

**N° d'Ordre :**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES**

**FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**Mémoire**

**De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master  
Domaine : **Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)****

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Biotechnologie microbienne**

**Intitulé du thème :**

**L'évaluation de l'activité antibactérienne,antioxydante et  
antiseptique du clou de girofle et pierre d'alun vis-à-vis la  
flore bucco-dentaire**

Présenté par : Melle **NOUALA SARAH** Melle **MOUAHDI IKRAM**

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : Mr **ABOUNI .B** (Professeur/ **UDL/SBA**)

Examineur : Mr **BENIN.A** (M.C.A/ **UDL/SBA**)

Mme **AOUISSAT.H** (Docteur/ **UDL/SBA**)

Promoteur : Mme **KHALDI . A** (M.C.A/ **UDL/SBA**)

*Année universitaire 2020 – 2021*

*Session : « Juin »*

## *Remerciements*

On remercie Dieu le tout puissant Allah pour nous avoir protégées, guidées et orientées durant toute notre vie et tout au long de notre parcours universitaire, à LUI nous croyons et à son destin nous admettons.

1.1.1.1.1 Nos plus vifs remerciements vont d'abord à notre encadreur **Mme Khaldi Amina** maitre de conférences A, de nous avoir fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail. Elle a su nous guider avec patience, compréhension et rigueur.

Nous témoignons Nos gratitude pour son aide, son soutien, sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils, ses qualités humaines.

Elle a toujours montré l'écoute et la disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire et le temps qu'elle a bien voulu consacrer à nous tenir compagnie au cours de la manipulation.

Notre mémoire doit beaucoup à son efficacité mais aussi à sa patience, qu'elles trouvent dans c'est quelque phrase, On lui en sera toujours reconnaissante.

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, toute Nos gratitude et tout notre respect

Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude a tous ceux qui ont contribué de loin ou de près pour la réalisation de ce travail .

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail...

Ce modeste travail est le fruit de mes efforts et mes sacrifices pendant mon parcours universitaire que je dédie :

A mes parents monsieur AHMED NOUALA et madame BENABDERRAHMANE FOUZIA, Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond respect et amour.

En témoignage de ma profonde affection, Qu'elles sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissante BENABDERRAHMANE LATIFA ET BENABDERRAHMANE NORIA ; le chemin qu'elles ont partagé avec moi : bonheur, joie, tristesse, échouements....Quoi que je dis je pourrais jamais les remercier pour tous les sacrifices qu'elles ont consentis depuis ma naissance. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

LATIFA Tu représente pour moi la raison de vivre de continuer, raison d'être plus forte en franchissons les barrières de ma vie, pour moi tu es l'exemple de la beauté de monde par excellence, la source de tendresse, t'es un cas de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier chaque jour et chaque matin pour moi. Tes prières m'ont été un grand soutiens et secours dans ma vie, le chemin que tu a partagé avec moi : bonheur, joie, tristesse, échouements.... tu es mon amie, ma joie, ma force, ma confiance, mon espoir, ma sœur, mon inspiration Quoi que je dit je pourrais jamais tu remercier pour tous les sacrifices que tu as consentis depuis ma naissance..

A vous qui avez cru en moi, qui m'avez encouragée, qui avez pris ma main dès mon enfance et tracé mon chemin étudiantin, à vous qui m'avez marquée à jamais et m'avez donnée exemple de persévérance et de sérieux, à vous qui

m'avez apprise le gout de l'effort et la joie d'accomplissement et du succès, à vous mes chères oncles et tantes SOUAD, KHEIRA, NORIA, LATIFA, AHMED, MOKHTAR, ABBES et leurs petite famille .Grâce à vous je suis parvenue à savoir que dans les nuits les plus noires il y a toujours un espoir qui brille quelque part. Que vous trouviez ici l'expression de ma gratitude et ma profonde reconnaissance que je ne pourrai jamais exprimer complètement.

