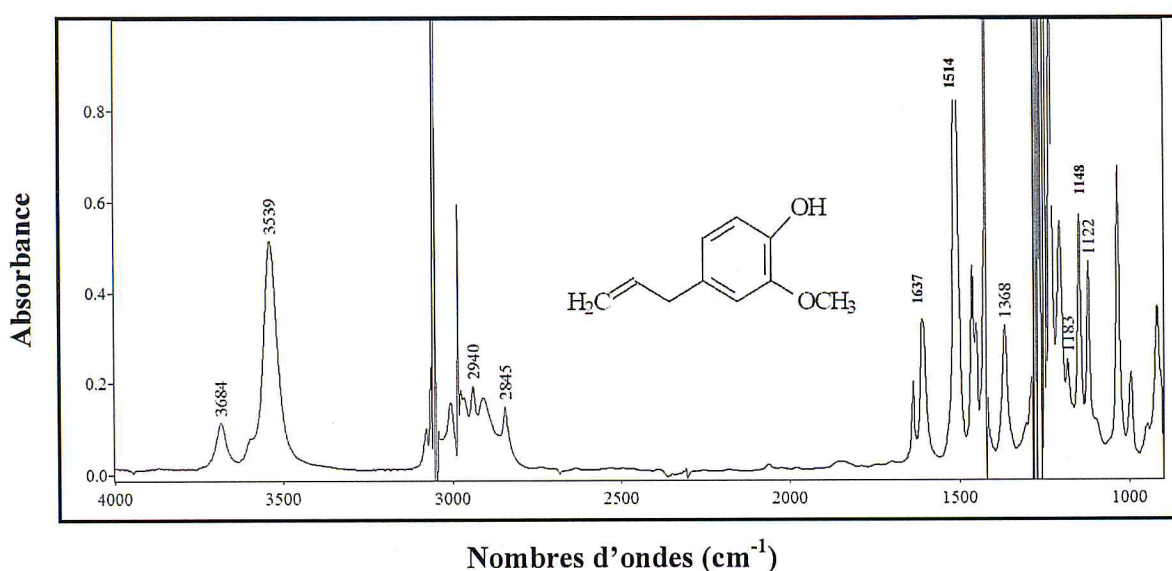


Figure 2.8 : Spectre IRTF de l'eugénole préparé directement dans CH_2Cl_2 ($10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)

2.4.4 Comparaison des caractéristiques analytiques obtenues pour la détermination de l'eugénole dans CH_2Cl_2 avant et après purification

La figure 2.9 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solutions de l'eugénole préparée directement dans le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène, et ce, dans un domaine de concentration pris entre 0.75 et $10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Les caractéristiques analytiques des solutions d'eugénole préparées directement dans CH_2Cl_2 , sont établies et résumées dans le tableau 2.3, et ce, en sélectionnant quatre bandes, dont deux sont spécifiques au dessous de 1500 cm^{-1} (zone des empreintes digitales) et les autres sont communes au delà de 1500 cm^{-1} , qui peuvent être utilisées pour effectuer la détermination quantitative. Elles sont : 1122 cm^{-1} , 1148 cm^{-1} , 1514 cm^{-1} et la bande à 1637 cm^{-1} , corrigées avec des lignes de base appropriées. Les caractéristiques analytiques montrent une très bonne linéarité, une limite de détection qui varie entre 0.02 et $1.06\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, et une déviation standard qui va de 0.5 à 1.1% .

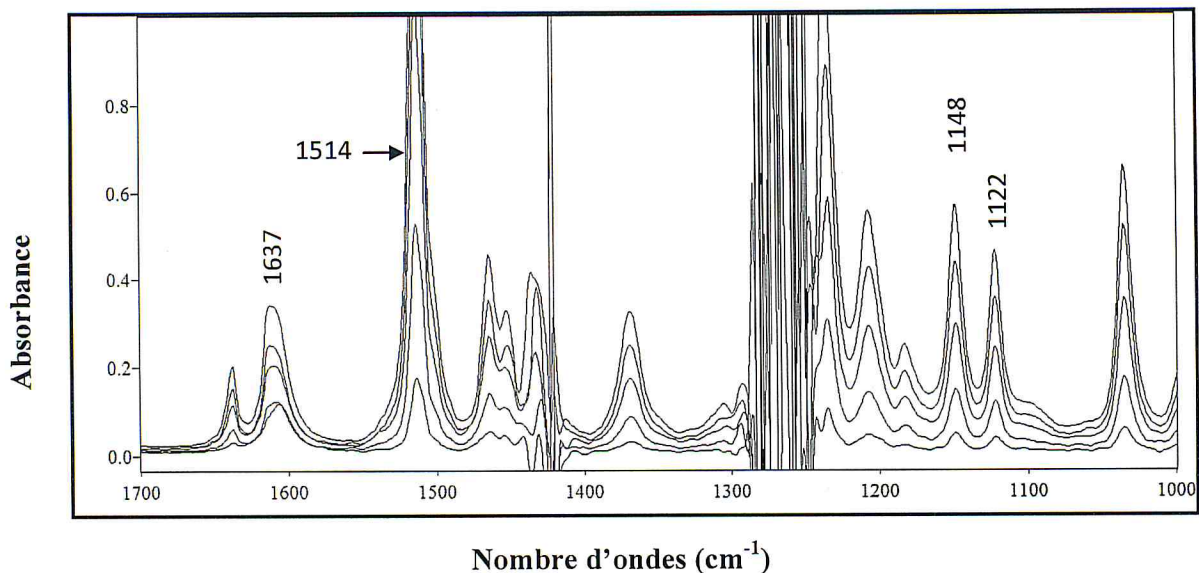


Figure 2.9 : Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de l'eugénol préparée directement dans CH_2Cl_2

La figure 2.10 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solution d'eugénol traitée et diluée dans le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène, et ce, dans un domaine de concentration pris entre 0.63 et 8.5 mg.ml^{-1} .

Les caractéristiques analytiques de la série des étalons de l'eugénol sans et après traitement préparés dans le CH_2Cl_2 sont établies et résumées dans le tableau 2.3 montrant une très bonne linéarité, une limite de détection qui varie entre 0.005 et $0.65 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$, et une déviation standard relative allant de 0.29 à 1.82% .

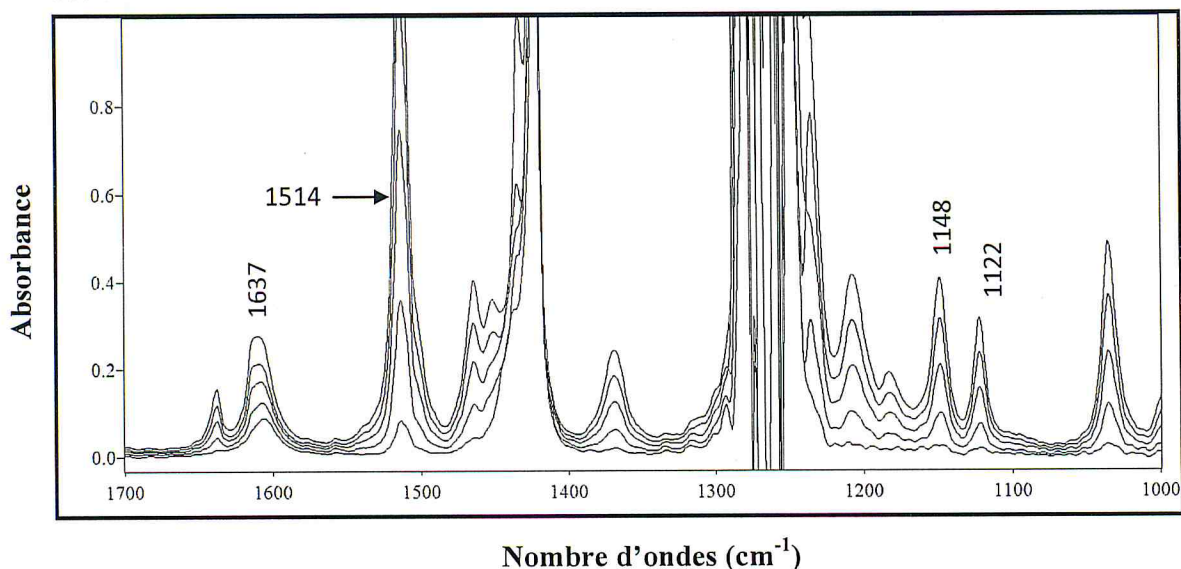


Figure 2.10 : Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de l'eugénol traitée et diluée dans CH_2Cl_2

Le pourcentage de récupération de l'eugénol est calculé à partir des rapports des pentes des droites de calibration obtenues pour des étalons de l'eugénol après traitement, et des étalons préparés directement dans le solvant, voir tableau 2.3.

Max: Ligne de base (cm ⁻¹)	Eugénol sans traitement	Eugénol après traitement	Pourcentage De récupération (%)
1122 :1112 – 1134	A= 0.030676C+0.006833 R= 0.9997 L.D= 1.06 µg.ml ⁻¹ D.S.R= 0.67%	A= 0.026942C-0.001093 R= 0.9990 L.D= 0.10 µg.ml ⁻¹ D.S.R= 1.31%	87.83
1148 :1134 – 1162	A= 0.042038C+0.003404 R= 0.9998 L.D= 0.06 µg.ml ⁻¹ D.S.R=1.1%	A= 0.035876C-0.002877 R= 0.9983 L.D= 0.02 µg.ml ⁻¹ D.S.R= 1.57%	85.34
1514:1482 - 1539	A= 0.181987C+0.028211 R= 0.9991 L.D= 0.02 µg.ml ⁻¹ D.S.R= 0.50%	A= 0.162259C-0.003534 R= 0.9982 L.D= 0.03 µg.ml ⁻¹ D.S.R=0.72%	89.16
1637 :1627 – 1645	A= 0.012636C+0.000950 R= 0.9997 L.D= 0.13 µg.ml ⁻¹ D.S.R= 0.75%	A= 0.010967C-0.002215 R= 0.9979 L.D= 0.005 µg.ml ⁻¹ D.S.R= 0.29%	86.79

Tableau 2.3 : Comparaison des droites de calibration de l'eugénol préparé directement dans CH₂Cl₂ et après purification et dilution dans le même solvant

Conditions expérimentales: A : absorbance, R : coefficient de corrélation, L.D : Limite de Détection, D.S.R : Déviation Standard Relative. Résolutions nominales est de 4cm⁻¹ ; nombre de balayage minimum égale à 10 spectres ; parcours optiques est de 0.5 mm ; background (voir annexe 3) de la cellule remplie avec le solvant de dilution (dichlorométhane stabilisé avec l'amylène).

Les résultats montrés dans le tableau 2.3 donnent un rendement de purification de l'ordre de 88%. Ce qui confirme la nécessité de traiter les étalons de la même manière que les échantillons réels.

En comparant les spectres d'eugénol, des extraits brut et purifié ; on a conclu que le procédé permet une bonne purification de l'eugénol, du moment qu'on a obtenu un spectre de l'extrait purifié qui est superposable au spectre de l'étalon.

L'extrait des clous de girofle présente également une bande à 1760 cm⁻¹ caractéristique de l'acétyl'eugénol qui disparaît après traitement de purification (figure 2.11).

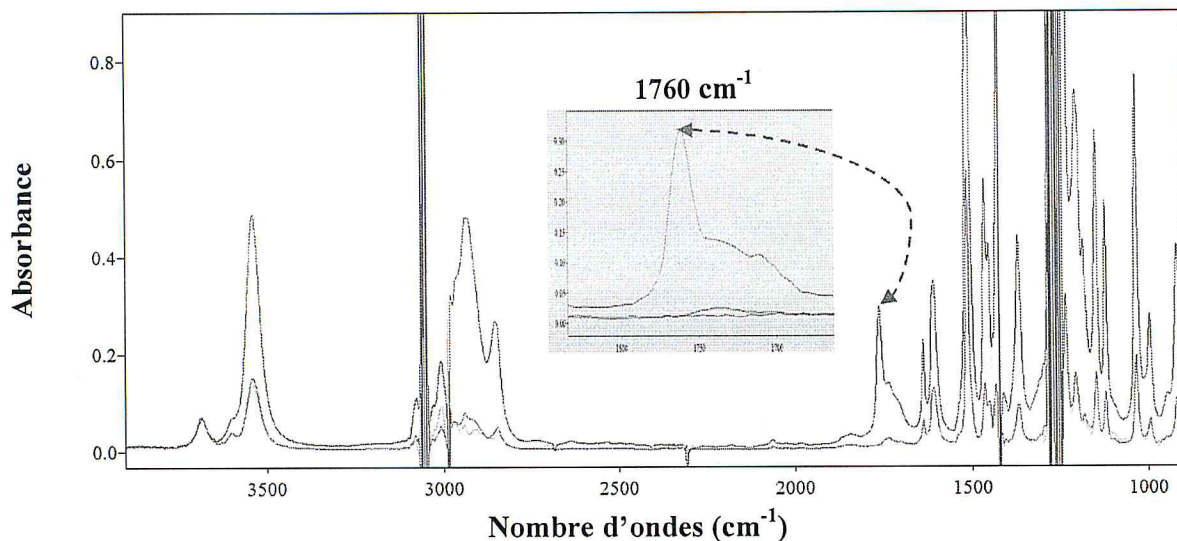


Figure 2.11 : Spectres IRTF des extraits de clous de girofle avant purification préparé directement dans CH_2Cl_2 (13.33 mg.ml^{-1}) (rouge), après purification et dilution dans CH_2Cl_2 (5.29 mg.ml^{-1}) (vert) et de l'eugénol préparé directement dans CH_2Cl_2 (5 mg.ml^{-1}) (violet)

2.4.5 Détermination du taux de l'eugénol dans l'extrait des clous de girofle

Une masse de 100 mg de l'extrait lipidique de clous de girofle préalablement purifiée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.3.1.2 est analysée par spectrométrie IRTF, l'expérience est répétée deux fois. Le spectre d'un échantillon réel de concentration de 5.69 mg.ml^{-1} est montré sur la figure 2.12.

