

République Algérienne Démocratique Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة ابن خلدون - تيارت
Université Ibn Khaldoun – Tiaret



Faculté des Sciences de la Matière
كلية علوم المادة
Département de Chimie
قسم الكيمياء

Mémoire

Présenté par.

Mr TAHAR AHMED
Melle TASSADIAT SOURIA

Pour obtenir le diplôme de
Master II

Filière : Chimie
Spécialité: CHIMIE ORGANIQUE

Sujet :

**Etude de l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire
in vivo de l'huile essentielle de clous de girofle à partir
d'un gel**

Soutenu le : 28/09/2020

Devant le jury:

Mr DEBDAB .M
Mme HENNI .M
Mr SELLES .M
Mme BENNABIL

Président
Examinatrice.
Examineur
Promoteur

Pr
MCB
MCA
MCB

UNIV .Tiaret
UNIV .Tiaret
UNIV .Tiaret
UNIV .Tiaret

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions **Allah** le tout puissant qui nous a donné autant de courage, de volonté, de santé et de patience pour réaliser ce travail.

Nous remercions très chaleureusement notre encadreur **Mme. BENNABI, L**, pour nous avoir proposé cet intéressant sujet de fin d'études et pour ses conseils si précieux, sa gentillesse et sa compréhension tout au long de notre projet. Et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit elle n'est pas seulement notre promoteur mais également notre sœur qui nous a donné l'exemple par ses comportements.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde Gratitude à **Mr SELLES.A** Nous le remercions de nous avoir accueillies au Sein de son laboratoire. Et pour avoir accepté d'être examinateur et membre de jury.

On tient à remercier avec plus grande gratitude **Mr DEBDAB.M** l'honneur qu'il nous fait d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire

On adresse nos sincères remerciements à **Mme HENNI.M** pour avoir accepté d'être examinatrice et membre de ce jury

Mr.BELLARBI directeur du Laboratoire de synthèse et catalyse de nous avoir facilité l'accès à son laboratoire, et son aide considérable
Aussi à **Mr BENNABI.F** MCA au centre universitaire de Ain timouchent

Sans oublier les membres du laboratoire de chimie pour leur Disponibilité, leur sympathie et leur gentillesse, surtout **Mr LARBI .A** ainsi que tous les enseignants qui ont Contribué à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ce mémoire

Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Enfin, nos chaleureux remerciements sont adressés à nos chers parents qui nous ont toujours encouragées dans nos études, et qui nous poussent chaque jour à aller de l'avant.

Un grand merci à tous

Je dédie ce modeste travail

A mon cher père, à ma chère mère, pour leur extrême amour, et leurs incessants encouragements.

Depuis de nombreuses années, ils ont toujours eu foi en moi et n'ont jamais cessé de croire en moi, que DIEU les préserve et leur prête bonne santé et longue vie.

A mes grande Mère, pour leurs prières. Que dieu les sauvegardent.

A mes chers frères et sœurs.

A mes amis qui m'ont toujours soutenu, et encouragé.

A toute la famille «**Tahar** ».

A mon encadrant, aux membres du jury, à tous mes professeurs qui m'ont fait Confiance tout au long de mon cursus universitaire, et qui m'ont fait acquérir des compétences et un savoir dont je serai éternellement reconnaissante.

Tahar Ahmed

Je tiens à dédier ce modeste travail

A mes Parents, merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, la conséquence de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

A mes sœurs et mes frères qui ont toujours été présents pour moi. Merci pour votre encouragement et confiance.

A mes amis qui m'ont toujours soutenu, et encouragé

A toute la famille «**Tassadiat et Lakehal**».

A mon binôme **Tahar** qui a su me soutenir tout au long de la réalisation de notre travail.

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

TASSADIAT SORAYA

Résumé :

Les huiles essentielles sont largement utilisées dans le domaine pharmaceutique, formulées pour une action rapide et efficace, afin de réduire les désagréments quotidiens, parmi les huiles utilisées l'huile de clous de girofle, d'où vient l'intérêt de cette étude qui consiste en premier temps à formuler un emulgel à base de clous de girofle et comparer son action biologique avec l'huile essentielle pur.

L'Etude de L'activité biologique, a révélé que le caractère antioxydant et bactériologique n'a pas été perdu une fois HE formulé dans l'emulgel

Le caractère anti-inflammatoire a été identifié par une étude in vivo en utilisant la caragénine qui été très concluante en donnant, des résultats comparatives avec un anti-inflammatoire d'origine commerciale pour la réduction de l'œdème

Les analyses physico- chimiques sur l'HE ont révèles des similitudes avec la littérature

Mots clés ; HE, clous girofle, emulgel, activité antioxydant, caragénine, anti-inflammatoire

المخلص:

تستخدم الزيوت العطرية على نطاق واسع في المجال الصيدلاني ، وقد تمت صياغتها لعمل سريع وفعال ، من أجل تقليل الإزعاج اليومي ، من بين هذه الزيوت المستخدمة زيت القرنفل ، ومن هنا جاءت أهمية هذه الدراسة التي تركز في البداية على صياغة مستحضر من القرنفل ومقارنة عمله البيولوجي بالزيت العطري النقي.

أوضحت دراسة النشاط البيولوجي أن الصفة المضادة للأكسدة والبيكتريولوجية لم تفقد خلال تركيب EH في emulgel

تم التعرف على الطابع المضاد للالتهابات من خلال دراسة في الجسم الحي باستخدام caragenin والتي كانت حاسمة للغاية في إعطاء نتائج مقارنة مع العقار التجاري المضاد للالتهابات للحد من الوذمة

كشفت التحاليل الفيزيائية والكيميائية ل HE عن أوجه التشابه مع الأدبيات

الكلمات الدالة ؛ EO ، قرنفل ، emulgel ، نشاط مضاد للأكسدة ، caragenin ، مضاد للالتهابات

Abstract

Essential oils are widely used in the pharmaceutical field, formulate for rapid and effective action, in order to reduce the daily inconveniences, among the oils used clove oil, hence the interest of this study which consists first of formulating an emulgel based of cloves and comparing its biological action with pure essential oil.

The Study of Biological Activity, revealed that the antioxidant and bacteriological characters was not lost once HE formulated in the emulgel

The anti-inflammatory character was identified by an in vivo study using caragenin which was very conclusive in giving, comparative results with a commercially occurring anti-inflammatory for the reduction of edema

Physical and chemical analyses of HE have revealed similarities with the literature

Keywords; HE, cloves, emulgel, antioxidant activity, caragenine, anti-inflammatory

Sommaire

1	Introduction générale.....	1
2	Les Huiles Essentielles	2
2.1	Définition.....	2
2.2	Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	2
2.3	Composition des huiles essentielles	3
2.3.1	Les dérivés terpéniques	3
2.3.2	Les composés phénoliques.....	3
2.3.3	Composés d'origine diverses.....	3
2.3.4	Composés issus de la dégradation d'acides gras	3
2.3.5	Composés issus de la dégradation de terpènes:	4
2.4	Techniques d'extractions des huiles essentielles.....	4
2.4.1	Distillation	4
2.4.2	Extraction assistée par micro-onde.....	6
2.4.3	Extraction par solvants :.....	7
2.4.4	Extraction par fluide supercritique	7
2.5	Conservation des huiles essentielles	9
2.6	Toxicité des huiles essentielles	10
2.6.1	Toxicité aigüe.....	10
2.6.2	Toxicité chronique.....	10
2.6.3	Toxicité cosmète-dermique.....	10
2.7	Méthodes de caractérisation des H.E.....	10
2.8	Analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles.....	10
2.8.1	La chromatographie en phase gazeuse (CPG)	11
2.8.2	La spectrométrie de masse	11
2.8.3	Analyse par couplage CPG/SM.....	11
2.8.4	Chromatographie sur couche mince (CCM)	11
2.8.5	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (CLHP).....	12
2.8.6	Notions de base en HPLC	13
2.9	Domaine d'utilisation des huiles essentielles.....	13
2.9.1	En pharmacie	13
2.9.2	Dans l'industrie	14
3	<i>Syzygium aromaticum</i> (Giroflier).....	16
3.1	Histoire de l'épice.....	16
3.2	Origine.....	16
3.3	Description de la plante	16
3.3.1	Description botaniques.....	16

3.3.2	Classification phylogénétique de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i> :.....	18
3.4	Culture.....	18
3.5	Récolte	19
3.5.1	Trois étapes succèdent à la récolte.....	20
3.6	Le stockage	21
3.7	Propriétés et usages	21
3.8	Effet thérapeutiques.....	21
4	Formulation de Gel	23
4.1	Définition.....	23
4.2	Classification	23
4.2.1	Classification générale	23
4.3	Composition.....	24
4.4	Voies d'administration des gels	25
4.5	Usages des gels	25
4.6	Caractéristiques et stabilité des gels	25
4.7	Formulation et caractérisation	26
4.7.1	Gélifiants	26
4.8	Procédés de formulation des gels	27
4.9	Caractérisation des gels	29
4.9.1	Etude des paramètres physico-chimiques.....	29
▪	Aspect	29
▪	Couleur	29
▪	PH	29
4.9.2	Mesure de la viscosité :.....	29
4.9.3	Etude rhéologique.....	29
4.10	Les alginates.....	30
4.10.1	Définition et Formule chimique.....	30
4.10.2	Structure chimique des alginates.....	30
4.10.3	Intérêts et valorisation des alginates	31
4.10.4	Propriétés des alginates.....	31
4.11	L'émulsification	32
4.11.1	Introduction.....	32
4.11.2	Définitions.....	32
4.11.3	Exemples d'émulsions	33
4.11.4	Formulation :	33
	Etude Expérimentale	35
5	Matériels et produits.....	36

5.1	Réactifs et solvants.....	36
5.2	Verrerie	36
5.3	Appareillage	36
6	Etude Expérimentale	37
6.1	Objectifs	37
6.2	Extraction d'huile à partir du clou de girofle.....	37
6.2.1	Choix du matériel végétal	37
6.2.2	Protocole d'extraction des huiles essentielles :.....	37
6.2.3	La conservation de l'huile essentielle.....	38
6.3	Densité relative	39
6.3.1	Mesure de la densité relative selon la (Norme NF T 75 - 111)	39
6.4	L'indice de réfraction.....	40
6.4.1	Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112	40
6.5	Caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	41
6.5.1	Principe de la chromatographie sur couche mince (CCM).....	41
6.5.2	Mode opératoire.....	42
6.6	Préparation de la formulation:	43
6.6.1	L'émulgel :.....	44
6.6.2	Préparation :.....	44
6.6.3	Mode opératoire.....	44
6.6.4	Détermination de type d'émulsion	45
6.6.5	Observation	46
6.6.6	Stabilité à la dilution.....	46
6.7	Les antioxydants.....	47
6.7.1	Définition.....	47
6.7.2	Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants	47
6.7.3	Présentation du test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).....	49
6.7.4	Mode opératoire.....	49
6.7.5	Estimation d'IC50.....	51
6.8	Activité antibactérienne.....	52
6.8.1	Les souches bactériennes.....	52
6.8.2	Préparation des suspensions bactériennes.....	53
6.8.3	Choix des milieux de culture	53
6.8.4	Préparation des disques.....	53
6.8.5	Méthode Antibiogramme	54
6.8.6	Méthode de l'aromatogramme	55
6.8.7	Méthode des puits	56

6.8.8	Méthode des micros -dilution en milieu liquide.....	57
6.8.9	Détermination de la concertation minimale inhibitrice (CMI)	57
6.8.10	Détermination de la concertation minimale bactéricide (CMB)	58
6.9	L'activité anti-inflammatoire	59
6.9.1	Définition des anti-inflammatoires	59
6.9.2	Quelques techniques de test anti- inflammatoires in vivo.....	59
6.9.3	Animaux utilisés.....	59
6.9.4	Conditions d'élevage	60
6.9.5	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	60
6.10	Test de la tolérance cutanée	62
6.10.1	Objectif et principe.....	62
6.10.2	Mode opératoire.....	63
6.10.3	Préparation des animaux	63
	Résultats et discussions	64
7	Résultats et discussions	65
7.1	Les analyses de l'huile essentielle.....	65
7.1.1	Caractéristiques organoleptiques.....	65
7.2	Contrôle de l'emulgel.....	69
7.2.1	Test visuel (macroscopique).....	70
7.2.2	Test microscopique :.....	70
7.2.3	Stabilité à la centrifugation	71
7.2.4	Détermination de PH d'emulgel :.....	72
7.3	Détermination du potentiel antioxydant par le test de réduction du radical stable DPPH :	72
7.4	Evaluation de l'activité antibactérienne	73
7.4.1	Activité antibactérienne des antibiotiques (antibiogramme).....	73
7.4.2	Aromatogramme.....	74
7.4.3	Méthode des puits	75
7.4.4	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :.....	77
7.4.5	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le gel :.....	78
7.4.6	Détermination de la concertation minimale bactéricide (CMB) de gel et huile essentielle	79
7.4.7	Qualification de l'activité antibactérienne d'HE.....	79
7.5	Résultats d'activité anti inflammatoire :.....	81
7.5.1	Résultats test de la tolérance cutanée :	83
8	Conclusion générale	84
9	Référence bibliographiques	85

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents types de molécules qui composent les huiles essentielles. [9]	4
Tableau 2 : Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes d'extraction [61]	9
Tableau 3 : classification phylogénétique du giroflier [60]	18
Tableau 4 : Calendrier de récolte des clous de girofle en fonction du pays producteur. Les zones vertes correspondent aux périodes de récolte. [39]	19
Tableau 5 : Classification des gels [47]	24
Tableau 6 : Agents gélifiants usuellement utilisés. [53]	27
Tableau 7 : Méthodes de préparations des gels [54]	28
Tableau 8 : représente les 2 types d'émulsion simple	32
Tableau 9 : représente Exemples d'ingrédients de la phase huileuse [58]	34
Tableau 10 : Les réactifs et les solvants employés sont cités dans le tableau suivant	36
Tableau 11 : résultat des différent masses	39
Tableau 12 : les deux tests de la solubilité d'émulsion dans l'eau et huile (figure 21) la solubilité dans l'eau et (figure 22) la solubilité dans huile.	46
Tableau 13 : Les différentes méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant [72]	48
Tableau 14 : la différente concentration et leur % inhibition	51
Tableau 15 : les souches bactériennes qui ont été testé.	52
Tableau 16 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés [85]	53
Tableau 17 : Les différents disques d'antibiotiques utilisés.	55
Tableau 18 : Quelques méthodes de tests anti-inflammatoires in vivo	59
Tableau 19 : Caractéristiques organoleptiques [95]	65
Tableau 20 : Résultats des 6 extractions de l'HE de clou de girofle.	66
Tableau 21 : Résultat de la densité	67
Tableau 22 : Résultat de l'indice de réfraction	68
Tableau 23 : résumé du résultat de la CCM	69
Tableau 24 : différent test visuel	70
Tableau 25 : Aspect de gel dans la centrifugation	71
Tableau 26 : Observation d'aspect de l'émulgel émulsions, et instabilités éventuelles après 1h	72
Tableau 27 : les résultats de sensibilité et diamètre mesure par la méthode de	74
Tableau 28 : résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle clou girofle Réalisé par la méthode de diffusion sur disque	74
Tableau 29 : résultats de l'aromatogramme pour huile essentielle dilue de clou de girofle ...	75
Tableau 30 : résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle clous girofle et de gel Réalise par la méthode de puits	76
Tableau 31 : Résultats d'activité antibactérienne d'huile essentielle de clou girofle Réalisé par la méthode de CMI	77
Tableau 32 : résultats d'activité antibactérienne de gel à Besse d'HE de clou girofle Réalisé par la méthode de CMI	78
Tableau 33 : les résultats de CMI d'huile essentielle de clous de girofle et le gel à base de clou de girelle	79
Tableau 34 : les résultats de CMB d'huile essentielle de clous de girofle et gel à Besse de clou de girofle	79
Tableau 35 : Le rapport CMB/CMI d'HE clous de girofle relatif aux quatre souches bactériennes	80

Tableau 36 : Le rapport CMB/CMI gel a Besse d'HE clous de girofle relatif aux quatre souches Bactériennes	80
Tableau 37 : Résultats d'observation après 24h et 48h	83

Liste des figures

Figure 1: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation [12]	5
Figure 2: Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau[13]	5
Figure 3 : Montage d'hydro diffusion[14].....	6
Figure 4 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes [11]	7
Figure 5 : Schéma de la technique d'extraction par le CO2 supercritique [19]	8
Figure 6 : Allure d'un giroflier de Madagascar[35]	17
Figure 7: Structure du Giroflier[21]	17
Figure 8: Fleur de giroflier[21]	17
Figure 9 :Egriffage des clous après la récolte[41].....	20
Figure 10 : Séchage des clous sur des nattes à Madagascar [43]	20
Figure 11 : Structure chimique des acides uroniques présents dans l'alginate [59].....	30
Figure 12 : les différents blocs de l'alginate.[59].....	30
Figure 13 : Émulsion huile dans eau[58].....	33
Figure 14 : Émulsion eau dans huile[58].....	33
Figure 15 : clous de girofle (giroflier) [62]	37
Figure 16 : Montage de l'hydro distillation (original).....	38
Figure 17:Pycnomètre.....	39
Figure 18 : Le réfractomètre	40
Figure 19 : Dépôts des échantillons	43
Figure 20: Test de deux colonats sur l'emulgel.....	45
Figure 21 : la solubilité dans l'eau.....	46
Figure 22 : la solubilité dans huile.....	46
Figure 23 :Principe du test DPPH [74]	49
Figure 24: Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle clous de girofle par la méthode du DPPH [75]	50
Figure 25 : Solution de DPPH du violet en jaune en fonction de la concentration	51
Figure 26 : solution méthanoïque DPPH	51
Figure 27 : Photographie de l'injection de la carragénine	60
Figure 28 : Photographie de l'injection de l'anti inflammatoire. (Original)	61
Figure 29 : application du gel sur la patte de lapin après deux heures	61
Figure 30 : Photographie représentant la mesure de la patte avec un pied à coulisse. (Original)	62
Figure 31 : Lapin après épilation	63
Figure 32 : 24 heures après l'application de gel.....	63
Figure 33 :48 heures après l'application de gel.....	63
Figure 34 : Les résultats des différents rendements en H.E. des différentes extractions	67
Figure 35 : Observation de la plaque CCM sous lampe UV.	69
Figure 36 : Test microscopique une goutte de gel.....	70
Figure 37: après 10 min dans la centrifugation	71
Figure 38 : après 5 min dans la centrifugation	71
Figure 39 : après 30 min dans la centrifugation	71
Figure 40 : mesure de PH par papier ph.....	72
Figure 41 : pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration l'huile essentielle clous de girofle	72

Figure 42 :Représentation graphique de diamètre d'inhibition L'huile essentielle clou girofle pur Et l'huile essentielle dilue aux souches bactériennes.	75
Figure 43 : Représentation graphique de diamètre d'inhibition L'huile essentielle clou girofle Et gel relative aux souches bactériennes	76
Figure 44 : Représentation graphique des CMI de L'huile essentielle clou girofle Relative aux souches bactériennes.	77
Figure 45 : Représentation graphique des CMI de gel a base HE clou girofle Relative aux souches bactériennes.....	78
Figure 46 : Représentation graphique de différent poids des lapins pendant les 15 jours.	81
Figure 47 : Représentation Graphique d'évaluation du diamètre (mm) de la patte en fonction des heures.....	82
Figure 48 : Graphe représentant les % d'augmentation de l'œdème	82
Figure 49 : représente la patte après inflammation (Original	82
Figure 50 : représente la patte avant inflammation	82
Figure 51 : Graphe représentant les % d'inhibition de l'œdème	83

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC: American Type Collection Culture

C : Carbone

°C : Degré Celsius

C : Concentration (mole.l⁻¹).

CCM: Chromatographie sur couche mince

CE₅₀ : Concentration Efficace à 50%

CLHP : Chromatographie Liquide A Haute Performance

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

cm: Centimètre

CPG : Chromatographie En Phase Gazeuse

DL₅₀ : Dose Létale à 50%

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH: Diphenylpicrylhydrazine

E.Coli: Escherichia coli

GC/MS: Gas chromatograph/ mass spectrometer

HE: Huiles Essentielle

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

MH: milieu de Mueller Hinton

MHB : Bouillon Müller-Hinton

Mm : Millimétré.

ml : millilitre.

PH : Potentiel Hydrogène

P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa

S. aureus : Staphylococcus aureus

tr/min : tour par minute

T° : température

R(%): Rendement (%).

µl: microlitre

V (L) : volume de la solution

UV- Visible: Ultraviolet visible.

1 Introduction générale

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique, de défense et d'adaptation de l'organisme contre toute agression qui entraîne une immunité progressive selon l'âge et le patrimoine génétique de l'individu.

Cependant, dans certains cas, face à l'agressivité de l'agent pathogène ou encore de la régulation anormale du processus inflammatoire le corps réagit mal d'où la nécessité de faire appel à des anti-inflammatoires, dont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont largement utilisés soit par voie orale ou cutanée sous forme de gel ou emulgel, dans les deux contextes les plus répondus chez nous : la prescription médicale ou l'automédication. Entraînent dans certains cas. Des effets indésirables, et dont certains sont potentiellement graves.

La très forte consommation des AINS surtout dans le contexte d'automédication, a orienté notre travail puisque nous avons pensé à réaliser un emulgel à base d'huile essentielle de clous girofle qui est connu pour ses propriétés anti-inflammatoire, anti-oxydante et anti-bactérienne. De nos jours, ,

l'aromathérapie a su exploiter les huiles essentielles comme agents thérapeutiques principaux pour traiter les maladies , la médecine a toujours favorisée l'utilisation des matières naturelles pour la formulation de certains médicaments tout en contrôlant le coté allergisant des huiles essentielles , afin d'exploiter le potentiel biologique du clous de girofle qui est utilisé dans de nombreux domaines notamment dans les cabinets dentaires ,comme analgésique ou culinaire comme une épice aromatisant dans certains plats , il possède aussi des propriétés biologiques très attrayantes d'où l'intérêt que porte cette étude sur le clous de girofle

L'objectif de ce travail est de formuler un emulgel à usage topique à base d'huile essentielle de clous de girofle et d'étudier leurs activités biologiques : antioxydants, antibactérienne, et anti-inflammatoires

Le mémoire se structure comme suit : La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres. Dans un premier chapitre, des généralités sur les huiles essentielles. Dans un second chapitre, une présentation botanique de la plante étudiée « *Syzygium aromaticum* » et ses propriétés biologiques majeures. Le dernier chapitre traite sur les différentes formes de gels et leurs applications .la seconde partie : comporte la partie expérimentale dans laquelle, les méthodes employées sont d'abord décrits. Les résultats obtenus sont ensuite présentés et discutés, une étude biologique, ainsi que une étude in vivo sur l'activité anti-inflammatoire de l'emulgel. Notre mémoire sera clôturé par une Conclusion et perspective.[76]

Etude Bibliographique

Les Huiles Essentielles



2 Les Huiles Essentielles

2.1 Définition

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne (01-2008 : 2098) : une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition»[1]

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ses composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante et au fait qu'elles soient inflammables [2]

2.2 Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont produites dans le protoplasme cellulaire des plantes aromatiques et représentent les produits du métabolisme secondaire [3]. La synthèse et l'accumulation de ces métabolites dans les organes sont associées à la présence de structures histologiques spécialisées : cellules sécrétrices. Les cellules sécrétrices sont rarement isolées, mais le plus souvent regroupées dans des poches (Myrtaceae, Rutaceae) dans des canaux sécréteurs (Apiaceae, Composeae) ou dans des poils sécréteurs (Lamiacées). Ces cellules sont le plus souvent à la périphérie des organes extérieurs de la plante [4].