A mes très chers frères et sœurs : Les mots n'arrivent pas à exprimé le respect, le remerciement, l'attachement, et l'amour que je vous porte, votre présence été un aide, soutenance, et un encouragement durant toute ma vie. Je vous souhaite un avenir radieux et plain de bonheur. A mes petits cœurs ILIAS AYMEN

REDOUAN RIAD et INAS

SARAH SAFAA

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail ...*

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, la femme la plus courageuse dans mes yeux "maman **SALHA**" sincèrement je vis pour toi, j'espère que je sois à la hauteur de tes sacrifices et tes souffrances endurées, ta satisfaction sur moi est le sommet de mes rêves.*

*À l'homme de ma vie, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours souhaité de me voir réussir, que dieu te garde, à toi "mon père **AHMED**".*

*A ma très chère sœur " **Hiba**" pour son appui et son encouragement.*

*À toute ma famille, mes amies et copines, à ma chérie et ma binôme "**Sara**" et toute sa famille ; et à tous ce qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci*

*A ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.*

***Ikram***

## Résumé :

Ce travail vise à évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. L'huile essentielle du clou de girofle a été extraite par la technique d'hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger ; L'huile extraite a révélé un rendement de 4.5%

Le clou de girofle est connu pour contenir des huiles essentielles . L'ensemble de plantes étudiées a donné des rendements allant de 4.5 %. En comparant séparément les rendements de l'huile essentielle obtenu au cours de notre étude avec ceux rapportés dans la littérature, nous avons fait les constats suivants.

### Activité antibactérienne des huiles essentielles

D'après les zones d'inhibition générées par les huiles essentielles étudiées, l'huile essentielle de Clou de girofle présente la meilleure activité sur l'ensemble des souches testées. Le présent travail a porté sur l'étude antibactérienne de l'huile essentielle de l'épice et *Syzygium aromaticum* et une étude comparatif avec le pierre d'alun .

L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de *Syzygium Aromaticum* et du pierre d'alun par la méthode des disques a révélé que l'huile essentielle de l'épice possèdent une forte sensibilité sur les souches de la flore bucco-dentaire avec zone d'inhibition comprise entre 3 - 4 mm .

La plus forte activité a été obtenue avec les pierres d'alun avec une zone d'inhibition de croissance de 5mm à la concentration de 100%.

Activité antioxydante ; L'évaluation de l'activité antioxydante d'HE par le test DPPH et le pouvoir réducteur a montré pouvoirs réducteur, antioxydant et anti-radicalaire très puissant associé à des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes intéressantes. L'application de cette huile essentielle a donné une bonne acceptabilité et pour confirmer ce résultat nous avons accompli une série de tests

l'ensemble des résultats présentés ici suggèrent que l'huile essentielle de clou de girofle est une bonne source potentielle d'ingrédients actifs pour l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

### Mots clés :

*Syzygium aromaticum*, huile essentielle, hydrodistillation, activité antimicrobienne, aromatoگرامme

## Abstract :

This work aims to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. The essential oils of the clove were extracted by the hydrodistillation technique on a Clevenger type device; the extracted oil revealed a yield of 4.5%. Clove is known to contain essential oils. Yields of 4.5% were obtained from all the plants studied. By comparing separately the yields of the essential oil obtained during our study with those reported in the literature, we made the following observations.

Antibacterial activity of essential oils  
Based on the inhibition zones generated by the essential oils studied, Clove essential oil has the best activity on all strains tested. This work focused on the antibacterial study of the essential oil of the spice and *Syzygium aromaticum* and a comparative study with alum stone .

The evaluation of the antibacterial power of the extracts of *Syzygium Aromaticum* and alum stone by the method of discs revealed that the essential oil of the spice possess a high sensitivity on the strains of the oral flora with inhibition zone between 3 - 4 mm . The highest activity was obtained with alum stones with a growth inhibition zone of 5mm at 100% concentration.

Antioxidant activity; The evaluation of the antioxidant activity of HE by the DPPH test and reductive power showed reductive, antioxidant and anti-radical very powerful associated with anti-inflammatory, antimicrobial activities interesting. The application of this essential oil gave a good acceptability and to confirm this result we carried out a series of tests All the results presented here suggest that clove essential oil is a good potential source of active ingredients for the food and pharmaceutical industry.

Key

Words:

*Syzygium aromaticum*, essential oil, hydrodistillation, antimicrobial activity, aromatogram, clov

## التلخيص:

يهدف هذا العمل إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري الأساسي *Syzygium aromaticum*

تم استخراج الزيوت الأساسية من القرنفل بواسطة تقنية تقطير الماء على جهاز من نوع Clevenger كشف الزيت المستخرج عن حصيلته قدرها 4.5 %.