Le taux est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans les droites de calibration établies pour des solutions étalons traitées de la même manière que les échantillons réels, tous en considérant la moyenne de trois mesures indépendantes. Les résultats sont résumés dans le tableau 2.4.

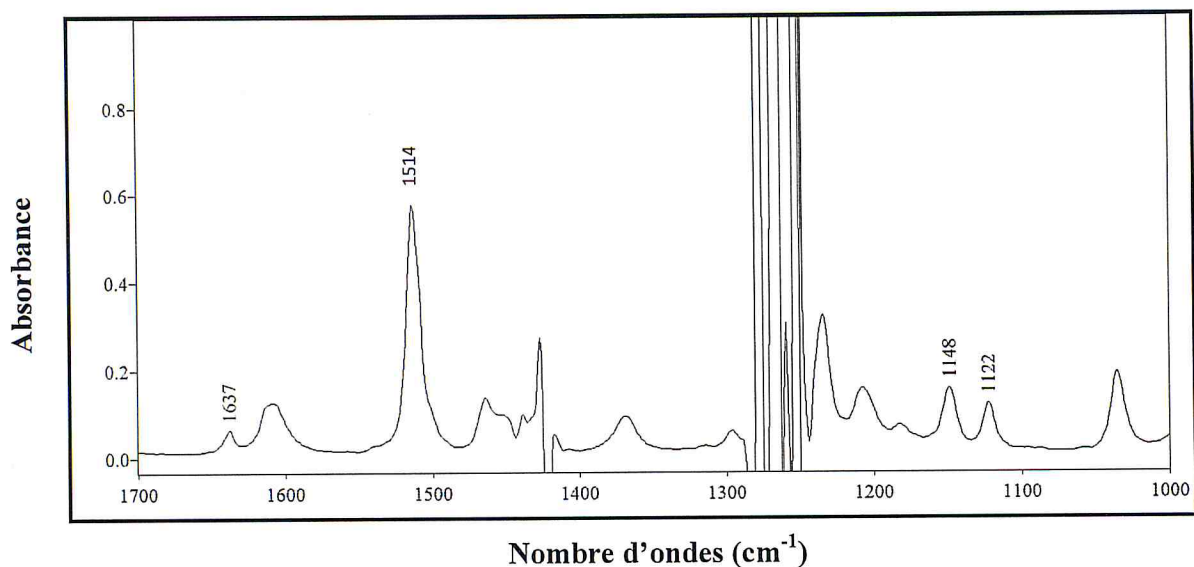


Figure 2.12: Spectre d'absorbance de l'extrait de clous de girofle après purification et dilution dans CH_2Cl_2 (5.69 mg.ml^{-1})

Le tableau 2.4 regroupe les résultats de détermination IRTF de l'eugénol de clous de girofle.

Max (cm^{-1}) Ligne de base	Taux (%)			
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyennes
1122	32.9	35.5	37.3	35.23 ± 2.21
1112 – 1134				
1148	33.5	36.3	37.8	35.86 ± 2.21
1134 – 1162				
1514	34.0	36.6	38.2	36.40 ± 1.90
1482 – 1539				
1637	34.2	38.1	39.3	37.20 ± 2.66
1627 – 1645				

Tableau 2.4 : Taux de l'eugénol dans l'extrait des clous de girofle

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 2.4, on constate que les taux d'eugénol obtenues, en considérant les quatre bandes sélectionnées sont très proches mais la bande à 1514 cm^{-1} présente une sensibilité importante dans le domaine de concentration considéré qui peut dévier à la loi de Beer-Lambert. Pour la bande à 1637 cm^{-1} , la répétabilité est la plus mauvaise. Alors que, les caractéristiques analytiques présentées par les bandes à 1122 cm^{-1} et 1148 cm^{-1} corrigées avec les lignes de base entre $1112 - 1134$

cm^{-1} et $1134 - 1162 \text{ cm}^{-1}$ sont les meilleurs. Ces dernières ont été sélectionnées pour donner le taux de l'eugénol dans l'extrait des clous de girofle qui est de 35.5 %.

Le taux de l'eugénol obtenue par spectrométrie IRTF (35.5 %) est différent de celui donné par CG-SM (58 %), cela est dû d'un coté au fait que la CG-SM a été utilisée juste pour une analyse qualitative de la composition chimique de l'extrait des clous de girofle. Par contre, la spectrométrie IRTF a été sollicitée pour le dosage quantitatif. Pour confirmer le taux obtenu par spectrométrie IRTF, on doit valider avec une méthode de quantification telle que la CLHP. De l'autre côté, les taux déterminés sont différents de ceux donnés dans la littérature, ceci revient au fait que l'origine de la plante (espèce, variété), les lieux de production (nature du sol et du climat) et les modes de cueillette et de préparation peuvent influencés la composition chimique. Par ailleurs, au cours du stockage ou du processus d'extraction, les pertes en composés volatils peuvent être importantes, à titre d'exemple le thym perd 15 % de la fraction volatile après trois mois de stockage et de 80 % après neuf mois [1].

CHAPITRE 3 :
ETUDE DES ACTIVITES
ANTIMICROBIENNES ET
ANTIOXYDANTES DE L'EXTRAIT
LIPIDIQUE DES CLOUS DE GIROFLE

3.1 Introduction

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de clous de girofle est le sujet de plusieurs études scientifiques depuis plusieurs années [28, 42- 44].

Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur [95-97].

La surproduction des radicaux libres dans l'organisme et le déficit du système de défense endogène peuvent engendrer de diverses pathologies ; cancer, vieillissement... Actuellement, La recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues des plantes, qui sont douées de propriétés antiradicalaires.

Le radical libre DPPH permis l'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits et huiles essentielles. Il possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune pâle.

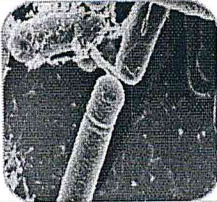
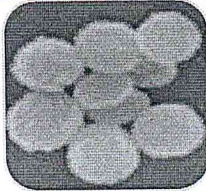
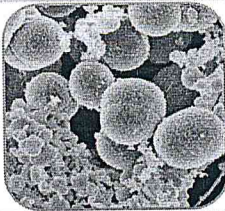
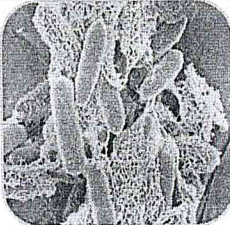
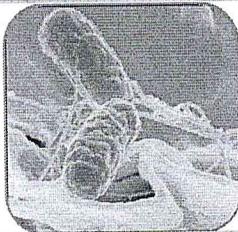
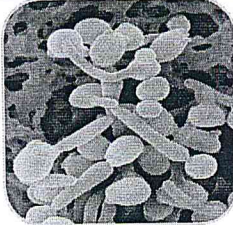
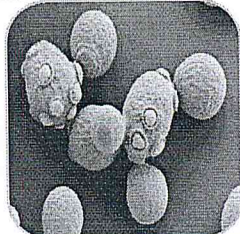
En effet, cette partie vise l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait des clous de girofle et la mise en évidence de son pouvoir antioxydant.

3.2 Etude du pouvoir antimicrobien

3.2.1 Matériels utilisés

a) Les disques utilisés proviennent du Laboratoire de Microbiologie, de la Filial ANTIBIOTICAL- SAIDAL.

b) Les Souches microbiennes utilisées proviennent du Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse. Le tableau 3.1 regroupe les références, l'allure sous le microscope électronique et la pathologie des souches utilisées. Les milieux de culture utilisés sont International *Streptomyces* Project (ISP2), Muller Hinton, Cétrimide agar base (CAB) et Sabouraud.

Souches	Noms	Références	Allures	Pathologie
Gram ⁺	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633		Non pathogène
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC9314		Non pathogène
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC		Pathogène
Gram ⁻	<i>Escherichia coli</i>	ATCC10536		Entéropathogène : Gastroentérite, infections intestinales.
	<i>Salmonella enterica</i>	CIP 81.3		Pathogène : Gastroentérite
Levures	<i>Candida albicans</i>	IPA 200		Résponsable d'infections superficielles
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 4226		Non pathogène

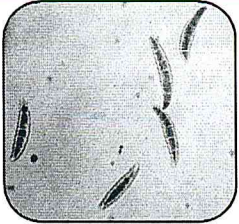
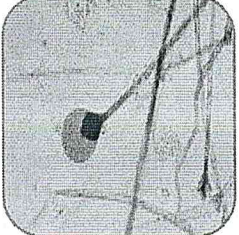
Champignons	<i>Fusarium culmorum</i>	F3288		Infections chez l'homme, maladies des céréales et herbes
	<i>Mucor ramannianus</i>	NRRL1829		Mucoromycoses opportunistes

Tableau 3.1 : Références, figures et pathologies des souches utilisées

3.2.2 Procédure générale

Deux protocoles sont choisis pour mettre en évidence l'activité de l'extrait des clous de girofle par diffusion dans différents milieux de culture, et ce, consiste à la réalisation d'un aromatoگرامme dans le but de déterminer la sensibilité des différentes souches.

L'aromatoگرامme repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'une huile essentielle dans un milieu gélosé à partir d'un support en papier pré-imprégné [97].

L'étude qualitative du pouvoir antimicrobien de l'extrait des clous de girofle par la méthode d'aromatoگرامme a été réalisée sur différents milieux de culture (figure 3.1):

- (I) ISP2 : milieu sélectif pour 8 souches ;
- (II) Muller Hinton : milieu sélectif pour *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus* ; Cétrimide agar base (CAB) : milieu sélectif pour *pseudomonas* et Sabouraud pour *candida albicans*.

Il ya lieu de noter que la méthode de préparation des précultures et d'ensemencement diffère aussi entre les deux protocoles d'aromatoگرامme.

Une étude comparative entre les résultats de la bactérie gram⁻ *Escherichia coli* et d'autres de la levure *Candida albicans* sera réalisée.

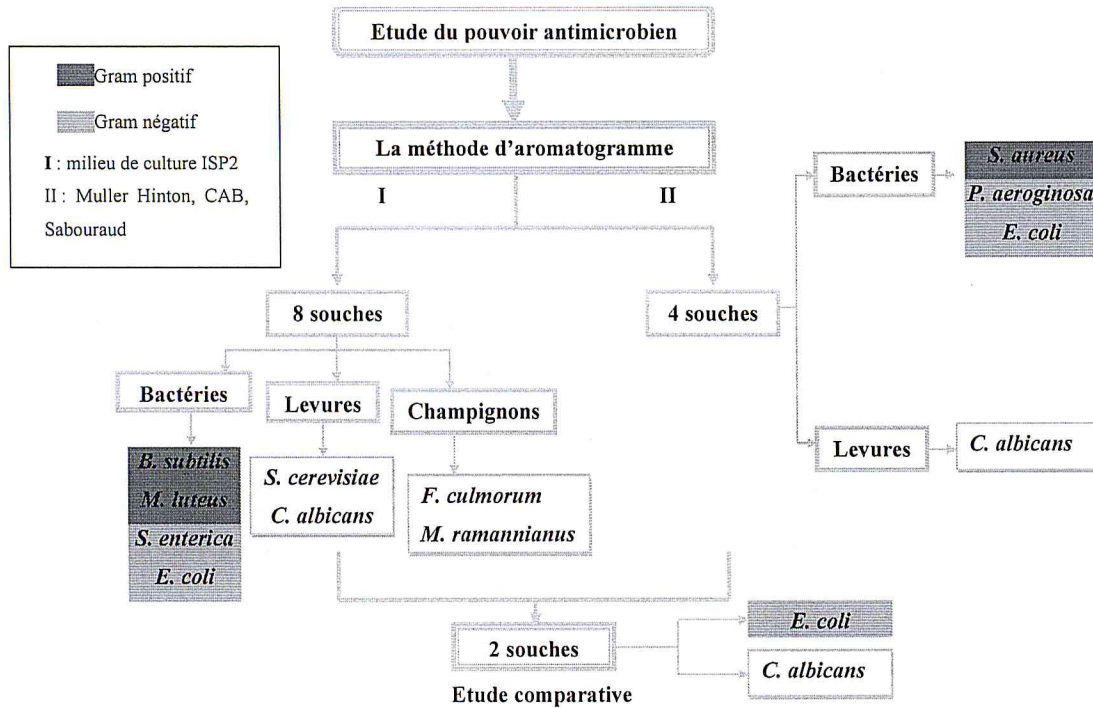


Figure 3.1 : Représentation de l'étude du pouvoir antimicrobien effectuée, en adoptant la méthode d'aromatogramme

3.2.2.1 Protocole (I)

3.2.2.1.1 Préparation du milieu de culture

La plupart des bactéries peuvent être cultivées sur des milieux artificiels liquides ou solides. Les conditions permettant la croissance varient beaucoup selon les bactéries. Il n'existe pas une condition de culture standard permettant la croissance de toutes les bactéries que l'on peut rencontrer en pathologie [98].

Le milieu de culture utilisé est International *Streptomyces* Project (ISP2). Il est préconisé par Shirling et Gottlieb [99], sa composition chimique est constituée de 4 g de glucose, 10 g d'extrait de malt, 4 g d'extrait de levure et 10 g d'agar (milieu semi-solide). Le tout est solubilisé dans 1000 ml d'eau distillée.

Le pH du milieu est ajusté avant la stérilisation à 7.3 (avec du HCl ou du NaOH). La stérilisation du milieu est réalisée à l'autoclave pendant 20 min à 120°C (figure 3.2).

3.2.2.1.2 Préparation des précultures

Des tubes contenant 3 ml d'ISP2 liquide sontensemencés par des germes cibles, déjà cités (figure 3.1), chaque préculture est bien agitée à l'aide d'un vortex (figure 3.3), est ajoutée à un flacon contenant le milieu de culture ISP2. Ce milieu est coulé dans des boîtes de Pétri stériles.

NB : les pré-cultures doivent être utilisées dans les 15 minutes suivant sa préparation.