La partie de la plante utilisée pour obtenir l'huile essentielle doit être précisée, soit pour des questions de rendement (par exemple : la fleur de lavande contient beaucoup plus d'huile essentielle que la tige), soit parce que la composition chimique de la partie considérée conduira à une application spécifique très intéressante (c'est le cas d'oranger amer (*Citrus aurantium*, Rutaceae): l'épicarpe frais du fruit fournit l'essence de Curaçao utilisée pour confectionner des cocktails, les fleurs fournissent l'huile de Néroli (eau de fleur d'oranger amer), les feuilles et les petits rameaux fournissent l'essence de petit grain de bigaradier).

Sur le plan quantitatif, les teneurs en huiles essentielles des plantes pouvant les contenir sont très faible, souvent inférieur à 1%. Des teneurs fortes comme celle du bouton floral du giroflier (15 %) sont rares et exceptionnelles [3- 4].

2.3 Composition des huiles essentielles

Les H.E constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses [5]. Cette composition peut varier d'une dizaine jusqu'au plus de 300 constituants [6]. (H.E 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 [7]. 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 [8].

2.3.1 Les dérivés terpéniques

Les composés de type terpénique sont largement rencontrés dans les huiles essentielles. Bien que les hydrocarbures terpéniques aient des structures très diverses, ils sont formés d'un multiple pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ou appelé encore Isoprène.

Les terpènes le plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée telles que les mono et les sesquiterpènes [9].

2.3.2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Souvent, ils sont des allyles, des propénylnénols et parfois des aldéhydes, on peut également retrouver des composés en C_6-C_1 comme la vanilline de la Vanille [10].

2.3.3 Composés d'origine diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles, ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits, selon leurs origines biosynthétiques [11]

2.3.4 Composés issus de la dégradation d'acides gras

La formation d'acide an C_9 ou C_{12} et ultérieurement des alcools d'aldéhydes et
De faible masse moléculaire

2.3.5 Composés issus de la dégradation de terpènes:

Les terpenes cétones en C₁₄ sont des produits de dégradation caractéristique [9]

Tableau 1: Différents types de molécules qui composent les huiles essentielles. [9]

Diterpènes Phytol	C ₁₀ H ₄₀ O
Alcools Géranol Linalool	C ₁₀ H ₁₇ OH C ₁₀ H ₁₇ OH
Aldéhydes Citral Cuminaldéhyde	C ₁₀ H ₁₆ O C ₁₀ H ₁₂ O
Cétones Camphor Carvone	C ₁₀ H ₁₆ O C ₁₀ H ₁₄ O
Phénols Thymol Eugénol	C ₁₀ H ₁₄ O C ₁₀ H ₁₂ O
Oxides 1.8-Cineol Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O C ₁₀ H ₁₈ O

2.4 Techniques d'extractions des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matière végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les H.E, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

2.4.1 Distillation

Il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydro distillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau [10]

2.4.1.1 Hydro distillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'H.E se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité. L'H.E étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysate (figure 01).

Cependant, l'hydro distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques [11]

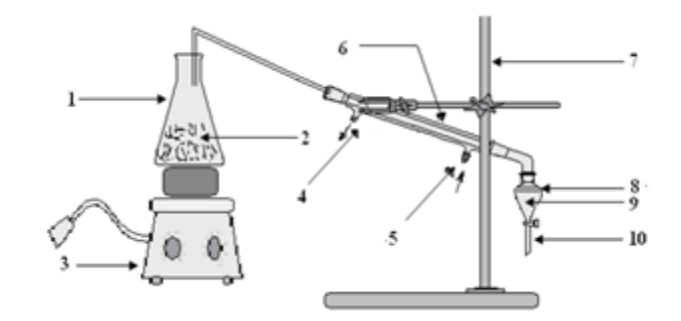


Figure 1: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation [12]

- | | |
|-----------------------|------------------------------|
| 1. Erlenmeyer | 6. Réfrigérant |
| 2. l'eau + la plante | 7. Le support de réfrigérant |
| 3. chauffe-ballon | 8. L'huile essentielle |
| 4. la sortie de l'eau | 9. L'eau aromatique |
| 5. l'entrée de l'eau | 10. L'ampoule à décompter |

2.4.1.2 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (figure:02). La Vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques.

De plus, l'hydro diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur

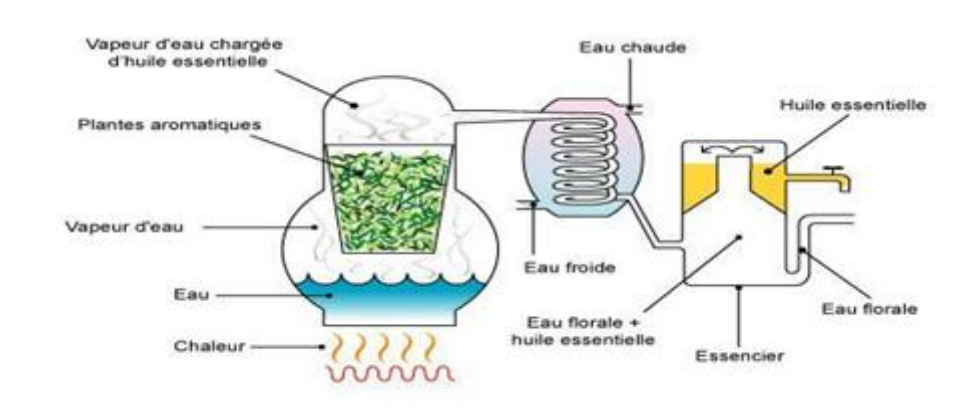


Figure 2: Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau [13]

2.4.1.3 Hydro-diffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (perdescendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale.

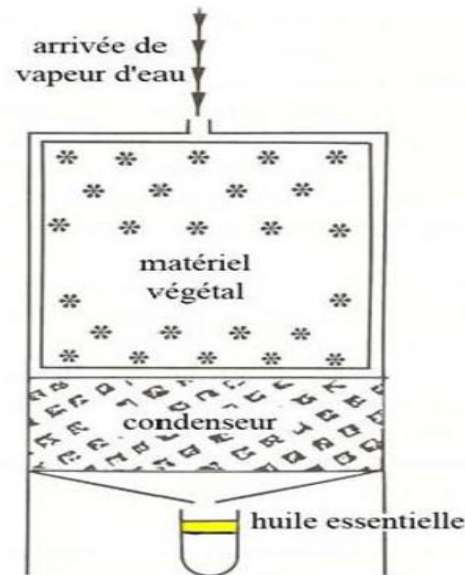


Figure 3 : Montage d'hydro diffusion[14]

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale : « essence de percolation »[15] De plus, l'hydro diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

2.4.2 Extraction assistée par micro-onde

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé [16].

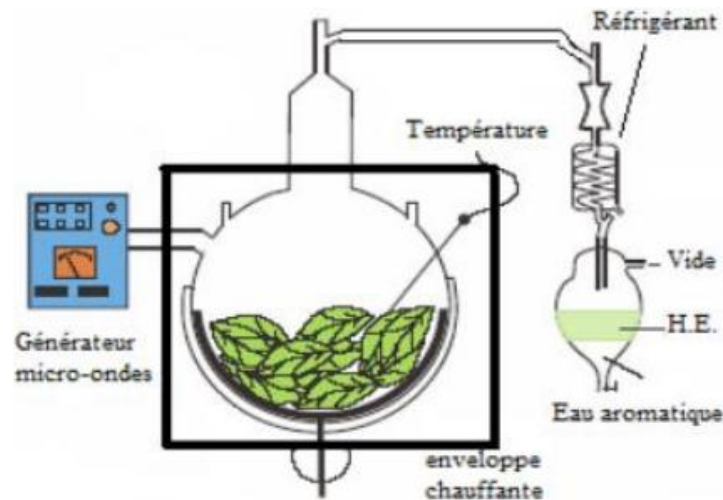


Figure 4 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes [11]

Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite.

2.4.3 Extraction par solvants :

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu.

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite.

L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool [17]. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants.

Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) Peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure. [18]

2.4.4 Extraction par fluide supercritique

Extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (figure.05). En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y'est réduit.

Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ($P= 73,8$ bars, $T^{\circ}= 31,1^{\circ}\text{C}$), le CO_2 possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction [10]

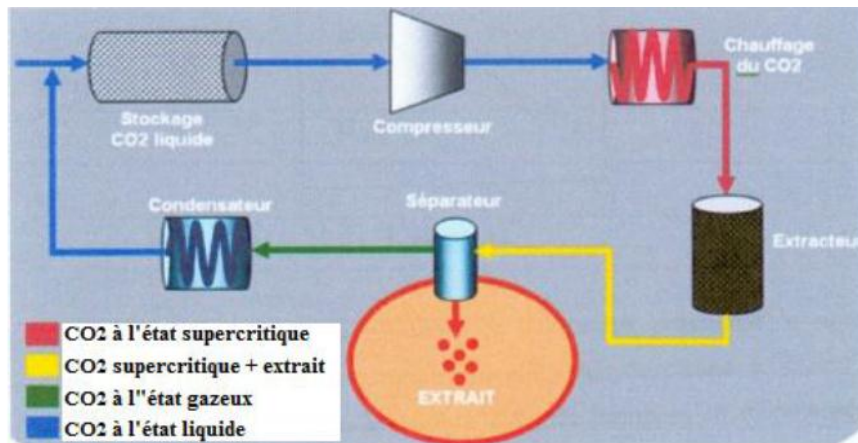


Figure 5 : Schéma de la technique d'extraction par le CO_2 supercritique [19]

Les Huiles Essentielles

Tableau 2 : Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes d'extraction[61]

Méthodes	Avantages	Inconvénients
L'hydrodistillation	-Rendement plus grand.	-le temps d'extraction plus Long. -Plus grand quantité d'eau. -Hydrolyse des composés non saturé. -pertes de quelques composés Volatils.
L'entraînement à la vapeur d'eau	-Rendement acceptable. -Pas des réactions d'hydrolyse.	-
L'extraction par micro-onde	-moins d'énergie. -plus effectives que les composés oxygénés. -le temps d'extraction est très court.	-
Extraction au Soxhlet	-Rendement plus important Par rapport aux autres Méthodes.	-grand volume de solvant. -long temps de l'opération a exigé (plusieurs heures). -reste des solvants toxique dans l'extrait. -dégradation les composés non saturé.

2.5 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se conservent plusieurs années. Elles ont même tendance à se bonifier avec le temps (à l'exception des huiles essentielles extraites des zestes d'agrumes qui ne se conservent pas plus de 2 ans).

Il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre ambre ou foncé, de manière à les protéger de la lumière, il faut éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air, il faut bien refermez les flacons après usage car les arômes s'évaporent dans l'atmosphère.

Tenir les flacons hors de portée des enfants. Les flacons doivent être stockés en position verticale, en position horizontale, il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (lesion corrosive sur le plastique). Dans ces conditions, les huiles essentielles se conservent plusieurs années [20].

2.6 Toxicité des huiles essentielles

2.6.1 Toxicité aiguë

Par voie orale les HE ont une toxicité aiguë très faible. La DL₅₀ de la cannelle, de et du girofle est comprise entre 2 et 5 g/kg.

La toxicité des huiles est souvent due aux produits phénoliques à l'origine d'atteintes nerveuses et de nécroses hépatiques [21]

2.6.2 Toxicité chronique

Elle est rarement rencontrée, en raison même des protocoles phytothérapeutiques appliqués. Les doses journalières administrées sont très faibles, mais leurs accumulations hépatiques, rénales et pulmonaires peuvent provoquer une toxicité au niveau de ces organes [21]

2.6.3 Toxicité cosmète-dermique

Le large usage que la parfumerie et l'industrie des cosmétiques font de ces huiles essentielles, a suscité de très nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aiguë, chronique) par application locale, leur pouvoir irritant (Cannelle, thym, etc.), sensibilisant (Cimma aldéhyde) ou photo toxique. Les résultats ont confirmé qu'elles sont irritantes pour la peau et les muqueuses [22].

2.7 Méthodes de caractérisation des H.E

La détermination de la composition chimique des H.E est une étape importante malgré le développement des méthodes de séparation et d'identification. Elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

2.8 Analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles

L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes nous parlons sur les méthodes micro analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces.

Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse de structures chimiques.

2.8.1 La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

C'est une méthode d'analyse qualitative et quantitative des mélanges complexes de composés gazeux ou susceptible d'être vaporisé sans décomposition [23]

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte: phase mobile (H₂, N₂, Hélium...).

La CPG est basée sur la répartition du produit analysé entre la phase gazeuse mobile et une phase liquide ou solide stationnaire. Les substances séparées sont affichées sur le chromatogramme, et chaque pic est caractérisé par un temps de rétention et une surface permettant ainsi de déterminer l'identité et le pourcentage de chaque constituant[24]

2.8.2 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (mass spectrometry ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).[25]

2.8.3 Analyse par couplage CPG/SM

Le couplage CPG/SM est la technique de référence dans le domaine des HE, elle permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse de différents constituants d'un mélange Complexe [24]. Elle fournit un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectre de masse correspondant à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification de la majorité des constituants séparés par la CPG [26].

2.8.4 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-iodure ou encore par observation à la lumière UV si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence.[27]

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

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

- 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.

2.8.5 Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (CLHP)

La chromatographie liquide à haute pression (le terme haute performance est également employé), elle est souvent appelée du nom de son abréviation CLHP, ou HPLC (High performance liquide chromatography) en anglais [28]

Cette chromatographie est une technique de séparation analytique et préparative des molécules, elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un composé ou un mélange de composés. Elle dérive d'ancienne chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées

grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées [29].

L'HPLC est une technique analytique en croissante évolution pour l'analyse des médicaments. Sa simplicité, haute spécificité et large intervalle de sensibilité, font que cette méthode soit l'idéale pour le dosage des formes pharmaceutiques et des fluides biologiques [30].

Principe

La chromatographie liquide haute performance est une technique utilisée pour séparer des composés chimiques dans un mélange. Son principe repose sur la séparation de ces composés dans une colonne contenant du gel de silice, appelée phase stationnaire, par pompage d'un solvant, appelée phase mobile, à travers la colonne selon l'affinité unique de chaque composant existant entre la phase mobile et stationnaire. Les composés migrent le long de la colonne à différentes vitesses et ressortent à différents temps, établissant ainsi une séparation du mélange. Les composés qui ont une grande affinité envers la phase mobile migrent plus rapidement vers le bas de la colonne, tandis que ceux qui ont une grande affinité envers la phase stationnaire migrent lentement[31].

2.8.6 Notions de base en HPLC

Un système chromatographique est composé de :

- Soluté (éluant, substrat).
- Phase mobile (éluant, solvant).
- Phase stationnaire (support).

2.9 Domaine d'utilisation des huiles essentielles

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que: [32]

2.9.1 En pharmacie

Les HE peuvent être utilisés comme:

- L'aromatisation des médicaments destinés à la voie orale.

- Pour leurs actions physiologiques (Menthes, Verveine, Camomille).

2.9.2 Dans l'industrie

Parfumerie et cosmétologie

De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines HE constituent des bases des parfums.

Exemples: Rose, Jasmine, Vétiver, Ylang-ylang, etc....

*"SYZYGIUM
AROMATICUM"*



3 *Syzygium aromaticum* (Giroflier)

3.1 Histoire de l'épice

On trouve la trace des clous de girofle dans des temps très anciens et tout au long des siècles. Un livre de médecine ayurvédique (médecine indienne) datant d'environ 1500 ans av. J-C aurait le premier décrit des clous de girofle et des traces en auraient même été retrouvées sur le sol d'une cuisine incendiée du site mésopotamien de Terqa (Syrie) daté de 1700 av. J-C. Au IIIème siècle av. J-C, les clous de girofle étaient importés en Chine : les courtisans devaient en avoir en bouche pour purifier leur haleine avant de voir l'empereur. Apicius consacre le triomphe des épices dans le livre "De re coquinaria" ou "de l'Art Culinaire", paru au IIIème ou IVème siècle, ouvrage dans lequel les clous de girofle sont intégrés dans la liste des épices indispensables dans une maison.

Au IVème siècle, l'empereur romain Constantin le Grand en apporta au Pape Sylvestre, mais le commerce des clous de girofle ne s'est réellement développé dans les régions méditerranéennes qu'entre le IVème et le VIIème siècle, grâce aux Arabes qui les importaient. Au XVIème siècle, les Portugais, débarqués aux îles Moluques, tentent d'en organiser seuls le commerce. Au siècle suivant, les Hollandais prennent le relais. Les clous de girofle seront introduits en terre française à partir du XVIIIème siècle sur l'île Maurice puis en Guyane et à Madagascar, à l'initiative de l'agronome Pierre Poivre, qui organisa des expéditions sur les îles Moluques pour importer des plants et ensuite adapter leur culture. [33]

3.2 Origine

Le Giroflier, est un arbre tropical appartenant à la grande famille des Myrtacées, originaire d'Indonésie, dans la partie sud des Philippines et les îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du Sud (Madagascar, Brésil, Zanzibar), principalement dans des pays tropicaux. Les clous de girofle sont les boutons floraux séchés de l'arbre (giroflier). Il produit des fleurs à partir de six ans et peut vivre jusqu'à 150 ans. [34]

3.3 Description de la plante

3.3.1 Description botaniques

Le giroflier est un grand arbre au tronc gris clair de 12 à 15 mètres de hauteur pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de haut (figure06) Il présente un port érigé et pyramidal.

Syzygium aromaticum (Giroflier)

Son feuillage est aromatique, coriace, persistant vert sombre et vernissé au revers plus clair. Ses feuilles sont opposées, entières, elliptiques, d'environ 10-12 cm à nervure médian marquée et parsemées de glandes sur le revers.



Figure 6 : Allure d'un giroflier de Madagascar[35]

Les fleurs sont disposées en cymes terminales (figure 07) de 25 fleurs environ, formant 3 fourches (figure08) .Elle se présente sous la forme d'un long pédoncule, petite fleur à l'extrémité des rameaux, à 4 pétales (blanc-rosé) pompon Duveteux d'étamines blanches saillantes, les fleurs à 4 pétales blanc rosé sont caractérisées par leurs sépales rouges.



Figure 7: Structure du Giroflier[21]



Figure 8: Fleur de giroflier[21]

Ce sont les boutons floraux cueillis avant épanouissement que l'on appelle les clous de girofle et l'huile essentielle qui est utilisés pour leurs vertus thérapeutiques ; Les fruits du giroflier sont des baies pourpres comestibles. [36]

La récolte des clous de girofle se fait au moment où ils contiennent le plus d'essence (Lorsque 'ils sont roses et les pétales pas encore ouverts). Ces clous sont récoltés, après 6 à 8 ans de culture de l'arbre, 2 fois par an. Ce sont des boutons auxquels on ôte le pédicelle manuellement et que l'on met sécher au soleil jusqu'à ce qu'ils deviennent brun rouge.

Boutons floraux appelés « clous ».

Syzygium aromaticum (Giroflier)

Les racines, les rameaux, les feuilles les fleurs et les fruits contiennent tous une HE dont la composition diffère. Par exemple l'HE des feuilles contient seulement 2 à 3 % d'eugénol. L'huile essentielle de girofle provient de la distillation des boutons de giroflier traité à la vapeur [37].

3.3.2 Classification phylogénétique de l'espèce *Syzygium aromaticum* :

Tableau 3 : classification phylogénétique du giroflier [60]

Règne	Plantae (= plantes)
Classe	Equisetopsida (= équisétophytes sphénophytes),
Sous-classe	Magnoliidae
Super ordre	Rosanae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry

3.4 Culture

Syzygium odoratum nécessite humidité, chaleur et forte luminosité. Il apprécie un sol riche et limoneux. Son développement en vue d'une récolte productive de clous ou de feuilles demande une température moyenne de 22 °C.

En France, il sera le plus souvent cultivé dans un large pot, le plus souvent en intérieur, serre tropical ou véranda. Il peut tout de même supporter de brèves et courtes gelées.

Lors d'une culture en intérieur, le manque d'aération le rend un peu plus sensible aux attaques fongiques, d'autant qu'il apprécie une atmosphère très humide (jusqu'à 80 % d'humidité). C'est pourquoi, il lui faut un sol plus drainant qu'en culture de plein air : une couche drainante au fond du pot, puis au-dessus, du terreau riche ou du compost bien décomposé

Le sol ne doit jamais se dessécher. Les arrosages sont donc très réguliers.

Le giroflier est une belle plante, mais un peu délicate à cultiver. Ses racines ne supportent pas les perturbations. Chaque repotage nécessite de démouler la terre sans casser la motte. Si un plant mature ne fleurit pas, c'est qu'il manque de lumière. [38]

Syzygium aromaticum (Giroflier)

3.5 Récolte

Le moment le plus favorable à la récolte est déterminé par la couleur rosé du clou de girofle. Cueillis trop tôt, les clous n'auront pas la teneur suffisante en essence, et trop tard, les fleurs seront épanouies (sans pétales). Etant donné que les clous n'arrivent pas à maturité de façon simultanée (les Branches basses fleurissent plus tôt que les branches hautes), il faut procéder à plusieurs passages pour un même arbre. [39]

Le giroflier donne des clous à partir de la 5^{ème} année. Autour de la 8^{ème} année, la récolte est exploitable, mais le giroflier n'atteindra sa pleine production qu'à 20 ans. Un giroflier peut Produire pendant 75 à 80 années, et ces vieux arbres peuvent donner 50kg de clous frais par an. [40]

La période de récolte diffère selon les zones de production. A Madagascar, les clous sont récoltés d'octobre à janvier, quand ils sont bien roses et qu'ils contiennent le maximum d'essence. A Zanzibar, il y a deux cueillettes annuelles : de Juillet à septembre et de décembre à Janvier, du fait que le Giroflier y fleurisse deux fois par an (tableau 4.) [41]

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

Tableau 4 : Calendrier de récolte des clous de girofle en fonction du pays producteur. Les zones vertes correspondent aux périodes de récolte.[39]

	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout	Sept	Oct	Nov	Déc
Indonésie												
Madagascar/Comores												
Zanzibar												
Sri Lanka												

La cueillette se fait à la main, puis les clous sont séparés des griffes. Les clous roses vont sécher pour permettre leur conservation : 35kg de clous frais donnent 10kg de clous secs. Ils seront alors prêts pour la distillation[41]

3.5.1 Trois étapes succèdent à la récolte

3.5.1.1 L'égriffage

Le soir même, les clous (à gauche sur la figure 09) sont séparés des griffes (à droite sur la figure 09)



Figure 9 :Egriffage des clous après la récolte[41]

3.5.1.2 Le séchage

Les griffes et les clous sont séchés séparément au soleil sur des nattes végétales pendant 2 ou 3 jours afin de les conserver dans de meilleures conditions. Cela permet de favoriser l'inhibition de toute activité enzymatique après la récolte, et d'éviter la dégradation de certains constituants ainsi que la prolifération microbienne[42]



Figure 10 : Séchage des clous sur des nattes à Madagascar [43]

3.5.1.3 Le vannage

Cette étape permet d'éliminer les dernières impuretés à l'aide d'un van (sorte de panier percé de petits trous).