ومن المعروف أن القرنفل يحتوي على الزيوت الأساسية وتم الحصول على مردود قدره 4.5 % من جميع النباتات التي تمت دراستها. وبمقارنة عائدات الزيوت الأساسية التي تم الحصول عليها خلال دراستنا على نحو منفصل بتلك الواردة في الكتابات ، قدمنا الملاحظات التالية .

النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية

واستنادا إلى مناطق التثبيط الناتجة عن الزيوت الأساسية التي تمت دراستها ، فإن الزيت الأساسي للقرنفل لديه أفضل نشاط على جميع السلالات التي تم اختبارها. وركز هذا العمل على دراسة مضادة للبكتيريا للزيت الأساسي *Syzygium aromaticum*

بالمقارنة مع دراسة حجر الشب .

وكشف تقييم القدرة المضادة للبكتيريا من مستخلص *Syzygium aromaticum* وحجر الشب بواسطة الأقراص أن الزيت الأساسي للتوابل يمتلك حساسية عالية على سلالات البكتيريا الفموية مع منطقة منع بين 3-4 ملم.

تم الحصول على أعلى نشاط مع أحجار الشب مع منطقة منع النمو 5 ملم بتركيز 100 %.

النشاط المضاد للأوكسدة ؛  
وأظهر تقييم النشاط المضاد للأوكسدة في الزيت الأساسي بواسطة اختبار DPPH وجود حد من قوة مضادة للأوكسدة وقوة مضادة جدا للجذور الحرة مرتبطة بأنشطة مضادة للالتهابات ومضادة للميكروبات. وقد أعطى تطبيق هذا الزيت الأساسي مقبولية جيدة ، وللتأكيد على هذه النتيجة أجرينا سلسلة من الاختبارات.

وتشير جميع النتائج المقدمة هنا إلى أن الزيوت الأساسية تشكل مصدرا محتملا جيدا للمكونات النشطة لصناعة الأغذية والمستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية

*Syzygium aromaticum*، زيت أساسي ، تقطير مائي ، نشاط مضاد للميكروبات ، aromato gramme ،

## Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µl: microlitre

CMI : concentration minimale inhibitrice

HE: huiles essentielle

MH: milieu de Mueller Hinton

BN : Bouillon Nutritif

Abs : Absorbance

CG : clou de girofle

g : Gramme.

H (%):Taux d'humidité

HEC : huile essentielle de clou de girofle.

ml : millilitre.

NaCl : chlorure de sodium.

pH: potentiel hydrométrique.

R(%): Rendement (%).

S.aromaticum : *Syzygium aromaticum*.

HEBBD : huile essentielle botaniquement et biochimiquement définies

T: Température.

V:Volume.

Cm : Centimètre.

Cm<sup>-1</sup> : Centimètre moins un.

d: diamètre.

