

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

-----  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES

-----  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



## MEMOIRE

Présenté pour obtenir le Grade de

## MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par

**LOUNI Mohamed**

Thème

**EXTRACTION, CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET  
MICROBIOLOGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE CLOU DE  
GIROFLE.**

Soutenu le 17 septembre 2013, devant le jury composé de :

Mme	KICHOU Noura	MCB - UMMTO	Présidente
Mr	BENCHOULAK Mounir	MAA - UMMTO	Rapporteur
Mr	BELAÏSSA Yahia	MAB - UMMTO	Examineur
Melle	TOUZOUIRT Saïda	MAB - UMMTO	Examinatrice

« Méfie- toi de celui qui n'a aucune faiblesse pour femme et parfums »  
**Mahomet, prophète (570-632)**

A tout mes chers, A qui je dois ce que je suis, Qu'ils trouvent dans ce projet, le fruit de  
meilleur de leurs même, et l'expression de mon amour et de ma gratitude pour  
la bienveillance avec laquelle ils m'ont toujours entouré.  
Que Dieu vous préserve longue vie et bonne santé.

« Louni Mohamed.»

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail :

Je remercie le bon dieu le tout-puissant pour l'achèvement de ce mémoire

" فله الحمد و الشكر "

Mes sincères remerciements aux membres de jury :

Mme KICHOU

Mr BELAISSA

Melle TOUZOURT

Et surtout à mon encadreur Mr. Benchoulak ,

Qui a fourni le meilleur de lui même pour l'élaboration de ce modeste travail.

Ainsi qu'à tout mes amis et les personnes ayant participé de près ou de loin.

Et ; je reste très reconnaissant envers tout les responsables et employés de l'Hôpital Universitaire de Tizi-Ouzou et les responsables des laboratoires Chimie Pharmaceutique, Microbiologique de l'Université de Tizi-Ouzou pour leur collaboration et leur hospitalité.

Enfin, j'adresse ma haute reconnaissance à ma famille pour leur soutien.

Encore une fois, merci à tous ! Que Dieu vous bénisse !

« Louni Mohamed »

## Liste des Abréviations

H.E : Huile essentielle

H.Es : huiles essentielles

°C : Degré Celsius

$d_D^{20}$  : Densité relative à 20°C

$n_D^{20}$  : Indice de réfraction à 20°C

Fig. : Figure

g : Gramme

IA : Indice d'acide

IS : Indice de saponification.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

Kg : Kilogramme

N° : Numéro

% : Pourcentage

$R_f$  : Référence frontale

UV : Ultraviolet

IR : Infra Rouge

$\mu\text{l}$  : Microlitre

$\mu\text{m}$  : Micromètre

V : Volume en ml ou  $\text{cm}^3$

V/V : Volume à volume

AFNOR : Association Française de Normalisation

NFT : Norme Française Technique

UMMTO : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

mm : Millimètre.

atm : Atmosphère

ppm : Partie par million

## Liste des Tableaux

Tableau 1 - Liste des souches microbiennes utilisées.....	29
Tableau 2 - La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des H.Es.....	35
Tableau 3 - Résultats d'extraction.....	37
Tableau 4 - Caractéristiques organoleptiques d'huile essentielle de clou de girofle.....	38
Tableau 5 - Caractéristiques physiques d'huile essentielle de clou de girofle.....	38
Tableau 6 - Indices chimiques d'huile essentielle de clou de girofle.....	39
Tableau 7 - Indices de saponification d'huiles végétales.....	40
Tableau 8 - Les résultats obtenus confirment la nature « acide » de cette huile.....	40
Tableau 9 - Données analytiques sur l'huile de clou de girofle.....	41
Tableau 10 - Les résultats des Rf.....	41
Tableau 11 - Halos d'inhibition (mm) provoqués par l'H.E. des Clous de girofle.....	44

## Liste des figures

Figure 1 : Structures de quelques dérivées du phénylpropane.....	5
Figure 2 : L'isoprène, un diène.....	6
Figure 3 : Quelques composés terpéniques.....	6
Figure 4 : Quelques composés d'origines diverses.....	7
Figure 5 : Schéma d'un montage.....	13
Figure 6 : Schéma d'un appareil de distillation des plantes aromatiques à générateur de vapeur séparé de l'alambic (vapo-distillation).....	14
Figure 7 : Représentation schématique d'une chaîne d'extraction.....	15
Figure 8 : Schéma d'une extraction assistée par micro-onde sous vide.....	16
Figure 9 : Enfleurage de pétales de rose.....	17
Figure 10 : Schéma des processus de transfert dans l'extraction.....	18
Figure 11 : Le giroflier.....	21
Figure 12 : Les feuilles de giroflier.....	21
Figure 13 : Les clous de girofle avant séchage.....	22
Figure 14 : Les clous de girofle après séchage.....	22
Figure 15 : Quelques composés de l'huile essentielle de clou de girofle.....	23
Figure 16 : Photo de moulin à café.....	25
Figure 17 : Montage d'hydrodistillation.....	25
Figure 18 : évaporateur rotatif de type HEIDOLPH.....	26
Figure 19 : Les souches utilisées.....	29
Figure 20 : La méthode d'aromatogramme.....	35
Figure 21 : Spectre UV/vis du H.E dans L'éthanol à 10 <sup>-4</sup> M.....	42
Figure 22 : Spectre IR du H.E.....	43

---

## ***Résumé***

L'utilisation d'huiles essentielles est aujourd'hui « tendance ». L'aromathérapie ou l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques est en expansion à travers le monde entier. Elle s'affirme comme une thérapeutique complémentaire dans le conseil officinal et elle permet l'harmonisation de la santé physique et mentale. L'H.E. de clou de girofle, qui a fait l'objet de cette étude, présente un important pouvoir antimicrobien sur les souches bactériennes (*S. aureus*, *B. cereus*, *S. paratyphi A.*, *S. flexneri* et *E. coli*).

L'extraction d'huile essentielle en question, accomplie par hydrodistillation juste après un broyage à l'aide d'un moulin à café, a donné un rendement de 11 %.

Les résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle sont en accord avec ceux donnés par la littérature. L'analyse de sa composition chimique et sa pureté par les méthodes spectroscopiques (UV et IR) et chromatographiques (CCM) a permis d'identifier ses constituants majeurs qui sont l'eugénol et l'acétate d'eugényle.

**Mots clés : Clou de girofle, Huile essentielle, activité antibactérienne, extraction.**

## **ABSTRACT**

The use of essential oils is now "trendy». Aromatherapy and the use of essential oils for therapeutic purposes is expanding across the globe. She says as a complementary therapy in the pharmacies board and allows the harmonization of the physical and mental health. The H. E. clove, which is the subject of this study has significant antimicrobial potency of the bacterial strains (*S. aureus*, *B. cereus*, *S. paratyphi A*, *S. flexneri* and *E. coli*).

The extraction of essential oil in question, performed by steam distillation just after grinding with a coffee grinder, gave a yield of 11 %.

The results of physico- chemical analysis of the essential oil are consistent with those given in the literature. Analysis of the chemical composition and purity by spectroscopic methods (UV and IR) and chromatographic (TLC) has identified its major constituents are eugenol and eugenyl acetate.

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

---

**PREMIERE PARTIE : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1-Définitions.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2-Historique .....</b>	<b>4</b>
<b>I.3-Composition Chimique .....</b>	<b>5</b>
<b>I.4-Activités biologiques des huiles essentielles .....</b>	<b>7</b>
<b>I.5-Caractéristiques physico-chimiques.....</b>	<b>8</b>
<b>I.6-Détermination des constituants chimiques .....</b>	<b>10</b>
<b>I.6.1-Chromatographie sur couche mince (CC M) .....</b>	<b>10</b>
<b>I.6.2-Analyse par rayonnement IR (La spectroscopie infrarouge).....</b>	<b>10</b>
<b>I.6.3-Analyse par rayonnement UV (Spectroscopie UV-visible) .....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE II : METHODES D'EXTRACTION .....</b>	<b>12</b>
<b>II.1-Introduction .....</b>	<b>12</b>
<b>II.2-Méthodes d'extraction.....</b>	<b>12</b>
<b>II.2.1-Distillation .....</b>	<b>12</b>
<b>II.2.2-Extraction par fluide supercritique .....</b>	<b>14</b>
<b>II.2.3-L'extraction assistée par micro-onde.....</b>	<b>16</b>
<b>II.2.4-L'enfleurage .....</b>	<b>16</b>
<b>II.2.5- L'extraction par ultrasons ou sonication .....</b>	<b>17</b>
<b>II.3- Présentation générale du phénomène d'extraction .....</b>	<b>17</b>
<b>II.3.2-Le rapport d'entraînement.....</b>	<b>18</b>
<b>CHAPITRE III : GENERALITES SUR LA PLANTE.....</b>	<b>20</b>
<b>III.1- Présentation de la plante .....</b>	<b>20</b>
<b>III.1.1- Données botaniques .....</b>	<b>20</b>
<b>III.1.2-Description et caractéristiques.....</b>	<b>20</b>



III.1.3-But de la culture .....	21
III.1.4-L'huile essentielle de giroflier .....	21
III.2-Le clou de girofle.....	22
III.2.1-Description et historique .....	22
III.2.2-L'huile essentielle de clou de girofle.....	23
III.2.3-Utilisation dans la thérapie .....	23
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES</b>	
I-Matériels de laboratoire utilisés.....	25
I.1.1-Pesée .....	25
I.1.2-Broyage .....	25
I.1.3-Extraction .....	25
I.1.4-Relargage .....	26
I.1.5-Décantation .....	26
I.1.6-Élimination du solvant organique (évaporation) .....	26
I.1.7-Séchage.....	27
I.8- Détermination des paramètres physico-chimiques .....	27
I.8.1- La Densité .....	27
I.8.2- L'indice de réfraction .....	27
I.8.3-Du pH .....	27
I.8.4-L'indice d'acide .....	27
I.8.5-L'indice de saponification .....	27
I.8.6-L'indice de peroxyde.....	27
I.9- Analyse chromatographique et spectroscopique.....	28
I.9.1-Les chromatographies sur couche mince (CCM) .....	28
I.9.2-Analyse par spectroscopie infrarouge (IR) .....	28
I.9.3-Analyse par spectroscopie ultra-violet /vis (UV/Vis) .....	28

I.10-Test microbiologique.....	28
II-METHODES .....	30
II.1-Extraction d’huile essentielle de clou de girofle.....	30
II.2-Détermination des caractéristiques physico-chimiques .....	30
II.2.1-Détermination de la densité relative $d_{20}^{20}$ .....	30
II.2.2-Détermination d’indice de réfraction .....	31
II.2.3-Evaluation de la miscibilité à l’éthanol.....	32
II.2.4-Evaluation d’indice d’acide .....	32
II.2.5-Indice de saponification .....	33
II.2.6-Indice de peroxyde.....	33
II.2.7-Contrôle du pH .....	34
II.3-Test microbiologique .....	34
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION .....	36
I-Extractions d’huile essentielle.....	36
II-Caractérisation de l’huile essentielle de clou de girofle .....	36
II.1-Caractéristiques organoleptiques.....	36
II.2- Caractéristiques physiques .....	38
II. 3- Caractéristiques chimiques.....	39
II.4- Identification des constituants chimiques .....	41
II.4.1-Analyse chromatographique sur couche mince (CCM).....	41
II.4.2- Analyses spectroscopies.....	42
II.4.2. 1-Etude en spectroscopie UV/visible .....	42
II.4.2.2- Analyses par spectroscopie Infra Rouge (IR) .....	43
II.5- Test d’activité antibactérienne .....	44
CONCLUSION GENERALE .....	45
Références bibliographiques .....	46

La nature cache une multitude de merveilles auxquelles, trop souvent, aucune attention n'est portée. En effet, Le monde végétal qui est très vaste offre depuis des milliers d'années les éléments nécessaires à la survie de l'espèce humaine. Elle lui fournit des ressources essentielles à son alimentation, à son hygiène et surtout, sa santé.

Senteurs, effluves, fragrances, essences, parfums autant de mots pour nommer des substances dite aromatiques qui nous sont offertes par ces plantes.

L'importance indiscutable des plantes aromatiques, leur contenu en huile essentielle et la nature chimique de leurs constituants, leur confèrent de grandes perspectives d'application. De nos jours, l'utilisation des huiles essentielles est de plus en plus répandue que ce soit dans les pharmacies, ou dans divers commerces. Il existe à l'heure actuelle un intérêt croissant du public pour les produits à base de plantes et un retour aux médecines naturelles. De plus, les médias relaient ce phénomène. Les articles concernant le bien-être et la santé par les plantes et les huiles essentielles fleurissent.

Du nom grec « *Eugenia caryophyllata* », le bouton floral du giroflier, très grand arbre des îles Moluques, les Antilles et Madagascar [1] est considéré comme l'un des grandes merveilles de la nature ; en effet l'huile essentielle extraite de ces boutons contient 70 à 85 % d'eugénol. Mélangé à de l'oxyde de zinc, l'eugénol forme l'eugénate, ciment dentaire très employé par le chirurgien-dentiste.

Les propriétés principales du clou de girofle sont antiseptiques et analgésiques. Mais cette Huile Essentielle possède également des propriétés anti-infectieuses et antibactériennes, des propriétés antivirales et antifongiques. [2]

Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle, mais peu d'informations relatives à sa composition et ces caractéristiques restent disponibles.

Le présent travail qui comporte deux grandes parties, a pour objectif la mise au point les caractéristiques physico-chimiques ainsi que l'identification de quelques composés majoritaires de cette huile essentielle.