Les feuilles peuvent, quant à elles, être cueillies toute l'année. Mais si un arbre est destiné à produire des clous, les feuilles ne se seront pas récoltées sur celui-ci .Il existe des arbres à clous ; et des arbres à feuilles

3.6 Le stockage

Les clous et les griffes doivent être séchés avant d'être stockés. Ce stockage permet la vente de la récolte tout au long de l'année. En ce qui concerne les feuilles, une fois récoltées elles sont immédiatement distillées.[41]

3.7 Propriétés et usages

Les clous de girofle servent à la fois de condiment, d'antiseptique et même de constituant aromatique. Aujourd'hui, 95 % de la production, soit près de 40 000 tonnes par an, servent à aromatiser les cigarettes Kretek en Indonésie, si bien que son parfum entêtant embaume toute la contrée. Le clou de girofle contient jusqu'à 21 % d'huile essentielle composée essentiellement d'eugénol. Cette molécule, que l'on trouve aussi dans la cannelle, est toxique à forte concentration pour une grande variété d'insectes. Elle sert à la plante de moyen de défense contre les ravageurs et peut s'utiliser comme insecticide à large spectre (contre les pucerons, les doryphores, les mouches et leurs larves, etc.).

Le clou est vendu entier ou sous forme de poudre marron foncé pour sa saveur brûlante aromatique et son parfum. Il entre dans la composition de curry, du mélange « 4 épices » aux côtés de la cannelle, du poivre et de la noix de muscade, de la bouchée de bétel et parfume le pain d'épice, les marinades de poisson, le vin chaud et des liqueurs. Le clou peut simplement se croquer en cas de nausées ou se conserver dans la bouche pour soulager les douleurs dentaires. La pomme d'ambre réalisée avec une orange piquée de clous de girofle était portée sur soi pour échapper à la peste au XV^e siècle en Europe.

La poudre de clou de girofle s'évente rapidement, aussi il est préférable de se procurer des clous que l'on râpe. Ajoutez une pointe de poudre à un verre de jus de citron, d'orange ou d'un vin chaud associé à la cannelle.[44]

3.8 Effet thérapeutiques

Traditionnellement, les clous de girofle étaient utilisés pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale et de la mauvaise haleine. En usage externe contre le rhumatisme, les myalgies (douleurs musculaires), la sciatique et anesthésiant local dans les soins des plaies. Par voie orale, les clous de girofle sont utilisés dans le traitement des troubles digestifs, ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations et flatulences[45]

FORMULATION DE GEL



4 Formulation de Gel

4.1 Définition

Le terme de gel échappe à toute définition précise. Le gel est un état de la matière. Il s'agit généralement d'une solution ou une suspension colloïdale qui subit une transformation physique ou chimique conduisant à un état semi-solide tout en conservant une grande partie du solvant à l'intérieur de sa structure [46].

Un gel macromoléculaire est une matrice polymère gonflée par une grande quantité de solvant. Les chaînes polymères sont connectées entre elles, formant un réseau qui sert à retenir le liquide et qui donne au gel sa rigidité [47].

Les gels sont doux et humides, ils ressemblent à des matériaux solides mais ils sont capables de subir de grandes déformations, ce qui est en contraste avec la plupart des matériaux industriels, tels que les métaux, les céramiques et les matières plastiques qui sont secs et durs. L'organisme vivant est en grande partie constitué de gels sauf les os, les dents et les ongles. Les couches extérieures de la peau et les tissus des mammifères sont des gels dans lesquels la teneur en eau va jusqu'à 90% (plasma - sang) ce qui permet à l'organisme de transporter les ions et les molécules tout en gardant sa rigidité [47-48].

4.2 Classification

4.2.1 Classification générale

Il existe plusieurs classifications des gels: selon leur origine tels que les gels naturels ou synthétiques; selon la matière contenue dans la matrice polymère tels que les hydrogels, les aérogels ou les organogels; selon le type de liaison de la matrice polymère tels que les gels chimiques ou physiques. La classification des différents gels est présentée dans le Tableau(5) La connexion entre les chaînes de polymères peut être de deux sortes, permanente (liaisons covalentes) ou réversible (liaisons hydrogènes, interactions de type Van der Waals, enchevêtrements ...) ce qui permet de différencier les deux grands types de gels: les gels chimiques et les gels physiques [43]. Le processus de la gélification physique est généralement réversible.

Formulation de Gel

Tableau 5 : Classification des gels [47]

Milieu de Gonflement	Liquide	Hydrogel (eau) Organogel (solvant organique) Lyogel (solvant huileux) Alcoogel (alcool)
	Gaz	Xerogel Aérogel (air)
	Solide	Polymère - Gel polymère
Polymères de Constitution	Gel naturel	Gel de protéine Gel de polysaccharide
	Gel synthétique	Gel de polymère organique Gel de polymère inorganique
	Gel hybride	Polysaccharide, et polymère Synthétique Polymère de protéine, et gel Synthétique
Réticulation	Liaison covalente	—————
	Interaction moléculaire	Interaction Coulombienne Liaison hydrogène Liaison de coordination

4.3 Composition

Les gels sont constitués de liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés. [50]
La quantité d'agent gélifiant varie, entre autre, selon la fonction principale du gel : un gel Lubrifiant contiendra par exemple moins d'agents gélifiants qu'un gel dermatologique.
Ils contiennent aussi au moins un principe actif dissout ou dispersé dans cette phase, et peuvent aussi contenir des agents humectants afin de retenir l'eau et éviter le craquellement des gels tels que le propylène glycol, le glycérol ou le sorbitol, des tampons pH, des agents de conservation, des agents chélatants, des parfums et des colorants. [51]

Les gels lipophiles (oléogels) sont des préparations dont l'excipient est habituellement de la paraffine liquide additionnée de polyéthylène, ou des huiles grasses gélifiées par de la silice colloïdale ou des savons d'aluminium ou de zinc.

Les gels hydrophiles (hydrogels) sont des préparations dont l'excipient est habituellement de l'eau, du glycérol ou du propylène glycol gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés tels que l'amidon, des dérivés de la cellulose, des carbomères ou des silicates de magnésium-aluminium. [50]

4.4 Voies d'administration des gels

Les gels permettent un contact prolongé avec la surface qu'ils couvrent. C'est pour cette raison, qu'ils sont utilisés par différentes voies d'administration telles que la voie cutanée (grandes zones pileuses et cuir chevelu), la voie vaginale, la voie ophtalmique et la voie parentérale.

Dans ce dernier cas, on parle de gels injectables. Ces gels sont destinés à être admis très grâce à un dispositif médical d'injection tel qu'une seringue. Ils sont utilisés en médecine esthétique, en orthopédie, en ophtalmologie.

4.5 Usages des gels

Les gels sont utilisés en tant que systèmes de libération pour une administration par voie orale sous la forme de gels proprement dits, ou de gélules de gélatine; pour les médicaments topiques appliqués directement sur la peau, les muqueuses ou les yeux; et pour les formes à action prolongée de médicaments injectés par voie intramusculaire ou implantés dans le corps. [52] En cosmétique, les gels ont été utilisés dans une grande variété de produits, y compris les shampooings, les produits de parfumerie, les dentifrices et les préparations pour les soins de la peau et des cheveux.

4.6 Caractéristiques et stabilité des gels

L'inclusion d'un agent gélifiant dans une formulation liquide devrait fournir une matrice solide qui peut être cassée facilement lorsqu'elle est soumise aux forces de cisaillement.

Ces forces de cisaillement peuvent être générées en secouant une bouteille ou en serrant un tube, ou pendant une application topique. [52]

Le gel présente un faible changement de viscosité sous les variations de température d'utilisation et de stockage normales, cela minimise les changements inacceptables dans les caractéristiques du produit. [52]

De nombreux gels, en particulier ceux de nature polysaccharidique, sont sensibles à la dégradation microbienne. L'incorporation d'un agent de conservation approprié devrait prévenir la contamination et la perte subséquente des caractéristiques du gel en raison de l'attaque microbienne. [52]

Les caractéristiques du gel doivent correspondre à l'utilisation prévue. Un gel topique ne doit pas être collant. Une concentration trop élevée d'agent gélifiant ou l'utilisation d'un poids moléculaire excessif peuvent produire un gel difficile à distribuer ou à appliquer. Un gel ophtalmique doit être stérile. Les consommateurs ont tendance à préférer le produit en gel avec une grande clarté optique. Le but est de produire un produit gel stable et économique convenant parfaitement à l'usage auquel il est destiné. [52]

4.7 Formulation et caractérisation

4.7.1 Gélifiants

Idéalement, les agents gélifiants utilisés en pharmaceutique et en cosmétique doivent être inertes, sans danger et ne réagissant pas avec les autres composants de la formulation. [52]

Les agents gélifiants usuellement utilisés en formulations pharmaceutiques sont regroupés en dérivés ioniques (anioniques et cationiques), et dérivés non ioniques

Le tableau 2 montre les différents gélifiants usuellement utilisés, leurs caractéristiques ainsi que leur type.

Formulation de Gel

Tableau 6 : Agents gélifiants usuellement utilisés. [53]

Agent gélifiant	Caractéristiques	Type
Carbopols	<ul style="list-style-type: none"> - Poudre blanche - Odeur acétique - Insoluble dans l'eau - Forme colloïdal après dispersion dans l'eau - Hygroscopique - Stabilisant 	Dérivés anioniques
Alginate (de Sodium, de Calcium)	<ul style="list-style-type: none"> - Poudre blanche - Inodore et sans saveur - Très soluble dans l'eau - Synthétisé à partir de l'acide alginique - Extrait d'algues brunes 	Dérivé anionique
Cellulose (carboxyméthylcellulose sodique)	<ul style="list-style-type: none"> - Poudre blanche - Soluble dans l'eau 	Dérivés anioniques
Chitosane	<ul style="list-style-type: none"> - Extrait de la coquille des crustacés 	Dérivé cationique
Gomme Agar gar	<ul style="list-style-type: none"> - Très puissant gélifiant - propriétés laxatives - N'est pas digéré dans l'estomac et les Intestins 	Dérivés non ioniques
Gomme Xanthane	<ul style="list-style-type: none"> - Poudre blanchâtre inodore et insipide - Polyoside ramifié - Stable en milieu acide - Soluble dans l'eau - Insoluble dans l'alcool 	Dérivés non ioniques
Celluloses (hydroxyéthylcellulose)	<ul style="list-style-type: none"> - Substance colloïdal - Possibilité d'être combiné à un autre polymère hydrosoluble non ionique - Emprisonnement de l'eau - Mauvaise dispersion 	Dérivés non ioniques

4.8 Procédés de formulation des gels

L'état de gel est un état dans lequel une grande quantité de solvant est placée entre les réseaux de polymère qui sont formés par réticulation. Ainsi formuler un gel consiste à obtenir une structure polymérique réticulée.

La structure réticulée peut être formée par des liaisons covalentes ou par des liaisons Physique sinterchaines. Il existe des méthodes pour réaliser la réticulation des polymères pendant ou après la polymérisation. [54]

Formulation de Gel

Tableau 7 : Méthodes de préparations des gels [54]

Préparation des gels par liaisons covalentes	Réalisation de réticulation pendant la polymérisation	Polymérisation thermique	Par addition de la chaleur : polymérisation du vinyle
		Polymérisation catalytique	Cas des peroxydes qui provoquent une réaction d'oxydoréduction
		Photo-polymérisation	Polymérisation et réticulation effectués par l'intermédiaire d'une lumière.
		Polymérisation par radiation	Monomères vinyliques polymérisés par les rayonnements Gamma
		Polymérisation par plasma	Dans le plasma à basse température par l'irradiation de lumière.
		Electro-polymérisation	monomères vinyliques polymérisés par électrolyse
	polymère déjà formées	Réactions chimiques	Certains polymères avec des groupements réactifs sont réticulés par des groupements correspondants
		Photo-réticulation	Réaction de photo-addition, suivie d'une Photodimérisation.
		Réticulation par radiation	Polymère réticulé par un rayonnement à l'état solide suivi d'un gonflement avec un solvant approprié. Ou une solution de polymère irradiée et gélifiée.
		Réticulation par plasma	Réticulation avec les espèces actives d'un gaz inerte.
Réticulation par des liaisons Hydrogènes		Le polyvinyle alcool (PVA) se gélifie en microcristaux qui sont formés par des liaisons hydrogène entre les points de réticulation	
Préparation des gels par liaisons Physiques intermoléculaires	Polymères synthétiques	Réticulation par des liaisons Statiques	Le mélange de polyélectrolytes avec des charges différentes mène à des congrégations moléculaires via des interactions statiques et deviennent des points de liaisons pour former des gels.
		Réticulation par des liaisons de coordinations	Gels au caractère thermoréversible. Ils deviennent sol à haute température.
		Réticulation par des liaisons de Van Der Waals	Via les forces de VDW ces gels sont généralement troubles et hétérogènes, leurs propriétés changent avec la composition des monomères, la température et la composition de solvant.
	Polymères naturels Et biologiques	Réticulation par des liaisons Hydrogènes	Les polysaccharides qui sont réticulés par des liaisons hydrogène comprennent l'amidon, l'agar, carraghénane, ils sont très utilisés dans l'industrie pharmaceutique.
		Réticulation par des liaisons de coordinations	Les hydrocolloïdes tels que le sel de l'acide alginique, la pectine, et le mannane Konyak deviennent des gels avec l'addition d'ions métalliques divalents.
		Réticulation par des liaisons Hydrophobes	Structure de réticulation unique pour les hydrogels.

4.9 Caractérisation des gels

4.9.1 Etude des paramètres physico-chimiques

- Aspect
- Couleur
- PH

4.9.2 Mesure de la viscosité :

La viscosité sert à mesurer la résistance d'un fluide à l'écoulement. Plus la viscosité est élevée, plus le fluide s'écoule lentement. [55]

Les coefficients de viscosité sont des grandeurs physiques qui jouent un rôle essentiel en rhéologie. Leur connaissance suffit parfois à caractériser de façon précise le comportement rhéologique du matériau. [56]

On définit différents coefficients de viscosité :

- Viscosité dynamique ou apparente (Pa. s)
- Viscosité cinématique (cm²/s)
- Viscosité relative, spécifique, intrinsèque

La viscosité est mesurée en utilisant un viscosimètre, mais peut être obtenue par l'étude rhéologique qui nous renseigne sur plusieurs paramètres à la fois entre autre la viscosité du fluide.

4.9.3 Etude rhéologique

La rhéologie est une discipline qui traite de l'écoulement, des déformations des matériaux sous l'action de contraintes en fonction de leur vitesse de cisaillement et de leur variation au cours du temps. [56]

Elle joue un rôle très important dans les procédés puisqu'elle fournit une caractérisation complète et précise de la structure étudiée, elle permet des corrélations et des interprétations moléculaires ainsi qu'une identification et un suivi de stabilité. [56]

Le mouvement laminaire de cisaillement est un mouvement au cours duquel le matériau présente une structure en lamelles, en couches adjacentes, la déformation du matériau s'effectue par un glissement relatif des différentes couches les unes sur les autres sans transfert de matière entre les couches. [56]

4.10 Les alginates

4.10.1 Définition et Formule chimique

Les alginates sont des polysaccharides linéaires, anioniques des polymères composés d'un enchaînement de deux acides hexuroniques: les monomères d'acide β-D mannuronique (M) et d'acide α-L-gulonique (G). La proportion des deux acides uroniques varie non seulement selon les espèces, mais encore suivant l'âge et les différentes parties du thalle[58]

4.10.2 Structure chimique des alginates

L'alginate est un des polysaccharides, naturellement anioniques, le plus utilisé. Il est obtenu sous la forme d'alginate de sodium, de calcium ou de magnésium. C'est un copolymère linéaire de β-D-mannuronate (M) et de son épimère C5, le α-L-gulonate (G) (figure. 11) associé par des liaisons α,β (1-4) [59]

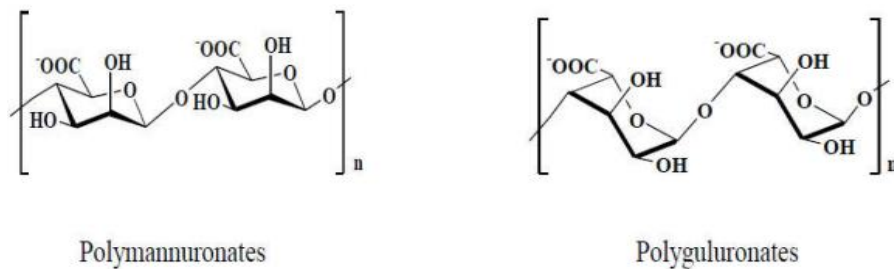


Figure 11 : Structure chimique des acides uroniques présents dans l'alginate [59]

Les motifs M et G sont organisés en blocs de régions homopolymères de motifs M (appelés blocs M), de motifs G (appelés blocs G) ou de régions de structure alternée (blocs MG) (figure 12). La proportion de ces deux monomères va influencer les propriétés physico-chimiques. Le rapport M/G se situe en général entre 0,25 et 2,25. Il peut être déterminé de la même façon que les fractions de dimères par RMN ou par chromatographie liquide échangeuse d'ions [59].



Figure 12 : les différents blocs de l'alginate.[59]

4.10.3 Intérêts et valorisation des alginates

Ils sont utilisés comme agents gélifiants et/ou épaississants dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. On les retrouve comme stabilisants des émulsions et des Suspensions comme par exemples les crèmes glacées, confitures, crèmes, crème pâtissière, lotions, pâtes dentifrices, et comme revêtement pour les pilules.

Ils sont également utilisés dans d'autres domaines industriels telles que la production de peinture, de certains matériaux de construction, de la colle et du papier, de l'huile, de photos et dans l'industrie textile.

Leur capacité à pouvoir se lier aux cations et métaux lourds les rend aussi utilisables comme dépolluants et détoxifiants.[59]

4.10.4 Propriétés des alginates

4.10.4.1 Solubilité

L'alginate de sodium, comme tous les sels d'alginate monovalents, est soluble dans l'eau pour des valeurs de force ionique faibles. Lorsque la salinité du milieu augmente, la solubilisation du poly anion est compromise. L'addition de sels tels que le chlorure de potassium va progressivement diminuer la solubilité de l'alginate dans l'eau jusqu'à la séparation de phases. Cela implique que la présence de sels dans l'eau peut avoir une forte influence sur la cinétique de solubilisation des alginates. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas des ions di-ou multivalents qui vont non seulement augmenter la force ionique totale du système, mais aussi être capables de provoquer une agrégation à grande échelle des chaînes polymères (formation d'un réseau) pouvant aboutir à une séparation de phases, voire à la formation d'un hydrogel.[57]

Le pH de la solution joue aussi un rôle dans la solubilisation des alginates. Si le pH de la solution contenant l'alginate est inférieure au pKa de l'acide mannuronique (pKa=3,38) ou de l'acide guluronique (pKa= 3,65), alors il peut y avoir séparation de phases voire formation d'un hydrogel [40]. La sensibilité des alginates vis-à-vis du pH de la solution dépend non seulement de la masse molaire mais aussi de la composition chimique et de la séquence des blocs.[57]

4.11 L'émulsification

4.11.1 Introduction

Le terme émulsion vient probablement du latin « emulgere » qui signifie « traire ». Ce terme désigne aujourd'hui un système comprenant au moins deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre, sous une forme plus ou moins stable. La fabrication des émulsions est connue depuis l'Antiquité, mais leur étude scientifique ne date que du début du 20^e siècle. En quelque 90 ans, la connaissance et l'utilisation des émulsions dans différentes applications a pris une ampleur extraordinaire. [58]

4.11.2 Définitions

a) Emulsion : Une émulsion est un mélange homogène de deux liquides ou phases peu ou pas miscibles. Ce mélange correspond à une dispersion de gouttelettes de l'une des phases dans l'autre. On distingue donc une phase dispersée et une phase continue.

b) émulsion eau dans huile (E/H) et émulsion huile dans eau (H/E) :

On parlera d'émulsion eau dans huile (E/H) si la phase continue est une phase grasse, et d'émulsion huile dans eau (H/E) si la phase continue est constituée d'un liquide polaire associé. [58]

Tableau 8 : représente les 2 types d'émulsion simple

SENS DE L'EMULSION	PHASE DISPERSEE	PHASE DISPERSANT	SYMBOLES
Emulsion Huile dans Eau (=Huile/Eau= Oil/water) = émulsion de type aqueux = émulsion à eau externe	Lipophile	Hydrophile	L/H, O/W, H/E
Emulsion Eau dans Huile (=Eau/Huile = Water/oil) = émulsion de type huileux = émulsion à huile externe	Hydrophile	Lipophile	H/L, W/O, E/H

4.11.3 Exemples d'émulsions

4.11.3.1 Émulsion H/E

Le mélange est constitué de particules ou gouttelettes lipophiles (L) ou huileuses (H) dispersées dans une phase aqueuse (E) ou phase hydrophile (H). [d'émulsion directe] [58]

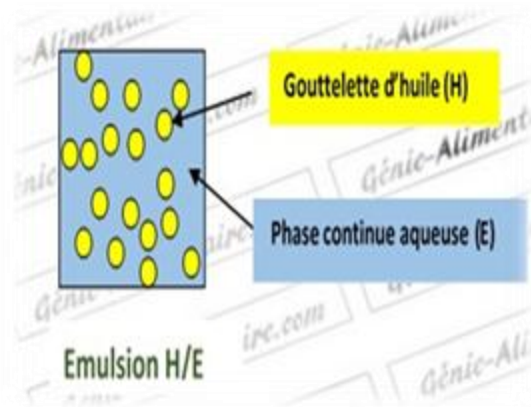


Figure 13 : Émulsion huile dans eau [58]

4.11.3.2 Émulsion E/H :

On parle d'émulsion eau dans huile (E/H) ou hydrophile-lipophile (H/L). Dans ce type d'émulsion ou, la phase discontinue est la phase aqueuse (E) ou hydrophile [encore d'émulsion inverse] [58]

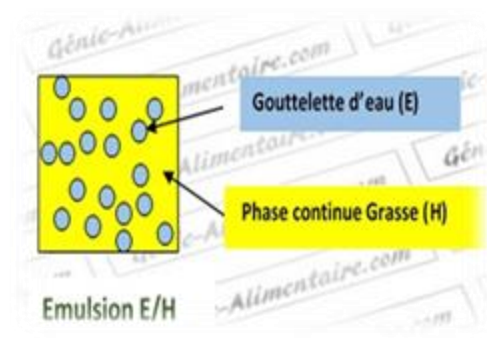


Figure 14 : Émulsion eau dans huile [58]

4.11.4 Formulation :

Pour réaliser une émulsion, deux liquides non miscibles sont nécessaires : une phase non polaire appelée phase grasse et une phase polaire ou phase aqueuse. [58]

4.11.4.1 Les ingrédients de la phase grasse

La phase lipophile, huileuse peut se composer de différents éléments liposolubles (solubles dans l'huile) comme : [58]

Tableau 9 : représente Exemples d'ingrédients de la phase huileuse [58]

ORIGINE	CIRES	GRAISSES	HUILES
Animale	Cire d'abeille Blanc de baleine	Lanoline	Huile de baleine, de foie requin
Végétale	Cire de carnauba	Beurre de cacao Beurre de karité	Huile d'arachide, d'olive, d'amande, de soja
Minérale	Paraffine	Vaseline	Vaseline Paraffine
Synthétique	Esters gras	Esters gras	Esters et alcools gras Huile de silicone

4.11.4.2 Les ingrédients de la phase hydrophile ou aqueuse

L'eau sert de solvant, on y trouve de nombreux éléments hydrosolubles (solubles dans l'eau) comme :

- Les humectant (Le glycérol)
- Les conservateurs (tels que les antimicrobiens hydrosolubles.)
- Des principes actifs.
- Certains émulsionnants : (ou émulsifiants, comme les tensio-actifs ou les esters.)