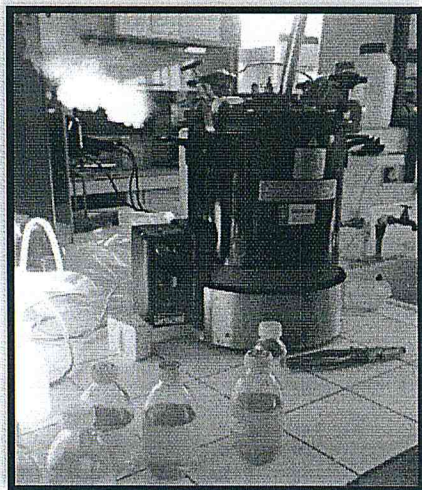


Figure 3.2 : Autoclave



Figure 3.3 : Agitation des précultures avec un vortex

3.2.2.1.3 Préparation des dilutions

L'extrait conservé dans des flacons à froid et à l'abri de la lumière est dilué avec du méthanol à des concentrations de 50% et 5%.

3.2.2.1.4 Dépôt des disques

Les disques de 9 mm de diamètre, sont imbibés par différentes concentrations d'extrait de clous de girofle : 100%, 50% et 5%. Le volume pris de chaque concentration est de 10 μ l (voir figure 3.4).

Les disques sont stérilisés sous UV (254 nm) pendant 45 minutes, voir figure 3.5. Ils sont ensuite déposés aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP2 préalablement ensemencé par le microorganisme cible (dans notre cas trois disques de différentes concentrations avec les répétitions sont déposés dans chaque boîte).

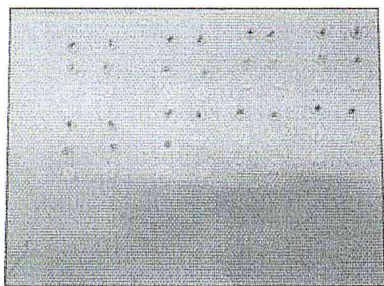


Figure 3.4 : Disques imbibés par différentes concentrations d'extrait



Figure 3.5 : Stérilisation des disques sous UV

Pour permettre une bonne diffusion de l'extrait des clous de girofle dans le milieu et inhiber momentanément la croissance du germe testé, les boîtes sont placées à 4°C pendant trois heures, puis incubées à 30°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour les champignons.

3.2.2.1.5 Lecture

La diffusion de l'extrait dans le milieu de culture, va permettre l'inhibition de la croissance des germes, tout au tour des disques, dans le cas d'une éventuelle activité antimicrobienne positive, qui se traduira par auréole claire et distincte autour du disque appelée : Halo ou zone d'inhibition. L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque.

La lecture des résultats après incubation est effectuée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions obtenues pour chacune des souches à l'aide d'un pied à coulisse (le diamètre mesuré est exprimé soit en cm, ou en mm).

Le diamètre des zones d'inhibition nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés à l'extrait, en adoptant la méthode de Chifundra *et al.* (1990) appliquée aux antibiotiques [100] :

Diamètres d'inhibitions	Sensibilité des souches
0-9	Souche résistante
10-15	Souche peu sensible
16-20	Souche sensible ou intermédiaire
>20	Souche très sensible

Tableau 3.2 : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches

3.2.2.2 Protocole (II)

3.2.2.2.1 Préparation des milieu de culture

Les milieux de culture sélectifs pour chaque souche sont mis en surfusion et sont coulés dans des boîtes de pétri de 9 mm de diamètre et 4 mm d'épaisseur (figure 3.6).

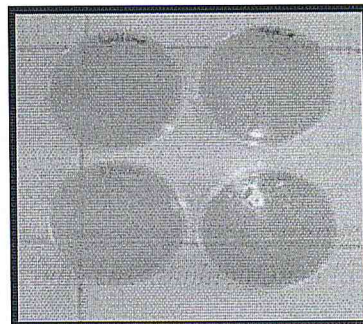


Figure 3.6 : Gélose fusionnée dans des boîtes de pétri

3.2.2.2 Obtention des précultures

La concentration bactérienne des inoculums est évaluée par la méthode des dilutions et elle est exprimée par la mesure de la densité optique (D.O à 620 nm) par un spectrophotomètre UV Visible.

Les suspensions ont été réalisées par le prélèvement de 4 colonnies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18h pour *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et de 48h pour *C. albicans*.

Les suspensions ont été émulsionnées dans un tube contenant 5 à 6 ml d'eau physiologique et homogénéisées par agitation au vortex.

La lecture de la concentration de chaque suspension est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm et en estimant une transmittance qui doit être comprise entre 22% et 32% pour les bactéries à l'exception de *staphylococcus aureus* qui doit être comprise entre 30% et 40% et entre 2% et 3% pour *C. albicans*.

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germe/ml.

3.2.2.3 Dépôt des disques

Les disques absorbants sont stérilisés et imprégnés d'une quantité de 10 μ l d'extrait et sont déposés sur la surface de gélose inoculée avec les souches testées (200 μ l), voir figure 3.7. Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve (24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 25°C pour *C. albicans*).

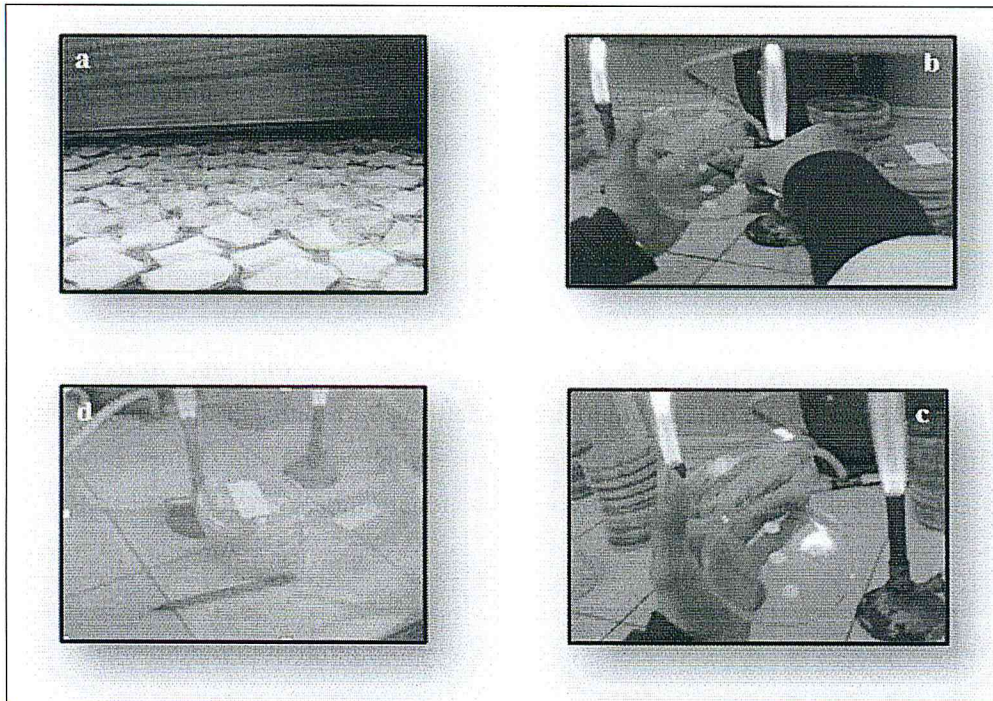


Figure 3.7 : Préparation des disques

3.2.2.2.4 Lecture

La lecture des résultats après incubation est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues pour chacune des souches.

3.3 Estimation du pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique des clous de girofle par la méthode de pigeage du radical libre DPPH

3.3.1 Appareillage et réactifs

Le matériel suivant a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait des clous de girofle :

- ✓ Un spectrophotomètre UV-visible de marque Chimadzu type 1605 à double faisceau (figure 3.8).
- ✓ Une balance sensible de marque Scaltec type OSI 9001, avec une précision de 0.01 mg.
- ✓ Des tubes à essaie avec leurs supports.
- ✓ Deux pipettes de 1ml graduées et une micropipette (pipette de précision).
- ✓ Papier aluminium, pour préserver les solutions à l'abri de la lumière.
- ✓ Une fiole de 100 ml, pour préparer la solution de DPPH.

Les différents produits utilisés sont regroupés dans le tableau 3.3.

Produits et standards	Marques	Pureté
DPPH	Fluka	97%
Méthanol	Merck	99,50%
BHT	Sigma-Aldrich	>99%
BHA	Sigma-Aldrich	>99%
Vitamine C	Sigma-Aldrich	>99%
Vitamine E	Sigma-Aldrich	>99%

Tableau 3.3 : Produits et standards utilisés, leurs marques et degrés de pureté

Le pouvoir antioxydant de notre extrait a été testé par la méthode au DPPH [101] avec quelques modifications. L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Le DPPH est un radical libre synthétique présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite conférée à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur

jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

Le DPPH (2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) est solubilisé dans le méthanol absolu pour avoir une solution de concentration de 0.004%, en raison de 4 mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol.

Les échantillons ont été préparés par dissolution de 0.5 mg d'extrait dans 1ml de méthanol. Cette solution dite solution mère, subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de mg par ml.

En parallèle, des solutions méthanoliques, de la vitamine C, vitamine E, BHT et BHA ont été préparées par dissolution de 0.2 mg de chaque standard dans 1ml de méthanol. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1ml du méthanol (figure 3.8.a) et les différentes concentrations (figure 3.8.b) de la solution à tester, on ajoute 1 ml de la solution DPPH. Après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante (25°C) pendant 30 min. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.



Figure 3.8 : Différentes étapes du test au DPPH

La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 ml (figure 6, annexe 3).

Pour chaque dilution, on prépare un blanc, constitué de 1 ml méthanol et 1 ml de la solution DPPH.

La caractéristique principale d'un antioxydant est sa capacité de capter les radicaux libres. Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radicale et la puissance d'un

antioxydant, nous avons réalisé un suivi de la réaction de réduction par mesure de l'abaissement d'absorbance dans le temps, de notre extrait, ainsi que les étalons d'antioxydants à la concentration qui correspond à la valeur de EC50 (autrement appelée la valeur IC50).

La valeur EC50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et de la solution de DPPH.

▪ Détermination du pouvoir antioxydant

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

$$\% \text{ AA} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{test}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}) * 100}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right\} [102].$$

Ou encore :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} * 100 [103].$$

Soit :

AA : Activité antioxydante.

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

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

Abs_{test} : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

3.4 Résultats et discussions

3.4.1 Etude du pouvoir antimicrobien

3.4.1.1 Activité antibactérienne

Cette étude est basée sur la mesure des diamètres des halos d'inhibition de l'extrait de clous de girofle.

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique de l'extrait a été effectuée par un test appelé « Aromatogramme » qui est une méthode de diffusion sur milieu gélosé ou méthode des disques absorbants. La mesure des diamètres des zones d'inhibition permet la détermination de l'activité antimicrobienne de l'extrait in vitro.

Les résultats qualitatifs concernant les diamètres des zones d'inhibition du développement des différentes souches bactériennes testées, en fonction des différentes concentrations en extrait lipidique de clous de girofle sont regroupés dans les tableaux 3.4 et 3.5 pour le milieu ISP2 et 3.6 et 3.7 pour les autres milieux.

Les figures 3.9 à 3.14 montrent les photographies des résultats d'action bactéricide de l'extrait lipidique, obtenus après l'incubation des germes testés pendant 24h.

Concentration de l'extrait (%)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	Bactéries Gram négatif					
	<i>Salmonella enterica (Se)</i>			<i>Escherichia coli (Ec)</i>		
	Essaie	répétition	moyenne	Essaie	Répétition	Moyenne
100	12	11	11.5	-	-	-
50	10	9	9,5	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

Tableau 3.4 : Diamètres des zones d'inhibition du développement des bactéries gram négatif, en fonction des différentes concentrations en extrait des clous de girofle (milieu de culture ISP2)

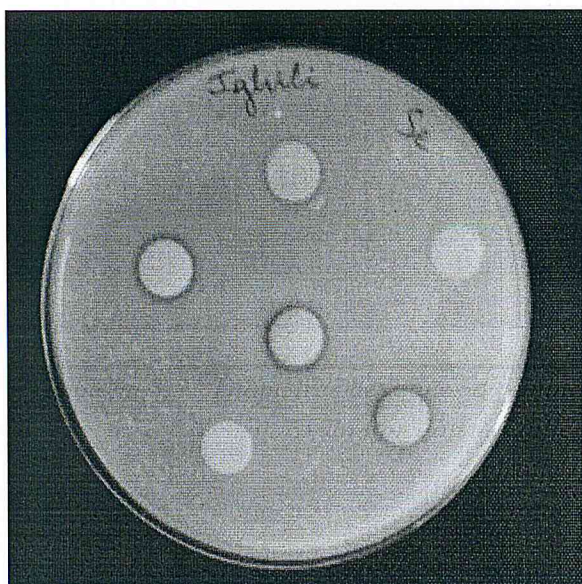


Figure 3.9 : Aromatogramme de *S. enterica* avec l'extrait de clous de girofle

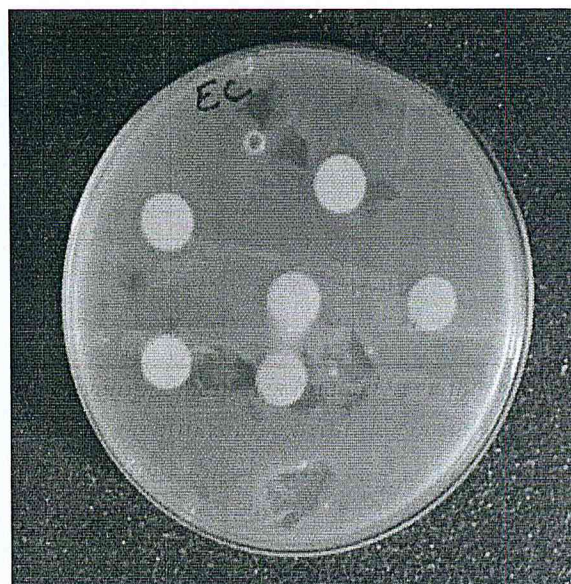


Figure 3.10 : Aromatogramme d'*E. coli* avec l'extrait de clous de girofle

Concentration de l'extrait (%)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	Bactéries Gram positif					
	<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)			<i>Micrococcus luteus</i> (MI)		
	Essaie	répétition	Moyenne	Essaie	Répétition	Moyenne
100	15	13	14	22	20	21
50	13	12	12,5	18	16	17
5	12	12	12	14	15	14.5