## *INTRODUCTION GENERALE*

---

Dans la première partie, des généralités sur les huiles essentielles, les méthodes d'extractions et le clou de girofle seront développées, afin de mettre en lumière les différentes caractéristiques et propriétés des huiles essentielles et leurs usages.

La seconde partie concerne l'étude de l'huile essentielle de clou de girofle, qui comporte :

- les caractères physico-chimiques et l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle.
- les résultats des analyses effectuées par chromatographie sur couche mince et les méthodes spectroscopiques (UV/Vis et IR) suivis de comparaisons avec la littérature et des discussions.

## **PREMIERE PARTIE : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES**

« L'élément essentiel, fondamental, de l'imagination créatrice dans l'ordre intellectuel, c'est la faculté de penser par analogie, c'est-à-dire par ressemblance..... ».

*Théodule Ribot, Essai sur l'imagination (Fin XIXième, début XXième siècle)*

## I.1- Définitions

- **Huile Essentielle (H.E)**

Il existe plusieurs expressions pour définir une huile essentielle. L'Association Française de Normalisation (L'AFNOR) donne la définition suivante (norme NF T 75-006) : « L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation « sèche ». L'H.E est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques».

Cependant, Cette définition peut être considérée restrictive car elle exclut d'autres procédés tels que : l'extraction par solvant non aqueux, par micro-ondes, l'enfleurage ainsi que les essences obtenues à partir des tissus animaux [3].

La définition qui semble la plus universellement acceptée est la suivante : « Les H.Es sont définies comme étant des produits de composition, généralement complexe, renfermant des substances volatiles et odorantes contenues dans divers organes des plantes : fleur, feuille, bois, racine, tige, écorce, fruit, ou autre. Elles sont obtenues soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage [4]. Le principal procédé d'extraction est la distillation à la vapeur d'eau ou hydrodistillation ».

- **Essence**

Substance odorante, volatile, naturelle contenue dans différents tissus sécréteurs et différents organes des plantes aromatiques (fleurs, feuilles, fruits, racines, bois,...).Ce terme ne peut être employé que pour certaines plantes comme celles contenant des citrals (orange, citron, pamplemousses, mandarine...) avec des principes trop lourds pour être entraînés par la vapeur d'eau utilisée pour la distillation des H.Es. L'huile essentielle est donc une « Essence distillée » [5].

- **Les plantes aromatiques**

Les plantes aromatiques sont des plantes capables de synthétiser une essence. Parmi les 800.000 espèces végétales, seules environ 10 % possèdent cette faculté [6].

Selon les espèces, les organes sécréteurs d'essence peuvent se trouver dans les sommités fleuries, les graines, les fruits, les feuilles, les racines, le bois, l'écorce ou encore l'oléorésine.

## I.2- Historique

Il semblerait que l'histoire des H.Es est un peu floue à suivre. Elle n'a pas eu le même déroulement sur les différents continents, tout comme les médecines n'ont pas suivi la même évolution au sein des différentes civilisations. On retrouve mention de leur fabrication dans des écrits védiques remontant à des milliers d'années avant notre ère. L'utilisation des H.Es remonte donc aux plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe. Elles étaient utilisées en Inde il y a plus de 7000 ans, l'Ayurveda, livre sacré écrit par Brahma, révèle les secrets de la longévité en conseillant l'usage des plantes aromatiques en médecine et dans l'alimentation. Les plantes aromatiques figurent aussi dans un livre, Pen Ts'ao, publié en Chine par le médecin érudit et l'empereur Shen Nung (2800 av. J-C), il y a environ 4 500 ans ou il recense plus de 100 plantes médicinales utiles parmi lesquelles figurent l'anis, la cannelle, le curcuma et le gingembre ; ce livre fera autorité jusqu'au XVI<sup>ème</sup> siècle ou il est revu et corrigé par un médecin botaniste et pharmacologue curieux et lettré, Li Che Tchen , qui ne recense pas moins de 1000 plantes médicinales utiles [8]. Entre 3 000 et 2 000 ans avant notre ère, les Égyptiens pratiquaient la médecine en utilisant largement les plantes aromatiques ; les Égyptiens maîtrisaient la fabrication des huiles et des eaux parfumées [9]. Les premiers à utiliser l'hydrodistillation semblent être les Perses, 1 000 ans avant notre ère. L'utilisation des H.Es était pratique courante chez les Grecs et plusieurs livres ont été publiés sur le sujet : « Histoire naturelle » de Pline, «Les Aphorismes» d'Hippocrate, «Traité des odeurs» de Théophraste et Pédanius Dioscoride a écrit un ouvrage sur la phytothérapie [3]. Les Arabes ont apporté une amélioration significative dans la distillation des huiles avec le célèbre chimiste Gerber (721-815). Vers la fin du XVI<sup>ème</sup> et du XVII<sup>ème</sup> siècle, plus de 100 H.Es sont utilisées [10]. Dans l'histoire moderne, Hermann Boerhave (1668-1738) fut le premier à décrire les H.Es de point de vue chimique et les vertus thérapeutiques des H.Es occupent une place de plus en plus importante. En 1928, le chimiste français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme aromathérapie pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main.

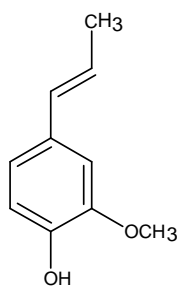
En 1964 le docteur français Jean Valunet a connu du succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie. Aujourd'hui, il existe environ 3000 huiles dont 300 seulement, sont réellement commercialisées et nous reconnaissons que les huiles essentielles ont des effets pharmacologiques, psychologiques et physiologiques sur l'homme [11].

### I.3- Composition chimique

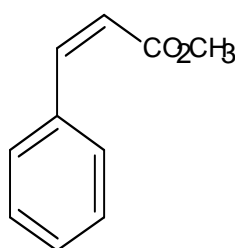
Les H.Es constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses [12]. Cette composition peut varier d'une dizaine jusqu'au plus de 300 constituants [11] (H.Es de vétiver, de patchouli, de géranium) qui peuvent être classés en deux catégories : les composés terpéniques et les composés aromatiques. On y trouve également, et en faibles concentrations des acides gras, des cétones et des coumarines volatiles, des lactones (dérivés des acides cinnamiques), des alcaloïdes de faible poids moléculaire [13]. La nature du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle principal dans l'efficacité de leurs effets biologiques voire les composés minoritaires. En général une huile essentielle contient en moyenne soixante-quinze molécules actives [14].

- **Les composés aromatiques**

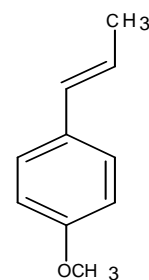
Sont des composés oxygénés et volatils dérivés du phénylpropane (Fig1). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont caractéristiques des H.Es du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc.... [15].



Eugénol



(Z)- cinnamate de methyl



Méthylchavécol ou estragol

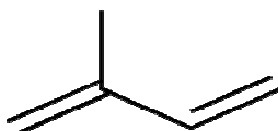
**Fig. 01: Structures de quelques dérivées du phénylpropane [15].**



- **Les composés terpéniques**

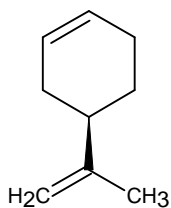
Les composés terpéniques prépondérants dans la plupart des essences, sont des hydrocarbures de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Ils sont formés d'unités isopréniques à cinq atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) et comprennent les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ), les sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ), les diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ) et les triterpènes ( $C_{30}H_{48}$ )....etc.

Ils ont la même origine métabolique. Leur formule brute générale est  $(C_5H_8)_n$ . Avec  $n = 1$  l'isoprène qui est l'unité de base [16].

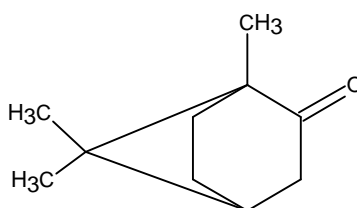


**Fig. 02 : L'isoprène, un diène [70].**

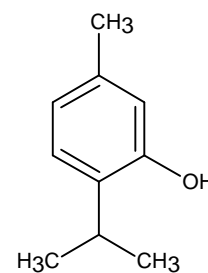
### Monoterpènes



**Limonène**

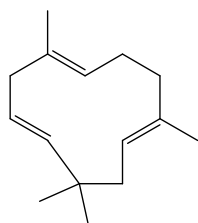


**Camphre**

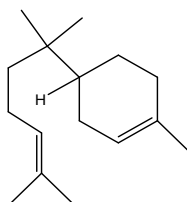


**Thymol**

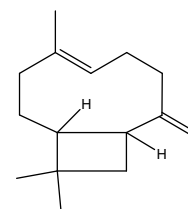
### Sesquiterpènes



**$\alpha$ -Humulène**



**$\beta$ -caryophyllène**

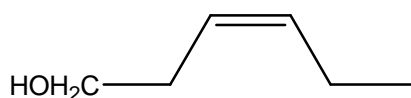


**$\alpha$ -Bisabolol**

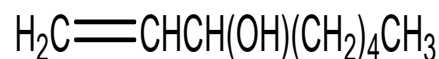
**Fig. 03 : Quelques composés terpéniques [15].**

- **Composés d'origines diverses**

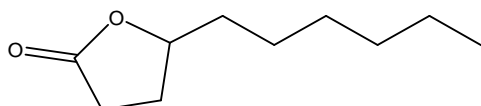
Il s'agit de produits résultants de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent aux arômes de fruits [17].



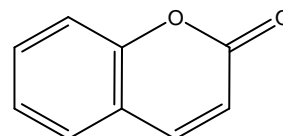
Hex-3-ène-1-ol-cis



Oct-1-ène



Decalactone



Coumarine

**Fig. 04: Quelques composés d'origines diverses [15].**

#### I.4-Activités biologiques des huiles essentielles

Les H.Es sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie, l'industrie alimentaire (les arômes) et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les H.Es [11].

##### I.4.1-Antibactérienne

L'activité antimicrobienne des H.Es est due principalement à leur composition chimique et en particulier à la nature de leur composé majoritaire [18].

Les composés aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les phénols contenus par exemple dans l'H.E de clou de girofle, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc. [19]. En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des H.Es se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires :

Phénol > alcool > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters [20].

##### I.4.2-Antivirale

Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. En effet, les H.Es constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques celles à phénol et à monoterpénol [21]. Nous pouvons citer encore l'H.E de Ravintsara, de Bois de Hô, ou de Cannelle de Ceylan [22].

### **I.4.3-Antifongiques**

Les H.Es utilisées pour leurs propriétés antifongiques sont les mêmes que celles citées précédemment la différence est la durée du traitement qui sera plus longue [23]. On peut citer, les H.Es de Cannelle, de Clou de girofle ou de Niaouli sont des antifongiques [24].

### **I.4.4-Antiparasitaire**

Les H.Es à phénol possèdent une action puissante contre les parasites.

Le thym à linalol, la sarriette des montagnes sont d'excellentes H.Es antiparasitaires [25].

### **I.4.5-Antiseptique**

Les aldéhydes et les terpènes qui sont souvent retrouvés dans les H.Es sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes [26]. Par exemple : l'huile essentielle d'Eucalyptus radiata.

### **I.4.6-Insecticides**

Les H.Es possédant des fonctions aldéhydes comme le citronellal contenu dans l'Eucalyptus citronné ou la citronnelle sont insectifuges ou insecticides [27].

## **I.5-Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles**

(Selon la norme AFNOR)

### **I.5.1- Densité relative à 20°C : $d_p^{20}$ NFT 75-111**

La densité relative à 20°C d'une H.E est le rapport de masse d'un certain volume d'H.E à 20°C à la masse d'un égal volume d'eau. Sa mesure est intéressante, à titre indicatif sur le plan commercial, pour se représenter en poids un volume d'huile transportée en vrac.

### **I.5.2-Indice de réfraction à 20°C : $n_p^{20}$ NFT 75-112**

L'indice de réfraction d'une H.E est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence ( $\theta_i$ ) et le sinus de l'angle de réfraction ( $\theta_r$ ) d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

La longueur d'onde spécifiée ou de référence est  $\lambda = 589.3 \pm 0.3\text{nm}$  et la température de référence est de 20°C d'où la notation précédente.

**I.5.3- Miscibilité à l'éthanol : NFT75-101**

Une H.E est dite miscible à V volume et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à la température de 20°C, lorsque le mélange de un volume de l'H.E considérée avec V volume de cet éthanol est limpide et le reste après graduelle d'éthanol de même titre, jusqu' à un total de 20 volumes

**I.5.4- Indice d'acide: I A NFT 75-103**

L'indice d'acide (I.A.) est le nombre en milligramme d'hydroxyde de potassium KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres dans un gramme d'huile essentielle.

L'indice d'acide augmente au cours du vieillissement de l'huile et indique le degré d'altération des esters (essentiellement des triglycérides) présents dans les corps gras.

Cette caractéristique rend compte de l'état de dégradation d'une huile dans la mesure où les acides gras libres sont des produits de dégradation et plus particulièrement d'hydrolyse des triglycérides.

**I.5.5-Indice de saponification : NFT 60-206**

L'indice de saponification est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier 1g de matière grasse dans les conditions opératoires déterminées.

L'indice de saponification est inversement proportionnel aux poids moléculaires des acides gras. Elle permet d'avoir une idée sur la longueur moyenne des chaînes grasses : plus l'indice de saponification est élevé, moins longue est la chaîne les acides gras.