Préparation des 2 phases

L'objectif est d'obtenir deux phases homogènes à une température définie. L'obtention d'une phase huileuse homogène implique un chauffage des différents ingrédients (certains ne sont pas liquides à température ambiante) de façon à réduire leur viscosité. Les températures d'usage sont comprises entre 70 °C et 90 °C. Les émulsifiants sont ajoutés à la phase dans laquelle ils sont le plus solubles. Certains additifs, généralement liposolubles, sont ajoutés à cette étape. Les éventuels additifs volatils (parfums...) ou thermolabiles (certains additifs) sont introduits après ou en cours de refroidissement. L'homogénéité de chaque phase est obtenue grâce à une agitation en cuve par une hélice ou une turbine et une ancre mobile qu'optime. [58]

Etude Expérimentale



5 Matériels et produits

5.1 Réactifs et solvants

Tableau 10 : Les réactifs et les solvants employés sont cités dans le tableau suivant

Réactifs	Solvants	Milieux de culture
<ul style="list-style-type: none">• Sulfate anhydre• Tewn80• Glycérol• Stéarate de magnésium• Liquide de paraffine• Alginate de sodium• Vert méthyl• Rouge Congo• solution méthanoïque de• DPPH	<ul style="list-style-type: none">• Dichlorométhane• DMSO• Eau physiologique• Eau distillée	<ul style="list-style-type: none">• Gélose Muller Hinton• Bouillon Muller Hinton

5.2 Verrerie

- Epprouvettes
- Verres de montre
- Ballon mono col
- Erlenmeyer
- Fioles jaugés
- Béchers
- Pipettes pasteur
- Tubes à essai
- Cuve à CCM
- Ampoule à décanter
- Mortier/ pilon
- Pipettes pasteur
- Boîtes de pétri
- Papier wattman

5.3 Appareillage

- Balance analytique
- Refractomètre
- Polarimètre
- Bec bunsen
- Autoclave
- Etuve de 37°C

6 Etude Expérimentale

6.1 Objectifs

L'objectif de ce travail est de chercher la composition d'un emulgel à base d'huile essentielle de clous de girofle comme principe actif et d'alginate de sodium afin de tester l'activité antibactérienne, antioxydant et anti-inflammatoire de l'huile de clous de girofle formulée.

- en premier lieu on va faire l'extraction sur plusieurs fois de l'huile essentielle à partir de clous de girofle.
- en second lieu préparer la formulation.

6.2 Extraction d'huile à partir du clou de girofle

6.2.1 Choix du matériel végétal

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



Figure 15 : clous de girofle (giroflier) [62]

6.2.2 Protocole d'extraction des huiles essentielles :

Ce travail se fait au niveau d'institut de vétérinaire IBN KHALDOUNE –TIARET. L'hydro distillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante.

L'opération a consisté à introduire 20 g de masse végétale séchée et concassée dans un ballon de 1000mL en verre, on a ajouté une quantité suffisante d'eau distillée environ 500mL sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements à l'ébullition.



Figure 16 : Montage de l'hydro distillation
(original)

- Le mélange est porté à ébullition
- La vapeur d'eau produit entraîne les constituants volatiles, qui après condensation dans le réfrigérant sont recueillis dans une ampoule à décanter.
- L'opération d'extraction dure une heure et demi à partir du début d'ébullition.

Il est en général formé de 2 liquides non miscibles encore appelés phase, la phase aqueuse, la plus abondante, est constituée d'eau dans laquelle sont dissoute très peu d'espèces odorantes, la phase organique (l'huile essentielle) est constituée des espèces odorantes.

- Après récupération de la phase huileuse, du sulfate anhydre y est ajouté pour éliminer toute trace d'eau. L'huile essentielle est conservée au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'utilisation.

6.2.3 La conservation de l'huile essentielle

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

6.3 Densité relative

6.3.1 Mesure de la densité relative selon la (Norme NF T 75 - 111)

La densité relative de l'H.E est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20 °C.

Cette grandeur est sans dimension et son symbole est d^{20}

$$d_{20} = \frac{ML - mv}{Me - mv} \quad (1)$$

ML : masse du pycnomètre avec l'HE

Me : masse du pycnomètre avec l'eau

MV : masse du pycnomètre vide



Figure 17:Pycnomètre

6.3.1.1 Mode opératoire :

- Nettoyer le pycnomètre, sécher dans l'étuve
- A l'aide d'une pipette remplir le pycnomètre par l'eau distillée et déterminer la masse de pycnomètre rempli d'eau distillé.
- Déterminer la masse du pycnomètre vide.
- Nettoyer, sécher le pycnomètre dans l'étuve
- A l'aide d'une pipette remplir le pycnomètre par HE et déterminer la masse de pycnomètre rempli de HE

Tableau 11: résultat des différent masses

La masse de pycnomètre rempli d'HE (ML)	25.6639 g
La masse de pycnomètre rempli d'eau (Me)	25.0391 g
La masse de pycnomètre vide (mv)	14.9162 g

$$d_{20} = \frac{25.6639 - 14.9162}{25.0391 - 14.9162} = 1.0617$$

6.4 L'indice de réfraction

6.4.1 Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée ; passant de l'air dans huile essentielle maintenue à une température constante

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses ; plus la lumière est ralentie ; plus la matière a un indice de réfraction élevé

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé, il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1.33556 ; et de l'huile d'olive à 20°C = 1.4684 ceci montre leur richesse en composants qui devient la lumière polarisée

L'appareil employé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre, qui est instrument optique servant à déterminer substance c'est à dire la mesure laquelle la lumière est déviée en traversant la substance [63]

6.4.1.1 Mode opératoire:

On a suivi les étapes suivantes

- Etalonner l'appareil par l'eau distillée
- Nettoyer la lame du réfractomètre
- Déposer quelques gouttes de HE dans la lame et régler la cercle de Chambre sombre et claire dans la moitié.
- Effectuer la lecture en prenant compte la température (20°C).



Figure 18 : Le réfractomètre

6.5 Caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour les analyses de routine par CCM, nous utilisons généralement des plaques de Silicagel® 60 F254 prêtes à l'emploi à support en aluminium (Marck). Celles-ci sont développées dans des cuves en verre conventionnelles, dont l'atmosphère a été préalablement saturée en vapeurs de phase mobile.

Du fait de ses faibles contraintes techniques, de son emploi simple et de son coût relativement modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phyto chimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées .[64]

Elle permet de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant. [65]

6.5.1 Principe de la chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile [66,67]qui est en générale un mélange de solvant; adapté au type de séparation recherché [68], et leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénolique et flavonoïque de l'extrait.

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées du gel de silice et sur des plaques de polyamide (DC6).

6.5.1.1 Phase stationnaire

6.5.1.1.1 Gel de polyamide

Plaque en verre de gel de polyamide DC6 préparées dans le laboratoire. Le gel est préparé en mélangeant 10g de poudre de polyamide dans 50ml d'éthanol. Après étalement du gel sur les plaques en verre et séchage, la phase stationnaire devient prête à l'utilisation [69].

6.5.1.1.2 Plaques de silice

Les analyses sont effectuées en phase normale, avec des plaques de silice (Silicagel 60 F254, de 0,25 mm d'épaisseur) déposées sur feuille d'aluminium. Sur les plaques préparées, on a déposé 10µl de chaque extrait (100 mg/ml) et les plaques sont ensuite introduites dans des cuves conventionnelles en verre préalablement saturée par la phase mobile, qui peut être

Généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée [70]

6.5.1.1.3 Phase mobile

On essaie plusieurs systèmes solvants et on choisit ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations).

6.5.1.1.4 Le dépôt

Le dépôt se fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire (pipette capillaire) à usage unique (un capillaire pour chaque phase). Le capillaire doit être posé perpendiculairement et prudemment sur la plaque pour ne pas gratter le gel. On fait plusieurs dépôts du même échantillon au même endroit pour obtenir les produits séparés en grande quantité (ceci est nécessaire surtout lors de la CCM préparative). Il faut sécher après chaque dépôt [71]

6.5.1.1.5 Développement des plaques

Les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes. Dans le cas idéal, on obtient autant de tâches que les constituants sur le trajet de migration du solvant.

6.5.1.1.6 Révélation (Visualisation des tâches)

Après développement et l'évaporation du solvant de migration les tâches sont visualisées : (Merghem 1995).

- A l'œil nu.
- Sous l'UV à 254nm.
- Sous l'UV à 365nm.

6.5.2 Mode opératoire

6.5.2.1 Préparation de la phase stationnaire

La phase stationnaire, est une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice, fixée sur une plaque d'aluminium.

6.5.2.2 Préparation de la phase mobile

La phase mobile est constituée par un solvant organique : éluant : dichlorométhane

6.5.2.3 Le Dépôt

Dans un premier temps, nous avons tracé un trait horizontal (la ligne de base) à environ 1 cm du bas de la plaque de CCM.

Pour déposer les solutions nous avons utilisé des pipettes pasteur en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire qui va nous permettre de déposer juste une petite quantité de chacune des solutions dans le puits correspondant

[les solution P : notre produit huile essentielle. C : produit commercial]

6.5.2.4 Développement des plaques

- La plaque est déposée en position verticale dans une cuve de chromatographie contenant l'éluant. . Puis on l'a fermé
- La plaque de CCM est retirée lorsque les taches atteignent la ligne frontale.
- laissée sécher à l'air libre.

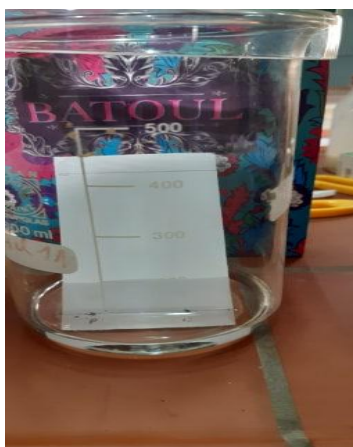


Figure 19 : Dépôts des échantillons

6.6 Préparation de la formulation:

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de science de la matière de l'université d'IBN KHALDOUN –TIARET.

6.6.1 L'émulgel :

Est une formulation d'une émulsion incorporée a un gel à base d'alginate de sodium nous vous présentons ci-dessous la composition de l'emulgel.

6.6.2 Préparation :

6.6.2.1 La phase aqueuse

- Tewen80. (0.3g)
- Eau distillé selon la consistance du mélange
- 3ml glycérol
- 0.6 g stéarate de magnésium

6.6.2.2 La phase huileuse

- 5 ml huile de clous girofle
- 2ml huile de paraffine

6.6.2.3 Gel

- 2g d'alginate de sodium
- Eau distillé selon la consistance du mélange

6.6.3 Mode opératoire

Les 2 phases ont été chauffées à la même température en plongeant les 2 ballons dans le même bain-marie chauffé préalablement à 60 à 70°C (laisser environ 10 minutes et agiter de temps en temps).

La phase huileuse contenant l'émulsifiant lipophile a été chauffée dans un bécher ensuite on a ajouté progressivement la phase aqueuse contenant l'émulsifiant hydrophile en agitant énergiquement avec agitateur mécanique à l'aide d'une pale à 3 lames. Il se produit d'abord une émulsion dans le sens de la phase la plus abondante, puis brusquement une inversion de la nature de l'émulsion qui favorise la dispersion des particules. Lorsque toute l'eau est ajoutée, l'agitation se poursuit jusqu'au retour à température ambiante, tout en évitant la formation de mousse par introduction d'air.

Une fois l'émulsion refroidit on procède à la deuxième étape de la préparation du gel à base d'alginate de sodium qui a été mélangé avec de l'eau distillée jusqu'à avoir une texture d'un gel

Etude Expérimentale

L'émulsion a été mélangée au gel sous agitation mécanique pendant 10mn jusqu'à l'obtention d'une texture de l'emulgel ayant une forme homogène et de couleur blanchâtre.

6.6.4 Détermination de type d'émulsion

6.6.4.1 La viabilité à l'eau

On a ajouté une goutte d'émulsion dans de l'eau pour observer si elle se disperse

Observation : elle ne se disperse pas sans agitation

6.6.4.2 Addition d'un colorant

Sur une lame de verre on a déposé une goutte d'émulsion, préalablement agitée, puis on a ajouté à la surface de l'émulsion une petite goutte de colorant hydrosoluble ou liposoluble.

6.6.4.3 Les colorant utilise sont

- Vert méthyl : soluble dans l'eau (hydrosoluble)
- Rouge Congo : insoluble da l'eau (liposoluble)

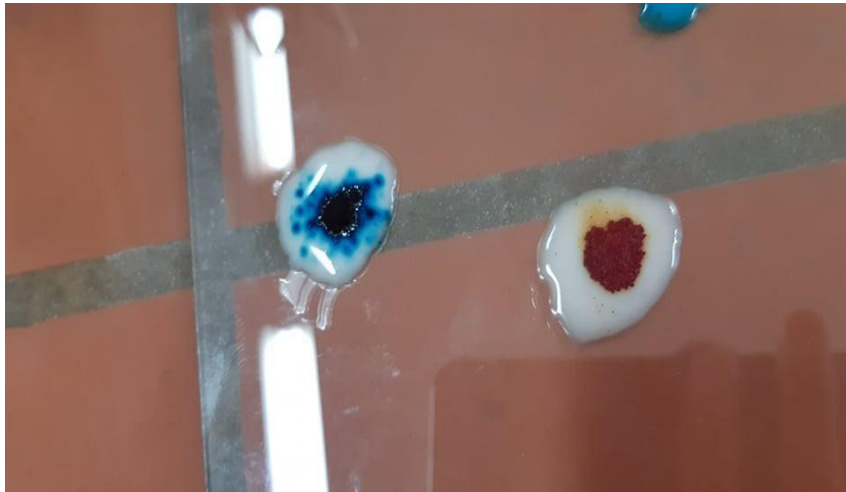


Figure 20: Test de deux colorants sur l'emulgel

6.6.5 Observation

- le colorant rouge de méthyl ne diffuse pas dans l'émulsion, c'est-à-dire que la coloration est hétérogène, c'est que la phase continue de l'émulgel n'est pas de même nature que la solubilité du colorant.
- le colorant vert méthyl diffuse dans l'émulsion, ce qui nous laisse à dire que la phase continue de l'émulgel est de même nature que la solubilité du colorant.

Résultat : Notre gel est une émulsion Hydrophile (eau)/Lipophile (huile).

6.6.6 Stabilité à la dilution



- **Test 01**

On a introduire dans un tube à essais, 1 ml d'émulsion puis 10 ml d'eau distillée.

- **Test 02 :**

On a introduire dans un tube à essais, 1 ml d'émulsion puis 5 ml

Tableau 12 : les deux tests de la solubilité d'émulsion dans l'eau et huile (figure 21) la solubilité dans l'eau et (figure 22) la solubilité dans huile

	Observation	Résultats	Les figures
Test 01	-L'émulsion est soluble dans l'eau après agitation -une heure après sans bouger le tube on a une précipitation de gel	-Notre gel hydrophile et Réversible	<p>Figure 21 : la solubilité dans l'eau</p> 
Test 02	-L'émulsion n'est pas soluble dans l'huile après agitation -une heure après sans bouger le tube pas changement elle resté insoluble	-Notre gel hydrophile et irréversible	<p>Figure 22 : la solubilité dans huile.</p> 

6.7 Les antioxydants

6.7.1 Définition

Un antioxydant est par définition une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Un antioxydant peut donc :

- prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles décrites ci-dessus ou
- désactiver directement les ROS. Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres.

L'organisme possède des systèmes endogènes dédiés à cette action protectrice. Cependant, cette ligne de défense est facilement saturée. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydant. Nous les trouvons dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges...), les légumes (brocoli, oignon...), les boissons (café, thé, vin...) ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales. Ces antioxydants sont surtout connus pour leur capacité à réagir directement réagir avec les radicaux libres en les « neutralisant » par réaction de réduction.

Les antioxydants sont un groupe hétérogène composé de systèmes antioxydants endogènes, enzymatiques ou non, de vitamines, d'oligo-éléments ou encore de polyphénols. [72]

6.7.2 Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants

Il existe différentes méthodes pour mesurer le pouvoir antioxydant d'un aliment ou d'un fluide biologique (**tableau13**)

.Parmi les tests les plus utilisés, nous présenterons ceux couramment cités.

Etude Expérimentale

Tableau 13 : Les différentes méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant[72]

Test en système modèles :			
Test du pouvoir anti radicalaire :			
Test :	Avantage :	Limite :	Référence :
FRAP (37°)	Sensible, simple et rapide	Peu spécifique ne mesure que le pouvoir réducteur	(Benzie et Strain, 1996)
DPPH (20°)	Rapide, peu sensible	Ne mesure que le pouvoir anti radicalaire	(Brand-williams et al., 1995)
TEAC (37°)	Sensible, simple, répétable, rapide	Interférence	(Prioret Cao, 1999 ; Re et al., 1999)
Tests faisant intervenir une CO-oxydant de lipide			
AAPH (37°)	Simulation d'un milieu alimentaire émulsionné	Longue à mettre en œuvre	(Liegeois et al .2000)
TAC (37°)	Sensible, simple, répétable	[Substrat] élève	(Lussignoli et al., 1999)
TOSCA (35°)	Sensible	Méthode d'analyse lourde interférence	(winston et al., 1998)
ORAC (37°)	Sensible, simple, répétable, spécifique	Bruit de fond	(De-lange et Glazer, 1990 ; Ghiselli, 2000)
Tests évaluant de pouvoir antioxydant dans une matrice			
TRAP (37°)	Sensible et répétable	Peu spécifique	(wayner et al., 1985)
LDL (30 °+/-37°)	Représente in vivo sensible et répétable	Extraction longue stabilité DES .LDL	(Ha-Khouw, 1993 ; Blache et Prost, 1992 ; valkonen et kusi, 1997)
Liposomes (37°.50°)	Reprise activité in vivo sensible et répétable	Préparation fastidieuse	(van-der-sluis et al.2020)
Hématie			

6.7.3 Présentation du test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

. Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydant d'un composé quelconque, le radical DPPH en solution est coloré en violet. En présence d'antioxydant (donneurs de proton); le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (**Figure 23**). Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant. L'activité antioxydant de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition [73]

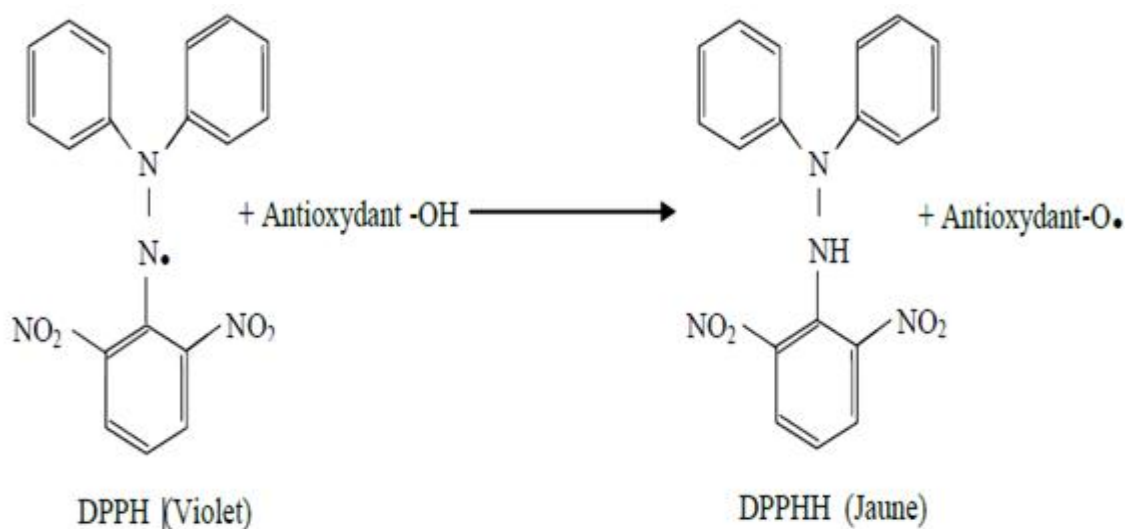


Figure 23 :Principe du test DPPH [74]

6.7.4 Mode opératoire

Une solution de DPPH (0,1mM) est préparée dans du méthanol selon les travaux [75], ensuite un volume de 1.2 ml a été ajouté à l'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant, 30 min et à température ambiante a l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

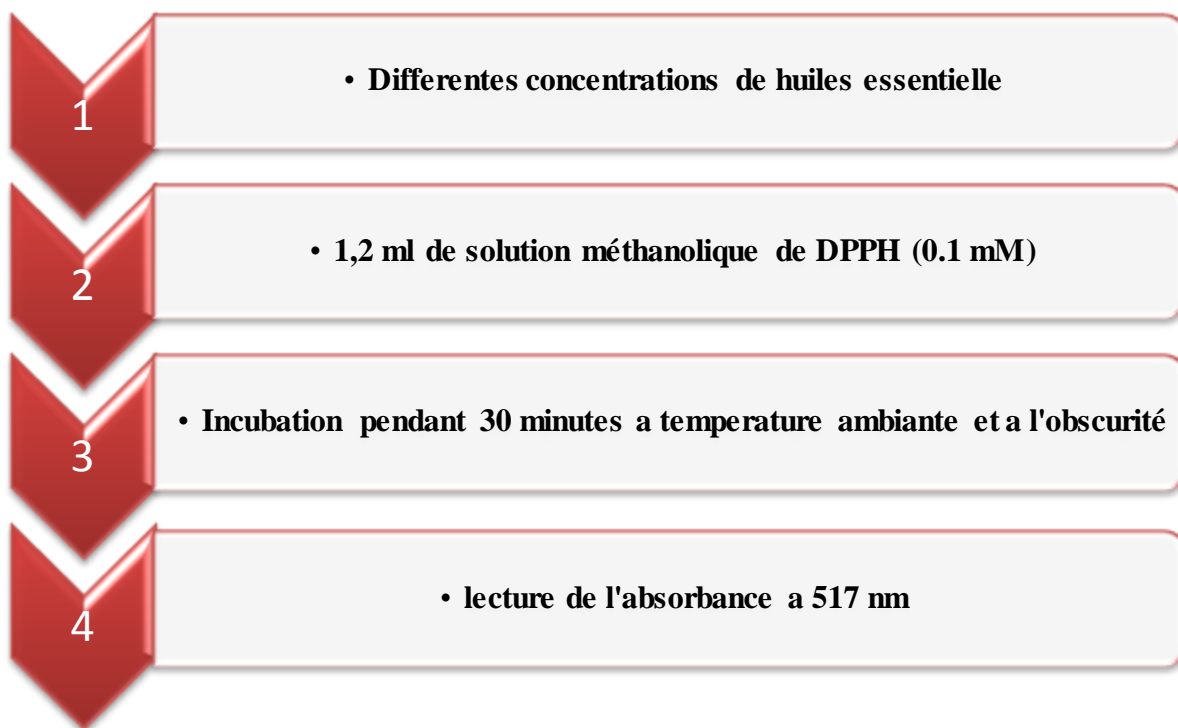


Figure 24: Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle de girofle par la méthode du DPPH [75]

L'acide ascorbique (vitamine C) a été utilisé comme antioxydant synthétique de référence (contrôle positif) à différentes concentrations dont la lecture se fait dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

La capacité de l'antioxydant (huiles essentielles ou acide ascorbique) à piéger le radical libre est estimée en déterminant le pourcentage de décoloration (réduction) du DPPH en solution dans le méthanol, le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100 \quad (2)$$

Ou:

- **AC:** Absorbance de contrôle, contenant tous les réactifs excepté le composé testé.
- **AT :** Absorbance de la réaction contenant le composé testé.