## Liste de figure :

<b>Figure 1:</b> Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.....	7
<b>Figure 2:</b> Des étiquettes d'huiles essentielles conformes .....	9
<b>Figure 3:</b> l'arbre de Girofle (girofler) .....	14
<b>Figure 4:</b> boutons de clous de girofle sec .....	15
<b>Figure 5:</b> girofler (les feuilles d'arbre).....	16
<b>Figure 6:</b> les clous de girofle conserves.....	19
<b>Figure 7:</b> Piere d'alun.....	20
<b>Figure 8:</b> carie de sillon .....	26
<b>Figure 9:</b> Extraction par hydro-distillation du clou de girofle .....	35
<b>Figure 10:</b> Décantation .....	36
<b>Figure 11:</b> Séparation du solvant avec le rota vapeur .....	37
<b>Figure 12:</b> Photos de prélèvement (prise par un Smartphone Galaxy s3). .....	38
<b>Figure 13:</b> Isolement des souches .....	40
<b>Figure 14:</b> Repiquage des souches bactériennes .....	41
<b>Figure 15:</b> Observation microscopique d'un frottis .....	42
<b>Figure 16:</b> Coloration de gram.....	43
<b>Figure 17:</b> Test catalase .....	44
<b>Figure 18:</b> inoculation de la galerie api 20 strept.....	45
<b>Figure 19:</b> Préparation du milieu de culture pour l'aromatogramme.....	47
<b>Figure 20:</b> Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de disque .....	48
<b>Figure 21:</b> dépôt de pierre d'alun sur la culture bactérienne .....	48
<b>Figure 22:</b> matériels utilisés dans la CMM.....	51
<b>Figure 23:</b> Produits utilisés dans CCM.....	52
<b>Figure 24:</b> résultats final de l'huile essentielle du clou de girofle extrait par la méthode d'hydro distillation .....	53
<b>Figure 25:</b> HE extrais de clou de girofle.....	54
<b>Figure 26:</b> isolement des souches buccales (streptocoques b hémolytique A) .....	55
<b>Figure 27:</b> isolement des souches buccales (streptocoques mutans ).....	55
<b>Figure 28:</b> observation microscopique de coloration de Gram (photo prise par appareil .....	56
<b>Figure 29:</b> Sensibilité des bactéries vis-à-vis antibiotiques(antibiogramme) .....	57
<b>Figure 30:</b> Effet de l'H. ES du clou de girofle sur les souches bactériennes testées.....	59
<b>Figure 31:</b> résultats d'identification biochimique galerie API 20 strept .....	61

<b>Figure 32:</b> résultats et identifications de l'espèce <i>enterococcus faecium</i> par la galerie api 20 strept .....	62
<b>Figure 33:</b> résultats et identifications de l'espèce S;M par la galerie api 20 strept .....	63
<b>Figure 34:</b> résultats du test DPPH .....	64
<b>Figure 35::</b> Pourcentage de réduction du radical libre DPPH par l'huile essentielle du clou de girofle.....	65
<b>Figure 36:</b> plaque de ccm observer sous la lampe uv a 250nm .....	66
<b>Figure 37:</b> aperçu de la plaque de CCM obtenu avec l'huile essentielle de <i>Thymus sp</i> après révélation aux UV .....	67

Liste de tableaux :

<b>Tableau I:</b> classification botanique du <i>Syzygium aromaticum</i> .....	17
<b>Tableau II:</b> Résultat du rendement d'HE de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i> .....	53
<b>Tableau III:</b> Caractéristiques organoleptiques de l'HE de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i> . ..	54
<b>Tableau IV:</b> Résultats de l'antibiogramme de l'HEC sur les trois souches bactériennes. ....	58
<b>Tableau V:</b> Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes .....	60

## Sommaire :

### Partie 1 :recherche bibliographique

#### Chapitre 1 : les huiles essentielles

1	Historique.....	4
2.1	Histoire et origine des huiles essentielles .....	4
2.2	Définition d'une huile essentielle .....	4
2.3	Les Propriétés des huiles essentielles .....	5
2.3.1	Les Propriétés biologiques : .....	5
2.3.2	Propriétés physiques des huiles essentielles :.....	5
2.3.3	Rôle des huiles essentielles .....	7
2.4	Critères de qualité des huiles essentielles .....	7
2.5	Conservation des huiles essentielles.....	9
2.6	Toxicité des huiles essentielles .....	10

#### Chapitre 2: clou de girofle et pierres d'alun

1	Origine .....	13
2.7	Définition .....	13
2.8	Description du giroflier .....	15
2.9	Classification systématique.....	17
2.10	Culture (Plantation du Giroflier).....	17
2.11	Récolte.....	18
2.12	La conservation du clou de girofle .....	18
3	Composition de la pierre d'Alun .....	19
3.1	Les trois catégories d'aluns .....	20
3.1.1	La pierre d'alun naturelle.....	20
3.1.2	La pierre d'alun "d'origine naturelle" .....	20
3.1.3	La pierre d'alun synthétique .....	20
3.2	Les propriétés de la pierre d'alun.....	21
3.2.1	Hémostatique.....	21
3.2.2	Hypoallergénique.....	21
3.2.3	L'alun pour guérir un bouton de fièvre .....	21
3.2.4	L'alun pour un ongle incarné .....	21