Tableau 3.5 : Diamètres des zones d'inhibition du développement des bactéries gram positif, en fonction des différentes concentrations en extrait des clous de girofle (milieu de culture ISP2)

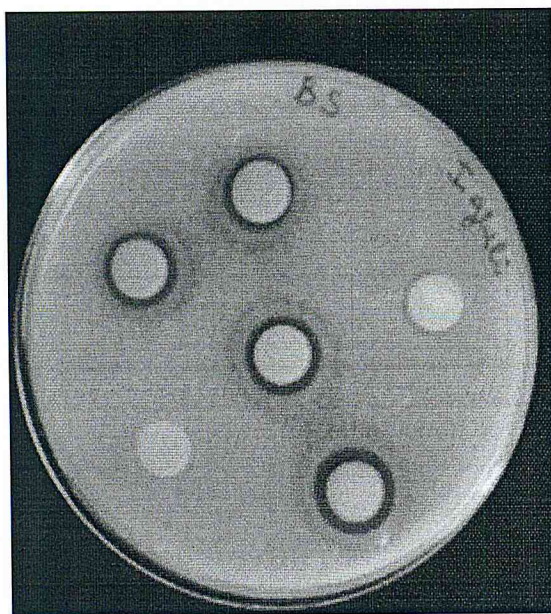


Figure 3.11: Aromatogramme de *B. subtilis* avec l'extrait de clous de girofle

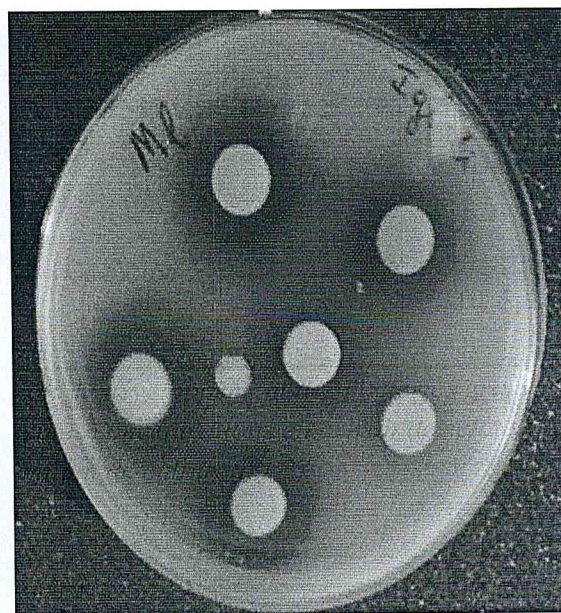


Figure 3.12: Aromatogramme de *M. luteus* avec l'extrait de clous de girofle

L'examen des résultats obtenus montre que l'extrait de clous de girofle présente une activité antimicrobienne vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées, à savoir : *S. enterica*, *E. coli*, *B. subtilis* et *M. luteus*.

En effet, les germes microbiens sont considérés comme sensibles à partir d'un diamètre d'inhibition de 16 mm, ce qui correspond à une concentration de 50% pour *M. luteus* [100].

Nous remarquons que les souches bactériennes gram⁺ paraissent plus sensibles envers l'extrait des clous de girofle que les bactéries gram négatif. En effet, le développement des bactéries gram positif est inhibé par des concentrations moins importantes que celle inhibant le développement des bactéries gram négatif.

Bactéries Gram ⁻	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	Répétitions			Moyenne
	1	2	3	
<i>Escherichia coli</i> (*)	17	20	19	18.66
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (**)	15	15	15	15

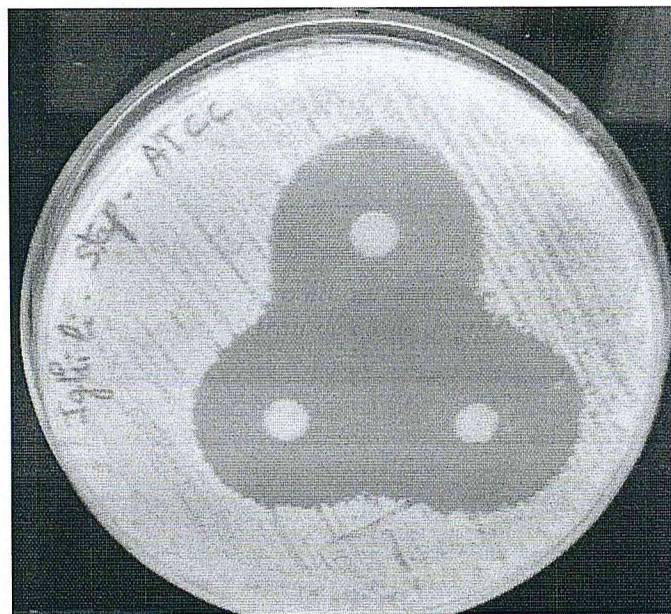
Tableau 3.6 : Diamètres des zones d'inhibition du développement des bactéries gram négatif ensemencées sur : (*) Muller Hinton, (**) Cétrimide agar base

Bactéries Gram ⁺	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	Répétitions			Moyenne
	1	2	3	
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	32	30	30.66

Tableau 3.7 : Diamètres des zones d'inhibition du développement de *S. aureus* ensemencées sur Muller Hinton



Figure 3.13 : Aromatogramme d'E. coli ()
avec l'extrait de clous de girofle*



*Figure 3.14: Aromatogramme de S. aureus
avec l'extrait de clous de girofle*

Nous remarquons que la souche bactérienne *P. aeruginosa* paraît peu sensible envers l'extrait des clous de girofle, alors que la bactérie *E. coli* s'est montrée plus sensible. Le développement de cette dernière est inhibé avec un diamètre égal à 18 mm. La bactérie gram⁺ *S. aureus* est inhibée avec un diamètre de 30.66 mm, s'est avérée plus sensible envers l'extrait des clous de girofle.

Donc on peut conclure que l'extrait de clous de girofle semble exercer une activité bactéricide importante.

3.4.1.2 Activité antifongique

Les résultats de mesure des diamètres des zones d'inhibition des levures et champignons ainsi ensemencés sur le milieu de culture ISP2, en fonction des différentes concentrations en extrait des clous de girofle sont reportés dans les tableaux 3.8 et 3.9, alors que ceux de *Candida albicans* ensemencée sur le milieu Sabouraud sont regroupés dans le tableau 3.10.

Les figures 3.15 à 3.20 montrent les photographies des résultats d'action fongicide de l'extrait lipidique, obtenus après l'incubation des germes testés pendant 48h.

Concentration de l'extrait (%)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	Levures					
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc)			<i>Candida albicans</i> (Ca)		
	Essaie	répétition	Moyenne	Essaie	Répétition	Moyenne
100	22	24	23	20	22	21.5
50	21	20	20.5	21	21	21
5	16	14	15	10	9	9.5

Tableau 3.8 : Diamètres des zones d'inhibition du développement des levures testées, en fonction de différentes concentrations en extrait de clous de girofle (milieu de culture ISP2)

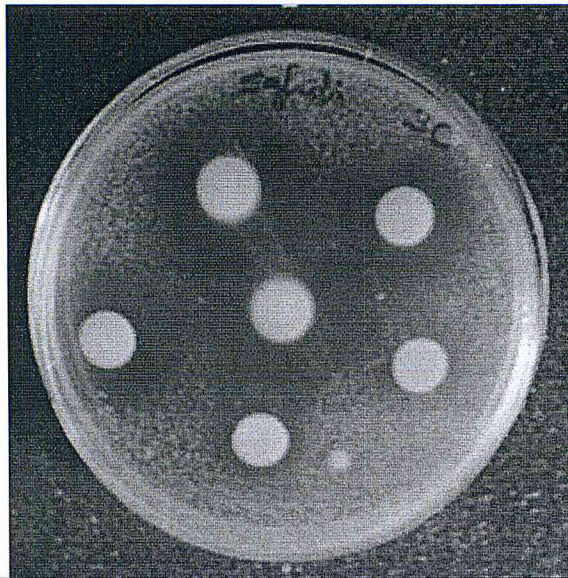


Figure 3.15 : Aromatogramme de *S. cerevisiae* avec l'extrait de clous de girofle

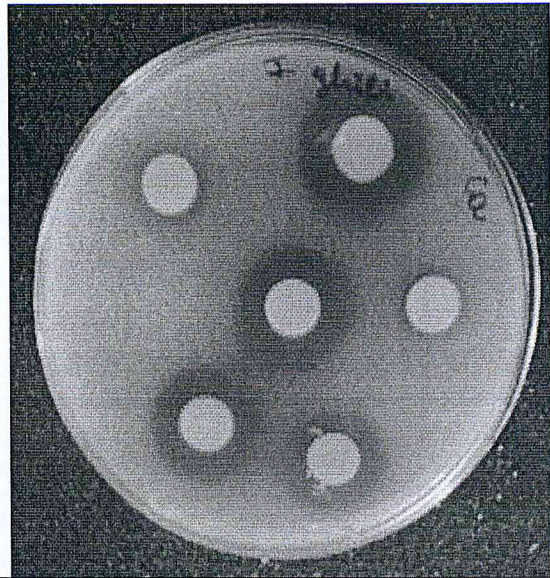


Figure 3.16 : Aromatogramme de *C. albicans* avec l'extrait de clous de girofle

Concentration de l'extrait (%)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	Champignons					
	<i>Fusarium culmorum</i> (Fc)			<i>Mucor ramannianus</i> (Mr)		
	Essaie	répétition	moyenne	Essaie	Répétition	Moyenne
100	22	21	21,5	20	16	18
50	17	20	18,5	14	16	15
5	-	-	-	-	-	-

Tableau 3.9 : Diamètres des zones d'inhibition du développement des champignons testés en fonction de différentes concentrations en extrait des clous de girofle (milieu de culture ISP2)

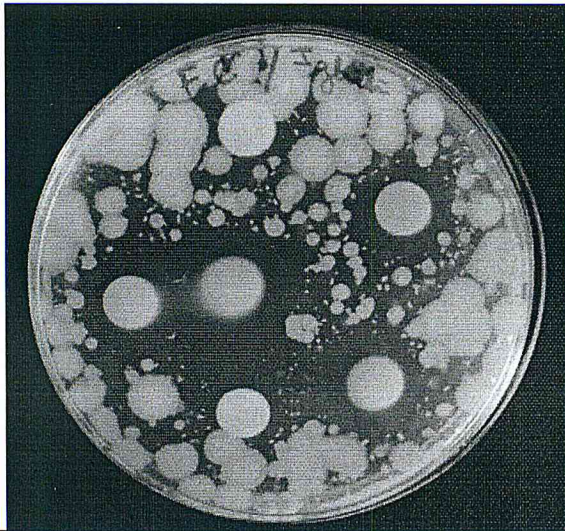


Figure 3.17 : Aromatogramme de *F. culmorum* avec l'extrait de clous de girofle

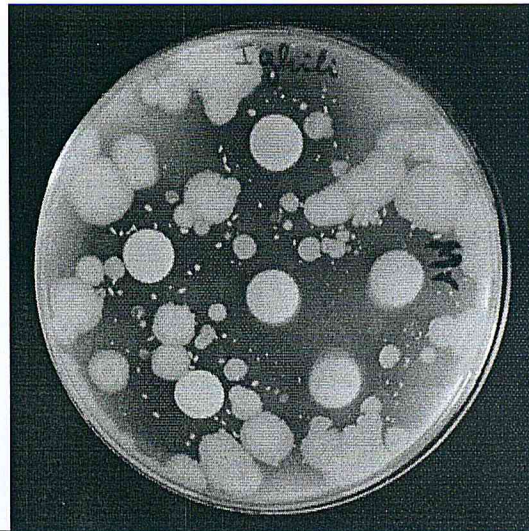


Figure 3.18 : Aromatogramme de *M. ramannianus* avec l'extrait de clous de girofle

L'analyse des résultats montre que l'extrait des clous de girofle possède un effet inhibiteur important vis-à-vis de *Saccharomyces cerevisiae* (elle est inhibée à une concentration de 50% d'extrait). En se basant sur la bibliographie [100], nous pouvons considérer que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* et *Fusarium culmorum* sont des germes microbiens très sensibles envers l'extrait des clous de girofle.

Levure	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	Répétitions			Moyenne
	1	2	3	
<i>Candida albicans</i> (Ca)	35	40	37	37.33

Tableau 3.10 : Diamètres des zones d'inhibition du développement de *C. albicans*, ensemencées sur Sabouraud



Figure 3.19: Aromatogramme de *C. albicans* avec l'extrait de clous de girofle

Ces résultats montrent que l'extrait des clous de girofle possède une très forte activité antifongique contre *Candida albicans*.

L'extrait des clous de girofle a donc révélé une importante activité antimicrobienne. D'après la bibliographie [105], ce pouvoir bioactif observé est attribué principalement à sa teneur élevée en eugénol, de même l'activité antimicrobienne est due aux terpènes phénoliques qui agissent en se fixant sur les groupes amines et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires [106].

3.4.1.3 Etude comparative des résultats d'aromatogrammes de la bactérie *E.coli* et de la levure *C.albicans*

Nous avons regroupé les résultats de la moyenne des diamètres des zones d'inhibition obtenus, qui correspondent à la concentration de 100% d'extrait de clous de girofle, dans le tableau 3.11 afin de pouvoir établir des représentations graphiques sous forme d'histogramme (figure 3.20).

Souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
	Protocole 1	Protocole 2
<i>Escherichia coli</i> (Ec)	-	18.66
<i>Candida albicans</i> (Ca)	21.5	37.33

Tableau 3.11: Etude comparative entre les résultats d'activité antimicrobienne obtenus d'*E.coli* et de *C. albicans*

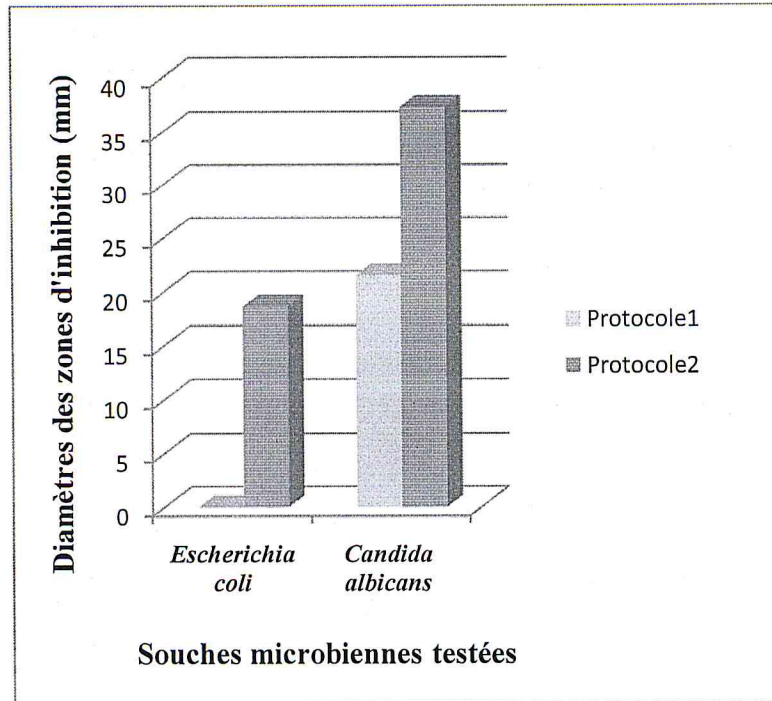


Figure 3.20 : Histogramme de la moyenne des diamètres d'inhibition de *E.coli* et *C.albicans* en utilisant les deux protocoles d'aromatogramme

Les résultats regroupés dans le tableau 3.11 et illustrés par l'histogramme précédent, montrent que les méthodes utilisées pour évaluer le pouvoir antimicrobien de l'extrait des clous de girofle donnent des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées dans chaque manipulation, ce qui est confirmé par la littérature [95-97].

3.4.1.4 Etude comparative entre nos résultats d'activité antimicrobienne et ceux obtenus avec l'huile essentielle de clous de girofle [84]

L'étude comparative entre nos résultats qui concerne l'extrait des clous de girofle et ceux obtenus avec son huile essentielle [84] sont représentés dans le tableau 3.12 et illustrés par la figure 3.21, montre une activité antimicrobienne variable pour l'extrait et l'huile essentielle des clous de girofle [84] vis-à-vis des différentes souches étudiées.

Souches	La moyenne des diamètres des zones d'inhibition (mm)	
	Extrait	H.E [84]
<i>Escherichia coli</i>	18.66	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	24
<i>Bacillus subtilis</i>	14	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	30.66	27
<i>Candida albicans</i>	37.33	45

Tableau 3.12 : Comparaison de l'activité antibactérienne de l'extrait étudié et de l'huile essentielle [84] vis-à-vis de différentes souche

Il ya lieu de noter que les conditions expérimentales sont les même pour *P. aeruginosa* et *C. albicans*, mais différentes pour les autres souches.

Le tableau 3.13 regroupe les milieux de culture qui ont été utilisés lors de ces études.

Milieux de culture Souches Utilisées	Extrait	Huile essentielle
<i>Escherichia coli</i>	Muller Hinton	Soja agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CAB	CAB
<i>Bacillus subtilis</i>	ISP2	Soja agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	Muller Hinton	Soja agar
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud	Sabouraud

Tableau 3.13 : Milieux de culture sélectifs dans l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait étudié et l'huile essentielle [84] des clous de girofle

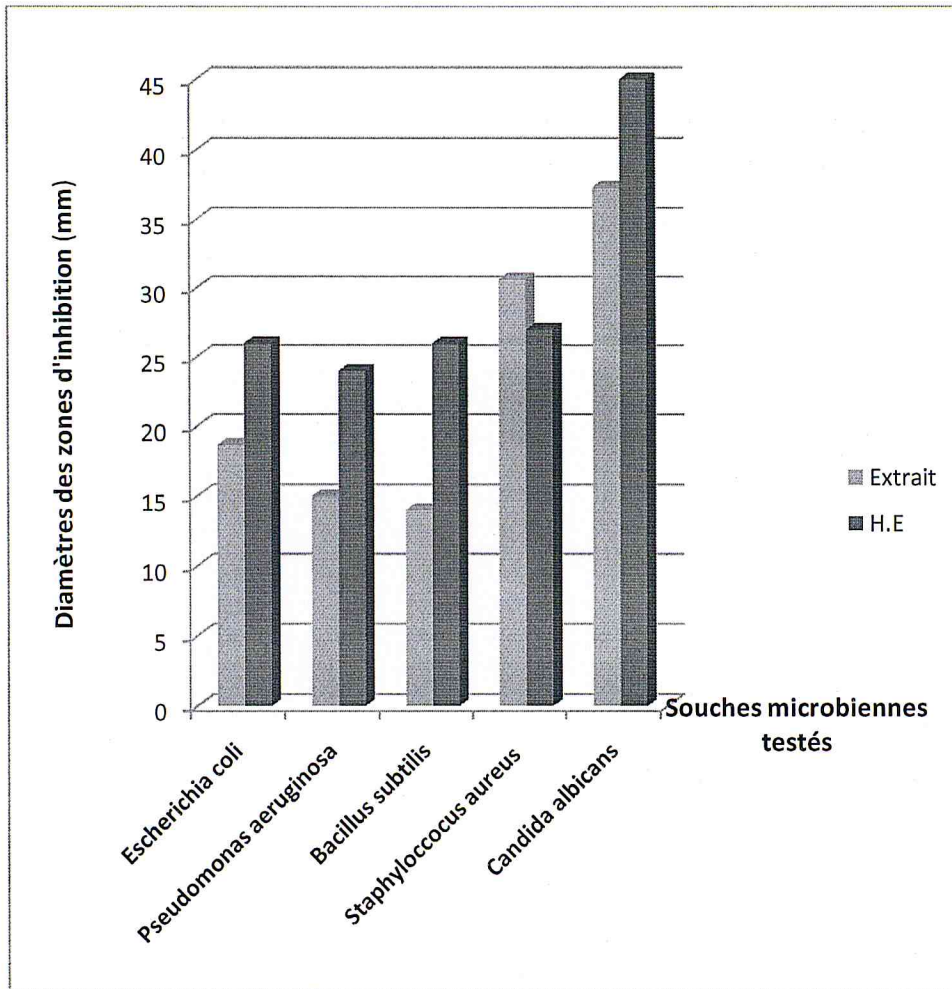


Figure 3.21 : Histogramme représentant l'étude comparative de l'activité antimicrobienne de l'extrait étudié et l'huile essentielle [84] des clous de girofle

D'après l'histogramme, on peut constater que parmi les souches testées, la levure *C. albicans* et la bactérie gram⁺ *S. aureus* sont révélées les plus sensibles envers l'extrait étudié et l'huile essentielle des clous de girofle [84].

Les résultats du tableau 3.12 illustrés par l'histogramme précédent montrent que les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne qui ont été utilisées, agissent sur le pouvoir antimicrobien (diamètres des zones d'inhibition).

Le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle sur les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* apparaît plus puissant que celui de notre extrait. Cela est dû principalement à sa teneur élevée en eugénol (87.03%) [84], qui est un phénol doué des propriétés antiseptiques et il inhibe la croissance des micro-organismes.

Alors, l'activité antibactérienne diffère selon les milieux de culture utilisés, la méthode d'ensemencement et la méthode d'extraction effectués. Donc, l'étude du pouvoir antimicrobien en utilisant l'huile essentielle des clous de girofle donne des résultats meilleurs en comparaison avec ceux obtenus avec l'extrait à l'exception de *S. aureus* qui paraît plus sensible envers l'extrait étudié.

3.4.2 Evaluation de l'activité antioxydante (test au DPPH)

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour notre extrait, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre synthétique présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite conférée à la solution une coloration jaune pâle (figure 3.22), le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

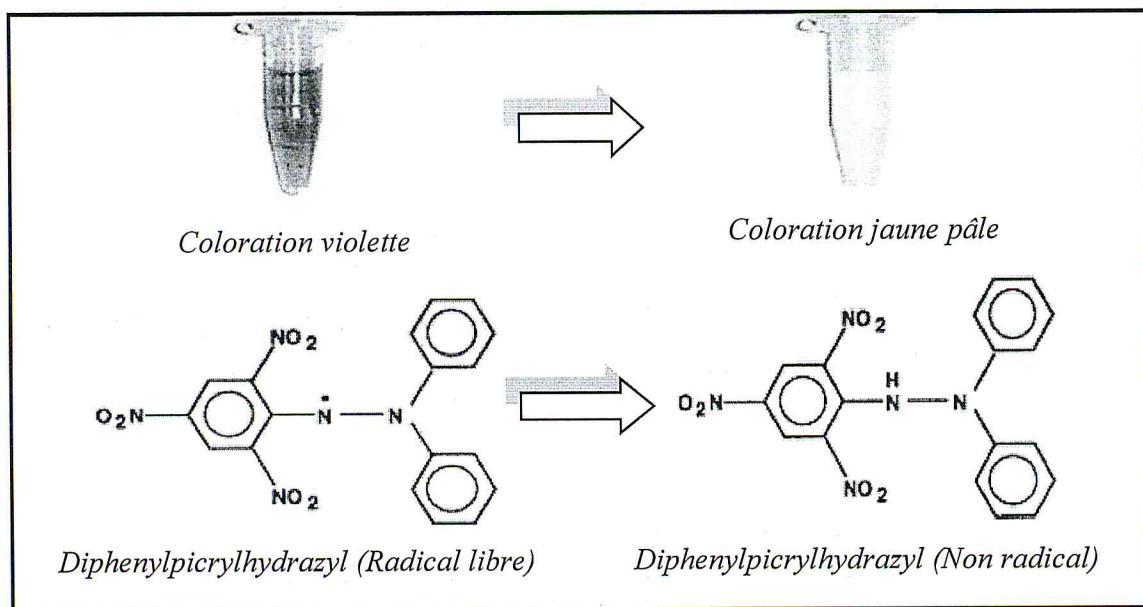


Figure 3.22 : Forme libre et réduite du DPPH [104]

Notre extrait a présenté un très bon pouvoir antioxydant, ce qui est confirmé par la bibliographie [8, 72, 73, 89, 90]. La figure 3.23 montre lisiblement la variation de la coloration du DPPH en fonction des concentrations de notre extrait.

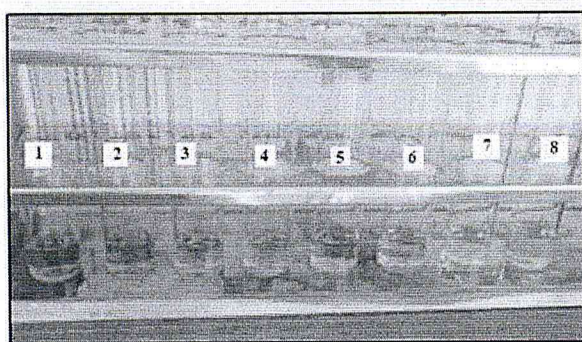


Figure 3.23 : Evolution de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de l'extrait de clous de girofle

Pour le DPPH l'absorbance mesurée à 517 nm montre une chute rapide dans un intervalle très réduit de la dose d'extrait des clous de girofle, comme le montre le tableau 3.14 et la figure 3.24.

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

Tableau 3.14 : Variation du taux de piégeage (I%) du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des clous de girofle

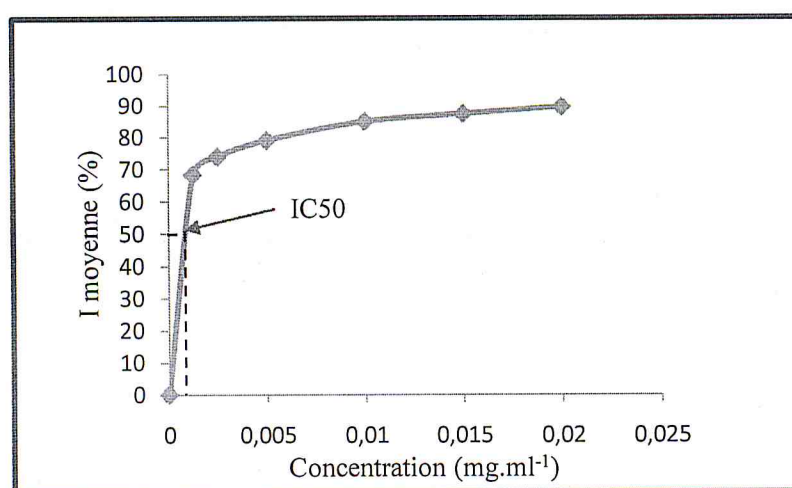


Figure 3.24 : Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de clous de girofle en fonction des différentes concentrations

Pour montrer la capacité antioxydante de l'extrait des clous de girofle, on a effectué plusieurs tests du taux de piégeage de radical libre DPPH sur la vitamine C, vitamine E, butylated hydroxyanisole (BHA) et butylated hydroxytoluene (BHT). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.15 et illustrés par la figure 3.25.