Etude Expérimentale

6.7.5 Estimation d'IC₅₀

La grandeur IC₅₀ est définie comme étant la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH, à Les IC₅₀ sont déterminées graphiquement par régressions linéaires des graphes tracés (taux d'inhibition en fonction de différente concentration

Tableau 14 : la différente concentration et leur % inhibition

Concentration (uL)	Absorbance	Absorbance de Control	Inhibition (%)
40	0,249	0,475	47,57894737
100	0,144	0,475	69,68421053
120	0,092	0,475	80,63157895
140	0,049	0,475	89,68421053
160	0,022	0,475	95,36842105
200.	0,001	0,475	99,78947368

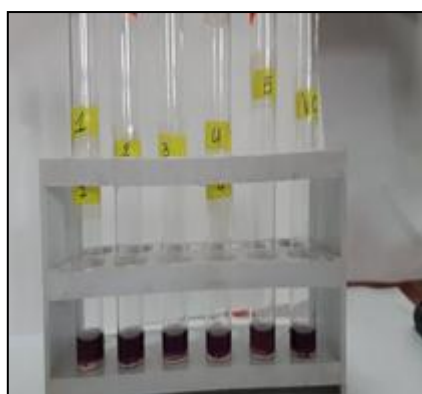


Figure 26 : solution méthanoïque DPPH

Température ambiante
→
Après 30 minutes



Figure 25 : Solution de DPPH du violet en jaune en fonction de la concentration

6.8 Activité antibactérienne

Pour cette partie plusieurs concentrations de 16µl et 30µl en clous de girofle ont été préparée dans l'emulgel pour évaluer l'effet du spectre d'activité antibactérienne d'HE Evaluation de l'activité antibactérienne

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, [77]. Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients[78]

6.8.1 Les souches bactériennes

L'étude a été réalisée sur quatre souches bactériennes appartenant à la collection ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Staphylococcus epidermidis*(Gram positive) *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif) et *Escherichia coli* (Gram négatif), qui ont été fournies par le laboratoire Microbiologie CENTRE UNIVERSITAIRE AIN TIMOUCHENT

Tableau 15 :les souches bactériennes qui ont été testé.

Souche de références	ATCC	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Negative (-)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25922	Positive(+)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC43300	Positive(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 22	Negative(-)

Etude Expérimentale

6.8.2 Préparation des suspensions bactériennes

A Partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, on raclé à l'aide d'un écouvillon scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Et décharger écouvillon dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm.

6.8.3 Choix des milieux de culture

Suivant les méthodes employées dans l'essai, nous avons utilisé comme milieux de culture solide et liquide(MH).

6.8.3.1 Muller Hinton (MH)

C'est le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens[79].Ce milieu peu est préparé selon la méthode suivante : on pèse avec précision une quantité de poudre déshydratée du MH équivalente **38 g** dans un ballon en y ajoutant **1000 ml** d'eau distillée Le mélange de la poudre-eau distillée est chauffé sous agitation pendant **20 min** afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux. Le milieu MH est ensuite réparti dans des flacons stériles avant d'être autoclave pendant **15 min** à **121°C**

6.8.4 Préparation des disques

Les disques ont été préparés à partir du papier filtre avec un diamètre de 6mm par l'emporte-pièce. Puis, ces disques ont été stérilisés à 120°C pendant 20 min dans un autoclave puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).[80]

Tableau 16 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés[85]

Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
<8	-	Résistant
9-14	+	Sensible
15 – 19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

6.8.5 Méthode Antibiogramme

6.8.5.1 Principe

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture[86]

6.8.5.2 Mode opératoire

6.8.5.3 Ensemencement

Dans les boîtes de Pétri, deux à quatre millilitres de chaque suspension bactérienne préalablement préparée sont distribués distinctement sur des boîtes gélosées de Mueller-Hinton puis homogénéisés dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boîte gélosée.

La suspension bactérienne est laissée au contact de la gélose pendant 1 mn puis l'excès de suspension est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile surmontée de poire. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées sont laissées pendant 15 mn à la température du laboratoire.

6.8.5.4 Dépôt des disques

A l'aide d'une pince flambée au Bec Bunsen, les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la boîte gélosée de Mueller-Hinton précédemment encensé. La boîte gélosée ainsi préparée est maintenue à la température du laboratoire pendant 30 mn afin de permettre la pré-diffusion. Ensuite, elle a été incubée à 37°C pendant 24 heures pour la lecture.

6.8.5.5 Lecture

L'inhibition de croissance conduit à la formation d'une zone claire (zone d'inhibition) autour des disques d'antibiotiques. La lecture de l'antibiogramme a été faite en mesurant à l'aide d'une règle graduée les diamètres d'inhibition autour des disques.

Etude Expérimentale

Nous considérons que pour un diamètre inférieur à 15 mm la souche est résistante (R) à l'antibiotique considéré. Pour un diamètre supérieur à 15 mm, elle est sensible (S) à l'antibiotique [87]

Tableau 17 : Les différents disques d'antibiotiques utilisés.

Antibiotiques		
Noms	Symbole	Charge de disque
Tétracycline	(TE)	30ug
Teicoplanine	(TEC)	30ug
Céfixime	(CFM)	10ug
Pipemidic ACID	(PI)	20ug
Cephalothin	(KF)	30ug

6.8.6 Méthode de l'aromatogramme

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme [81] elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme[82] méthode de VINCENT [83]méthode de diffusion dans la gélose (agar) [73]Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'action antibactérienne. Elle permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle donnée. Elle peut être aussi adaptée pour tester d'autres agents antimicrobiens, [78]

La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable (10-25mL), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman (6-8mm), préalablement imprégnés de quantités connues d'HE (5-30 μ L), sont alors placés en surface de la gélose [78].

Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition [78].

6.8.6.1 Mode opératoire

Nous avons coulé aseptiquement le milieu de culture gélosé Müller Hinton dans les boîtes de pétrie de 90 mm de diamètre (15ml) par boîte. Après solidification du milieu de culture, nous avons étalé 100ul de chaque suspension bactérienne à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'un écouvillon.

6.8.6.2 Dépôt des disques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier filtre (2 à 3 disques/boîte) pour les différentes dilutions et un disque par boîte pour l'huile essentielle pure et les autres préparations, à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Puis, ils ont été imbibés par 5 µl de chaque composé testé.

6.8.6.3 Incubation

Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 15 min à température ambiante puis incubées à 37 ° C pendant 24 heures, trois essais sont réalisés pour chaque test avec témoins utilisés comme contrôle négatif, les diamètres sont mesurés en mm [84].

6.8.6.4 Expression des résultats

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.E, [85]

6.8.7 Méthode des puits

La méthode des puits est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle.

Cette méthode consiste à faire des puits remplis d'une quantité de l'huile essentielle à la surface de la géloseensemencée par les germes à tester et de mesurer les diamètres d'inhibition en millimètre (mm) après incubation.[85]

6.8.7.1 Mode opératoire

Couler aseptiquement le milieu de culture MH en surfusion dans les boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur la paillasse. On a ajouté ensuite 100 µl de chaque suspension de culture bactérienne, puis on aensemencé à la surface du milieu gélosé MH à l'aide d'un écouvillon.

Etude Expérimentale

Des puits de 6 mm de diamètre ont été creusés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Dans le but d'éviter la surfusion des extraits sous la gélose et on remplit chaque puits avant d'une goutte de gélose ensuite :

Test :

- 15ul de gel à base d'HE clou girofle de concentration 16ul/10ml.
- 15ul de gel à base d'HE clou girofle de concentration 30ul/10ml.
- 15ul HE clou girofle concentré.

6.8.7.2 Lecture

La sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du puits, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse en (mm) (y compris le diamètre du puits de 6mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle[85].

6.8.8 Méthode des micros -dilution en milieu liquide

C'est une méthode de dilutions sur milieu liquide permettent de déterminer la CMI (Concentration minimal inhibitrice) et CMB (Concentration minimal bactéricide) Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : bactériostatique ou bactéricide.

6.8.9 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

6.8.9.1 Méthode de micro-dilution

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'huile essentielle de clou de girofle est déterminées selon la méthode de micro-dilution [89]

6.8.9.2 Principe

Le principe de la méthode repose sur une concentration minimale d'un Agent antimicrobien,

Nécessaire pour empêcher la croissance de microorganismes.[90] Consiste àensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration Décroissante en huile essentielle. Après incubation, permettre le contrôle de la plage Pour atteindre la concentration minimale (CMI) .[91]

6.8.9.3 Mode opératoire

Une solution mère de chaque extrait (d'une concentration final de 100mg/ml est Obtenue en DMSO, une dilution en double série est réalisé extemporanément en DMSO à partir de la solution mère. puis une série de dilution est réalisée à partir de Cette solution dans un plaque de 96 puits , la gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 0.5-0.25- 0.125-0.0625- 0.0312-0.0159-0.0078-0.0039-0.0019 et 100µl de chaque dilution sont transférées dans les 10 puits consécutifs incorporés à 100ul de bouillon Mueller Hinton puisensemencés par 20µl de l'inoculum bactérien standardisé. Chaque ligne est réservée à Souche spécifique. L'autre charge deux puits, l'un servant de contrôle Négative rempli par 100ul de BMH et l'autre utilisé comme contrôle positive positive rempli par 100µl de MHB et 20µl de l'inoculum. Après on incube la plaque à 37° pendent 18h

6.8.9.4 Lecture des résultats

La CMI est la concentration minimale d'huile qui inhibe la croissance des microorganismes dans les puits, La croissance bactérienne est indiquée par la présence d'un "trouble" blanc sur le fond des puits.

6.8.10 Détermination de la concertation minimale bactéricide (CMB)

la plus faible concentration d'antibiotique laissant 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet **bactéricide** d'un antibiotique. Différentes techniques dérivent de ces deux mesures ; le laboratoire de bactériologie effectuera ces techniques en fonction des différentes étapes de l'analyse bactériologique. [92]

6.8.10.1 Caractère bactéricide et bactériostatique

Pour définir le caractère bactériostatique ou bactéricide il est possible de calculer le rapport CMB/ CMI. Si le rapport est inférieur a 4 l'huile est considère bactéricide [93] Pour d'autres auteurs si les valeurs de CMB sont équivalentes aux valeurs de CMI cela implique que l'effet est **bactéricide**, et si les valeurs de CMB sont plus élevées aux valeurs de CMI cela signifie que l'effet est **bactériostatique**[94].

6.9 L'activité anti-inflammatoire

6.9.1 Définition des anti-inflammatoires

Les anti- inflammatoires constituent la classe thérapeutique la plus prescrite au monde. Ils permettent de réduire ou de supprimer les conséquences de la réaction inflammatoire sans préjuger de l'étiologie ni du mécanisme de celle- ci [95]

L'importance des espèces réactives de l'oxygène dans la génération de stress oxydants et des pathologies parfois graves tels que les maladies inflammatoires ont conduit le métabolisme à fabriquer une défense efficace contre ces espèces, ainsi les neutraliser et protéger le corps d'autres agressions générés par l'attaque de ces dernières.

Un nombre important de médicaments synthétiques ou naturels ont été étudiés pour y remédier. [96]

6.9.2 Quelques techniques de test anti- inflammatoires in vivo

Tableau 18 : Quelques méthodes de tests anti-inflammatoires in vivo

Agent phlogistique	Cedème	Références
acide arachidonique	Application local à la surface de l'oreille	(Garrido et al., 2004 ; Backhouse et al., 2008)
Carragénine	Injection intra-articulaire dans la patte postérieure	(Winter et al., 1962).
huile de croton	Application locale dans l'oreille	(Yaping et al., 2003 ; Ismaili et al.,2004
adjuvant de Freud	Injection intra-articulaire dans patte postérieure	(Garrido et al.,2004)
Albumine de l'oeuf	Injection intra-articulaire dans patte postérieure	Karthikeyan et Deepa, 2011 ; Yu et al., 2012)

6.9.3 Animaux utilisés

Des lapins d'un seul sexe (femelles), avec un poids corporel de 1700 à 1800 g et une moyenne d'âge de 5 mois.

6.9.4 Conditions d'élevage

Les lapins ont été misés dans un milieu d'élevage sous une température ambiante de 23 à 25°C, et nourries par des aliments fabriqués à base de céréales (50g/jour), ainsi que par l'eau, tout en respectant un rythme d'éclairage et d'obscurité de 12/12h pour respecter l'alternance jour et nuit. Elles ont été laissées 15 jours dans les conditions du laboratoire pour s'adapter au milieu.

6.9.5 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

La méthode de la carragénine induisant un œdème au niveau de la patte a été utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire, le diamètre de la patte a été mesuré à l'aide du micromètre avant et après l'injection de la carragénine pour évaluer l'augmentation et la réduction du diamètre. (97]

L'activité anti-inflammatoire de gel à 7% d'huile essentiel clou girofle a été investiguée par l'utilisation de test d'inhibition d'œdème de la patte de lapin par la carragénine.

- Les lapins ont été réparties en 2 groupes (lots) de 2 lapin chaque un.
- Les deux lots ont étai injecter par 100ul de carragénine à 0.1% au niveau de la patte gauche de lapin a t=0



Figure 27 : Photographie de l'injection de la carragénine dans la patte de lapin. (Original)

Etude Expérimentale

- **Le groupe témoin (lot 1)** : a $t=2$ heures ont reçu la FLUNIXINE 50 Mg/ml comme anti-inflammatoire de référence (anti-inflammatoire non stéroïdien) à une dose de 0.22ml/10kg.



Figure 28 : Photographie de l'injection de l'anti inflammatoire. (Original)

- **Le groupe traité par le gel (lot 2)** : à $t=2$ heures application d'une quantité de gel (3.5ml) sur la pâte (jusqu'à ce que la patte soit recouverte)



Figure 29 : application du gel sur la patte de lapin après deux heures de l'injection de la carragénine(Original)

- L'œdème a été mesuré (2) heure après injection de la carragénine et chaque (2) heure pendant 10h à l'aide d'un pied à coulisse, qui permet de mesurer le diamètre de la patte de lapins.



Figure 30 : Photographie représentant la mesure de la patte avec un pied à coulisse.
(Original)

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème a été calculé pour chaque deux heure selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = ((D_n - D_0) / D_0) \times 100 \quad (3)$$

D_n : diamètre de la patte de chaque deux heure après injection de la carragénine.

D_0 : diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine

6.10 Test de la tolérance cutanée

6.10.1 Objectif et principe

Le test de la tolérance cutanée a pour but de connaître le risque d'un produit à application cutanée d'induire des signes d'irritation : des érythèmes et des œdèmes.

Le produit est appliqué sur une peau épilée saine et scarifiée d'un lapin non traité par le gel. Des lectures sont faites 24 heures et 48 heures après.

6.10.2 Mode opératoire

6.10.3 Préparation des animaux

- Le lapin a été épilé au niveau du flanc, 24 heures avant l'application du produit, à l'aide d'un rasoir.
- La zone épilée, a été ensuite rincée avec de l'eau pour obtenir une peau saine et glabre.



Figure 31 : Lapin après épilation

- Ajoute le gel clous girofle à (7%) sur la zone épilée (remplisse tout la zone)
- Des lectures sont faites 24 heures et 48 heures après.

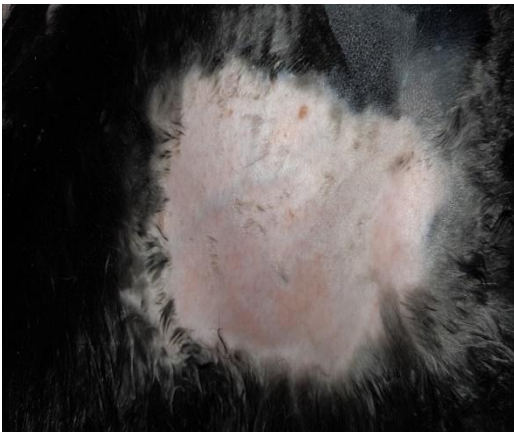


Figure 33 :48 heures après l'application de gel



Figure 32 : 24 heures après l'application de gel

Résultats et discussions



7 Résultats et discussions

7.1 Les analyses de l'huile essentielle

7.1.1 Caractéristiques organoleptiques

Chaque extrait est caractérisé par ces propriétés organoleptiques telles que l'odeur, l'aspect et la couleur.

L'odeur : L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habileté des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parviennent à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'au dix millièmes de grammes par litre d'air.

La couleur : La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée.

L'aspect : L'aspect d'un extrait dépend des produits qui la constituent, qui peuvent nous apparaître sous forme solide, liquide ou bien solide- liquide.

Le (**Tableau19**) nous montre une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des clous de girofle avec les normes d'**AFNOR**.

Tableau 19 : Caractéristiques organoleptiques [95]

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR	Liquide mobile limpide parfois, légèrement visqueux	Jaune très clair	Epicée caractéristique de l'eugénol
Huile Essentielle Etudiée	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Epicée

On remarque que l'huile essentielle obtenu au cours de cette étude est conforme à normes rapportées par l'AFNOR

L'analyse physico-chimique

Les Caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur, odeur, gout) étaient autrefois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques [98].

7.1.1.1 Le rendement d'extraction

Le rendement en l'huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter. Le rendement est calculé comme suit :

$$\text{RHE} = M' / M \cdot 100 \quad (4)$$

RHE : rendement en huile essentielle des clous de girofle ;

- **M'** : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme ;
- **M** : masse des clous de girofle broyés en gramme.

Les résultats des différentes extractions effectuées au laboratoire sont représentés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Résultats des 6 extractions de l'HE de clou de girofle.

Date d'extraction	Masse de végétal (g)	Masse d'HE extraction (g)	Rendement (%)	Temps d'extraction
10/02/2020	20,00	1.20	6	1 h 30 min
10/02/2020	20,00	1.55	7.75	1 h 30 min
10/02/2020	20,00	1.939	9.69	1 h 30 min
12/02/2020	20,00	1.84	9.2	1 h 30 min
12/02/2020	20,00	1.968	9.84	1 h 30 min
12/02/2020	20,00	1.871	9.35	1 h 30 min

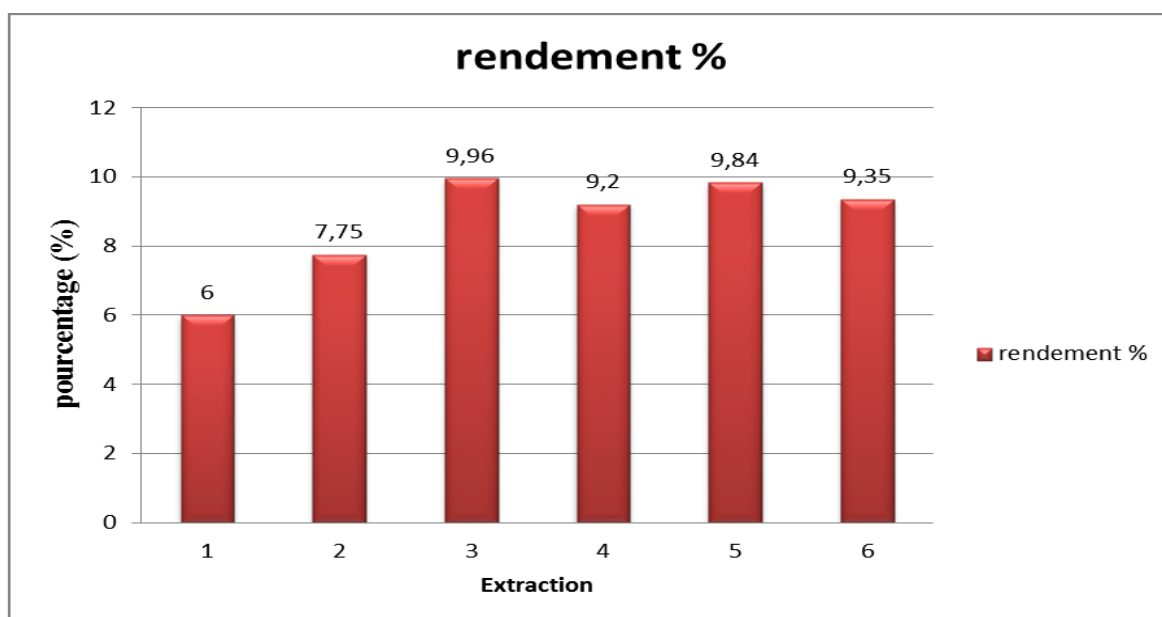


Figure 34 : Les résultats des différents rendements en H.E. des différentes extractions

La (**figure 34**) montre les résultats des différents rendements en H.E. des 6 extractions. Les rendements des différentes extractions varient entre (6%et 9,8%).

D'après cette figure, il s'avère que le rendement moyen en H.E extraite par hydro distillation à l'échelle de laboratoire à partir des Clous de girofle est de 0.086 %. La différence de rendements est probablement due à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et la simplicité de notre dispositif d'hydrodistillation, il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique de l'épice.

7.1.1.2 Densité relative d'HE

La solubilité dans l'eau de huile essentielle de clou de girofle est faible il y a donc des phases différentes ; les densités de l'eau et de l'huile essentielle sont très voisines égale à 1 il n'y a donc pas vraiment de phase qui surnage[63]

Tableau 21 : Résultat de la densité

	Huile étudié	Norme AFNOR	
		minimum	maximum
La densité (g/cm3)	1.0617	1.054	1.042

7.1.1.3 L'indice de réfraction

Indice de réfraction selon notre (Tableau 22), est conforme avec les normes AFNOR généralement utilisé pour l'identification et comme un critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers.

Tableau 22 : Résultat de l'indice de réfraction

	Huile étudié	Norme AFNOR	
		minimum	maximum
Indice de réfraction	1.5400	1.5346	1.5280

Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptable dans ce cas, on peut considérer que notre HE est pure.

7.1.1.4 Caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM) :

7.1.1.4.1 Exploitation de la CCM :

La distance parcourue entre la ligne de dépôt et le centre de la tache est caractéristique de l'espèce chimique: elle est identique que l'espèce soit pure (témoin) ou dans un mélange (HE).

Les espèces qui ont migrées à des hauteurs identiques sont les mêmes.