**I.5.6-Indice de peroxyde : NFT 60-220**

On entend par indice de peroxyde d'un corps gras, le nombre de microgrammes d'oxygène actif contenu dans un gramme de produit capable d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. Sa détermination reflète l'état d'oxydation de l'huile.

Cet indice permet de prévoir une détérioration ultérieure des qualités organoleptiques de l'huile mais ne renseigne absolument pas sur le passé oxydatif de l'huile.

**I.6- Caractérisations chimique****I.6.1-Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La CCM est une méthode permettant de contrôler la pureté d'une substance, de séparer les constituants d'un mélange et éventuellement de les identifier.

- **Principe**

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Pour une séparation des substances aussi différentes que les ions minéraux, les complexes organo-minéraux et les composés organiques, la CCM est toujours utilisée.

Le mélange est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium).

Il est entraîné par un solvant approprié (phase mobile ou éluant) qui migre par capillarité sur la plaque. Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire.

Après migration les taches doivent être révélées ; c'est la détection qui peut se faire par pulvérisation d'un réactif caractéristique ou par immersion dans un bain de permanganate de potassium ou de vapeur de di-iodé ou encore par observation à la lumière UV si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence.

La référence frontale  $R_f$  caractérisant la position d'un composé sur une plaque est définie par l'expression suivante :

$$R_f = \frac{dx}{ds}$$

Où  $dx$  : distance parcourue par le composé à partir de la ligne de dépôt

$ds$  : distance parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt.

## I.6.2-Analyses spectroscopiques

### I.6.2.1-Analyse par rayonnement IR (La spectroscopie infrarouge)

La spectroscopie infrarouge est utilisée depuis une centaine d'année pour identifier et quantifier la composition d'un échantillon .Elle est considérée comme une méthode analytique très puissante car elle permet d'identifier un grand nombre d'espèce chimique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. Les tables de corrélation de spectroscopie infrarouge sont largement présentes dans la littérature scientifique.

La spectroscopie infrarouge repose sur le phénomène de vibrations internes (d'élongation et de déformation) des molécules. Elle exploite le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec des niveaux d'énergie discrets (modes vibratoires). Quand une lumière IR traverse un échantillon, certaines liaisons absorbent de l'énergie pour changer de fréquence de vibration, faisant apparaître des bandes dans le spectre. [28]

### I.6.2.2-Analyse par rayonnement UV (Spectroscopie UV-visible)

La spectrophotométrie UV / Visible repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière dans le domaine s'étendant du proche UV au très proche IR soit entre 180 et 1100 nm. Cette partie du spectre est relativement pauvre en informations sur la structure des composés moléculaires. En revanche, l'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration. [29]

Où

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon_{\lambda} \cdot \ell \cdot C \quad \dots\dots\dots(1)$$

- $I/I_0$  est la transmittance de la solution (sans unité).
- $A$  est l'absorbance ou densité optique à une longueur d'onde  $\lambda$  (sans unité).
- $\varepsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'extinction molaire (en  $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$\varepsilon_{\lambda}$  dépend de la longueur d'onde, de la nature chimique de l'entité et de la température. Cette constante représente une propriété moléculaire fondamentale dans un solvant donné, à une température et une pression donnée.

- $\ell$  est la longueur du trajet optique dans la solution traversée, elle correspond à l'épaisseur de la cuvette utilisée (en cm).
- $C$  est la concentration molaire de la solution (en  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Dans le cas d'un gaz,  $C$  peut être exprimée comme un volume inverse (unités de longueur réciproque au cube,  $\text{cm}^{-3}$ ).

## II.1-Introduction

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses [30]. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisante une forte demande toujours plus exigeante.

Plusieurs techniques d'extraction des H.Es sont connues et utilisées à ce jours, dont l'extraction par solvant organique, l'extraction à l'eau surchauffée, l'extraction au CO2 supercritique, par micro-ondes, par ultrasons ou par l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation qui sont les deux techniques les plus anciennes et les plus utilisées quelle que soit a l'échelle industrielle ou dans les laboratoires [31].

## II.2 – Méthodes d'extraction

### II.2 .1– Distillation

C'est la technique la plus largement utilisée et la mieux adaptée pour obtenir les H.Es les plus pures [32]. Le principe consiste à faire placer Les plantes dans un alambic industriel ou dans un ballon au laboratoire, puis chauffées avec de l'eau, de la vapeur ou les deux. La chaleur intense fait exploser ou éclater les cellules qui contiennent les huiles, et celles-ci se répandent dans la vapeur d'eau. Elles sont ensuite canalisées dans un condensateur et réfrigérées pour se liquéfier à nouveau. A la sortie, un essencier ou «séparateur florentin» sépare l'huile qui flotte à la surface de l'eau de distillation (hydrolat) par différence de densités.

Les molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique [33] d'où l'avantage de cette technique qui réside en l'abaissement de la température de distillation de mélange; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leurs températures d'ébullition, ce qui évite leur décomposition.

- Il existe 03 méthodes qui utilisent le principe de distillation [34].

La distillation par l'eau ou "l'hydrodistillation", la distillation à la vapeur d'eau ou " la vapo-hydrodistillation" et hydrodiffusion. Ces trois modes reposent sur le même principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau.

La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal.

### II.2.1.1- Distillation à l'eau ou "hydrodistillation"

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée [7]. La matière végétale à distiller est mise en contact direct avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel ; elle peut flotter ou être complètement immergée selon sa densité et la quantité de matière manipulée. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité. Cette technique met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult) [35].

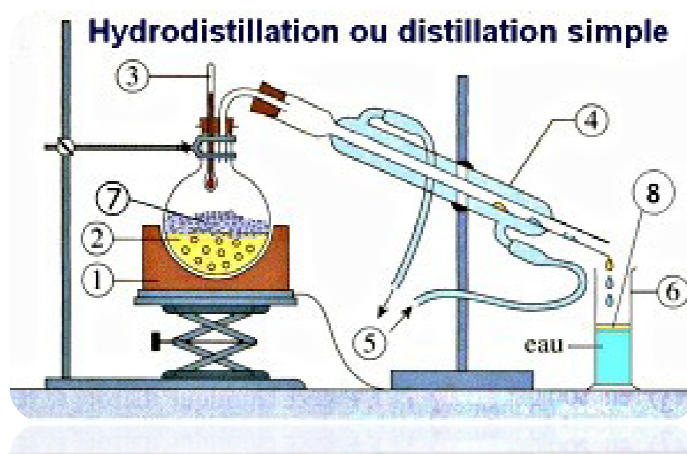


Fig.05 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation [71].

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

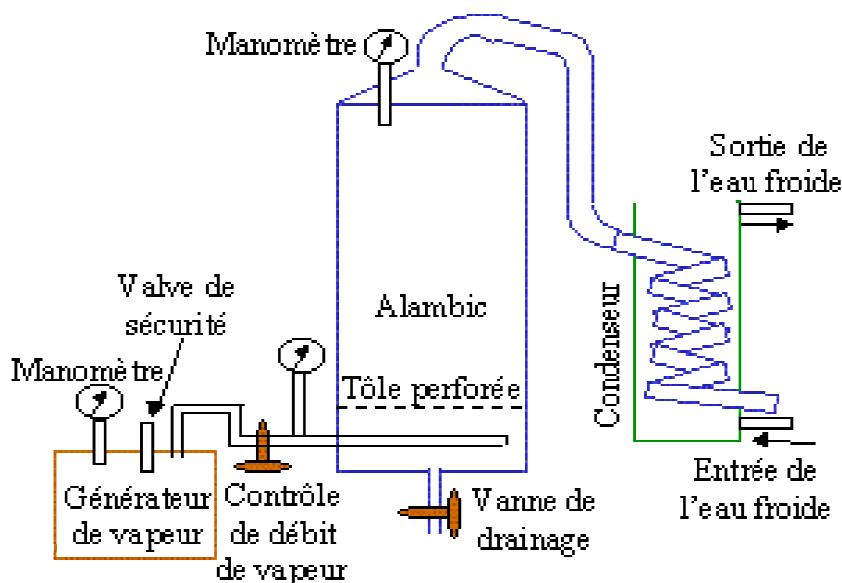
### II.2.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau (Vapo-hydrodistillation)

À la différence de l'hydrodistillation, le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, il est placé sur une grille ou une plaque perforée au-dessus de la base de l'alambic et placée à une distance adéquate du fond de l'alambic. La partie inférieure de celui-ci est remplie d'eau. Le niveau de cette dernière doit permettre d'éviter tout contact entre l'eau et la plante.



Les composés volatils sont entraînés par un courant de vapeur d'eau et récupérés après condensation dans un vase florentin, où ils se séparent du distillat par décantation du distillat refroidi.

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [34].



**Fig.06: Schéma d'un appareil de distillation des plantes aromatiques à générateur de vapeur séparé de l'alambic (vapo-distillation) [34].**

### II.2.1.3- Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur, en effet, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique relativement récente, elle consiste à faire passer, du haut vers le bas, un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la matière végétale. Elle est plus rapide que les précédentes et exploite l'action osmotique de la vapeur d'eau. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau.

### II.2.2-Extraction par fluide supercritique

L'utilisation de fluides supercritiques est assez récente (fin des années 1970) et seul le CO<sub>2</sub> est aujourd'hui universellement employé, en raison de sa disponibilité et des

conditions relativement simples d'obtention (ses température et pression critiques sont relativement basses : 31°C et 74 bars) [40]. Un fluide est qualifié de supercritique quand il placé au-delà de son point critique. Porter au-delà d'une certaine température et d'une certaine pression, un fluide est dans un état dit « supercritique », intermédiaire entre l'état gazeux et l'état liquide. Sa densité se rapproche de celle d'un liquide, alors que sa viscosité et sa diffusivité restent celles d'un gaz. [37]

Le principe de cette technique est fondé sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. À l'état supercritique, le CO<sub>2</sub> n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO<sub>2</sub> sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux [38].

Le dioxyde de carbone refroidi et comprimé à une pression inférieure à la pression critique passe à l'état liquide. Il est ensuite comprimé puis chauffé à une pression et température choisies. Le fluide traverse alors la cuve d'extraction où il dissout l'extrait contenu dans le matériel végétal. Le CO<sub>2</sub> supercritique chargé en soluté est ensuite détendu au-dessous de la pression critique, perdant ainsi ses propriétés de solvant. Le fluide entre ensuite dans le séparateur, où le CO<sub>2</sub> passe à l'état gazeux, permettant ainsi aux solutés de précipiter (condenser) et d'être récupérés.

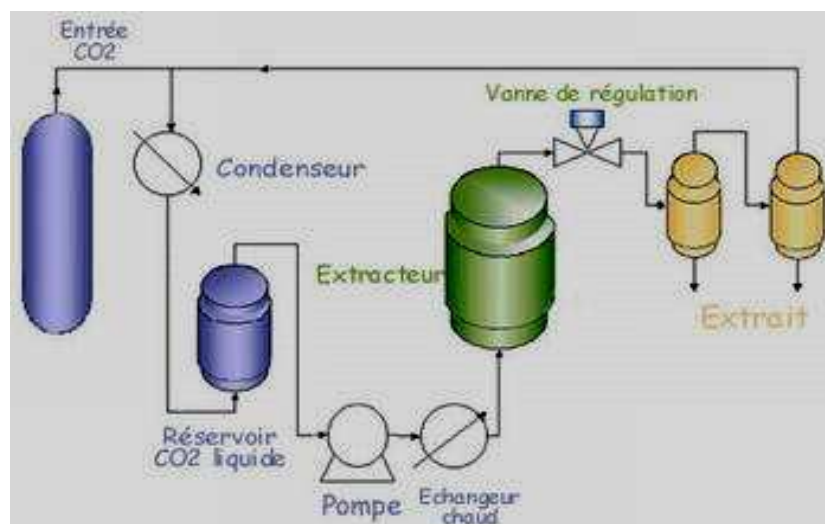


Fig.07: Représentation schématique d'une chaîne d'extraction [72].

### II.2.3-L'extraction assistée par micro-onde

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique encore plus récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques [39].

Le procédé consiste à irradier par le rayonnement micro-ondes la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les rayonnements micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les rayonnements micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires.

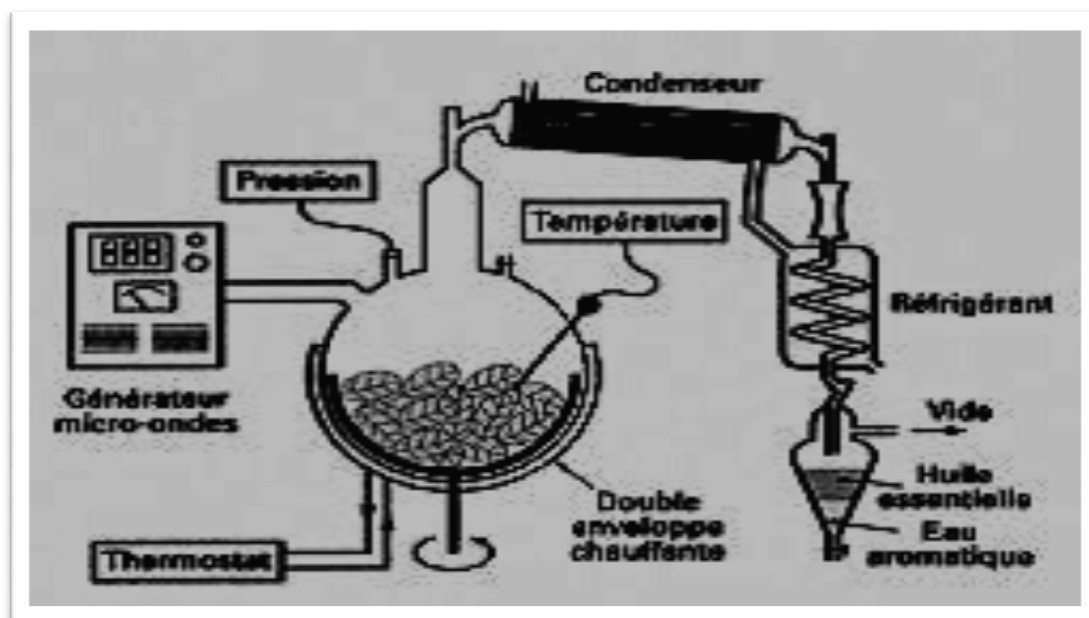


Fig.08 : Schéma d'une extraction assistée par micro-onde sous vide [38].