Standard	Tube	Concentration (mg.ml ⁻¹)	V (μl)	I _{moy} (%)
Vitamine C	1	0,0000	0	0,000
	2	0,000498753	5	12,379
	3	0,002955665	30	32,120
	4	0,005825243	60	62,945
	5	0,00861244	90	68,366
	6	0,013953488	150	73,463
	7	0,018181818	200	77,832
Vitamine E	1	0,0000	0	0,000
	2	0,000498753	5	17,199
	3	0,002955665	30	54,255
	4	0,00861244	90	57,713
	5	0,013953488	150	60,550
	6	0,033333333	400	72,163
		0,046153846	600	82,713
	0,057142857	800	84,752	
BHT	1	0,0000	0	0,000
	2	0,000498753	5	8,511
	3	0,002955665	30	26,330
	4	0,005825243	90	44,681
	5	0,00861244	120	49,645
	6	0,011320755	150	54,610
	7	0,013953488	200	58,422
	8	0,033333333	400	74,379
	9	0,046153846	600	82,004
	10	0,057142857	800	82,535
BHA	1	0,0000	0	0,000
	2	0,000498753	5	10,904
	3	0,002955665	30	42,553
	4	0,00861244	90	56,028
	5	0,011320755	120	58,067
	6	0,018181818	200	63,475
	7	0,033333333	400	76,950
	8	0,046153846	600	80,319
	9	0,057142857	800	82,890

Tableau 3.15 : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des étalons d'antioxydants

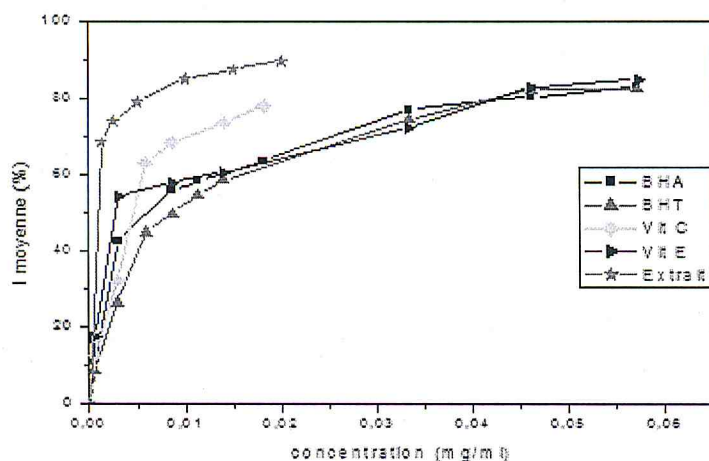


Figure 3.25: Variation du taux de piégeage du DPPH par la vitamine C, vitamine E, BHT, BHA en fonction des différentes concentrations

➤ **La détermination de la valeur EC50**

La EC50 a été apparemment introduit par Brand-williams et ses collaborateurs et elle a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs pour représenter leurs résultats. Elle définit la concentration efficace de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre « DPPH » [104].

Les EC50 de l'extrait des clous de girofle et les antioxydants standards sont déterminées graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée représente l'activité antioxydante en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau 3.16.

Composés	EC50 ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
Extrait des clous de girofle	0,946
Vitamine C	4,6
Vitamine E	2,8
BHA	6
BHT	8,6

Tableau 3.16 : Valeurs EC50 de l'extrait des clous de girofle et les standards antioxydants

➤ Comparaison entre les EC50

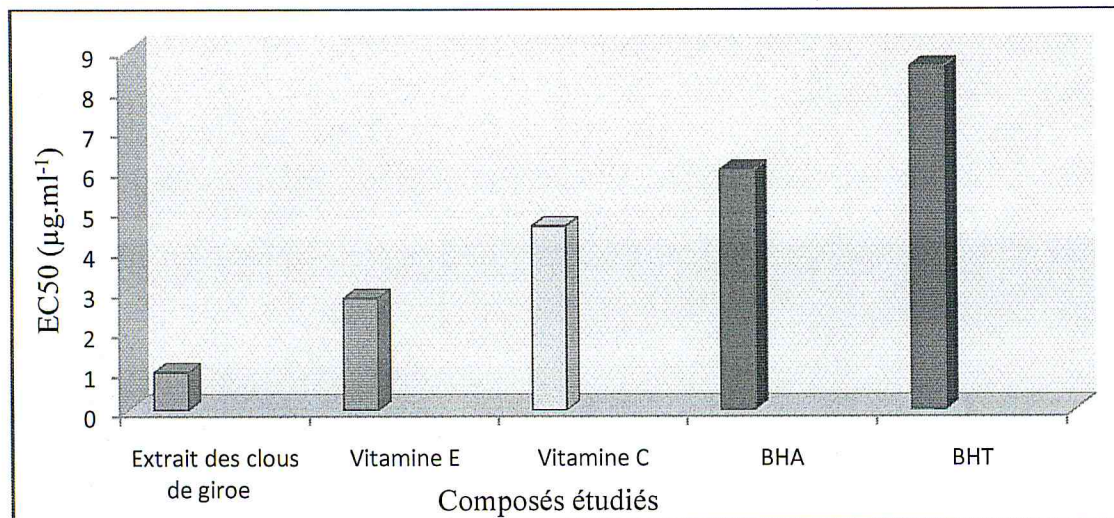


Figure 3.26 : Comparaison des valeurs EC50 de notre extrait et les antioxydants standards

Comme c'est illustré par l'histogramme de la figure 3.26, l'extrait des clous de girofle possède des capacités de piégeage du radical libre DPPH puissantes, puisqu'il agit à faible dose. Tous les EC50 sont très basses comprises entre 0.946 et 8.6 µg.ml⁻¹. Suivant ce paramètre, les capacités de balayage du radical libre sont classées dans l'ordre suivant :

Extrait des clous de girofle > Vitamine E > Vitamine C > BHA > BHT.

Nos observations sur l'activité de piégeage des radicaux libres par l'extrait des clous de girofle viennent renforcer celles observées par Ilhami Gülçin [72, 90].

Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radical libre et la puissance de l'extrait des clous de girofle, nous avons réalisé un suivi réactionnel par mesure de l'abaissement de l'absorbance de la concentration EC50. La figure 3.27 montre l'évolution de l'activité antioxydante de l'extrait en fonction du temps.

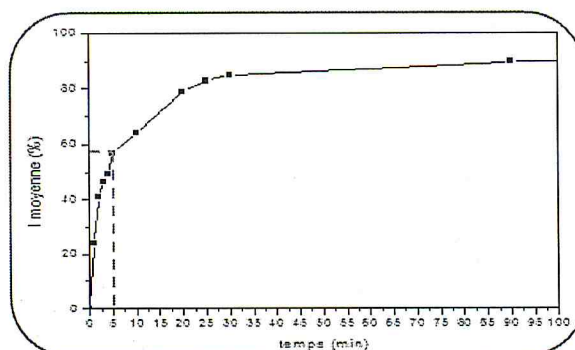


Figure 3.27 : Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de clous de girofle en fonction du temps

L'étude cinétique de piégeage des radicaux libres montre qu'après seulement 5 min de la réaction, on atteint plus de 50% d'activité.

En fonction des résultats obtenus, nous pouvons dire que l'extrait des clous de girofle possède le potentiel antioxydant le plus fort, qui est dû principalement à son composé majoritaire l'eugénol (résultats obtenus par CG-SM et IRTF) avec un taux acceptable et probablement encore à la présence de la vitamine E qui est un antioxydant important [107-111].

Conclusion générale

Conclusion générale

Notre étude a porté sur deux parties expérimentales distinctes :

- Etude chimique de l'extrait brut des clous de girofle par CG-SM et dosage de son composé majoritaire (eugénol) par spectrométrie IRTF ;
- Etude des propriétés microbiologiques et antioxydantes de l'extrait lipidique des clous de girofle.

Nous avons préparé un extrait lipidique à partir des clous de girofle secs sans traitement préalable par solvant (dichlorométhane), le rendement obtenu est de 18,40%.

L'extrait brut obtenu est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) et la chromatographie sur couche mince (CCM).

L'analyse par CG-SM a permis de relever les constatations suivantes :

- La composition chimique révèle qu'il s'agit d'un chémotype riche en phénol, dominé par eugénol (58,06%), acétyleugénol (6,07%).
- On relève également la présence de sesquiterpènes (9,89%), acide gras (5,03%), la vitamine E (6,64%) et d'autres composés.

L'analyse par la chromatographie sur couche mince de gel de silice (CCM) avec un mélange binaire AcOEt /cyclohexane : 1/5 (V/V) a montré sous UV, l'apparition des taches importantes correspondantes à l'eugénol identifié à l'aide d'un témoin. L'eugénol est caractérisé, dans ces conditions, par un facteur de rétention $R_f = 0,51$. Cette analyse a permis de confirmer l'abondance de l'extrait en eugénol.

Notre apport dans cette étude concerne l'utilisation de la spectrométrie IRTF pour développer une méthode analytique pour le dosage de l'eugénol dans l'extrait des clous de girofle. Il ya lieu de noter que cette technique présente un degré de sélectivité et de spécificité élevé dans la résolution des problèmes d'interférences en utilisant la zone « des empreintes digitales » comprise entre 1500 cm^{-1} et 400 cm^{-1} .

La méthode ainsi proposée a été mis en œuvre après purification et préconcentration de l'extrait par extraction liquide-liquide.

La quantification de l'eugénol a été réalisée en mesurant les valeurs d'absorbance de l'eugénol aux bandes spécifiques à 1122 cm^{-1} et 1148 cm^{-1} corrigées avec les lignes de base appropriées. Les taux de l'eugénol ainsi obtenu est de 35,5%.

Au regard de cela, la nouvelle méthode développée est simple, rapide et peu coûteuse.

Les tests d'activités effectués sur l'extrait des clous de girofle montrent que ce dernier possède un pouvoir antimicrobien très fort vis-à-vis des souches bactériennes à gram⁺ et à gram⁻ ainsi que les souches fongiques. Ce résultat montre clairement que l'extrait lipidique des clous de girofle est doté d'un large spectre d'activité inhibitrice sur les microorganismes testés.

Cependant, l'étude comparative entre les deux protocoles d'aromatogramme adoptés pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait des clous de girofle, ne montre aucune similitude de résultats.

A la suite de ça, l'étude comparative du pouvoir antimicrobien de l'extrait et de l'huile essentielle des clous de girofle [84] menée montre que cette dernière est la plus puissante.

L'étude du pouvoir antioxydant a confirmé les propriétés puissantes que possède l'extrait des clous de girofle à piéger les radicaux libres.

Suivant les résultats qu'on a obtenu expérimentalement, nous pouvons prédire que l'huile essentielle des clous de girofle est plutôt antimicrobienne alors que l'extrait est un agent antioxydant de première classe.

L'ensemble des résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche, des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Les perspectives de ce travail sont :

- Validation de la méthode développée par une autre méthode de quantification telle que la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).
- Le couplage de la spectrométrie IRTF et l'extraction en phase solide (EPS) pour le dosage de l'eugénol dans les clous de girofle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Richard H., « Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. In Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires », Ialine Agorial – Normandie St-LÖ (1974).
2. Larousse, « Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins », (2001), p. 28-31.
3. Verdrager, J., « Ces médicaments qui nous viennent des plantes », Ed. Maloine S.A., (1978), p. 12-15.
4. Schauenberg P., « Les guide du naturaliste, guide des plantes médicinales » ; 3^{ème} édition révisée et augmentée, (1977).
5. Kalyana Sundram., « Analytical, Nutritional and Clinical Methods compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses », Food Chemistry (2006).
6. British Pharmacopoeia, Volumes I et II, (1993).
7. Walsh S.E., Maillard J.Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L. and Bartolo R.G., « Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and gram-negative bacteria », J. Appl. Microbiol. 94, (2003), p.240–427.
8. Dorman H. J. D. and Deans S. G., « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils ». J. Appl. Microbiol. 88, (2000), p. 308–316.
9. Fouché J. G., Marquet A. et Hambuckers A., « Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament », Observatoire Du Monde Des Plantes, Sart-Tilman, (2000).
10. Belaïche P., « Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 l'aromatogramme ». Editeur : Maloine S.A, Paris, (1979), p 204.
11. Padrini F., Lucheroni M.T., « Le grand livre des huiles essentielles – guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromassage énergétiques avec plus de 100 photographies ». Edition de Vecchi, Paris, (1996), p. 11, 15, 61, et 111.
12. Bajpai V. K., Rahman A. et Kang S. C., « Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria », International Journal of Food

Microbiology, 125, (2008), p.117–122.

13. Burt S. A., « Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review », *International Journal of Food Microbiology*, 94, (2004), p. 223–253.
14. Van de Braak S. A. A. J. et Leijten G. C. J. J., « Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union », CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, (1999), p. 116.
15. Chami F., « Evaluation in vitro de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires in vivo Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés », Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences, 19(5), (Février 2005), p. 405-408.
16. Benchaar C., Hristov A.N. et Greathead H., « Essential oils as feed additives in ruminant nutrition », In: Steiner, T. (Ed.), *Phytogenics in Animal Nutrition, Natural Concepts to Optimize Gut Health and performance*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, (2009), p. 111- 146.
17. Masotti V., Juteau F., Bessièrre J.M. and Viano J., « Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities », *J. Agric., Food Chemistry*, 51, (2003), p. 7115–7121.
18. Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S. et Cabras P., « Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers », *J. Agric., Food Chemistry* 54, (2006), p. 4364–4370.
19. Max Wichtl et Robert Anton, « *Plantes thérapeutiques - tradition, pratique officinale* », science et thérapeutique 2^{ème} édition, Edition : Tec et Doc, 2-7430-0631-5, (2003).
20. Bruneton J., « *Pharmacognosie* », phyto-chimie, plantes médicinales (1997).
21. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M., « Biological effects of essential oils » – A review, *Food and Chemical Toxicology*, (46), (2008), p. 446–475.
22. Teuscher E., Anton R. et Lobstein A., « *Plantes aromatiques épicées, aromates* », condiments et huiles essentielles, Edition Tec and Doc, Lavoisier : (6), (2005), p. 266-272.
23. Kozam G., « The effect of eugenol on nerve transmission », *Oral Surg Oral Med Oral*

Pathol (44), (1977), p. 799-805.