Le rapport frontal ou rate of flow (Rf) pour chaque tache observée a été calculé comme suit :

$$Rf = h / H \quad (5)$$

- h : la distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tache
- H : la distance entre la ligne de dépôt et le front du solvant

7.1.1.4.2 Analyse de la composition chimique par CCM :

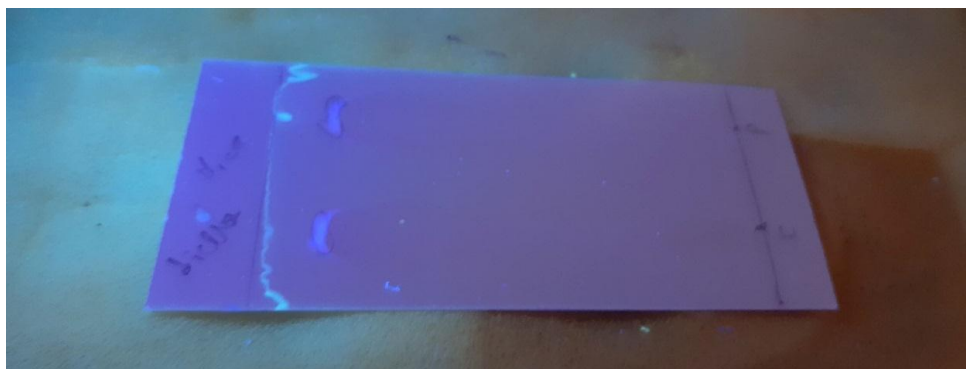


Figure 35 : Observation de la plaque CCM sous lampe UV.

Pour contrôler la pureté et déterminer le composé majeur d'huile que nous avons obtenue Par analyse chromatographique sur couche mince.

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

Tableau 23 :résumé du résultat de la CCM

	Solution témoin	huile essentielle
		1 ^{er} tâché
Distance parcourue (cm)	7.6	7.5
Rapport frontal (cm)	0.95	0.938

L'analyse chromatographique sur couche mince de silice a montré la présence de deux taches ayant des rapports frontaux identiques

Cette analyse confirme la présence un 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=0.938) correspondant à la tache supérieure de la plaque de chromatographie).

7.2 Contrôle de l'emulgel

Les essais complets sont décrits à la pharmacopée Française Xème édition [76]

Résultats et discussions

7.2.1 Test visuel (macroscopique)

Tableau 24 : différent test visuel

Gel	
Couleur	Blanche
Consistance	Bonne
Solubilité	Insoluble à l'eau
Tendance H/L	Hydrophile
La stabilise à la déluision	Une seule phase homogène
Effet Tyndall	Absence
Fluidité	++ (bonne fluidité)

- **Effet Tyndall :**

La couleur de base des émulsions est blanche. Si l'émulsion est diluée, l'effet Tyndall disperse la lumière et déforme la couleur en bleu; si elle est concentrée, la couleur est déformée vers le jaune. Ce phénomène peut être facilement vu en comparant le lait écrémé (avec ou sans graisse) avec de la crème (avec des concentrations élevées de matières grasses laitières). [99]

7.2.2 Test microscopique :

Déposer sur une lame une petite goutte d'émulsion prélevée dans l'émulsion homogène (si nécessaire agiter légèrement, par simple retournement, le flacon) recouvrir d'une lamelle et observer au microscope:

Evaluer de façon comparative la taille des globules des 3 émulsions : grossière, moyenne, fine, très fine. Estimer l'homogénéité de la taille des globules.

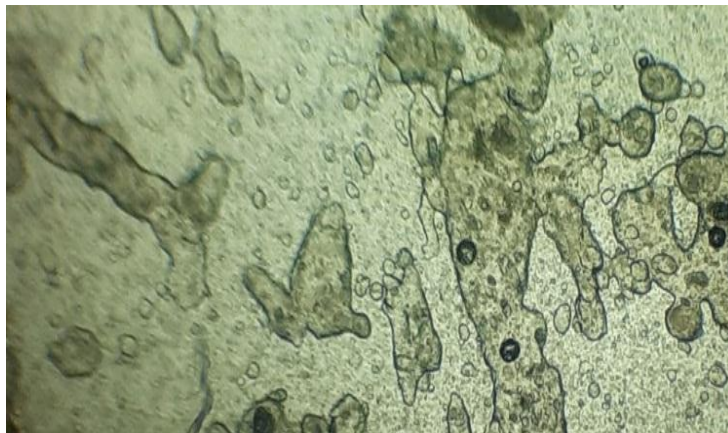


Figure 36 : Test microscopique une goutte de gel

Résultats et discussions

7.2.3 Stabilité à la centrifugation

Tableau 25 :Aspect de gel dans la centrifugation

Vitesse (x 1000 u/min)	50	50	50	50
Temps (min)	5	10	15	30
Aspect	Homogène	Homogène	Homogène	Petite séparation



Figure 38 : après 5 min dans la centrifugation



Figure 37: après 10 min dans la centrifugation



Figure 39 : après 30 min dans la centrifugation

Ce qu'on peut conclure sur la stabilité de notre formulation:

La hauteur de séparation en comparaison avec le volume totale de l'emulgel petite a été calculée si on a considéré que la quantité du gel dans le tube est de 100% donc la séparation est de 4% ce qui est négligeable à notre avis donc la formulation résiste à 1 h de centrifugation rigoureuse.

Résultats et discussions

Tableau 26 : Observation d'aspect de l'émulgel émulsions, et instabilités éventuelles après 1h

Crémage [remontée des globules de la phase dispersée vers la surface : Phénomène réversible]	Négative - - -
Sédimentation [précipitation des globules vers le fond du tube : Phénomène réversible]	Positive + après 1h
Coalescence [fusion des globules = rupture de l'émulsion : Phénomène irréversible]	Négative - - -

7.2.4 Détermination de PH d'emulgel :



Figure 40 : mesure de PH par papier ph

7.3 Détermination du potentiel antioxydant par le test de réduction du radical stable DPPH :

Les résultats présentés dans la figure de l'activité anti radicalaire de l'extraction d'huile essentielle clous de girofle :

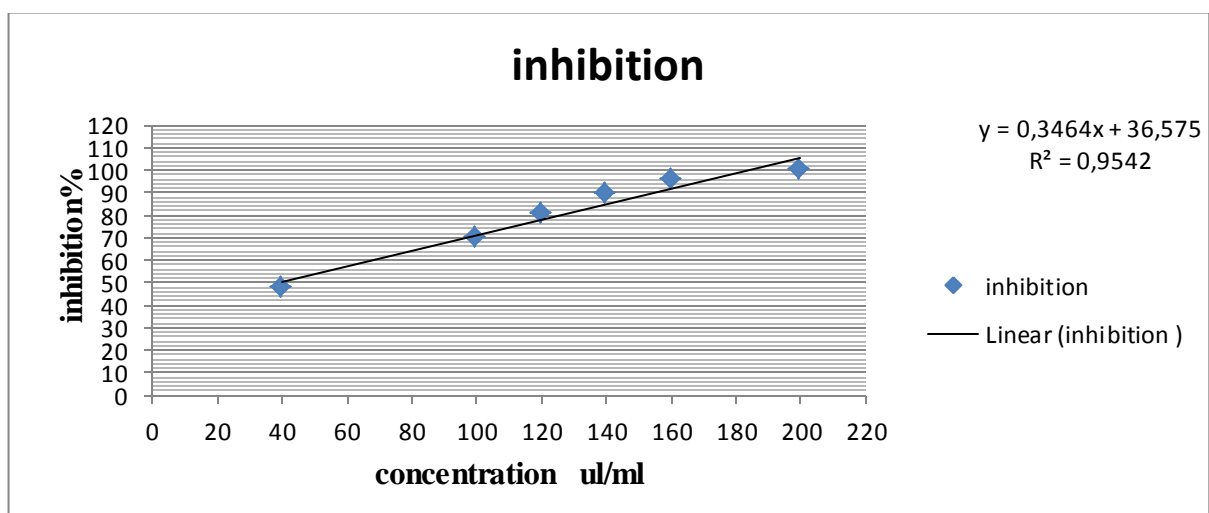


Figure 41 : pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration l'huile essentielle clous de girofle

Résultats et discussions

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont Représentés dans la Figure 41 Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration d'huile essentielle de clous de girofle

L'IC50 est déterminée graphiquement:38.76ul/ml.

Les valeurs De l'IC50 de notre extrait sont nettement supérieures de l'IC50 de l'acide ascorbique. Contrairement à l'acide ascorbique qui présente un effet antioxydant à faible concentration (3.25µL/ml), L'huile essentielle clou girofle a montré une activité de balayage du DPPH• moins élevée par comparaison à la vitamine C.

L'activité antioxydant des huiles essentielles ont été évaluée par la méthode de piégeage du radical (DPPH) [100]

Cette méthode se basé exclusivement sur la capacité réductrice ou de piégeage des radicaux comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant

L'essai au DPPH est une méthode les plus connue et la plus utilisée pour la détermination de l'activité antioxydant de plusieurs substances et extraits

Le radical DPPH possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote [100]de ce fait en présence d'antioxydant, le radical DPPH se réduit par transfert de protons [101]Ceci est visible par le changement de couleur du pourpre au jaune, le maximum d'absorption du DPPH est de 517 nm [102]

7.4 Evaluation de l'activité antibactérienne

7.4.1 Activité antibactérienne des antibiotiques (antibiogramme)

L'antibiogramme est réalisé dans le but de tester la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques (témoin positif), nous avons choisis les antibiotiques a charge connue, afin d'évaluer la résistance des souches testés, le tableau suivant résume l'ensemble des témoins positifs

Les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité ou résistance des souches bactériennes vis-à-vis des ATB utilisés sont résumés dans le tableau suivant :

Résultats et discussions

Tableau 27 : les résultats de sensibilité et diamètre mesure par la méthode de diffusion(en mm)

ATBs	<i>Staphe</i> 43300		<i>Pseudo</i> CIP A22		<i>Staphe</i> 25922		<i>E.coli</i> 8739 ATCC	
	SB	Diamètre (mm)	SB	Diamètre (mm)	SB	Diamètre (mm)	SB	Diamètre (mm)
TE	+++	20	++	15	NR	NR	NR	NR
KF30	-	/	-	/	-	/	-	/
CFM.5	-	/	-	/	-	/	-	/
PI 20	NR	NR	NR	NR	++	16	NR	NR
TEC 30	NR	NR	NR	NR	NR	NR	++	17
SB : La sensibilité des souches vis-à-vis des disques d'antibiotiques NR : non recherché								

7.4.2 Aromatogramme

Nous avons testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou girofle par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis de quatre souches bactériennes. Les résultats montrent une inhibition de la croissance bactérienne proportionnelle au diamètre de la zone d'inhibition notre huile essentielle a montré une moyenne activité du tout testés des souches bactériennes

- **Huile essentielle pure**

Tableau 28 : résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle clou girofle Réalisé par la méthode de diffusion sur disque

Souche Microbienne	<i>Staphe</i> 43300	<i>Pseudo</i> CIP A22	<i>Staphe</i> 25922	<i>E.coli</i> 8739 ATCC
Diamètre d'inhibition	15 mm	23mm	30mm	35 mm
Sensibilité	Très sensible ++	Extrêmement sensible +++	Extrêmement sensible +++	Extrêmement sensible +++

Les espèces microbiennes testées présentent des diamètres d'inhibition différents vis-à-vis d'huile essentielle du clou de girofle concentré

L'espèce qui présente le plus grand diamètre étant. *E.coli* 8739 ATCC, suivie de *Staphylococcus* 25922 puis *Pseudo* CIP A22 et enfin *Staphe* 43300 avec le plus faible diamètre.

Résultats et discussions

- Huile essentielle dilue (100mg/ml)

Tableau 29 : résultats de l'aromatogramme pour huile essentielle dilue de clou de girofle

Souche microbienne	<i>Staphe 43300</i>	<i>Pseudo CIP A22</i>	<i>Staphe 25922</i>	<i>E. coli 8739 ATCC</i>
Diamètre d'inhibition	12 mm	12 mm	14mm	23mm
Sensibilité	Sensible +	Sensible +	Sensible +	Extrêmement sensible +++

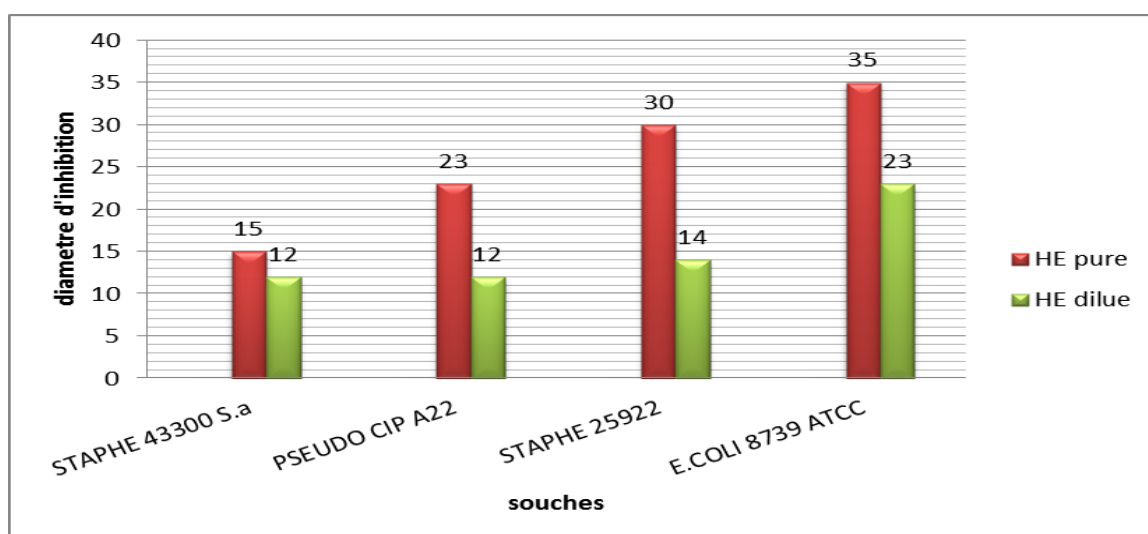


Figure 42 :Représentation graphique de diamètre d'inhibition L'huile essentielle clou girofle pur Et l'huile essentielle dilue aux souches bactériennes.

D'après la figure et le tableau ci-dessus on constate que l'HE de clou de girofle pur possède un fort pouvoir antibactérien contre *E.coli 8739* et *Staphylococcus 25922* ainsi qu'une activité moyenne pour les autres souches à part *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* qui s'est avérée résistante.

On constate aussi que l'HE dilué possède un pouvoir antibactérien vis-à-vis des souches testées, la sensibilité est différente une fois la concentration de HE diminue néanmoins il reste très efficace sur les quatre souches, surtout sur la souche *E.coli 8739 ATCC* la plus inhibée par HE même en étant dilué.

7.4.3 Méthode des puits

Nous avons testés par cette méthode HE et le gel préparé afin d'évaluer le pouvoir antibactérien de HE une fois intégré dans la formulation

Comme cité auparavant des puits ont été creusés dans la gélose après ensemencement, après incubation 24 h nous avons obtenus les diamètres suivants :

Résultats et discussions

Tableau 30 résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle clou girofle et de gel Réalise par la méthode de puits

Souches	gel à base d'HE clou girofle 16ul /10ml	gel à base d'HE clou girofle 30ul /10ml	HE clou girofle Concentre
<i>Staphe.E</i> 43300 <i>S.a</i>	Néant	15 mm	27 mm
<i>Pseudo</i> CIP A22	Néant	12 mm	20 mm
<i>Staphe</i> 25922	Néant	14 mm	20 mm
<i>E.coli</i> 8739 ATCC	Néant	15 mm	22 mm

Deux test sont réaliser pour cette méthode les résultats sont exprimer après incubation 24 h

Après 24H nous avons constaté que le gel à base d'HE clous de girofle 16ul/10ml indique une absence d'activité antibactérienne, par contre le gel à base d'HE clous de girofle à (30ul/10ml) montre une sensibilité pour les souches étudiées comparable à celle de HE concentrée en présentant des diamètres plus importants que HE lui-même, ceci eut être expliquer par la présence des excipients contenus dans les formulations qui apparemment ont un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries

Ces résultats doivent être confirmés avec une étude approfondie de l'effet de chaque composant seul afin de conclure et dans les conditions appropriées.

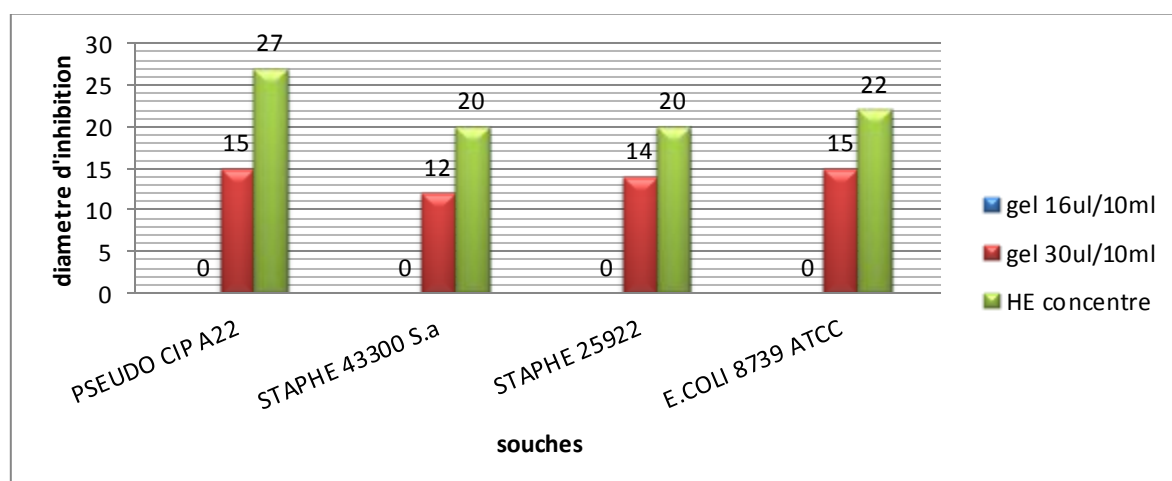


Figure 43 : Représentation graphique de diamètre d'inhibition L'huile essentielle clou girofle Et gel relative aux souches bactériennes

Résultats et discussions

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'association de gel HE clous girofle avec Le gel de Lavande a donné une interaction synergique pour *PSEUDO CIP 22* (25 mm) et un résultat antagoniste vis-à-vis des autres souches, ce qui nous laisse à dire que l'effet d'HE de lavande n'est pas une forme pas bonne mélange pour améliorer l'activité bactérienne

7.4.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices de l'huile de "clou girofle " par la technique de micro-dilution. Les résultats des (CMI) d'HE vis-à-vis les souches bactériennes sont présentées dans le (tableau 31)

Tableau 31 : Résultats d'activité antibactérienne d'huile essentielle de clou girofle Réalisé par la méthode de CMI

Souches	Les concentrations (mg /ml)											
	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	T.P	T.N
<i>PSEUDO CIP A22</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	CMI											
<i>STAPHE 43300 S.a</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	CMI											
<i>STAPHE 25922</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	CMI											
<i>E.COLI 8739 ATCC</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	CMI											

T : Témoin - : inhibition
N : Négative + : croissance
P : positive

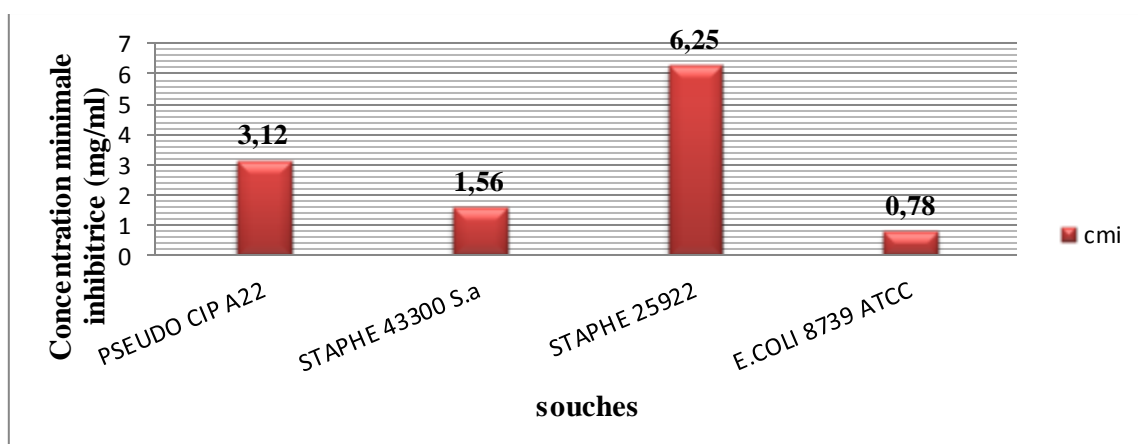


Figure 44 : Représentation graphique des CMI de L'huile essentielle clou girofle Relative aux souches bactériennes.

Résultats et discussions

A travers les résultats, nous avons remarqué que l'huile essentielle de clou de girofle présente un effet inhibiteur remarquable. En effet, pour les quatre souches étudiées, la gamme de CMI varie de 0.78 6.25 à mg /ml.

7.4.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le gel :

Tableau 32 : résultats d'activité antibactérienne de gel à Besse d'HE de clou girofle Réalisé par la méthode de CMI

Souches	Les concentrations (mg /ml)											T. N
	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.3 9	0.1 9	0.0 9	T.P	
<i>PSEUDO CIP A22</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
				CMI								
<i>STAPHE 43300 S.a</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		CMI										
<i>STAPHE 25922</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
				CMI								
<i>E.COLI 8739 ATCC</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			CMI									

T : Témoin
N : Négative
P : positive
- : inhibition
+ : croissance

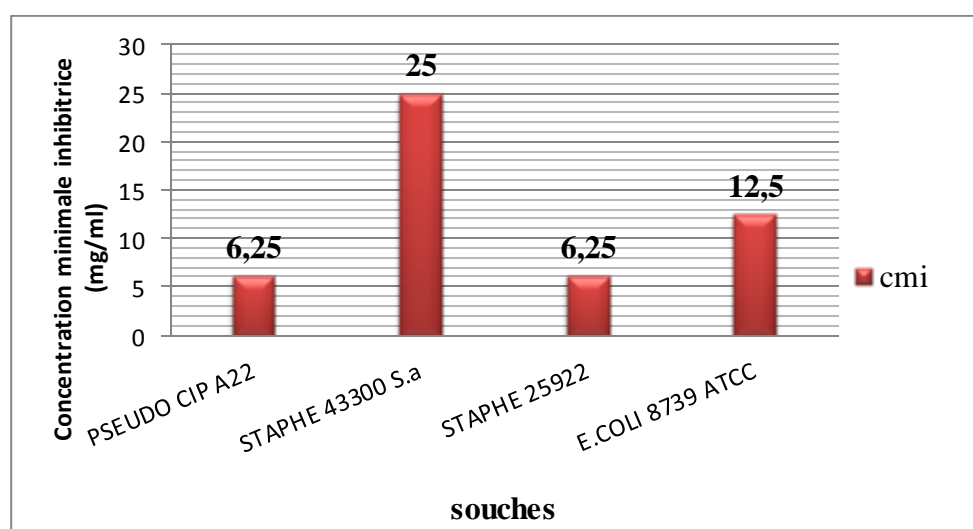


Figure 45 : Représentation graphique des CMI de gel à base HE clou girofle Relative aux souches bactériennes

Résultats et discussions

Nous remarquons que les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de dilution a confirmé que l'huile essentielle de clous girofle témoigne d'une activité antibactérienne vis-à-vis des 4 souches testées de avec des CMI

Relativement moyenne entre 0.78µg/ml et 6.25µg/ml. Par ailleurs les résultats observés illustrent bien que les valeurs moyennes des CMI obtenues par la méthode de dilution du gel à base des clous de girofle sont élevées par rapport à celles obtenues de l'HE brute le tableau résume l'ensemble des résultats obtenus.