## Chapitre 3: les infections de la bouche et des dents

1	Les infections de la bouche et des dents .....	24
4	Définition de la carie dentaire .....	25
4.1.1	Causes .....	26
4.1.2	Symptômes .....	26
4.1.3	Facteurs de risque .....	26
4.1.4	Diagnostic.....	27
4.1.5	Prévalence .....	27
5	Notions générales sur streptococcus mutans .....	27
5.1	Introduction.....	27
5.2	Définition .....	28
5.3	Morphologie.....	28
5.3.1	Habitas et pouvoir pathogène .....	28
5.3.2	Caractéristiques biochimiques :.....	29
5.4	Caractéristique antigéniques :.....	29
5.4.1	Caractère culturaux :.....	29
5.5	Résistance aux antibiotiques :.....	30
5.6	Résistance naturelle .....	30
5.7	Résistance acquise .....	30
6	Pathologies liées a streptococcus mutans .....	30
6.1	Parodontopathies :.....	31
6.2	Prévention des caries .....	31
7	Le clou de girofle et le pierre d'alun et prévention des caries. ....	31
partie 2:matériels et méthodes		
1	Objectifs :.....	33
2	Lieu et période d'étude : .....	33
3	Type d'étude :.....	33
4	Extraction de clous de girofle par hydro-distillation .....	33
4.1	Instruments et appareillage .....	33
4.2	Matériels utilisés : .....	33
4.3	Produits et réactifs :.....	34
4.4	Extraction de clou de girofle (mode opératoire): .....	34

5	Prélèvement buccale humain des échantillons .....	38
5.1	Echantillonnage.....	38
5.2	Les critères d'inclusion et d'exclusion : .....	39
5.2.1	Les critères d'inclusion .....	39
5.2.2	Les critères d'exclusion.....	39
5.3	Analyse des prélèvements.....	39
5.3.1	Milieux de culture.....	39
5.3.2	Isolement .....	40
5.3.3	Repiquage.....	40
6	Identification phénotypique des isolats.....	41
6.1	Caractères microscopiques.....	41
6.2	Coloration de Gram : .....	42
6.3	Caractères macroscopiques .....	43
6.4	Caractères biochimiques .....	43
6.4.1	Test de catalase : .....	43
6.4.2	Galerie API 20 Strep.....	44
7	Test de sensibilité aux antibiotiques ou Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques : .....	45
7.1	Disques d'antibiotiques .....	45
7.2	Mode opératoire .....	46
8	Aromatogramme : .....	46
8.1	Revivification des souches microbiennes.....	46
8.2	Préparation des disques .....	47
8.3	Préparation des milieux de culture avec des suspensions microbiennes .....	47
8.4	Dépôt de disque.....	47
8.5	Préparation d'un antibiogramme pour la pierre d'alun : .....	48
8.5.1	Incubation.....	49
8.5.2	Résultat.....	49
9	Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles .....	49
9.1	MATÉRIEL ET RÉACTIFS.....	49
9.2	Préparation de la solution de DPPH.....	49
9.3	Solutions d'huiles essentielles .....	49

9.4	Réglage de spectrophotomètre .....	50
10	Identification des constituants par chromatographie sur couche mince (C.C.M.) .....	50
10.1	1 Principe Une chromatographie sur couche mince (CCM en abrégé) : .....	50
10.2	Matériels et produits : .....	51
10.3	Préparation de la cuve d'éluion .....	51
10.4	Préparation des solutions diluées à analyser .....	51
10.5	Dépôt des substances à analyser sur la plaque .....	52
10.6	Elution .....	52
10.7	Révélation (sous UV ou par réaction chimique) .....	52

### partie 3: résultats et discussion

1	Description de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> obtenue .....	53
1.1	Le rendement.....	53
1.2	Etude des propriétés organoleptiques .....	54
2	Activité anti microbienne.....	54
2.1	Isolement et purification des isolats .....	54
2.2	Caractérisation phénotypique des isolats.....	55
2.2.1	Aspect macroscopique de colonies obtenues : .....	55
2.3	Caractérisation microscopique .....	55
2.3.1	L'état frais .....	55
2.3.2	Coloration de Gram .....	56
2.3.3	Activité anti bactérienne .....	56
3	Resultats aromatoigramme « pierre d'alun .....	60
4	Activité anti fongique .....	63
5	Activité antioxydante.....	64
6	Résultats CCM : .....	66
7	discussionsgénérales.....	68
8	conclusions.....	70
9	référencesbibliographiques.....	72

# Introduction

## Introduction générale

Depuis la nuit des temps, pour calmer ses maux, l'homme s'est depuis toujours servi des plantes, il ya 200 ans encore, les moyens thérapeutiques naturels étaient les seules remèdes dont disposait l'humanité.