### II.2.4-L'enfleurage

Le principe de cette méthode est assez simple : Les molécules odorantes étant des composés volatils, au lieu de les laisser s'échapper dans l'air, elles sont captées par la graisse qui a la propriété de les dissoudre. Lors de l'ajout d'alcool les molécules organiques passent dans ce solvant [40]. Cette méthode est particulièrement employée typiquement dans le domaine de la parfumerie, lorsque l'hydrodistillation dénature les molécules à extraire. Les fleurs sont disposées sur des châssis de verre enduit de graisse et renouvelées tous les 3 à 7 jours selon les espèces [41].



**Fig.09 : Enfleurage de pétales de rose [72].**

### **II.2.5- L'extraction par ultrasons ou sonication**

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 20 MHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz [42]. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression). Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu.

Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former.

Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression. La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie [43].

Les micros cavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines cellulosiques [45].

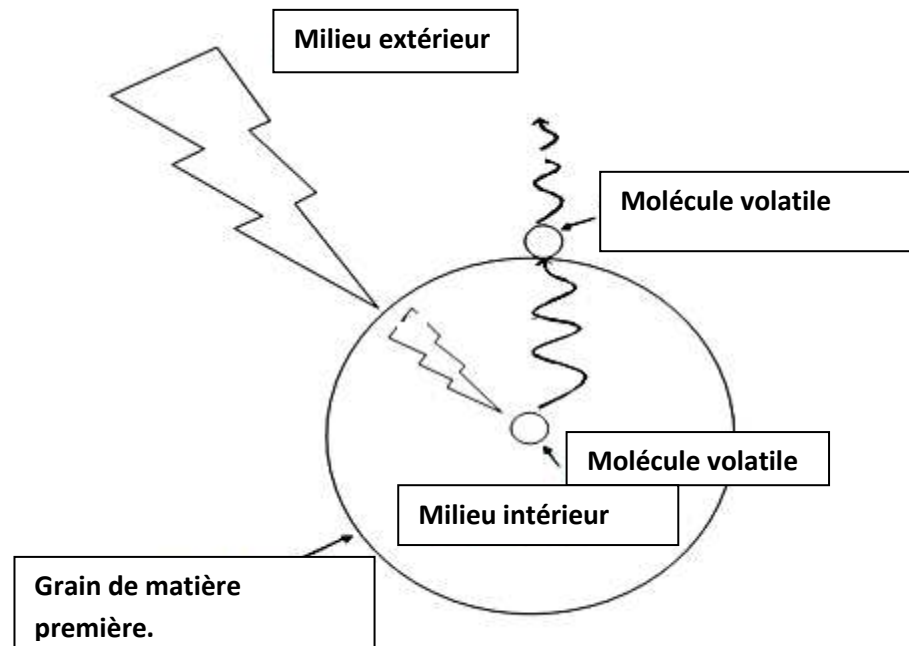
Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation des constituants des huiles essentielles. Dans certains cas, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées [40].

## **II.3- Présentation générale du phénomène d'extraction**

### **II.3.1 – Description du phénomène**

Le procédé d'extraction correspond généralement à une interaction entre un solide, un liquide, un gaz et de la chaleur [46]. Lors de cette opération, nous assistons systématiquement, à un moment ou un autre, à une transformation de phase : les molécules volatiles, initialement à l'état liquide, passent à l'état vapeur [47].

Quatre principaux processus interviennent successivement dans la réalisation de cette opération ; elles sont schématisées de la façon suivante [38]:



**Fig.10 : Schéma des processus de transfert dans l'extraction [73].**

L'analyse de l'opération fait appel à :

- Un transfert de chaleur au sein de la matrice solide, de la surface vers le cœur;
- La diffusion de l'eau au sein de la matière,
- La diffusion des molécules des composés volatils (huiles essentielles) a donc lieu par diffusion dans la structure solide (souvent en phase gazeuse) ou solubles dans l'eau.
- La diffusion des molécules dans l'atmosphère et leur condensation à la surface du condenseur.

### II.3.2-Le rapport d'entraînement

La distillation est un procédé de séparation basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée. La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes.

L'hydrodistillation des huiles essentielles est une distillation de liquides non miscibles.

Cette technique consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique.

Le procédé d'extraction des molécules volatiles correspond à un équilibre des phases liquide-vapeur qui met en jeu l'application de deux lois physiques [48].

- **La loi de Dalton:** dans laquelle la pression du mélange de vapeurs est égale à la somme des tensions de vapeur de divers constituants. [48].

$$P_T = T_H + T_E \dots\dots\dots(2)$$

- **La loi de Raoult:** le rapport des quantités des entités distillées simultanément est fonction de la tension et des densités des vapeurs (donc des masses moléculaires) à la température de distillation choisie [49].

$$\frac{\text{Mole H}}{\text{Mole E}} = \frac{T_H}{T_E} \dots\dots\dots(3)$$

La relation de ces deux lois donne respectivement la pression totale et la composition des vapeurs en fonction des pressions partielles, d'où le calcul du taux de corps entraîné appelé également rapport d'entraînement [50].

$$R = \frac{m_{H_2O}}{m_{huile}} = \frac{P_{H_2O}}{P_{huile}} * \frac{M_{H_2O}}{M_{huile}} \dots\dots\dots(4)$$

R : rapport d'entraînement ; m<sub>H<sub>2</sub>O</sub> et m<sub>huile</sub> : masses respectives de l'eau et de l'huile dans le condensat ; P<sub>H<sub>2</sub>O</sub> et P<sub>huile</sub> : pressions respectives de l'eau et de l'huile à la température de l'alambic ; M<sub>H<sub>2</sub>O</sub> : masse molaire de l'eau ; M<sub>huile</sub> : masse molaire moyenne de l'H.E.

Si dans le cas de l'eau, la masse molaire est de 18 g/mole et la variation de la pression de vapeur en fonction de la température est bien connue, par exemple 1 atm ou 760 mm de mercure à 100 °C, les valeurs correspondantes pour l'huile doivent être calculées dans chaque cas, puisqu'elles dépendent de la composition de l'huile.

Dans le cas du clou de girofle, dont l'huile est surtout constituée de l'eugénol (70-85 %). Compte tenu de la masse molaire de cette molécule, on pourra supposer que la valeur de M<sub>huile</sub> est approximativement égale à 168 g/mole.

De même, la littérature indique une pression de vapeur de l'huile de 4.8 mm de mercure à 100 °C. Un calcul plus rigoureux pourrait faire intervenir l'ensemble des constituants de l'huile.

### III.1- Présentation de la plante

#### III.1.1- Données botaniques

- Nom : (Dénominations vernaculaires)
  - français : girofle,
  - anglais : clove-tree,
  - Arabe : Qaranful.
- Famille des Myrtacées [51].
- La famille des myrtaceae comprend plus de 4000 espèces d'arbres, d'arbustes et d'arbrisseaux des régions tropicales. C'est l'une des familles d'arbres les plus soigneurs.
- Espèce : Eugénia caryophyllata.
- Synonymes: Caryophyllus aromaticus, Eugenia aromatica, E. caryophyllata, E. caryophyllus. Syzygium aromaticum (Eugenia aromatica) : La désignation botanique Syzygium vient du grec syzygos, qui veut dire «assemblé» et se réfère aux feuilles assemblées par paires d'une espèce jamaïquaine [2].

#### III.1.2-Description et caractéristiques

Le giroflier, (nom donné par Pline, du grec pyllyon : feuille et karyon : noyau, noix) est un bel arbre tropical petit à moyen, de 12 à 15 m de haut, (il peut atteindre jusqu'à vingt mètres) [52], au feuillage persistant et dense, originaire des petites îles volcaniques de l'archipel des Moluques en Indonésie [53]. Le fruit est une baie appelée « anthofle » allongée de 2,5 à 3 cm de long sur 1,3 à 1,5 cm le large, de couleur rouge foncé à maturité [54].

Cet arbre a une forme conique. Ses feuilles persistantes sont ovales et coriaces. Les fleurs à quatre pétales blanc rosé sont caractérisées par leurs sépales rouges persistants. Avant l'épanouissement, les boutons floraux sont nommés « clous de girofle ». C'est à cette époque qu'on les récolte avant de les laisser sécher plusieurs jours, au soleil jusqu'à ce qu'ils perdent leur couleur rose et prennent une teinte brun foncé [52].



Fig.11 :Le giroflier [74].



Fig. 12: Les feuilles de giroflier [75].

### III.1.3- But de la culture

Le giroflier est cultivé pour ses clous et griffes servant d'aromates dans l'alimentation.

Ses feuilles riches en eugénol sont utiles dans la préparation de la vanilline artificielle [55].

- Ses clous, griffes, feuilles, branches et anthofles sont utilisés : en pharmacie pour des médicaments en médecine pour la chirurgie en cosmétique pour la parfumerie et la savonnerie en quincaillerie pour la peinture
- Les cigarettes indonésiennes : KRETEK sont issues du mélange de girofle et de tabac.
- les fruits sont également utilisés en confiserie.



### III.1.4-L'huile essentielle de giroflier

- Le clou de girofle renferme une quantité importante d'huile essentielle (15 à 20%) ,16% d'eau, des tanins, un peu d'amidon et des matières fibreuses cellulosiques.
- Le pédoncule floral (griffes) :5 à 6% d'huile, et les feuilles : 3 à 4 %.
- L'huile de girofle (obtenue par distillation) est très riche en eugénol (70 à 85%).On trouve aussi d'autres composés terpénique (dont environ 10% de caryophyllène), aliphatique, aromatique et hétérocycliques [56].

### III.2-Le clou de girofle

#### III.2.1-Description et historique

Les clous de girofle, *pimenta dioica*, sont les bourgeons séchés, non éclos, du giroflier et sont parmi les plus anciennes épices et drogues décrites dans l'histoire. On peut lire dans des écrits antiques qu'il a été introduit il y a plus de 2000 ans en Chine, en Inde, et plus tard dans l'Empire romain. En Chine, les courtisanes avaient coutume de mâcher un clou de girofle lorsqu'ils adressaient la parole à l'empereur [57].

Les Arabes ont apporté le clou de girofle en Europe. Mais on ignorait à l'époque quelle était son origine exacte. Les premières indications plus précises datent du 13e siècle.

Le gouverneur français Poivre a réussi en 1769 à acclimater le giroflier aux îles africaines Maurice et de la Réunion. Le clou de girofle a un aspect caractéristique brun foncé, à saveur chaude, brûlante, légèrement amère et fortement aromatique [58].



**Fig.13 : Les clous de girofle avant séchage [76].**

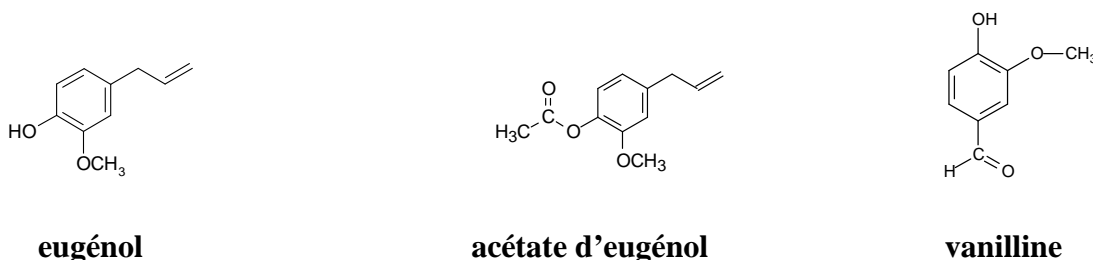


**Fig.14 : Les clous de girofle après Séchage [50].**

### III.2.2-L'huile essentielle de clou de girofle

L'huile essentielle des clous de girofle contient principalement de l'eugénol, de 75 à 85 %, de l'acétate d'eugénol, de 4 à 10 %, du  $\beta$ -caryophyllène, de 7 à 10 % et de faibles quantités d'autres produits (dont un peu de vanilline). L'eugénol, extrait de l'huile essentielle des clous de girofle ou des feuilles de girofler sont utilisées dans certains produits des domaines médical et dentaire en raison de ses propriétés antalgique et antiseptique.

L'H.E. des clous de girofle, extraite par hydrodistillation, contient principalement deux composés: l'eugénol et l'acétyl'eugénol et l'une des caractéristiques fondamentales de cette huile est sa densité élevée ( $d = 1,066 > d \text{ eau} = 1,00$ ), ce qui nous permet de les séparer par simple décantation [59].



**Fig.15 : Quelques composés de l'huile essentielle de clou de girofle [77].**

### III.2.3-Utilisation dans la thérapie

Les vertus du clou de girofle sont multiples, il n'est donc pas étonnant qu'on lui accorde une place de choix dans la médecine comme dans la cuisine.