24. Ohkubo T. et Shibata M., « The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol », *J Dent Res* (76), (1997), p. 848-851.
25. Garibaldi JA., Greenlaw J. et Choi J., « Fotovatjah M., Treatment of postoperative pain », *CDA Journal* (23), (1995), p. 71-72.
26. Guénette SA., Beaudry F., Marier JF. et Vachon P., « Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats », *J Vet Pharmacol Ther* (29), (2006), p. 265-270.
27. Hikasa Y., Takase K., Ogasawara T. et Ogasawara S., « Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp », *Cyprinus carpio, Jpn J Vet Sci* (48), (1986), p. 341-351.
28. Munday PL. et Wilson SK., « Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis* », a coral reef fish, *J Fish Biol* (51), (1997), p. 931-938.
29. Endo T., Ogishima K., Tanaka H. et Ohshima S., « Studies on the anesthetic effects of eugenol in some fresh water fishes ». *Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries* (in Japanese with abstract in English), (38), (1972), p. 761-767.
30. Sladky KK., Swanson CR., Stoskopf MK., Loomis MR. et Lewbart GA., « Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*) », *Am J Vet Res* (62), (2001), p. 337-342.
31. Guénette SA., Uhlend FC., Hélie P., Beaudry F. et Vachon P., « Pharmacokinetics of Eugenol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». *Aquaculture* (266), (2007), p. 262-265.
32. Guénette SA., Hélie P., Beaudry F. and Vachon P., « Eugénol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) », *Vet Anaesth Analg* (34), (2007), p.164-170.
33. Lafortune M., Mitchell MA. et Smith JA., « Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs », *Rana pipiens, J Herpetol Med Surg* (11), (2001), p. 13-18.
34. Sell AB. et Carlini EA., « Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives », *Pharmacology* (14), (1996), p. 367-377.

35. Lebeau P. et Courtois G., « Traité de pharmacie chimique – Tome II », Masson et Cie, (1929).
36. Reddy AC. et Lokesh BR., « Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats », *Ann Nutr Metab* (38), (1994), p. 349–358.
37. Laekeman SM., Hoof VL., Haemers A., Berghe VAD., Herman AG. et Vlietink AK., « Eugenol, a valuable compound for in-vitro experimental research and worthwhile for further in-vivo investigation ». *Phytother Res* (4), (1990), p. 90-96.
38. Wie MB., Won MH., Lee KH., Shin JH., Lee JC., Suh HW., Song DK., Kim YH., « Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures », *Neurosci Lett*, (225), (1997), p. 93-96.
39. Newmark HL., « Plant phenolics as potential cancer prevention agents ». *Adv Exp Med Biol* (401), (1996), p. 25-34.
40. Nishijima H., Uchida R., Kawakami N., Shimamura K. et Kitamura K., « Role of endothelium and adventitia on eugenol induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine », *J Smooth Muscle Res* (34), (1998), p. 123-137.
41. Jadhav BK., Khandelwal KR., Ketkar AR. et Pisal SS., « Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Disease ». *Drug Dev Ind Pharm* (30), (2004), p. 195-203.
42. Chen F., Shi Z., Neoh KG. et Kang ET., « Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles ». *Biotechnol Bioeng* (104), (2009), p. 30-39.
43. He M., Du M., Fan M. et Bian Z., In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms, *Mycopathologia* (163), (2007), p. 137-143.
44. Chami N., Chami F., Bennis S., Trouillas J. et Remmal A., « Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats », *Braz J Infect Dis* (8), (2004), p. 217-226.
45. Bruneton J., « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales », Techniques et Documentations, Lavoisier, (1999).
46. Burdock GA (Ed), « Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients ». Volume I, 3^{ème} Edition CRC Press (1995).

47. Leung Albert Y., « Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics », Wiley-Interscience Publication, New York, (1980).
48. Richard H. et Loo A., « Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts », In Richard H (coordonnateur) Epice et Aromates, Tec et Doc – Lavoisier, apria, (1992).
49. Guyot L. et Gibassier P., « Les noms des arbres. Que Sais – Je ? » Presses Universitaires de France, (1966).
50. Baba-Aissa F., « Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident », EDAS Algérie (2000).
51. Dorman HJD., Figueiredo AC., Barroso JG and Deans SG., « In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components », Flavour and Fragrance Journal (15), (2000), p. 12-16.
52. Kurokawa M. et coll., J. Pharmacol. Exp. Ther, (284), (1998), p. 728-735.
53. Kurokawa M., antiviral Res. (27), (1995), p. 19-37.
54. Yu L. et Robyt J.F., Carbohydr. Lett, (3), (1998), p.9-16.
55. Cai L. et Wu C.D., Nat J. Prod. (59), (1996), p. 987-990.
56. Son K.H. et coll., Nat. Prod. Sci. (4), (1998), p. 263- 267.
57. Thorsell W. et coll., Phytomedicine 5, (1998), p. 311-323.
58. Pourgholami M.H. et coll., J. Ethnopharmacol. 64, (1999), p. 167-171.
59. Deininger R., Phytother Z., 12, (1991), p. 205-212.
60. Cowan MM., Plant products as antimicrobial agents, Clinical Microbiology Reviews, 12, (1999), p. 564-582.
61. Friedman M., Henika PR. and Mendrell RE., « Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* », Journal of Food Protection 65 (10), (2002), p. 1545-1560.
62. Hammer KA., Carson CF. and Riley TV., « Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts », Journal of Applied Microbiology 86, (1999), p. 985-990.

63. Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L., « Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens », *Letters in Applied Microbiology* 26, (1998), p. 118-122.
64. Violon C., Leger D. et Chaumont JP., « Activités antagonistes, in vitro, de certains composés volatils naturels vis-à-vis de germes de la flore vaginale », *Plantes Médicinales et Phytothérapie* 26, (1993), p. 17-22.
65. Gill AO. and Holley RA., « Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytigenes* and of Eugenol against *L. monocytigenes* and *Lactobacillus Sakei* », *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10), (2004), p. 5750-55.
66. Robbitt J.M., Schwarting A., Gritter R.j., « Introduction à la chromatographie », édition gauthier-villars, Paris, (1972).
67. Burgot G. et Burgot J.L., « Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales », édition Tec & Doc, Paris, France, (2002).
68. Aliche Z., « Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques et fractions volatiles de l'algue brune *Cystoseira Sedoides* », mémoire de magister, USTSD (Juin 2008).
69. Creswel C.J., Runquist O.A. and Campbell M.M., « Spectral analysis of organic compounds », Burgess Publishing Company, 2^{ème} édition, (1972).
70. Rouessac F. et Rouessac A., « Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes », Masson 3^{ème} édition, Paris, Milan, Barcelone, (1997).
71. Wathey B., Tierney J., lidstrom P. and westman J., « The impact of microwaveassisted organic chemistry on drug discovery », *Drug Discovery Today* 7, (2002), pp. 373-380.
72. Gülçin I., Elmastas M. et Aboul-EneinH Y., « Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source », original article, *Arabian Journal of Chemistry* (2010) xxx, xxx-xxx.
73. Kwang-Geun L. et Takayuki S., « Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry] », *Food Chemistry* 74, (2001), pp. 443-448.
74. Machado M., Dinis A.M., Salgueiro L., Custódio José B.A., Cavaleiro C. et Sousa M.C., « Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure », *Experimental Parasitology* 127, (2011), p.732-739.

75. Silverstein R.M., Basler G.C., Morill T.C., « Identification spectrométrique de composés organiques », édition de Boeck & Larcier, (1998).
76. Browing D.R., « Méthodes spectroscopiques », édition Masson et Cie, Paris, France, (1974).
77. Bertrand D., « La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale », INRA Prod. Anim., 15(3), (2002), p. 209-219.
78. Scheuer P.J., « Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential », Science 248, (1990), p. 173-177.
79. Amico V., « Marine algae of family Cystoseiraceae: chemistry and chemotaxonomy », Phytochemistry, 39 (6), (1995), p. 1257-1279.
80. Leclerc H., Gaillard J-L. et Simonet M., « Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien ». Doin éditeurs, Paris (1995).
81. Luu C., « Les essences majeures anti-infectieuses, l'aromatogramme ». *Votre diététique* N° 53, (2002).
82. Benzeggouta N., « Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments », thèse de magister en Pharmacochimie, Université Mentouri de Constantine, (2005), p.118-126.
83. Prabuseenivasan P., J., Savariumuthu I., « In vitro antibacterial activity of some plant essential oils », BMC Complementary and Alternative Medicine, 6: 39, (2006).
84. Meliani A., Rahmouni Z., « Extraction et caractérisation de l'huile essentielle des clous de girofle (*Eugenia caryophyllata*): activité antimicrobienne, effet anesthésique et toxicité », mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie, (2010).
85. Iqbal A., Farrukh A., et Mohammad O., « Modern phytomedecine, Turning Medicinal Plants into drugs », édition Wiley VCH, (2006), p. 360.
86. Giani F., Santoro., Maria G. Cardoso., Luiz Gustavo L. Guimarães., Lidiany Z. Mendonça., Maurilio J. Soares., « Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on *epimastigotes* and *trypomastigotes* », Experimental Parasitology 116, (2007), p. 283–290.
87. Marfak A., « Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de dépsides ». Thèse de doctorat de l'université

de limoges, (2003).

88. Boutabet K., « Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine ». Thèse de Magistère de l'université de Jijel, (2007).
89. Baohua Kong., Huiyun Zhang. et Youling L. Xiong., « Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action », *Meat Science* 85, (2010), p.772–778.
90. Gülçin I., Güngör Şat I., Sükrü Beydemir., Elmastas M. et Irfan Küfrevioğlu Ö., « Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata Thunb*) buds and lavender (*Lavandula stoechas L.*) », *Food Chemistry* 87, (2004), p. 393–400.
91. Bouzidi N., « Contribution à l'étude chimique d'algues marines méditerranéennes : analyse quantitative des stérols de l'extrait lipidique par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier », thèse de doctorat, USTSD, (2009).
92. Colthup N. B., Wiberly, S.E., « Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy », Ed. Academic Press (3rd edition), (1990).
93. Robert A., Miller, Bussell Norman E. et Charles k., « Ricketts and howard Jordi, Analysis and Purification of Eugenol », *J Dent Res* 1979 58, (1979), p. 1394.
94. Dhoot G., Auras R., Rubino M., Dolan K. et Soto-Valdez H., « Determination of eugenol diffusion through LLDPE using FTIR-ATR flow cell and HPLC techniques », *Polymer* 50, (2009), p. 1470–1482.
95. Carson C.F. and Riley T.V., « Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* ». *J.Bacteriol.* 78, (1995), p. 264 -269.
96. Suhr K.I., and Nielsen P.V., « Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi ». *J. Appl. Microbiol.* 94, (2003), p. 665-674.
97. Denis F., Poly MC., Martin C., Bingen E. et Quentin R., « Bactériologie médicale, Techniques usuelles », édition Masson, p.546.
98. Nauciel, C., « Bactériologie médicinales », édition Masson, 75. (2000), p.5-11, 17, 21, 35, 45, 55, 65.
99. Shirling E.B., Gottlieb D., « Methods for characterisation of *Streptomyces* species », *International journal of systematic bacteriology*, 16, (1966), p.313-340.
100. Chifundra K., Bury W.M., et Kizungub, « Screening photochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycamorus L.* », short communication phytothérapie, (1990), p.

535, 539.

101. Loo A.Y., Jain K. et Darah I., « Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata* ». *Food chemistry*, 107, (2008), p.1151-1160.
102. Molyneux P., « The use of the stable free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity », *Songklanakarin J. Sci. Technol* 26 (2), (2004), p. 211-219.
103. Leitão G. G., Leitão S. G. et Vilegak W, « Quik preparative separation of naturel Naphtopyranones with Antioxidant Activity by High-speed Counter-Current Chromatography.Z. », *Naturforsch*, 57c, (2002), p. 1051-1055.
104. Wang S-Y., Wu J-H., Shyur L-F., Kuo Y-H. et Chang S-T., « Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides Hayata* ». *Holzforschung* 56 (5), (2002).
105. Sarni- Manchado P. et Cheynier V., « Les polyphénols en agroalimentaire », édition Tec and Doc, Lavoisier, (2006), p. 56, 57, 60-62, 270.
106. Knowles J.R., Roller S., Murray D.B., et Naidu A.S., « Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual, spices biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*, *Serovar typhimurium* ». *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, (2005), p.797-803.
107. Maydani M., « Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly ». *Am J Clin Nutr* 71(suppl), 1665S-1668S, (2000).
108. Maydani M., « Vitamin E and prevention of heart disease in high- risk patients ». *Nutr Rev* .58, (2000), p. 278-281.
109. Pieroni A., Jania KV, Dürr C.M., Lüdeke S, Trachsel E. et Heinrich M.« In vitro Antioxydant Activity of Non-cultivated Vegetables of Ethnic Albanians in southern Italy. *Phytother. Res.*16, (2002), p.467-473.
110. Vansant G, Radicaux libres et antioxydants: principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone, (2004).
111. Burton G. W, Traber M.G., Acuff R.V., et al., Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in reponse to supplementation with denterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr*. 67, (1998), p.669-684.