Tableau 33 : les résultats de CMI d'huile essentielle de clous de girofle et le gel à base de clou de girofle

souches	CMI/HE µg/ml	CMI/gel
<i>PSEUDOCIP A22</i>	3.125	6.25
<i>STAPHE 43300 S.a</i>	1.56	25
<i>STAPH 25922</i>	6.25	6.25
<i>E.COLI 8739 ATCC</i>	0.78	12.5

La souche *ECOLI* donne une CMI la plus faible et *STAPH25922* montre la CMI la plus importante pour HE par contre le gel a augmenté les CMI sauf pour la CMI de la souche de *STAPH25922*, ou l'activité inhibitrice du HE est restée la même, néanmoins la CMI de la souche *STAPH43300* a considérablement augmentée ce qui laisse à dire que HE une fois formulé, perd de son pouvoir inhibiteur vis à vis de cette souche, à cause des excipients utilisés dans gel, pour sa croissance d'où la CMI le plus élevée

7.4.6 Détermination de la concertation minimale bactéricide (CMB) de gel et huile essentielle

La comparaison des dénombrements bactériens effectuée après incubation a permis de déterminer la CMB

Tableau 34 : les résultats de CMB d'huile essentielle de clous de girofle et gel à Besse de clou de girofle

souches	CMB/HE µg/ml	CMB/ gel
<i>Pseudo cip A22</i>	50	25
<i>Staphe 43300</i>	25	50
<i>STAPH 25922</i>	50	25
<i>E.COLI 8739 ATCC</i>	50	50

7.4.7 Qualification de l'activité antibactérienne d'HE

Le rapport CMI/CMB qui permet de définir le caractère bactéricide ou bactériostatique d'une Huile essentielle de et clous de girofle on dit que si :

$CMB / CMI = 4$ L'ATB est bactéricide

$CMB / CMI = 8-16$ L'ATB est bactériostatique

Résultats et discussions

En effet, si les CMI et CMB sont proches cela signifie que l'ATB tue quasiment tout de suite Les bactéries = bactéricide.

Si les CMI et CMB sont un peu éloigné, au début l'ATB empêche simplement les bactéries De croitre et c'est seulement en augmentant la dose d'ATB que les bactéries meurent.

Si les CMI et CMB sont carrément très éloignées, cela signifie que l'ATB stoppe la croissance Des bactéries mais que celles-ci le supportent bien puisqu'en augmentant la dose, elles Survivent encore. Elles sont donc tolérantes les résultats de rapport CMB/CMI sont présentés dans le (tableau 35).

Tableau 35 : Le rapport CMB/CMI d'HE clous de girofle relatif aux quatre souches bactériennes

Le rapport CMB/CMI					
HE CLOUS DE GIRFELE	Les souches bactériennes				
	<i>STAPHE</i> 43300 <i>S.a</i>	<i>PSEUDO</i> <i>CIP A22</i>	<i>STAPHE</i> 25922	<i>E.COLI</i> 8739 ATCC	
	16	16	8	64	
<p>CMI : Concentration minimale inhibitrice</p> <p>CMB : Concentration minimale bactéricide</p>					

Tableau 36 : Le rapport CMB/CMI gel a Besse d'HE clous de girofle relatif aux quatre souches Bactériennes

Le rapport CMB/CMI					
Gel a Besse CLOUS DE GIRFELE	Les souches bactériennes				
	<i>Staphe</i> 43300 <i>S.a</i>	<i>Pseudo</i> <i>CIP A22</i>	<i>Staphe</i> 25922	<i>E.coli</i> 8739 ATCC	
	4	2	4	4	
<p>CMI : Concentration minimale inhibitrice</p> <p>CMB : Concentration minimale bactéricide</p>					

Le rapport CMB/CMI de notre l'huile essentielle clous de girofle est compris entre 8 et 16 pour toutes les souches bactériennes testées sauf *E. coli* ATCC 25922 = 64

Cette constatation nous amené à dire que nos huiles essentielles exercer une action bactériostatique contre *S. aureus* 25923, *S. aureus* 43300 et *P. aeruginosa* 27853

Résultats et discussions

Le rapport CMB/CMI de gel à basse de clous de girofle

D'après les résultats obtenus on peut dire par calcul du rapport CMB/CMI que le gel exerce un effet bactéricide puisque le rapport varie entre 2-4

7.5 Résultats d'activité anti inflammatoire :

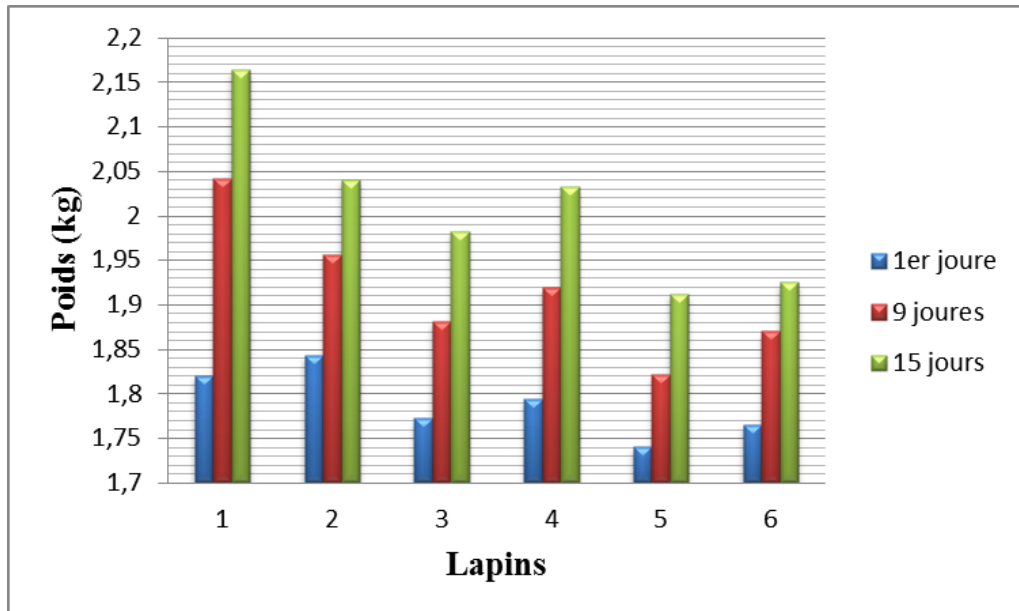
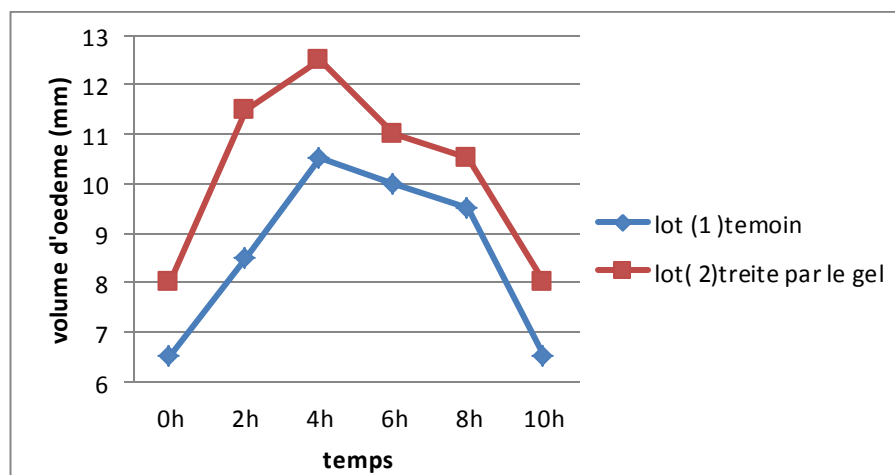


Figure 46 : Représentation graphique de différent poids des lapins pendant les 15 jours.

L'activité anti-inflammatoire de gel (de clou girofle) a été évaluée par la méthode de carragénine induisant un œdème de la patte chez les lapins, le diamètre de la patte mesuré par la pied à coulisse a donné les résultats illustrés dans ce tableau, montrant l'augmentation du diamètre de la patte en fonction du temps.



Résultats et discussions

Figure 47 : Représentation Graphique d'évaluation du diamètre (mm) de la patte en fonction des heures

Le diamètre de la patte augmente considérablement en fonction du temps après injection d'un agent phlogistique (la carragénine) qui est le plus utilisé pour examiner l'activité anti-inflammatoire car il n'est pas antigénique.

Afin de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de notre gel, on a calculé les % d'augmentation de l'œdème en fonction du temps (heures), les résultats sont reportés sur le graphe suivant :

Reportés sur le graphe suivant :

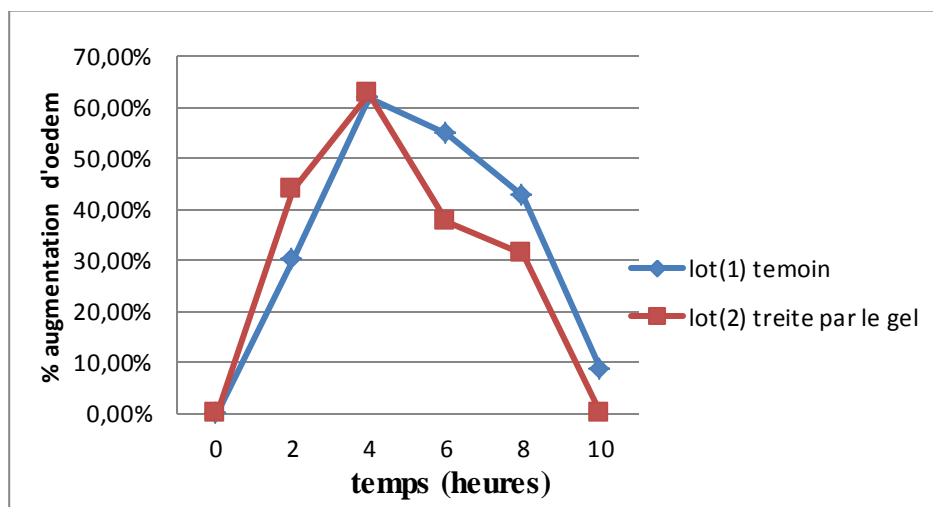


Figure 48 : Graphe représentant les % d'augmentation de l'œdème

On remarque que l'augmentation de l'œdème est plus importante chez le lot traité par le gel qui atteint son maximum à la 4^{ème} heure (62,5 %) suivie d'une phase de régression, on comparait avec lot témoin qui atteint son maximum à la 4^{ème} heure (57,14 %).



Figure 50 : représente la patte avant inflammation



Figure 49 : représente la patte après inflammation (Original)

Résultats et discussions

L'effet de la molécule anti-inflammatoire non stéroïdienne de référence (FLUNIXINE 50 Mg/ml) et celui de la crème à 7% d'huile essentielle de clou de girofle se traduit par une réduction de l'œdème de façon progressive. Cet effet était significative à la 6^{em} heure et atteint son maximum d'activité à la 8^{em} heure avec un pourcentage d'inhibition de 44.02 % et 62.68 % respectivement.

On a calculé le % d'inhibition de l'œdème, les résultats sont représentés sur la

Figure ci-dessous :

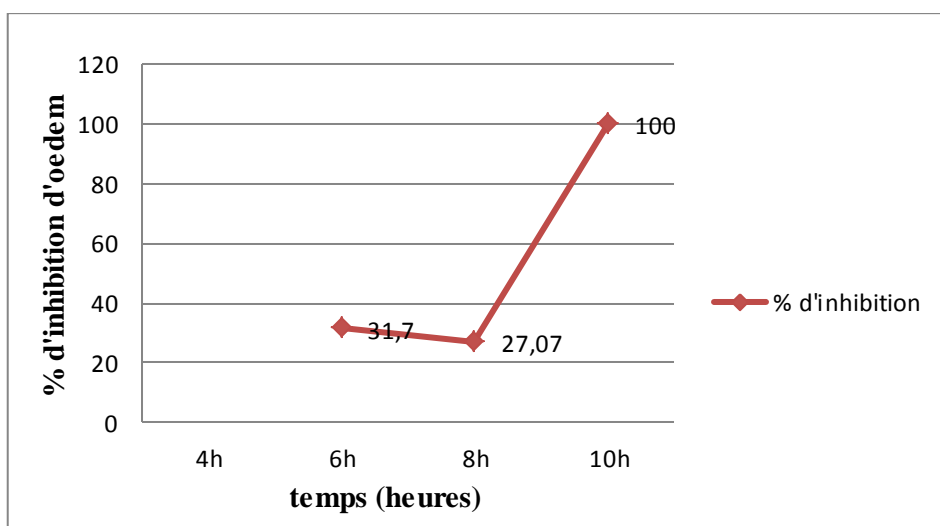


Figure 51 : Graphe représentant les % d'inhibition de l'œdème

7.5.1 Résultats test de la tolérance cutanée :

Les résultats obtenus après les deux observations (24h et 48h) sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 37 : Résultats d'observation après 24h et 48h

Lapin	Erythème		Œdème	
	24h	48h	24h	48h
1	Pas d'érythème	Pas d'érythème	Pas d'œdème	Pas d'œdème

Nous avons remarqué l'absence d'œdème et d'érythème sur la zone de la peau, ce qui permet de juger que notre produit le gel 7% est un produit non irritant.

8 Conclusion générale

Les plantes médicinales restent une bonne source de principe actif, tels que les huiles essentielles pour ce qui apportent d'effets thérapeutiques et surtout antibactérien, dans cette thématique la présente étude révèle l'activité antibactérienne de HE des clous de girofle seul et une fois formulé dans un gel anti-inflammatoire.

L'extraction de HE du clous de girofle a révélé un taux différent à chaque fois ceci dépend de la méthode d'extraction utilisée, qui est l'hydrodistillation, la mesure de densité et l'indice de réfraction de l'huile de clous de girofle est en accord avec la littérature, puisque les résultats sont comparables.

La soumission de notre gel a des tests de qualités (homogénéité, pH, stabilité) et des tests biologique (antibactérienne, anti-inflammatoire) ont montré que notre produit fini est conforme aux normes pharmacologiques grâce aux protocoles appliqués et il s'est révélé un très bon agent antibactérien puisque le gel grâce aux propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires de l'huile de clous de girofle contenue dans la formulation du gel on constate que le gel n'a modifié en aucun cas son activité biologique.

Le pouvoir antibactérien du clous de girofle seul ou dans le gel a révélé une activité antibactérienne contre les souches référencées (*Staphe 43300*, *Pseudo CIP A22*, *Staphe 25922*, *E .coli 8739 ATCC*) a été mise en évidence grâce à la méthode de diffusion par gélose, la CMI a été mesuré par la méthode dilution qui donné une différence entre le gel et HE seul d'après ces résultats on a conclu que les constituants du gel hormis HE ont révélés une bonne activité antibactérienne contre les souches bactériennes.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire in vivo a montré que le gel possède une activité anti-inflammatoire pratiquement identique, à celle d'un anti-inflammatoire d'origine commerciale puisque l'œdème a été inhibé.

Les résultats obtenus d'après le gel formulé montrent que l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire de HE a été préservé, malgré les excipients du gel, on peut dire que notre gel est un médicament anti-inflammatoire, cette affirmation nous laisse envisager pour l'avenir d'étudier l'aspect antioxydant et analgésique du gel formulé in vivo afin de minimiser la toxicité des médicaments antioxydants et anti-inflammatoire prescrits d'habitude qui peuvent interagir avec d'autres traitement que le malade est obligé de prendre, puisque HE utilisé est d'origine naturelle et a bonne dose il est bénéfique est sans danger pour l'être humain.

9 Référence bibliographiques

- [1]: **Benoit G.** Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de Vienne [Thèse]. Université de Poitiers faculté de médecine et de pharmacie, 2015.
- [2]: **Brunot J.** Pharmacognosie photochimie plantes médicinales 3ème édition. Paris
- [3]: **Dorosso Sonate J.** Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Université Ouagadougou. : 2002
- [4]: **Kaloustian J, Hadji-Minaglo F.** La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Paris. Edition Springer. 2012
- [5]: **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.
- [6]: **Hellal Zohra; (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et anti oxydantes de certaines huiles essentielles des citrus ; mémoire de magister ; page: 03.
- [7]: **Azevedo N.R., Campos I.F., Ferreira 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*. *Photochemistry*; 56: 733-736
- [8]: **Violaine Chassaing ; (2008).** L'aromathérapie: les huiles essentielles au service de cheval. Eds ; page: 2, 4.
- [9]: **Georgette, S.R., Casa grande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria, J.V. (2003).** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Methode. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : P1-5
- [10]: **Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- [11]: **LUCCHESI M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.
- [12]: **luicita . lagunez rivera. 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- [13] **Boutamani.M.** Etude de la variation du rendement et de la composition chimique du *Curcuma longa* et *Myristica fragrans* en fonction du temps et de la technique utilisée. Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger, 2013. [En ligne]. [Consulté en Juin 2018]. Disponible sur: www.memoireonline.com
- [14]: **Elhaib A.** Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse. 2011.

Référence bibliographiques

- [15] : **Franchomme, P.** ;Pénoël , D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois éditeur. Limoges. 445 p.
Richard, H. 1992. Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339p
- [16] : **Hemwimon S.,** Pavasant P. &Shotiprux A. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. Separation and Purification Technology, 2007, Vol. 54; pp 44-50.
- [17] : **BRUNETON J,** Pharmacognosie « Photochimie Plantes » médicinales 3 eme éd, Tec et Doc, Paris1999- pp 484-540 (livre)
- [18] : **:El-BAHAI M., Al-HARIRU M., YART. et BAMOSA A.**200. Cardiac inotropic and hypertrophic effects of *Nigella sativa*. Department of Physiology, College of Medicine, King Faisal University, PO Box 2114, Dammam, 31451, Saudi Arabia, P. 1.2.3
- [19]: **Pourmortazavi S.M. &Hajmirsadeghi S.S.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatil oil analysis, Journal of chromatography A, 1162, (2007), 2-24
- [20] : **Y.Shen, R.D.** Smith, Electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography, TELEDYNE ISCO, 2008.
- [21] : **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier, 3eme Edition: tech & doc, Paris. P: 507-509.
- [22] : **Hilan C, Bouaoun D, Aoun J, Sfeir R et Garabeth F. (2009).** Propriétés antimicrobiennes et toxicité par détermination de la DL50 de l'huile essentielle de *Parangons asperula Boissier*.Phytothérapie. 7 : 8 -14
- [23] **Franchrome P , Jollois R, Penoel D.** L'aromatherapie exactement : encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Edition Roger Jollois. 2001.
- [24] : **Benoît G.** Etat des lieux sur l'aromatherapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de Vienne [Thèse]. Université de poitiers faculté de médecine et de pharmacie, 2015.
- [25] : loi 85-5 du 16 février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé.
- [26] **Fekih N.** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du Genre *Pinus* poussant en Algérie [thèse].Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid. 2015.
- [27] **Maach A., Jemali A. ; (1986);** Etude des caractéristiques physico-chimiques des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc: Menthe NaaNaa Abdi, Coriandre. IAV Hassan II, Rabat, Maroc ; pp : 85-109.
- [28] **Rouessac Francis,** Roue sac Annick, Gauche D., « Analyse chimique. Méthodes et technique instrumentales modernes » 2^e Edition : Dunod. 2004.
- [29] : **A. Pryde, M.T Gilbert,** Application of high performance liquid chromatography. John Wilyandsons, New York, 1979.
- [30] : **W.J. Munson,** Pharmaceutical analysis: Modern Methods, Part B, 1984.

Référence bibliographiques

- [31] G. G. Kirkland, L. R. Snyder. A. Wiley. Introduction to Modern Liquid Chromatography, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, (1978).
- [32] : L'aromathérapie exactement, P. Franchomme, R. Jallois et D. Péroël, Ed. Roger Jollois 2001
- [33]: Le clou de girofle - histoire de fleur - Article <http://www.foodavenue.fr/article/le-clou-de-girofle-histoire-de>
- [34]: Giroflier, Clou de girofle : planter, cultiver, récolter <https://www.aujardin.info/plantes/syzygium-aromaticum.php> (accessed Jan 3, 2020).
reviews 44 (2004) 87–112.
- [35]: **BARBELET S.** Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. (Mémoire de fin d'étude pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie) université de lorraine, 2015
- [36] : Rakotoatimanana B.V. et al., 1999 « Contribution à l'optimisation d'une unité de production d'huiles essentielles », mémoire de fin d'études, Département Génie Chimique, Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo ESPA, Université d'Antananarivo,
- [37] : Koroch A., Ranarivelo L., Behra O., Juliani H.R., and Simon J.E.
« Quality Attributes of Ginger and Cinnamon Essential Oils from Madagascar » in : Issues in new crops and new uses. Ed by Janick and A. Whipkey. ASHS Press, Alexandria, VA, 2007pp 338-341,
- [38] : article <https://www.aujardin.info/plantes/syzygium-aromaticum.php>
- [39] : **BOIS D.** Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges : histoire utilisation, culture. Volume 3 : plantes à épices, à aromates, à condiments. Paris : Ed. CME; 1999. p. 1-11.
- [40] : **RANOARISOA KM.** Evolution historique et état des lieux de la filière girofle à Madagascar [Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome]. Antananarivo : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques ; 2012. 89 p.
- [41] : **BARBELET S.** LE GIROFLIER : HISTORIQUE, DESCRIPTION ET UTILISATIONS DE LA PLANTE ET DE SON HUILE ESSENTIELLE. (Mémoire de fin d'étude Pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie) UNIVERSITE DE LORRAINE, 2015
- [42]: AFSSAPS. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles [en ligne]. 2008 [consulté le 20.09.14].
Disponible sur :
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/657257784ff10b16654e1ac94b60e3fb.pdf
- [43] : <https://www.fotocommunity.fr/photo/sechage-des-clous-de-girofle-nomade60/37221948>

Référence bibliographiques

- [44] : <https://jardinage.ooreka.fr/plante/voir/1649/giroflier?fbclid=IwAR3AqZNQ2nw3xLL62S7MnJl3YzuzqleZmjzyhdSZhvoCjZJgCUC163LlhSs>
- [45] : Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R. (2010) *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier, *Phytothérapie*, 8, 37-43.
- [46] : Y. Bar-Cohen, *Electroactive polymer (EAP) actuators as artificial muscles-reality potential and challenges*, SPIE Press (2001).
- [47] : Y. Osada, J.P. Gong, Y. Tanaka, *Polymer gels*, *Journal of macromolecular science Part C Polymer reviews* 44 (2004) 87–112.
- [48] : Y. Osada, J.P. Gong, *Soft and wet materials: Polymer gels*, *Advanced materials* 10 (1998) 827 – 837.
- [49] : M. Barrow, McGraw-Hill, *Physical chemistry*, Gordon 4th Edition (1979).
- [50] : pharmacopée européenne 6ème édition. 2007
- [51] : Le Hir.A, *Abrégée de pharmacie galénique*, 4ème édition revue et complétée. Masson Paris . 1983.
- [52] : Herbert A.Lieberman, Martin M.Rieger, Gilbert S.Banker, *Pharmaceutical Dosage Forms : Disperse systems*. Vol. 2.1990.
- [53] : Touzouirt.S, *Formulation d'un gel anti-inflammatoire et bactéricide à base d'AlkylphénoI*, thèse magister, faculté de Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, Université M'hamedBougaraBoumerdes. 2009.
- [54] : Bounouira.F, *les gels, aspects théoriques et applications*, thèse doctorat, faculté de médecine et de pharmacie, université Mohammed V - RABAT, 2015
- [55] : Herbert A.lieberman, Martin M.Rieger, Gilbert S.Banker, *Pharmaceutical Dosage Forms disperse systems*. Vol. 1. 1996.
- [56] : Guy Couarraze, Jean-Louis Grossiord, *Initiation à la rhéologie*. 3ème édition. 2000.
- [57] : A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrød. *Acta Chem. Scand.* 1967, 21: 2859-2870.
- [58] : Gaël RUIZ, *Extraction, Détermination Structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges*, 10 novembre 2005, 256 P
- [59] : P. Gacesa. *Alginates*. *Carbohydrate Polymers*, 1988, Vol.8, Issue.3, p. 161-182.
- [60] : **Flandrios J.P. (1997) : Bacteriologie Médicale collection AZAYPP : 2007.**
- [61] : Hameurlaine Samir. 2009, *Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes Pituranthos scoparius et Rhantherium adpressum de la région de Ghardaïa*. Ouargla,mémoire de magister.