Il réchauffe, est aromatique, stimulant, antiseptique, analgésique, a également des effets positifs sur la digestion, est recommandé contre les nausées et protège contre les parasites intestinaux, pour ne citer que quelques-unes des utilisations possibles du clou de girofle.

Quelques gouttes d'huile essentielle de girofle auraient déjà apaisé bien des maux de dents. Il n'est donc pas étonnant que l'huile essentielle de girofle entre dans la composition de dentifrices [60].

La Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC) emploie le clou de girofle avec succès pour fortifier les reins.

Les boules aromatiques et faisant fonction de diffuseur de parfum renferment elles aussi fréquemment des clous de girofle entiers. À mentionner également, par souci d'exhaustivité, que le clou de girofle est également utilisé pour parfumer les cigarettes indiennes et indonésiennes.

Ces propriétés sont essentiellement dues à l'eugénol dont on sait qu'il est rapidement métabolisé et excrété, et considéré comme non cancérigène. Il peut être présent dans les aliments jusqu'à une concentration de 1500 ppm.

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

« L'expérimentateur qui ne sait pas ce qu'il cherche  
ne comprend pas ce qu'il trouve. »

*Claude Bernard, De la physiologie générale (XIX<sup>ème</sup> siècle)*

## I- Matériels utilisés

### I.1- Pesée

Deux types de balance ont été utilisés pour les pesées :

- Balance analytique DENVER.
- Balance électronique de précision DENVER.

### I.2-Broyage

Le broyage a été effectué à l'aide d'un moulin à café.



**Fig.16 : Photo de moulin à café.**

### I.3- Extraction

L'huile essentielle de clou de girofle a été extraite par :

- hydrodistillation au moyen de matériel qui comporte les éléments suivants : un chauffe-ballon de type PILZ, un ballon tri-col et un réfrigérant. Le montage est présenté sur la (fig.17.)



**Fig.17 : Montage d'hydrodistillation.**

#### **I.4-Relargage**

L'huile essentielle de clou de girofle extraite est un composé organique en partie soluble dans l'eau. Le relargage consiste à la rendre moins soluble dans l'eau en ajoutant du chlorure de sodium. De cette façon il sera plus aisé de récupérer cette huile essentielle.

#### **I.5-Décantation**

La séparation de l'huile essentielle de l'eau ou l'extraction liquide-liquide a été réalisée dans des ampoules à décanter.

L'extraction liquide-liquide consiste à faire passer, par solubilisation, l'huile essentielle de clou de girofle dans un solvant organique. L'huile est alors plus facile à isoler en solution dans le solvant extracteur.

L'huile doit être non miscibles et plus soluble dans le solvant extracteur.

Le solvant choisit est le dichlorométhane de par ses caractéristiques d'être un produit volatil (Téb à 40°C), ce qui facilite la séparation « solvant-huile » pendant l'évaporation, et c'est aussi un solvant peu toxique.

#### **I.6-Élimination du solvant organique (évaporation)**

L'élimination du solvant organique, le dichlorométhane, a été réalisé à l'aide d'un évaporateur rotatif de type HEIDOLPH à une température de 40°C et à la pression atmosphérique.



**Fig.18 : Evaporateur rotatif de type HEIDOLPH.**

### **I.7-Séchage**

Le séchage d'huile sert à éliminer les traces d'eau que contient le produit après l'extraction.

Les desséchants chimiques sont des solides inorganiques qui fixent l'eau lorsqu'ils sont ajoutés au milieu humide. Ils sont choisis parmi des sels anhydres susceptibles de s'hydrater:  $MgSO_4$  (le plus efficace),  $Na_2SO_4$ ,  $CaCl_2$  (pour les hydrocarbures et les dérivés halogénés).

Le choix du desséchant tient compte des critères suivants

- Il ne doit pas provoquer, de réactions chimiques avec l'huile à sécher ;
- Il doit avoir un pouvoir desséchant efficace et rapide ;
- Il ne doit pas se dissoudre dans le liquide à sécher ;
- Il doit être aussi économique que possible.

Le desséchant utilisé dans notre travail était le  $MgSO_4$

### **I.8- Détermination des paramètres physico-chimiques**

#### **I.8.1- La Densité**

La mesure de la densité relative à 20°C a été effectuée à l'aide d'un pycnomètre de capacité 5.024ml en verre.

#### **I.8.2- L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction à 20°C a été mesuré avec un réfractomètre.

#### **I.8.3- pH**

La mesure de pH à 20°C a été réalisé à l'aide d'un pH mètre de type HANNA et de papier pH.

#### **I.8.4- L'indice d'acide**

L'indice d'acide a été fait à l'aide d'une burette de capacité 25 ml et de ballon de 50ml.

#### **I.8.5- L'indice de saponification**

L'indice de saponification a été réalisé avec une burette graduée de capacité 25 ml, un ballon de 250 ml et un réfrigérant à reflux.

#### **I.8.6- L'indice de peroxyde**

L'indice de peroxyde a été fait à l'aide d'une burette de capacité 25ml et un ballon de 250ml.

La détermination des indices a été réalisée sur la base de 03 essais pour chaque indice et le tableau 06 regroupe les résultats obtenus.

## **I.9- Analyse chromatographique et spectroscopique**

### **I.9.1-Les chromatographies sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée sur des plaques de silice et la révélation a été effectuée par l'iode ( $I_2$ ).

L'éluant utilisé est constitué, de mélange binaire des deux solvants : Toluène et d'alcool (éthanol à 96%) avec des proportions volumiques 90% et 10% respectivement.

### **I.9.2-spectroscopie infrarouge (IR)**

La spectroscopie infrarouge a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à transformation de Fourier Shimadzu FTIR-8400, au laboratoire de Chimie Appliqué de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, Les échantillons d'huile ont été dilués dans une matrice de KBr (transparente aux infrarouges) et Les fréquences d'absorption ( $\nu$ ) sont données en  $\text{cm}^{-1}$ .

### **I.9.3- spectroscopie ultra-violet /vis (UV/Vis)**

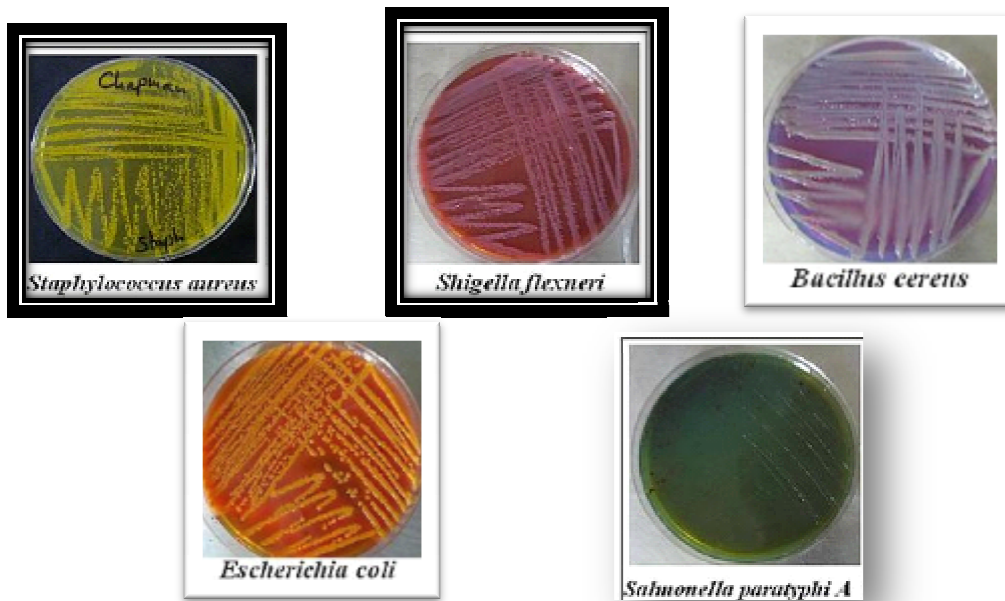
Les échantillons d'huile ont été dissouts dans l'éthanol (96%) et les mesures d'absorbance ont été enregistrées sur un appareil de marque Shimadzu de type UV-1601PC, dans des cellules en quartz suprasil Hellma (laboratoire de Chimie Appliqué de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou).

## **I.10-Test microbiologique**

Le test d'activité antibactérienne d'huile essentielle de clou de girofle a été réalisé au laboratoire commun de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques - Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été faite selon la méthode de diffusion sur milieu solide ; les germes utilisés pour les tests sont : *S. aureus*, *B. cereus*, *S. paratyphi A.*, *S. flexneri*, et *E. coli*.





**Fig.19 : Les souches utilisées.**

Ces cinq souches bactériennes qui ont été utilisées dans notre travail sont des bactéries Gram-positif (G+): *S. aureus* et *B. cereus*, et des bactéries Gram-négatif (G-): *S. paratyphi A*, *S. flexneri*, et *E. coli*. Ces souches bactériennes ont été fournies par l'Hôpital Universitaire de Tizi Ouzou.

**Tableau 01 : Liste des souches microbiennes utilisées.**

Nom de la souche	Gram	Famille	Principal infection causées
<b>Escherichia. Coli</b>	G-	Enterobacteriaceae	-Dommages au niveau de la muqueuse digestive. -Commensale du tube digestif.
<b>Salmonella paratyphi A</b>	G-	Enterobacteriaceae,	Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.
<b>Staphylococcus aureus</b>	G+	Micrococcaceae	-Infections urinaires -Syndromes gastrointestinaux de types crampes abdominales, vomissements, nausées, diarrhées.
<b>Bacillus cereus</b>	G+	Bacillaceae	-
<b>Shigella.flexneri</b>	G-	Enterobacteriaceae.	provoquent des dysenteries bacillaires.

## II-METHODES

### II.1- Extraction d'huile essentielle de clou de girofle

L'extraction a été effectuée par hydrodistillation du clou de girofle broyé, le jour même de broyage pour chaque échantillon. Pour cela, la prise d'essai a été introduite dans un ballon de 1000 ml contenant 500 ml d'eau distillée. Nous avons utilisés un dispositif simple (fig.17.)

Le principe consiste à mettre les clous de girofle (Le broyat) dans l'eau et à faire bouillir le mélange. Pour cela, l'eau contenue dans le ballon est mise à chauffer jusqu'à une température de 99°C. Le courant de vapeur d'eau entraîne les substances volatiles ensuite les vapeurs de l'eau atteignent le réfrigérant et à la sortie du réfrigérant, le liquide de condensation est récupéré dans un flacon dans laquelle se forme une émulsion.

Le distillat obtenu est formé d'eau dans laquelle sont dissoutes très peu d'espèces odorantes; et de l'H.E qui est constituée d'espèces odorantes. L'opération de distillation dure environ 4 heures. Les deux phases doivent faire l'objet d'une séparation à l'aide d'un rota- vapeur après un relargage et une décontation.

Les résultats des rendements obtenus sont résumés dans le tableau 03.

### II.2-Détermination des caractéristiques physico-chimiques

#### II.2.1- La densité relative $d_{20}^{20}$

##### a)- Préparation de pycnomètre

Le pycnomètre d'une capacité de 5.024 ml a été nettoyé et rincé avec de l'alcool et de l'acétone. Ensuite, il a été séché dans l'étuve à 100°C, puis laissé refroidir pendant quelque minute.

##### b)- Pesée de l'eau distillée

On a rempli le pycnomètre avec de l'eau distillée puis chauffée aux environs de 20°C.

Lorsque l'équilibre de température est réalisé, le pesage de pycnomètre rempli muni de son bouchon est réalisé à l'aide d'une balance analytique.

##### c)- Pesée de l'huile essentielle

Le pycnomètre précédent est vidé puis rincé et séché. On a effectuée les mêmes opérations que précédemment mais, l'eau a été remplacée par l'huile essentielle pour chaque essai.

### Formule de calcul

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où :

$m_0$  : est la masse en gramme du pycnomètre vide à 20°C,

$m_1$  : est la masse en grammes du pycnomètre rempli d'eau à la température 20°C,

$m_2$  : est la masse, en grammes du pycnomètre rempli d'huile essentielle à la température 20°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 05.

#### II.2.2- L'indice de réfraction

L'indice de réfraction est particulièrement utile car il renseigne sur l'état de dégradation d'une huile. En effet, la présence d'acides gras libres abaisse fortement l'indice de réfraction et une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé [62].

On fait passer un courant d'eau dans le réfractomètre afin de maintenir l'appareil à la température de 20°C à laquelle les lectures doivent être effectuées.

On porte l'échantillon à une température de 20°C à peu près égale à celle à laquelle la mesure doit être effectuée, puis on l'introduit dans l'appareil.

Expression des résultats :

La variation de l'indice de réfraction  $n$  est fonction linéaire de la température. Elle varie en moyenne de 0.0004 par degré au voisinage de 20°C.

L'indice de réfraction,  $n_D^{20}$  à la température de référence 20°C est donné par la formule :

$$n_D^{20} = n_D^t + 0,0004(t-20) ;$$

Où :

$n_D^t$  est la valeur lue, obtenue à la température  $t$  à laquelle a été effectuée la détermination.

Pour cette lecture directe, la précision de la détermination doit être de  $\pm 0,0002$ .

0.0004 : facteur de correction. Les résultats sont regroupés dans le tableau 05.

#### II.2.3-Evaluation de la miscibilité à l'éthanol

##### a)- Prise d'essai

On introduit dans une fiole, 1ml d'huile essentielle mesuré à l'aide d'une pipette. On place la fiole dans le bain marie pour la maintenir à une température de 20°C.