ANNEXE 1

Classe	Structure
Phénols simples, benzoquinones	C_6
Acide Hydroxybenzoïque	C_6-C_1
Acéthophénones, acide phénylacétique	C_6-C_2
Acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones, chromènes)	C_6-C_3
Napthoquinones	C_6-C_4
Xanthonnes	$C_6-C_1-C_6$
Stilbènes, anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoïdes, isoflavonoïdes	$C_6-C_3-C_6$
Lignans, neolignans	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoids	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lignins	$(C_6-C_3)_n$
Tanins Condensés (proanthocyanidines ou flavolans)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Tableau 1 : Classes des phénols

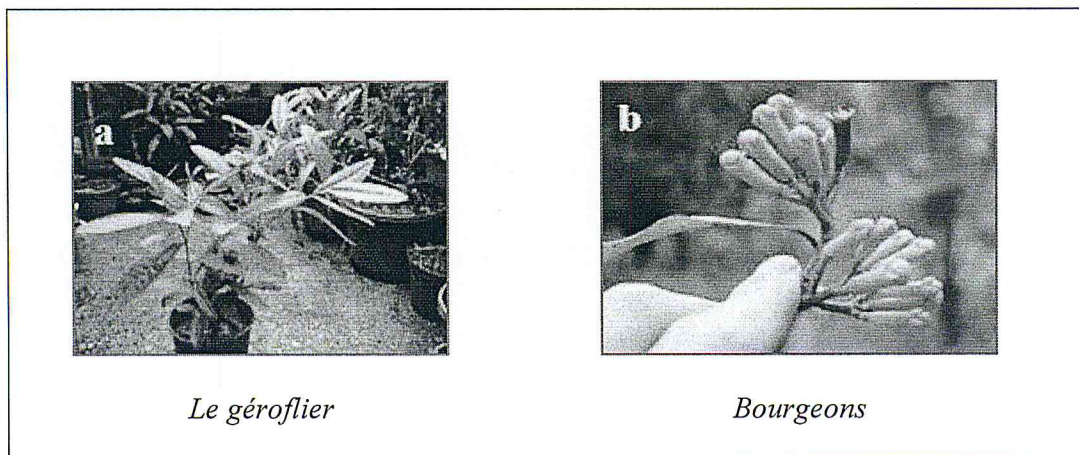


Figure 1 : l'arbre (a) et les bourgeons (b) de clou de girofle

ANNEXE 2

❖ Les micro- organismes testés

➤ Cocci Gram positif

• *Staphylococcus aureus*

Le germe *Staphylococcus* appartient à la famille des Micrococcaceae qui regroupent les espèces bactériennes qui constituent des cellules arrondies (Cocci) à Gram positif, immobiles, disposées, en amas, à la façon d'une grappe de raisin. Leur système respiratoire est de type anaérobie facultatif.

Staphylococcus aureus: est un germe ubiquitaire qui retrouve dans le sol, l'air et l'eau, c'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme, on le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles et au niveau du périnée ou des aisselles.

✓ Caractéristiques

Cocci à gram positif, immobile, coagulase +, pigment +, ADS ase +, nitrate réductase +, phosphate +, D- mannitol +, Hémolysine+, protéine A+, résistance novobiocine.

✓ Pouvoir pathogène

Les manifestations pathologiques dues à *Staphylococcus aureus* sont très nombreuses. Elles sont suppuratives, nécrotiques ou entériques.

✓ Les suppurations localisées

On peut distinguer :

- Les infections cutanées : furoncle, abcès, panaris, anthrax, impétigo, staphylococcie maligne de la face, syndrome de la peau ébouillante ;
- Les infections ORL divers : sinusites, otites, mastoïdites ;
- Les infections des séreuses : arthrite, pleurésie, péritonite ;
- Les infections osseuses : ostéomyélite infections sur prothèse ;
- Les infections viscérales : abcès du poumon, abcès du cerveau, phlegmon péri néphrétique.

✓ **Les septicémies et les endocardites**

Elles peuvent être secondaires à n'importe quel foyer infecté, mais la fréquence des infections sur cathéter est soulignée l'incidence des endocardites à *S. aureus* s'est accrue avec les prothèses valvulaires intracardiaques. Les septicémies sont caractérisées par la fréquence des métastases par embolies septiques. Malgré l'antibiothérapie, la mortalité reste élevée.

✓ **Les manifestations digestives**

Les toxi-infections alimentaires surviennent à six heures après l'ingestion d'un aliment contaminé contenant l'entérotoxine staphylococcique thermostable. Elles sont caractérisées par des vomissements chez un malade sans fièvre.

Les entérocolites staphylococciques consécutives à un traitement antibiotique (tétracyclines) sont exceptionnelles aujourd'hui. La flore fécale y est remplacée par *S. aureus*.

✓ **Le syndrome de choc toxique**

Ce syndrome associe une fièvre avec éruption scarlatiniforme, une hypotension et des atteintes cérébrales rénales, hépatiques et musculaires, Les hémocultures et le liquide céphalo-rachidien sont stériles. La symptomatologie est due à la toxine du staphylocoque.

➤ **Bacille Gram positif**

• ***Bacillus subtilis***

Le genre *Bacillus* appartient à la famille bacillaceae comprend des bactéries sporulées, mobiles ou immobiles, gram positif, aérobies strictes ou facultatives catalase +.

Bacillus subtilis : est une bactérie qui forme des spores capables de survie dans des Conditions extrêmes, révélant une adaptation très ancienne, que l'on trouve habituellement dans le sol.

✓ **Pouvoir pathogène**

Bacillus subtilis : n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire.

❖ **Bacille Gram négatif**

➤ ***Escherichia coli* (colibacille)**

Bacille à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. *E. coli* se développe sur gélose ordinaire. Indole +, urée-, fermente le lactose, gazogène, mais ne produit pas d'acétoïne.

✓ **Habitat** : *E. coli* est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux. Chez l'homme, il est présent à raison de 10 à 100 bactéries par gramme de selles, densité cependant très inférieure à celle des anaérobies qui constituent la flore dominante. La présence d'*E. coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale.

✓ **Pouvoir pathogène**

Infections extra- intestinales : *E. Coli* est responsable d'infections diverses.

Infections urinaires : la majorité des infections urinaires est due à *E. coli*. L'anatomie du bas appareil urinaire féminin permet facilement aux souches d'*E.coli* de la flore fécale d'atteindre la vessie par voie ascendante. De plus, certaines souches d'*E. Coli* sont dotées à leur surface de structure, les adhésines, qui leur permettent d'adhérer spécifiquement aux épithéliums de l'appareil urinaire.

Infection abdominales : ce sont des cholécystites, péritonites ou salpingites.

Infection méningées : les méningées néonatales, sont souvent graves.

Les bactériémies consécutives à une infection localisée peuvent causer un choc septique gravissime du à l'action du lipopolysaccharidue (LPS) ou endotoxine.

Infections intestinales : Les diarrhées infectieuses à *E. coli* peuvent être différentes fonction de la virulence codée par les gènes hébergés par ces souches.

➤ ***Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique)**

Bacille à Gram négatif, aérobie strict, oxydase positive, mobile par flagelle polaire, température optimale de croissance 30°C.

L'une des caractéristiques de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est la production d'un pigment bleu ou pyocyanine, les souches typiques produisent aussi un pigment vert fluorescent.

L'aspect des colonies est particulier. Elles sont rugueuses avec un reflet métallique.

✓ **Habitat**

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie répandue dans la nature. Elle vit dans l'eau et sur le sol on le trouve aussi dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides : siphons de lavabos, savons liquides, humidificateurs, solutions d'antiseptiques.

Pseudomonas aeruginosa fait partie de la flore de transit de l'homme. On le trouve dans le tube digestif et plus rarement dans la salive.

✓ **Epidémiologie**

En raison de sa résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, *Pseudomonas aeruginosa* est souvent responsable d'infections nosocomiales ces infections peuvent par nombre, revêtir une allure épidémique.

✓ **Pouvoir pathogène**

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste, les infections concernent surtout les malades recevant un traitement immunosuppresseur ou ayant une maladie grave sous-jacente, hémopathie ou cancer. Les brûlés sont particulièrement sensibles à ces infections. Chez ces sujets, les bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa* ont un taux de mortalité très élevée.

Les plaies opératoires, les voies urinaires et les voies respiratoires sont des portes d'entrée fréquente.

❖ **La levure**

➤ ***Candida albicans*** : est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Au laboratoire médical, la culture en boîte de pétrie des *Candida* donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème.

✓ **Habitat**

Candida albicans est un organisme vivant à l'état normal dans la bouche, vagin et le tube digestif de l'être humain, on le retrouve chez 80% de la population.

✓ **Pouvoir pathogène :**

Candidoses : *Candida albicans* est responsable d'infections fongiques superficielles aussi bien que systémiques. Ces dernières ne surviennent que chez des individus immunodéprimés, il fait partie de la flore normale de l'intestin. Les infections superficielles comprennent le muguet, des vulvo-vaginites.

Mycoses Systémiques : La plupart de ces infections résultent de l'inhalation de spores, bien que *Candida albicans* provienne plutôt du tube digestif ou de dispositifs intra vasculaires.

ANNEXE 3

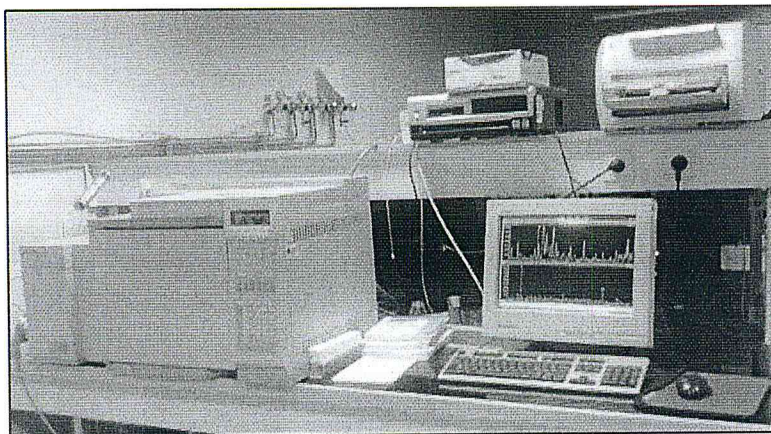


Figure 1 : Chromatographe en phase gazeux couplé à un spectromètre de masse

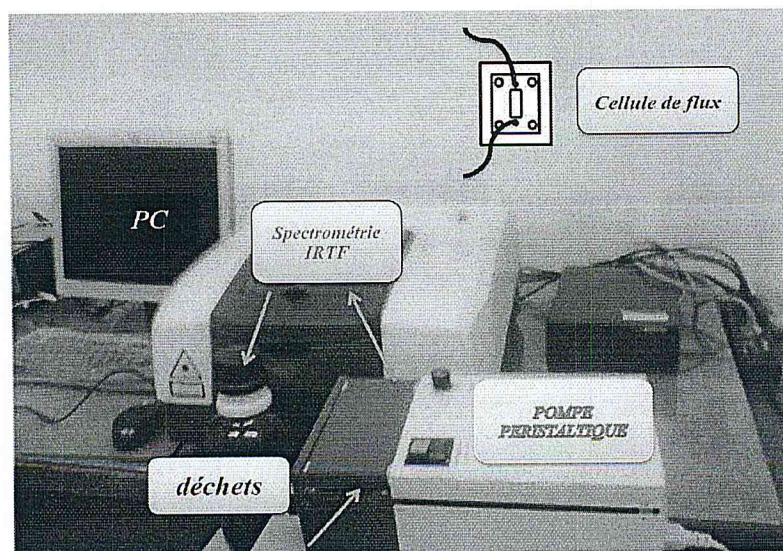


Figure 2 : Montage de flux utilisé dans la détermination de l'eugénol par spectromètre IRTF de marque Jasco



Figure 3 : extrait lipidique des clous de girofle

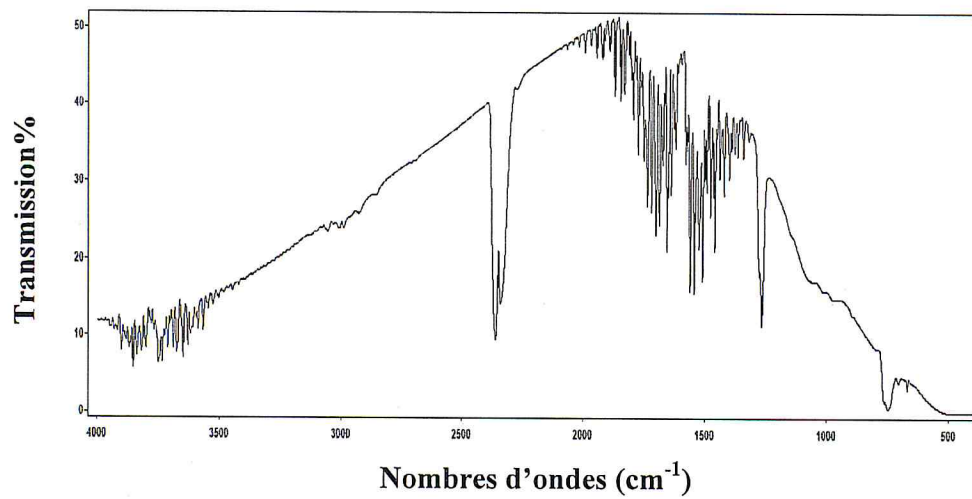


Figure 4 : Background de la cellule vide

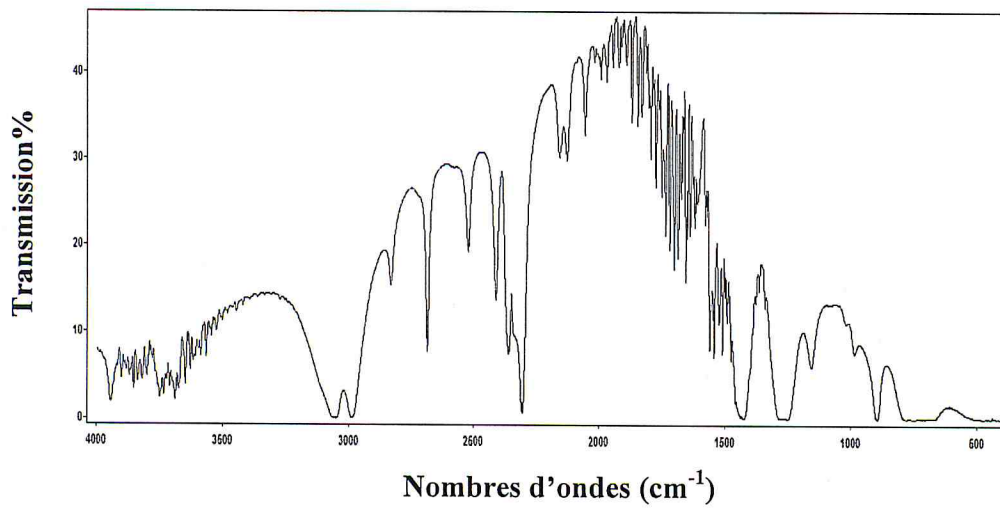


Figure 5 : Background de la cellule remplie avec le solvant



Figure 6 : Cuves en quartz de 2ml