Référence bibliographiques

[62]: La société Unify (inscrite au RCS de Nanterre sous le numéro 312 897 111) représentée par son Président, Olivier Abecassis

<https://www.doctissimo.fr/sante/aromatherapie/guide-huiles-essentielles/huile-essentielle-de-clous-de-girofle>.

[63] :anonyme3: <http://vcorbe.x.pagesperso-orange.fr/specialite/chimie/TP1-%20Eugenol.pdf>

[64] :Bataille X. 2000. LIVRE interactif de chimie.

[65] :Delmeyda W. 2001. Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site). chromatographie sur couche mince.

[66] :Ekoumou C. 2003. . Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite Thèse de doctorat de l'université de Bamako.

[67] :Debete Judith M. 2005. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.

[68] :Ferrari, J. (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. Ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.

[69] Merghem R., Jay M., Viricel Viricel M.R., Bayet C., et Voirin B. 1995. Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*, **38** : 637-640.

[70] Biallo D., Sanogo R., Yasambou H. et autre (2004) Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae). *C. R. Chimie*. **7** : 1073-1080.

[71] Sine J. P. 2003. Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses éditions marketing S A. p 99-101.

[72] : Kaplan M, Aviram M, Hayek T. Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: Role of insulin therapy. *Pharmacol Ther*. nov 2012;136(2):175-85

[73] :Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Technology*, **89**(3), 217–233. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008

[74]: Majhenic L., Kerget M.S., et Knez Z., Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. **104** (2007) 1258–1268.

[75]: SHARMA N. & TRIPATHI A. (2006). Fungitoxicity of *Citrus sinensis* L. essential oil on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiological and Biotechnology*, **22**, 587-593.

Référence bibliographiques

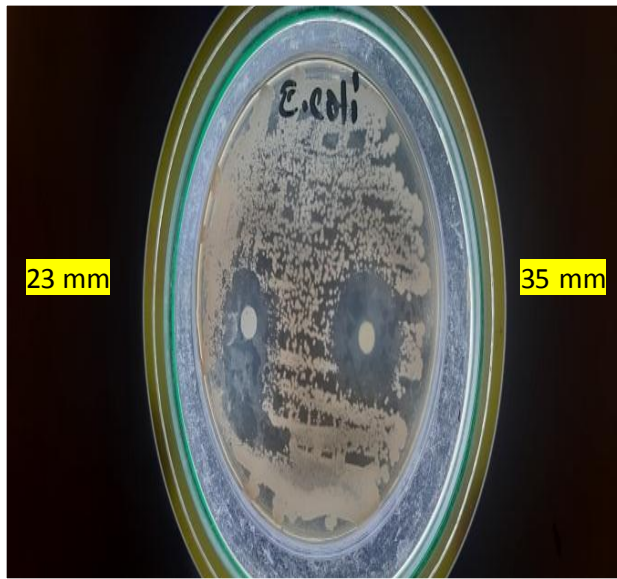
- [76]: Rakotoatimanana, B.V. et al. , 1999. « Contribution à l'optimisation d'une unité production d'huiles essentielles », mémoire de fin d'études, Département Génie Chimique, Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo ESPA, Université d'Antananarivo.
- [77]: Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253.
- [78]: Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII . pp.157 -165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim,405p.
- [79]: **Gachkar L.** 2007, Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, *Food Chem.*, p: 898-904
- [80] :**Zahira et al, (2013):** 100 plantes médicinales d'Algérie. Edition Palais du livre P135-131.
- [81]: Abdesselam Z., 2006. Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*, pp. 6-16.
- [82]: Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R., 1979. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: pp. 26-30.
- [83]: Pibiri M.C., 2006. Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp. 28-52.
- [84]: Razakarivony A.A., Andriamihaja B. & Razanamahefa B., 2009. Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. Actes du symposium biomad. Université d'Antananarivo. 28p.
- [85]: **PONCE A.G., (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native micro ora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, **36**, 679-684.
- [86]: Guérin-Faublée V. et Carret G. (1999) L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA. 5-12.
- [87]: Karam, N-E. et Karam, H. (1994). Isolement et caractérisation de bactéries lactiques de laitscrus d'Algérie. In *alimentation, Génétique et Santé de l'enfant*. Pp. 257-264. Ed. Desjeux, J. F. et Touhami, M., l'Harmattan.
- [88]: Lahlou M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 : pp. 435-448.
- [89]: Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 48, 5-16.
- [90]: Genné, D., Siegrist Hans, H., 2003. De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse*, pp. 464-468.
- [91]: Derwich, E. Benziane, Z. Boukir, A. (2010) Chemical Composition and In Vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Cedrus atlantica* vol (3) p:381-385.

Référence bibliographiques

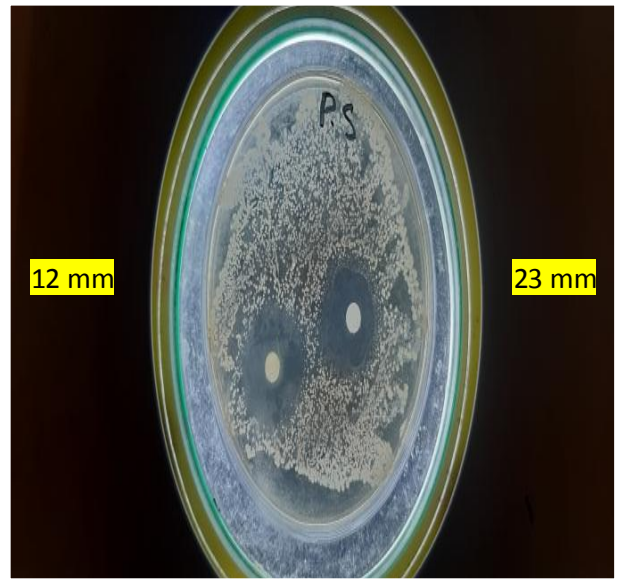
- [92]: Ennadir, J., Hassikou, R., Bouazza, F., Arahou, M., Al Askari, G., & Khedid, K. (2014). Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques des graines de *Nigella sativa* L. et de *Foeniculum vulgare* Mill. *Phytothérapie*, 12(5), 302-308.
- [93]: **Guinoiseau E.**, 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat. Université de corse, France. P 114.
- [94] : **Cosentino S., Tuberoso CIG.**, 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian. *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29(2): 130- 135.
- [95]: Nardi, G. M; Felippi, R; DalBó, S; Siqueira-Junior, J. M; Arruda, D. C; Delle Monache, F; Timbola, A. K; Pizzolatti, M. G; Ckless, K; Ribeiro-do-Valle, R. M.(2003). Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*, 10, 176–184
- [96]: **B. (2006)**. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona reticulata* (Annonaceae) sur l'oedème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr. 2006, Vol. XIV, pp. 179-186*
- [97] Winter E.A, Risley, EA, Nuss GV. (1963) Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin. *J. Pharm. Exp. Ther.*141:369-376.
- [98] **TALEB-TOUDERT Karima**, extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région Kabylie, mémoire de docteur, biologie animale et végétale, Université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou, (2015), p 27- 28-29
- [99] : aquaportail.com/definition-6274-emulsionà.
- [100]: **Shirwaikar A., Rajendran K. & Punitha I.S.R. (2006)**. In Vitro Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloid Berberine. *Biol. Pharm. Bull.*,29(9): 1906 -1910
- [101] : **Popovici C., Saykova, I. & Bartosz, T. (2009)**. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4 : 1313 - 8871.
- [102] : **Elmastas M., Isildak O., Turkekul I. & Temur N. (2007)**. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 337-345.

Annexe

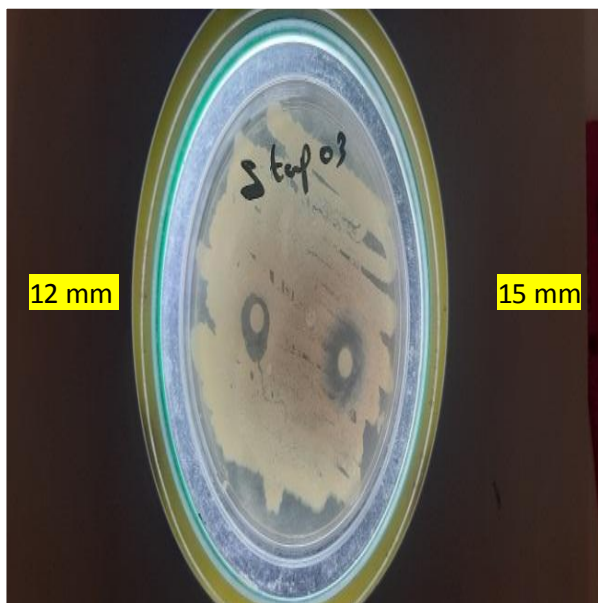
Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne d'HE de CLOUS DE GIROFELE Réalisé par la méthode de diffusion sur disque



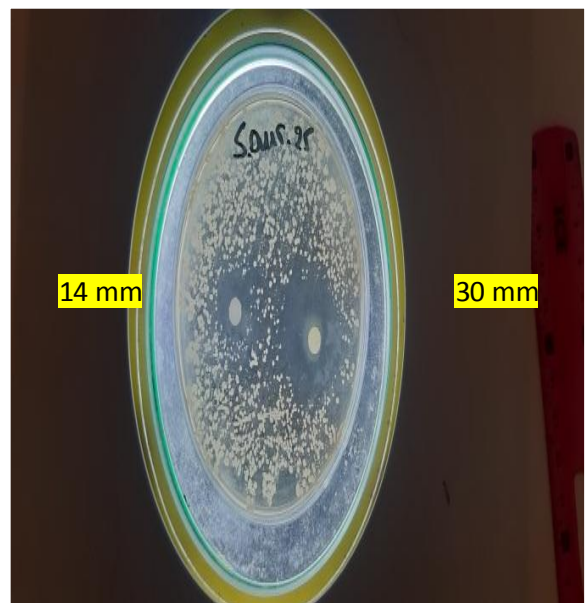
E. coli ATCC 25922 + HE de CLOUS DE GIROFELE



PSEUDO CIP A22 + HE pure et dilue

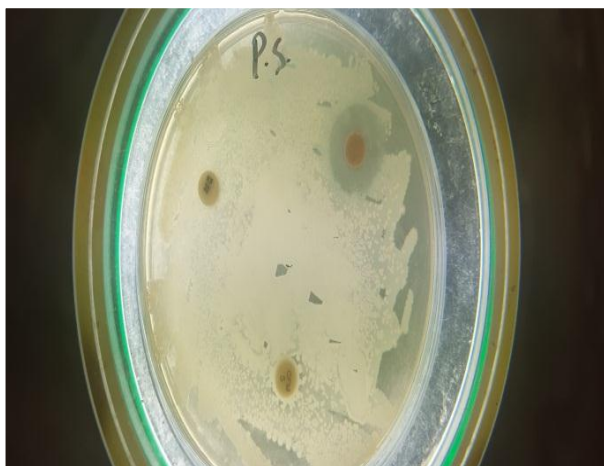


S. aureus ATCC 43300 + HE pure + dilue

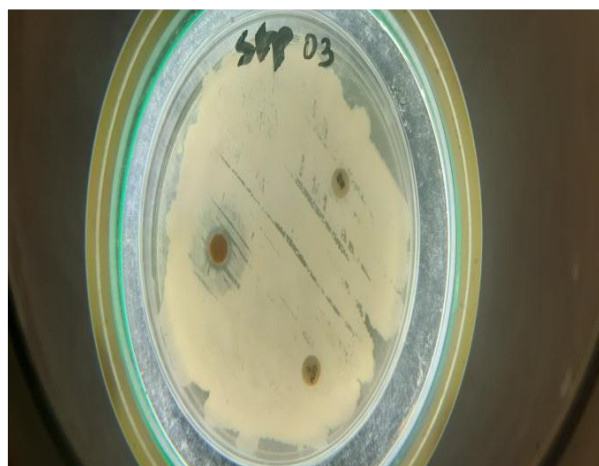


S. aureus ATCC 25923 + HE pure + dilue

Photos des antibiotiques réalisés par la méthode de diffusion sur gélose (antiboigramme)



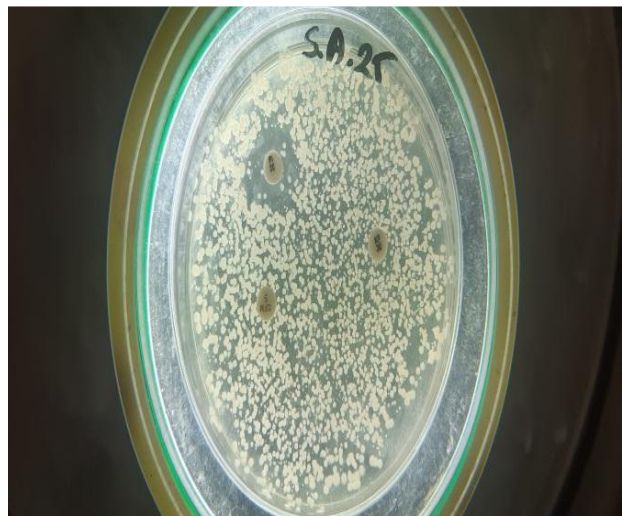
PSEUDO CIP A22+TE +KF30+CFM.5



S.aureus ATCC 43300+ TE+ KF30+ CFM.5

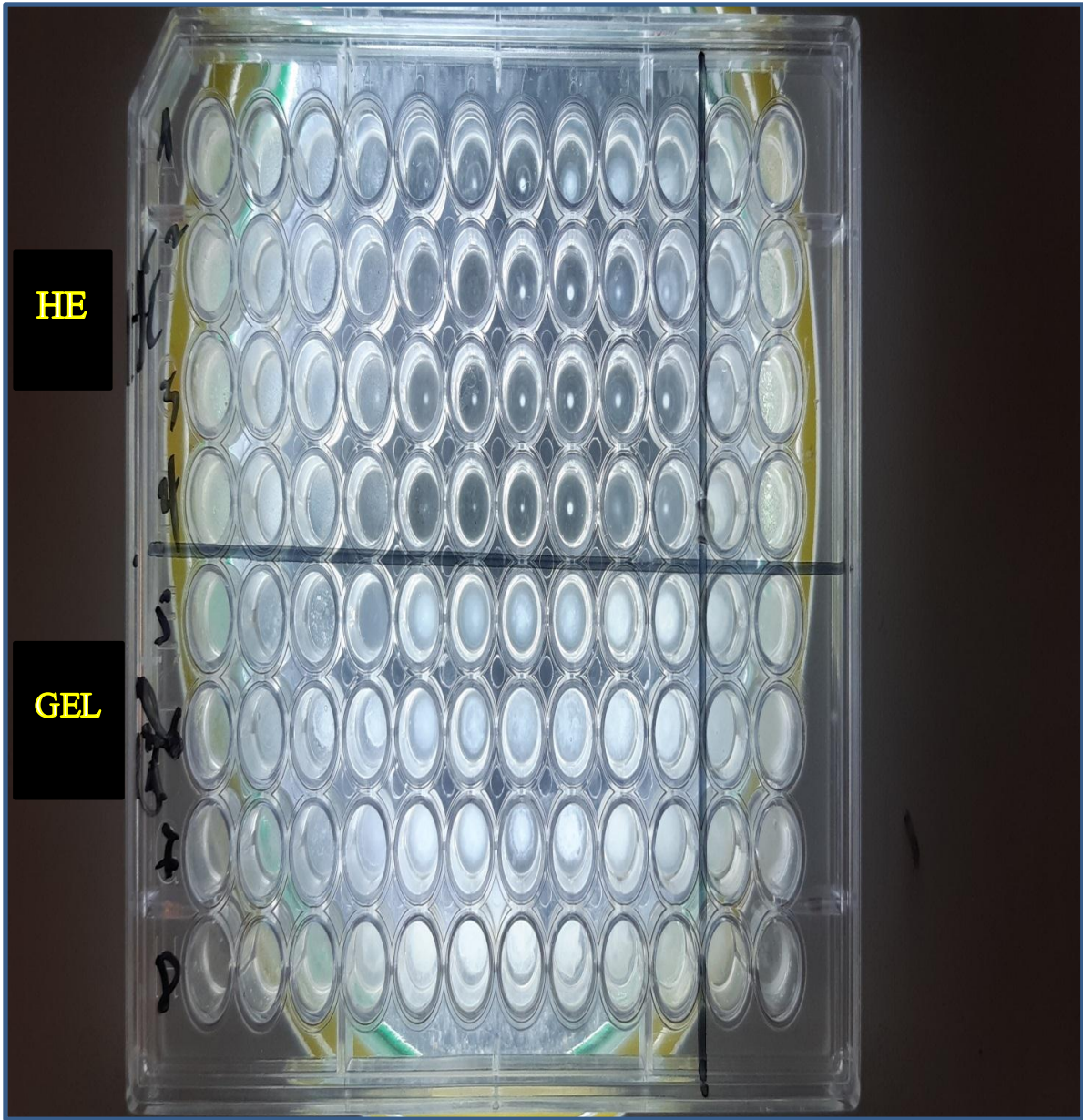


E.coli ATCC 25922+KF30+CFM.5+ TEC 30



S.aureus ATCC 25923+ PI 20+KF30+CFM.5

Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne d'HE de
CLOUS DE GIROFLE par la méthode micro dilution



Photos représentant les résultats de CMB d'huile essentielle

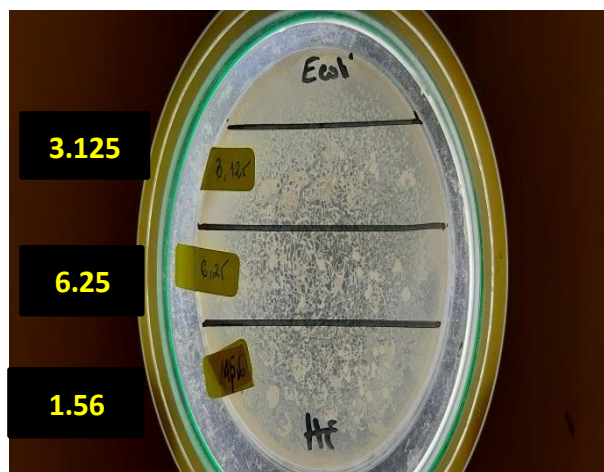
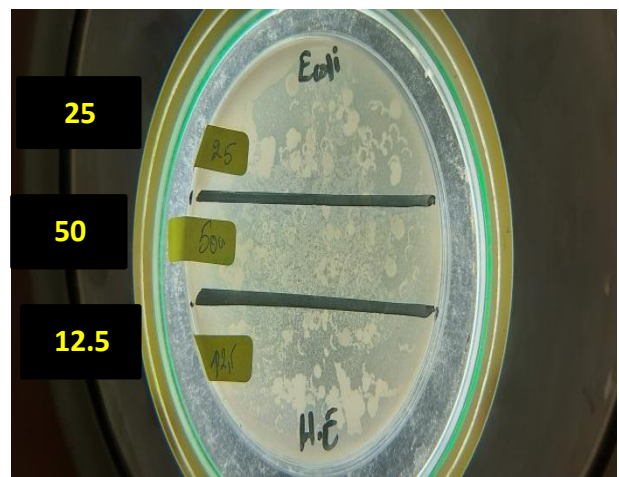
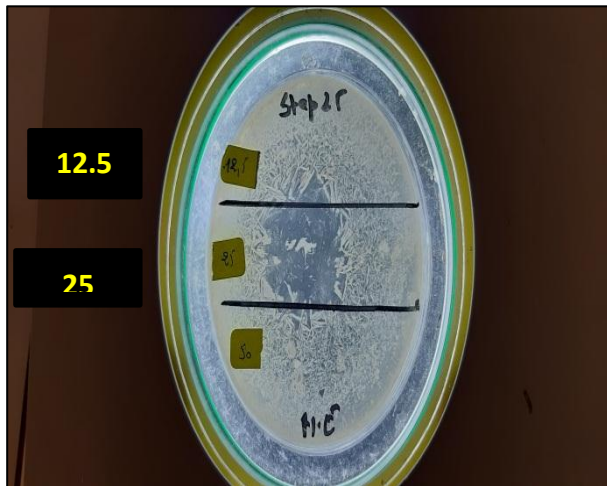
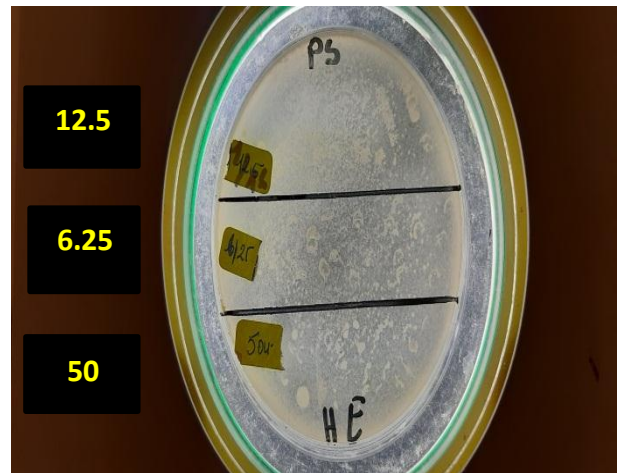
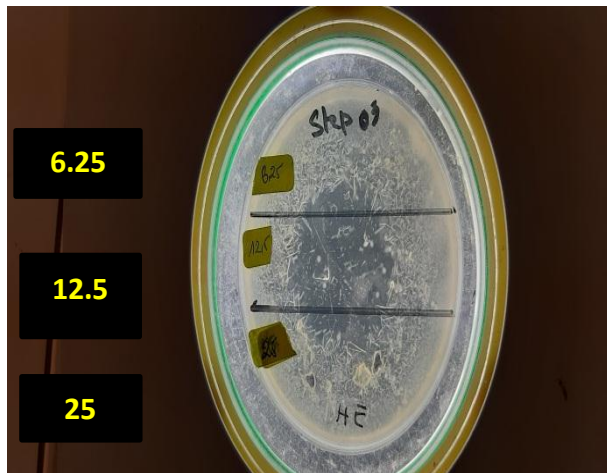


Photo représentant les résultats de CMB de gel.