**b)- Miscibilité**

On ajoute à l'aide de la burette de 10ml, un mélange hydroéthanolique de titre alcoométrique déterminé (96%) préalablement amené à une température de 20°C, par fractions de 0,1ml, jusqu'à miscibilité complète en agitant après chaque addition. Le mélange obtenu doit être limpide.

**- Expression des résultats****• Miscibilité**

La miscibilité de l'huile essentielle à l'éthanol de titre t, à la température de 20°C, est exprimée de la façon suivante : un volume d'huile essentielle dans V volumes d'éthanol de titre t.

**II.2.4- indice d'acide**

C'est la neutralisation des acides libres par une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique.

On pèse à 0,5mg près, 2g de l'échantillon d'huile essentielle pour essai. On introduit dans un ballon cette prise d'essai. On ajoute 5ml d'éthanol et 5 gouttes de solution de phénolphthaléine, comme indicateur coloré.

A l'aide d'une burette de capacité 25ml, graduée en 0,5ml et contenant une solution d'hydroxyde de potassium (0.5N), on verse goutte à goutte la solution basique jusqu'au virage de l'indicateur coloré.

La détermination de cet indice a été réalisée sur la base de 03 essais. On a obtenu alors un indice moyen de 1.2 mg KOH/g d'huile essentielle de clou de girofle.

L'indice d'acide est donné par la formule

$$I_A = \frac{5.61.V}{m}$$

Où V est le volume en ml de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé et m est la masse en gramme de la prise d'essai.

### II.2.5-Indice de saponification

On pèse 2g de l'échantillon d'huile essentielle dans l'erlenmeyer. On ajoute à la prise d'essai, à l'aide de la pipette 25ml de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium en agitant. On ajoute à la solution chaude de 0.5ml à 1ml de la solution de phénolphaléine, et on titre avec la solution d'acide chlorhydrique 0.5N jusqu'à ce que la couleur rose de l'indicateur disparaisse.

Un essai à blanc dans les mêmes conditions, a été effectué en utilisant également 25ml de la solution éthanolique de KOH, mais en omettant la prise d'essai.

L'indice de saponification  $I_s$  est donné par la formule suivante

Avec :

$$I_s = \frac{28,05.(V_0 - V_1)}{m}$$

$V_0$  : Volume d'HCl utilisé dans l'essai à blanc ;

$V_1$  : Volume d'HCl utilisé dans l'essai avec la matière grasse ;

$V_0 - V_1$  : Volume d'HCl qui est utilisé pour neutraliser la potasse combinée à la prise d'essai;

$m$  : masse de la prise d'essai.

La détermination de cet indice a été réalisée suivant la norme AFNOR NFT 60-206 et le résultat obtenu est donné dans le tableau 06.

### II.2.6- Indice de peroxyde

On pèse 2g de l'échantillon d'huile essentielle dans une fiole de 250ml. On ajoute 25 ml d'un mélange qui se compose de 10ml de chloroforme et de 15ml d'acide acétique puis 1ml d'une solution d'iodure de potassium (KI) 0.01 M. On agite pendant une minute et on laisse à l'abri de la lumière pendant 5 mn. 75 ml d'eau distillée ont été ajoutées à la prise d'essai avec quelques gouttes d'empois d'amidon.

À l'aide d'une burette de capacité 25ml et contenant une solution de thiosulfate de sodium 0,01 M, on verse goutte à goutte la solution de thiosulfate de sodium jusqu'au virage de l'indicateur.

On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions.

L'indice de peroxyde est calculé selon la formule suivante

$$I_p = \frac{V-V_0}{m} * 10 \text{ (en meq O}_2\text{/Kg d'huile).}$$

Avec :

V : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai.

V<sub>0</sub> : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc.

m : prise d'essai en « g ».

### II.2.7- Contrôle du pH

Le pH de chaque échantillon utilisé est mesuré à l'aide d'un papier pH et un pH-mètre.

## II.3-Test microbiologique

### -Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes)

L'aromatogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne.

Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des H.Es à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide (Mueller Hinton) ou des disques stériles de papier Wattman (D=6 mm) imprégnés d'une quantité d'H.E. sont déposés au centre de ces boîtes. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, l'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antimicrobienne se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (ou une règle) (exprimé en mm) [63]. Des témoins négatifs utilisant uniquement des disques placés sur gélose inoculée sans l'H.E.

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des H.Es étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition selon les critères regroupés dans le tableau 02.

Tableau 02 : La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des H.Es.[50]

le diamètre d'inhibition « D »	Sensibilité
<8 mm	non sensible (-)
compris 9-14 mm	sensible (+)
15-19 mm	très sensible (++)
>20 mm	extrêmement sensible (+++)

Il est important de noter que la quantité d'H.E. déposée sur le disque varie selon les auteurs, excluant toute comparaison des valeurs des diamètres mesurés.

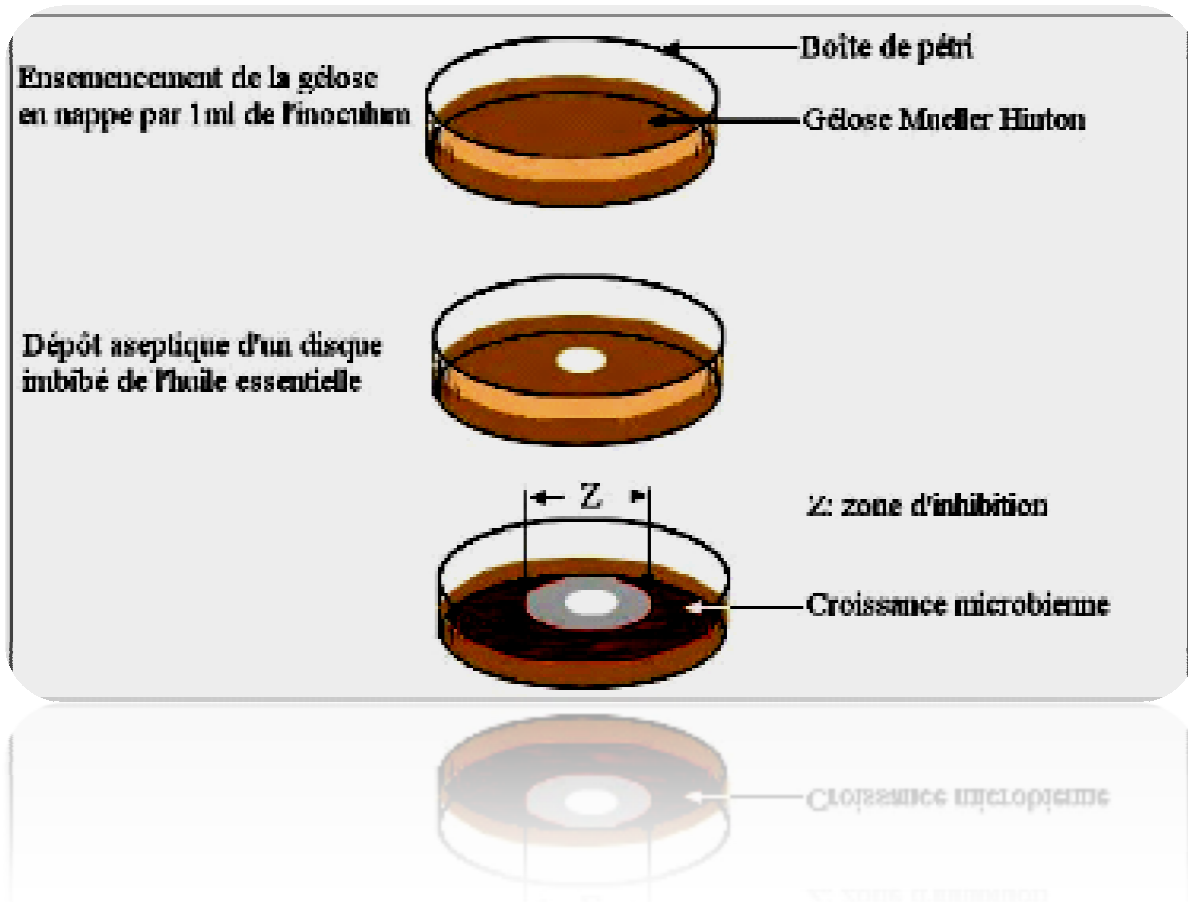


Fig. 20: La méthode d'aromatogramme [50].

## **Résultats et discussion**

### **I-Extractions de l'huile essentielle**

L'étude entreprise sur l'huile essentielle de clou de girofle a donné les résultats consignés dans le tableau 03.

#### **Mode de calcul de rendement**

L'expression de la teneur en huile en pourcentage en masse du produit tel quel est donnée par

$$\text{Rendement \%} = \frac{m1}{m0} \cdot 100$$

Où :

m0 : représente la masse des clous de girofle traitée ;

m1 : masse de l'huile récupérée.

### **II- Caractérisation de l'huile essentielle de clou de girofle**

Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile de clou de girofle, en particulier, la densité relative, les indices de réfraction, d'acide, de peroxyde ainsi que l'indice de saponification ont été déterminés selon des méthodes normalisées par l'AFNOR.

#### **II.1- Caractéristiques organoleptiques**

Une huile essentielle est caractérisée par son aspect, sa couleur et son odeur, c'est à dire ses caractéristiques organoleptiques, qui la différencient des autres huiles.

Ainsi les résultats obtenus après les déterminations sont consignés dans le Tableau 04.



**Tableau 03 : Résultats d'extraction.**

<b>Masse traitée(g)</b>	10	10	10	20	20	20	30	30	30	40	40	40	50	50	50
<b>Volume d'eau (ml)</b>	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
<b>Durée d'extraction (h)</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>Masse d'huile obtenue(g)</b>	1.1175	1.2502	1.1752	2.415	2.5214	2.4985	3.814	3.888	3.7987	4.7248	4.7582	4.812	5.77	5.815	5.525
<b>Rendement (%)</b>	11.175	12.502	11.752	12.075	12.607	12.492	12.713	12.96	12.66	11.81	11.89	12.03	11.54	11.63	11.05
<b>Rendement moyen</b>	11.81			12.39			12.78			11.91			11.407		

### Discussion

L'extraction par hydrodistillation a donné un rendement environ égal à 11 % pour les différentes quantités traitées. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle trouvée par d'autres auteurs, et qui est de 11.21 % dans les mêmes conditions d'extraction [72]. Il est constaté que le rendement le plus élevé est trouvé avec une masse initiale de la matière première de 30 g cela peut être expliqué par le rapport d'entraînement.

**Tableau 04: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de clou de girofle.**

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide mobile	Jaune à jaune pâle	Aromatique, épicée, agréable puissante, avec une odeur Aldehydée.

### Discussion

Les paramètres organoleptiques de notre H.E sont en accord avec ceux rapportés par la littérature.

### II.2- Caractéristiques physiques

La détermination des caractéristiques physiques de l'huile essentielle de clou de girofle a été réalisée au Laboratoire chimie pharmaceutique du Département de Chimie de l'UMMTO. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 05.

**Tableau 05: Caractéristiques physiques d'huile essentielle de clou de girofle.**

Caractéristiques physiques	HE de clou de girofle
Densité relative à 20°C	1.065-1.066
Indice de réfraction $n_{20}^{20}$	1.54-1.56

#### II.2.1- Densité relative à 20°C

Pour tous les essais, les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur ; la densité relative de cette huile étant comprise entre 1.065 et 1.066.

Le clou de girofle fournit une huile d'une densité plus élevée que les autres huiles, puisque elle est légèrement supérieure à 1[32].

La composition chimique (75% à 85% de l'eugénol qui est un composé lourd) pourrait expliquer la densité élevée observée par rapport aux autres huiles.

#### II.2.2- Indices de réfraction à 20°C

Les indices de réfraction mesurés pour cette huile présentent de grandes similitudes (indices compris entre 1,54 et 1,56). Ils sont d'ailleurs tout à fait comparables à ceux trouvés dans la

littérature. Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une faible teneur en monoterpènes donnera un indice faible [65].

## **II. 3- Caractéristiques chimiques**

### **II. 3.1-Miscibilité à l'éthanol**

Utilisant la technique décrite au numéro NFT 75–101 des normes AFNOR, il a fallu mélanger un volume d'éthanol à 96% (V) à température ambiante, pour obtenir une solution limpide avec un demi volume (V/2) de l'huile essentielle de clou de girofle.

### **II. 3.2 –Les indices chimiques**

La détermination des indices chimiques de cette huile selon les méthodes décrites au numéro NFT dans les normes AFNOR a permis d'obtenir les résultats rapportés dans le tableau 06.

**Tableau 06: Indices chimiques de l'huile essentielle de clou de girofle.**

	<b>Indices</b>	<b>Résultats</b>
(1)	acide	1.2
(2)	peroxyde	6.34
(3)	saponification	186

(1) exprimé en mg KOH/g d'huile ; moyenne de 3 essais.

(2) exprimé en méqO<sub>2</sub>/kg d'huile ; moyenne de 3 essais.

(3) exprimé en mg KOH/g d'huile ; moyenne de 3 essais.

#### **II.3.2.1- Indice d'acide**

La valeur d'indice d'acide trouvée est de l'ordre de 1, cette valeur est très faible et révèle le parfait état et la bonne qualité de l'huile extraite.

La quantité d'acides gras libres formée est négligeable traduit la non altération de cette huile. Ceci est sans doute dû aux précautions prises lors de sa conservation. Résultats de leur non dégradation.

Un Ia inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence. Inversement, un Ia supérieur à 2 peut trouver une explication dans la dégradation de l'H.E (hydrolyse des esters) durant sa conservation [65].

### II.3.2.2- Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde mesuré sur cette huile est faible (inférieur à 10 meq/kg d'huile) [66] ; ce qui traduit un état non avancé d'oxydation de notre huile et ce qui confirme bien le parfait état et la bonne qualité d'huile extraite déjà supposé à cause d'un indice d'acide faible.

### II.3.2.3- Indice de saponification Is

La détermination de l'indice de saponification Is a permis d'enregistrer la valeur de 186. En rappelant que la valeur d'Is reflète la longueur de la chaîne des acides gras, on vérifie bien sur le tableau 7 que les huiles à courtes chaînes comme le coton et le palme ont des Is supérieurs à 200, tandis que les huiles à chaînes plus longues comme le soja, l'arachide, le tournesol, et aussi les huiles de grenadille et de courge ont des Is inférieurs à 195 [67].

D'après ces données rapportées dans la littérature (tableau 07) et le résultat obtenu on peut dire que l'huile essentielle de clou de girofle est une huile à chaîne longue.

**Tableau 07 : Indices de saponification d'huiles végétales [76].**

Corps gras	IS	Acides gras majeurs
Huile de coco	256	C12
Huile de palme	200	C16
Huile de soja	192	C18
Huile d'arachide	190	
Huile de tournesol	190	

### II.3.2.4-Contrôle du pH

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 08: Les résultats obtenus confirment la nature « acide » de cette huile.**

Méthodes	Papier pH	pH mètre
pH	3-5	4.25

## Conclusion

Au terme de l'étude des caractéristiques physico-chimiques, il est intéressant de dresser une fiche technique pour cette huile. C'est une démarche nécessaire dans une perspective de commercialisation des huiles. Cette fiche technique est représentée par le tableau récapitulatif suivant :

**Tableau 09 : Données analytiques sur l'huile de clou de girofle.**

Couleur	Jaune à jaune pâle
Densité	1.065-1.066
Indice de réfraction	1.54-1.56
Indice d'acide	1.2
Indice de saponification	186
Indice de peroxyde	6.34

## II.4- Caractérisation chimique

### II.4.1-Analyse chromatographique sur couche mince (CCM)

Pour contrôler la pureté et déterminer le composé majeur d'huile que nous avons obtenue une recherche d'éluant qui pourrait donner la meilleure résolution sur colonne de silice a été entreprise au travers une analyse chromatographique sur couche mince. Après quelques essais le mélange toluène /éthanol (96%) (9/1, V/V) a été retenu pour la séparation des constituants chimiques sur couche mince.

Nous avons obtenus deux taches et les résultats de Rf obtenus après révélation à l'aide de (I2) sont rapportés dans le tableau suivant :

**Tableau 10: les résultats des Rf.**

Expériences	Rf	
1	0.95	0.29
2	0.87	0.31
3	0.88	0.33

## Discussion

L'analyse chromatographique sur couche mince de silice a montré la présence de deux taches ayant des rapports frontaux identiques à ceux rapportées dans la littérature [68].

Cette analyse confirme la présence de deux produits majoritaires dans l'huile essentielle de clou de girofle. Après cette observation, nous pouvons dire que ce que nous avons obtenu par hydrodistillation contenait de l'eugénol (Rf=0.3) et d'acétylégénol (Rf=0.9)

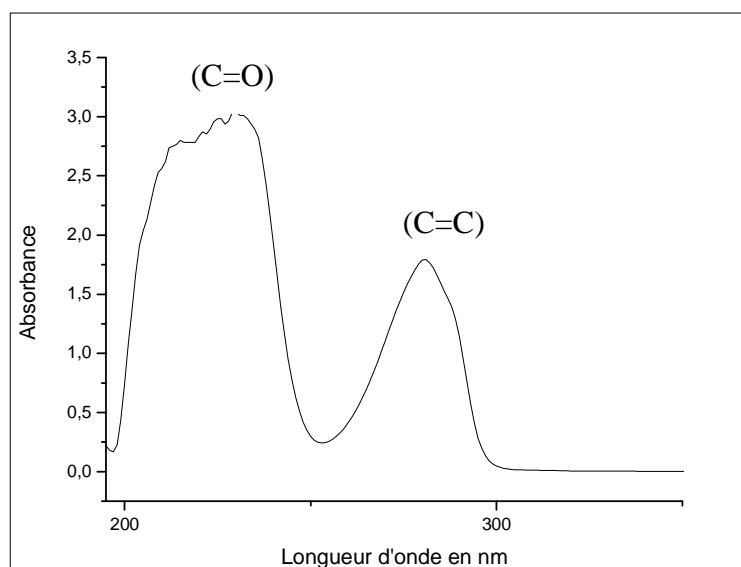
correspondant à la tache supérieure de la plaque de chromatographie). Comme nous n'observons aucune autre tache on peut dire que notre produit était quasiment pur.

#### **II.4.2- Analyses spectroscopiques**

Le produit obtenu a été analysé par les méthodes spectroscopiques suivantes

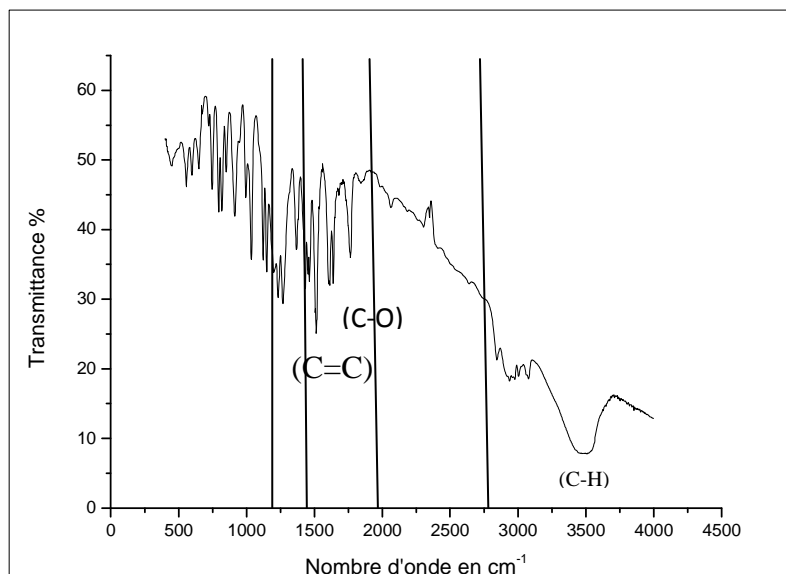
##### **II.4.2.1-Etude en spectroscopie UV/visible**

L'échantillon a été dissout dans l'éthanol (96%) à  $10^{-4}$  M , puis analysé en faisant un balayage sur un intervalle de 200 à 900 nm, nous avons obtenu un graphe qui montre l'apparition de deux bandes ; une qui absorbe entre 200 et 250 nm (fig.21) correspondante à (C=O) et une bande qui absorbe entre 250 et 300 nm correspondante à ( C=C) [79].



**Fig.21 : Spectre UV/vis du l'H.E dans L'éthanol à  $10^{-4}$  M.**

### II.4.2.2- Analyses par spectroscopie Infra Rouge (IR)



**Fig.22 : Spectre IR du l'H.E.**

Nous avons observé (fig.22) une bande large vers  $3500\text{cm}^{-1}$ , sur laquelle se superposent les bandes caractéristiques des liaisons (C-H) des groupements alkyles. La bande représentative de la fonction (C-O) est intense vers  $1760\text{cm}^{-1}$ , Une autre bande apparaît vers  $1700\text{cm}^{-1}$  qui est caractéristique du groupement (C=O) de la fonction ester ou cétone.

D'autres bandes caractérisent les doubles liaisons (C=C) du cycle aromatique sortent entre  $1500\text{cm}^{-1}$  et  $1600\text{cm}^{-1}$ .

Comme on peut diviser ce spectre infrarouge en cinq zones spectrales qui apportent des informations sur les fonctions chimiques des esters d'acides gras :

- la zone  $1200-600\text{cm}^{-1}$  comprend de nombreuses vibrations attribuables aux chaînes saturées et insaturées.
- la zone  $1300-1200\text{cm}^{-1}$  est caractéristique des élongations (C-O),
- la zone  $1500-1300\text{cm}^{-1}$  est caractéristique des déformations (C-H),
- la zone  $1800-1660\text{cm}^{-1}$  correspond aux élongations (C=O) des esters,
- la zone  $3040-2800\text{cm}^{-1}$  est caractéristique des vibrations d'élongations (C-H) pour les chaînes saturés et insaturés.

Il en résulte que la spectrométrie UV-VIS donne relativement peu d'informations qualitatives si on la compare, par exemple, à la spectrométrie infrarouge.

## **II.5- Test d'activité antibactérienne**

### **-Pouvoir antimicrobien**

Il s'agit de déterminer le diamètre d'inhibition selon la méthode d'aromatogramme. Nous avons testé l'effet antimicrobien, sur cinq souches bactériennes et Les résultats expérimentaux sont présentés dans le Tableau 11.

**Tableau 11: Halos d'inhibition (mm) provoqués par l'H.E. des clous de girofle.**

Souches	le diamètre d'inhibition	sensibilité
E. coli	16.5	+++ Très sensible
B. cereus	15.8	+++ Très sensible
S. paratyphi A	12.5	++ : sensible
S. flexneri	12.3	++ : sensible
S.aureus	11	++ : sensible

### **Discussion :**

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que toutes les espèces testées présentent une certaine sensibilité vis-à-vis de l'H.E. des clous de girofle. Cependant, E. coli et B. cereus se sont révélées très sensibles, tandis que S. flexneri, S. paratyphi A et S. aureus se sont révélées sensibles.

Des bactéries Gram - se sont montrées généralement plus résistantes que les Gram + en raison des lipopolysaccharides présents dans la membrane externe, mais ce n'était pas toujours vrai [69].



Les produits naturels sont et restent toujours une source inépuisable de structures complexes et diverses. Ils jouent un rôle important dans de nombreuses applications : la parfumerie, l'industrie pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire. Au cours de ce travail, nous avons constaté que le clou de girofle renferme une quantité d'huile que l'on peut extraire à l'aide de l'hydro distillation avec un rendement de 11 %.

Nous avons pu constater que cette H.E. est composée de deux constituants majoritaires qui sont l'eugénol et l'acétate d'eugényle mais nous n'avons pas pu déterminer les autres composés.

Cette étude nous a permis également d'établir et de déterminer les caractéristiques physico-chimiques ainsi que l'effet antibactérien de cette H.E.

Cette huile est miscible à l'éthanol à 96% (V / V) avec un demi volume de l'huile essentielle. Sa densité est comprise entre 1.065 et 1.066 et son indice de réfraction entre 1.54 et 1.56. La connaissance de ces propriétés est très importante pour apprécier la qualité et le prix des huiles essentielles à mettre sur le marché. Les études chimiques et pharmacologiques des huiles essentielles permettant d'élaborer leur fiche technique qui sont très utiles à la dynamisation de la filière huile essentielle.

Ce travail a permis de nous initier et de nous familiariser aux techniques de laboratoire, aux normes d'hygiène et de sécurité puis surtout à l'étude chimique des substances naturelles, notamment l'extraction et l'identification des huiles essentielles.

Etant donné que cette espèce végétale aromatique n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études en Algérie, pour l'avenir ou la suite de ce travail, il est indispensable de se focaliser sur l'étude de la variabilité de la composition chimique et l'extraction de l'eugénol pur pour toutes ses utilisations possibles notamment la fabrication du ciment dentaire.

## *Références Bibliographiques*

- [1]- **Hurtel J.M. ; (2001)**. Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles ; www.phytomania.com
- [2]- **Laredj H. ; (2004)**. Les plantes médicinales: Extraction des huiles essentielles et activités antibactériennes. Premières journées de pharmacie. Université, Badji Mokhtar - Faculté de Médecine, Annaba (Algérie) ; pp : 17-29.
- [3]- **Garneau François-Xavier ; (2006)**. Le matériel végétal et les huiles essentielles ; Laseve-UQAC ; Chicoutimi (Québec) ; fxgarnea@uqac.ca.
- [4]- **Mayer Florence ; (2012)**. Utilisation thérapeutique des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite. Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie ; université de Lorraine ; page : 22.
- [5]- **Guilhem Jocteur ; (2006)**. Huiles Essentielles : Atouts majeurs dans le conseil à l'officine ; page : 04.
- [6]- **Verreck J.; (2007)**. Journées portes ouvertes à l'ISI de Gembloux (Belgique) de 12 à 15 fév 2007.
- [7]- **Whish J. P. M. and Williams R. R. ; (1996)**. Effects of post harvest drying on the yield of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Journal of Essential Oil Research* ; 8: 47-51.
- [8]- **Roulier Guy;(2001)**. Fabuleuse Amazonie, Ses plantes et huiles essentielles, Éd. Dangles ; pp : 20-24.
- [9]- **Franchomme P., Jollois R. et Pénéol D. ; (1990)**. L'aromathérapie exactement. Roger Jollois, éditeur, Limoges, France ; pp : 44-48.
- [10]- **Silva J., Abebe W., Sousa S.M., Duarte V.G., Machado M.I.L., Matos F.J.A. ; (2003)**. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol* ; 89 : 277-283.
- [11]- **Hellal Zohra;(2011)**. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et anti oxydantes de certaines huiles essentielles des citrus ; mémoire de magister ; page: 03.
- [12]- **Silos Thomas, Marc Malanda, Laurent Loubaki ; (2004)**. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 23. *Journal of Food Engineering* ; 65 : 219–223.
- [13]- **Azevedo N.R., Campos I.F., Fereira H.D., Prtes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C., Paula J.R. & Ferri P.H ; (2001)**. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*; 56: 733-736.
- [14]- **Violaine Chassaing ;(2008)**. L'aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval. Eds ; page: 2, 4.

## *Références Bibliographiques*

- [15]- **Bakkalia. F, Averbek. S, Averbek. D, Idaomar.M.; (2008).** Biological effects of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicology*; 46: 446–475.
- [16]- **Padua L.S., Bunyapraphatsara N., Lemmens R.H.M.J. ; (1999).** Plant Resources of South-East Asia; page: 12.
- [17]- **Piochon M. ; (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: Thèse de doctorat, université du Québec à Chicoutimi, Canada ; page : 25.
- [18]- **Carson C.F. & Riley T.V; (1995).** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl Bacteriol*; 78: 264-269.
- [19]- **Caccionni D., Guizzardi M., Biondi D., Agantio R., Guiseppe R.; (1998).** Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *penicillium digitatum* and *penicillium italicum*. *International J. Food Microbiol* ; 43 : 73- 79.
- [20]- **Franchomme P. ;(1981).**L'aromatologie à visée anti-infectieuse. *Phytomédecine* ; pp: 25-47.
- [21]- **Zakarya D., Fathallah T., Chastrette M. ; (1993).** Use of multifunctional autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds. Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices. *J. Phys. Org. Chem.*; 6(10): 574-582.
- [22]- **Bilgrami K.S. , Sinha K.K & Sinha A.K.; (1992).** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* ; 96 : 171-175.
- [23]- **Chaumont J.P., Leger D. ; (1989).** Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins. Relation structure –activité. *Plant Med. Phyto.* ; 23(2) : 124-126.
- [24]- **Maach A., Jemali A. ; (1986);** Etude des caractéristiques physico-chimiques des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc : Menthe Naa Naa Abdi, Coriandre. IAV Hassan II, Rabat, Maroc ; pp : 25-77.
- [25]- **Blayn J-F ; (1980) ;** Parfums Cosmétique Arômes, N°117.
- [26]- **Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A. ; (2004).** Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymus vulgaris* L. *J. Essent. Oil Res* ; 16(1) : 69-74.
- [27]- **Maach A., Jemali A. ; (1986);** Etude des caractéristiques physico-chimiques des

## *Références Bibliographiques*

HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc: Menthe Naa Naa Abdi,  
Coriandre. IAV Hassan II, Rabat, Maroc ; pp : 85-109.

[28]- **Rouessac F., Rouessac A. ;(1998)**. Analyse Chimique. Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes. Cours et Exercices Résolus, 4ème Eds. Dunod, Paris ; pp : 24-54.

[29]- **Skoog ; (2007)**. Principles of Instrumental Analysis, Eds., Thomson Brooks ; pp 169-173.

[30]- **El Haib Abderrahim;(2011)**. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse doctorat. L'Université Toulouse III (Paul Sabatier) ; page : 8.

[31]- **Meyer-Warnod B.;(1984)**. Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, Perfumer & Flavorist; 9: 93-103.

[32]- **Normes AFNOR ;(1992)**. Recueil des normes françaises. Huiles essentielles. AFNOR, Paris.

[33]- **Gramegn Morchio ;(2004)**. Extraction de l'eugénol. Andrea Biochimie.

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

[35]- **Pavida D.L., Lampman G.M., Kriz G.S.; (1976)**. Introduction to organic laboratory techniques, W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA; page: 567.

[36]- **Moyler D.A.; (1993)**. Extraction of essential oil with carbon dioxide, Flavour and Fragrance Journal; 8: 235-247.

[37]- **Perrut M. ; (2003)**.Extraction par fluides supercritiques. Techniques de l'ingénieur ; J2770.

[38]- **Besombres Colette;(2008)**. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Thèse doctorat de l'université de la Rochelle ; page : 49, 50.

[39]- **Ganzler K., Salgo A., Valko K.; (1986)**. A novel sample preparation method for chromatography Journal of Chromatography A; 371: 299-306.

## *Références Bibliographiques*

- [40]- **Sousa E., Chiavone filho O., Moreno M.T, Silva D.N, Marques M.O.M et Meireles M.A.A. ;(2002).** Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoidescham*. *Brazilian journal of chemical Engineering*. 19 (2): 229-241.
- [41]- **Lawrence B.M. ;( 1980).** Essential oils. *Perfumer and flavorist*; page: 117.
- [42]- **Vinatoru M.; (2001).** An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.
- [43]- **Hromadkova Z., Ebringerova A., Valachovic P.; (1999).** Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of from *Salvia officinalis* L. *Ultrasonics Sonochemistry*; 5: 163-168.
- [44]- **Dubois G.E., Grosby G.A., et Saffron P. ; (1977).** Non nutritive sweeteners: taste structure relationships with for some new dihydrochalcones. *Science* ; 195 : 397-399.
- [45]- **Boelens M.H., Valverde F., Sequeiros L., Jimenez R. ;( 1990).** *ParfumFlavor* ; page : 15, 11.
- [46]- **Lagunez Rivera Luicita; (2006).** Étude de l'extraction de métabolites secondaire de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; These doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse ; pp : 21-47.
- [47] - **Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P.O., Lazurca D., Mason T.J.; (1997).** The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*; 4 : 135-139.
- [48]- **Garnero J.; (1985).** Semipreparative separation of terpenoids from essential oil. *Phytotherapy* ; page : 15, 19.
- [49]- **Derridj A., Ghemouri G., Meddour R., Meddour-Sahar O.; (2009).** Approche ethnobotanique des plantes médicinales en kabylie (wilaya de Tizi Ouzou, Algérie) *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. SIPAM* ; page : 33-45.
- [50]- **Boubrit Souhila ; Baassad Nafaa ;(2007).** Détermination in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande. *Mémoire d'ingénieur en biologie* ; page : 35.
- [51]- **Speck Brigitte, Ursula & Fotsch Christian ; (2011).** *Connaissance des herbes* ; EGK-Caisse de Santé ; [www.egk.ch](http://www.egk.ch).
- [52]- **Auzis ; (2007).** *Madagascar* ; eds petit ; page : 694.

## *Références Bibliographiques*

- [53]- **Pesson et Louveaux ;(1984)** .Pollinisation et production végétales ; édition INRA ; page : 663.
- [54] - **G.-J., Chavanne M., Flamand E., Jullien A. ; (1986)**. Protocoles d'extractions, TP Chimie organique expérimentale. Belin ; page : 02.
- [55]- **Jean Minelle ;(1959)**. L'Agriculture à Madagascar ; eds. Librairie Marcel Rivière et Cie ; page : 3-6.
- [56]- **Bruneton ;(1999)**. Pharmacognosie. Phytochimie - plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Eds. Paris.
- [57]- **Speck Brigitte, Ursula & Fotsch Christian ; (2011)**. Connaissance des herbes ; EGK-Caisse de Santé ; www.egk.ch.
- [58]- **Teuscher E., Anton R., Lobstein A. ; (2005)**. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Ed. Française Tec & Doc., Lavoisier ; page : 110.
- [59] -**Treiner J. (2000)**. Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France ; page : 143.
- [60]- **Beylier-Maurel M.F.; (1976)**.Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. Rivista Italiana. E.P.P.O.S.; 58: 283-286.
- [61]- **Pesce C.; (1985)**. Oil palms and other oil seeds of the Amazon; publications, INC, Michigan; pp: 79-90.
- [62]- **Fauchere J.-L., Avril J.-L. ;(2002)**. Bactériologie générale et médicale. Eds. Ellipses Paris ; page : 365.
- [63]- **Pibiri M.C. ;(2005)**. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorale. Ecole poly technique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse) ; pp : 54-68.
- [64]- **Bachelot Coraline, Blaise Aurélie, Corbel Tanguy et Le Guernic Aurélie ; (2006)**. Les huiles essentielles, extraction et comparaison ; U.C.O Bretagne Nord ; page : 09.
- [65]- **Kanko C. , Sawaliho Be., Kone S., Kone S., Koukoua G., N'guessan YT. ; ( 2004)**. Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ; Comptes rendus Chimie ; 7 : 1039–1042.
- [66]- **Didier Bereau ; (2001)**. Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers Amazoniens. Thèse de doctorat de l'institut polytechnique de Toulouse ; page : 63.

## *Références Bibliographiques*

- [67]- **Rafidimanantsoa Patrice ;(2010)**. Caractérisation de l'huile de Pepins de Passiflora Edulis et de l'huile de Pepins de Pepo ; Mémoire d'ingénieur ; université d'Antananarivo ; page : 63.
- [68]- **Goffard M. ; (2000)**.Huiles essentielles – Extraits naturels ; MENRT, CNDP et GTD de physique-chimie ; page : 27.
- [69]- **Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. (2007)**. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control; 18: 414-420.
- [70]- **Svoboda K.P, Hampson J.B.; (1999)**. Bioactivity of essential oils of selected temperate of aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant biology department, Sac Aucheneruive Ayr. Scotland; pp: 224-232.
- [71]- **Lucchesi ; (2005)**.Extraction sans solvant assisté par micro-ondes .Thèse de doctorat université de la Réunion ; page : 24.
- [72]- **Melle Boleh Hinane ;(2011)**. Valorisation du Rosmarinus Officinales de Kabylie. Recherche de l'effet thérapeutique de l'huile essentielle et des formulations médicamenteuses afférentes mémoire de magistère ; pp : 36-37.
- [73]- **Colette Besombes ; (2008)**. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Thèse doctorat de l'université de la Rochelle ; page : 71.
- [74]- **Anonyme 1 ; (2008)**. [www.websters-online-dictionary.org](http://www.websters-online-dictionary.org)
- [75]- **Anonyme 2 ; (2012)**.[Wikipedia.org/Wiki](http://Wikipedia.org/Wiki)
- [76]- **Aiboud Kamal ; (2011)**.Etude de l'efficacité de quelques huiles essentielles à l'égard de bruche de niébé Callosobruchus maculatus et impacts des traitements sur la germination des grains de Vigna unguiculata ; Mémoire de Magister en Biologie (UMMTO) ; pp : 21.
- [77]- **March Gea Sébastien Cereghetti, Saidi Karim, Swiss Givaudan- Liceo Cantonale Mendrisio S.A. ; (2009)** .Isolation et purification d'une huile essentielle utilisée en parfumerie ; page : 05.
- [78]- **Philippe Galez ; (2011)**. Mesures Physiques Annecy – MPh2 SE3 ME3 – Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible ; pp : 7-17.

## **Les microorganismes utilisés**

### **1- Escherichia coli.**

C'est l'une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine. *Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia* des entérobactéries. Appelée communément "colibacille" c.-à-d. "bacille à côlon", cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram- aérobies. La plupart des *E. coli* se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire et qui se transmet par voie orofécale.

### **2- Salmonella paratyphi A.**

Le genre *Salmonella* est caractérisé par des bacilles à coloration Gram -, non sporulants, la plupart du temps doués d'une mobilité propre grâce à des flagelles péritriches (à l'exception de *Salmonella gallinarum*). La taille des bâtonnets varie entre 2 et 5 µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur. Ils sont aéro-anaérobies. Les *Salmonelles* sont des bactéries de l'intestin. Chez de nombreux sujets, elles peuvent être présentes sans entraîner de symptômes (porteurs sains).

### **3- Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* C'est un coque à Gram+ de 0,5 à 1 µm de diamètre, non sporulé, immobile, aéro-anaérobie facultatif, catalase+, fermentant le glucose. C'est une bactérie ubiquitaire, présente dans tous les milieux naturels (air, poussière, sol, eau, égouts, vêtements) mais également chez les animaux et chez les hommes. C'est le plus régulièrement pathogène, d'origine humaine, animale (volaille, bovin, ovin, caprin...), environnementale ou non spécifique.



#### **4- Bacillus cereus**

Les Bacillus sont des bacilles Gram+, à spore de 1 à 1.2 um de large sur 3 à 7 um de long .Ils sont aéro-anaérobies facultatifs ou parfois aérobies stricts .Les souches de Bacillus cereus sont constituées de bacilles, aux extrémités arrondies, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 um et d'un diamètre moyen de 1,4 um, souvent groupés en chaînes. B. cereus est un germe ubiquiste. Bactérie vivant dans les sols et dans les eaux, peut survivre dans l'environnement sous forme de spores.

#### **5- Shigella flexneri**

Ce sont des entérobactéries à tropisme exclusivement digestif, très proches d'E. coli. Le genre Shigella appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Les Shigella sont des entérobactéries à Gram-, immobiles, qui provoquent des dysenteries bacillaires. Les plus rencontrées sont Shigella flexneri responsable des formes endémiques et S. sonnei. Ce sont des bactéries strictement humaines à transmission féco-orale. Agents d'une maladie diarrhéique aigue à transmission direct (mains sales, porteurs sains...) ou indirect (aliment ou eau de boisson contaminés par les matières fécales).

#### **- Le Milieu de culture :**

**Gélose Mueller-Hinton :** Sa faible teneur en thymine –thymidine « élément inhibiteur de l'activité des sulfamides. » diminue les phénomènes de repousse autour des disques et permet une meilleure détermination des diamètres d'inhibitions.

#### **Composition :**

Formule théorique en g/l d'eau purifiée :

Peptones de viande « Bovin » 2g

Peptones de caséine « Bovin » 17.5g

Fécule de pomme de terre « amidon » 1.5g

Ion Ca<sup>++</sup> 45à75 mg/l

Ion Mg<sup>++</sup> 20à35mg/l

Agar 17g