La science confirme les différentes vertus des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles et leurs extraits bruts dont les domaines d'applications sont très variés et qui sont très utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs et dans les cosmétiques, les parfumeries, les industries de savon et de détergents en volume impressionnant. Elles rentrent également dans la composition de plusieurs médicaments, sous forme de crèmes, gélules et suppositoires.

Leur utilisation s'appelle "l'aromathérapie", qui consiste à utiliser les huiles essentielles pour le traitement de diverses manifestations pathologiques.

Les huiles essentielles sont des produits de composition complexe, renfermant des produits volatils contenus dans les végétaux obtenus à partir d'une matière première végétale : fleur, feuille, bois, racine, écorce, fruit, ou autre ; soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par extraction mécanique. Le principal procédé d'extraction est la distillation à la vapeur d'eau.

Les huiles essentielles sont un assemblage de molécules complexes qui ont toutes des propriétés particulières.

De par leur composition chimique, les plantes médicinales représentent un intérêt économique considérable par leur appartenance aux industries des produits agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Les épices sont classées parmi les plantes aromatiques qui font partie de plantes médicinales, en effet, elles sont douées non seulement de qualités parfumées et culinaires, mais aussi de vertus médicinales variées grâce aux différents principes actifs qu'elles contiennent, notamment les huiles essentielles (Benjlali.B, 2004)

Dans notre étude, nous sommes intéressés au giroflier (*Syzygium aromaticum*). Le giroflier est une plante connue de tous, du moins son bouton floral, le clou de girofle.

# Introduction

Cette plante médicinale est utilisée traditionnellement, sa richesse en métabolites secondaires et plus spécifiquement en huile essentielle, confère plusieurs effets biologiques dont les activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticancéreuses et anti oxydantes, cependant, peu de personnes connaissent ses véritables propriétés. (barbelet, 2015)

Il évoque souvent les cabinets dentaires, ou encore cette astuce de grand-mère, les oranges piquées de clous, pour assainir l'air en hiver.

Les recherches sur l'histoire de cette plante montrent que les clous de girofle avaient autrefois beaucoup plus de valeur, dès leur essor durant les Grandes découvertes qui ont engendré le commerce des épices. Cette épice a su motiver plusieurs nations à partir à sa conquête et cela pendant plusieurs siècles (barbelet, 2015)

Notre travail a pour but :

- ➔ Extraire l'huile essentielle de l'espèce *Syzygium aromaticum* et d'évaluer son activité antibactérienne.
- ➔ Etude de l'activité antibactérienne de la pierre d'alun.
- ➔ Faire une comparaison entre les activités antibactérienne de *Syzygium aromaticum* et la pierre d'alun.

Ce travail est scindé en deux parties :

1. La première est une compilation des connaissances bibliographiques, elle-même, composée de **trois** chapitres. Le premier présente des généralités sur les huiles essentielles, la description botanique de la plante.
2. La deuxième partie du travail est expérimentale. Elle est composée de deux chapitres.
  - Le premier illustre le matériel et les méthodes utilisés.
  - Second présente et discute l'ensemble des résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

# **Chapitre 1**

# **Les huiles essentielles**

## 1 Historique

### 1.2 Histoire et origine des huiles essentielles

Les huiles essentielles, reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques, ont été utilisées pendant des millénaires en Chine, au Moyen Orient, en Inde, en Egypte, en Grèce, en Amérique et en Afrique. Puis, au Moyen-âge, elles sont beaucoup moins utilisées. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouveau développement de la médecine par les plantes.

En France, c'est au début du XIX ème siècle que René-Maurice Gatte fossé, le pionnier de la parfumerie moderne, se brûle les mains lors d'une explosion dans son laboratoire. Il a soudain, le réflexe de plonger ses mains dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande, pensant que c'était de l'eau : sa plaie se guérit avec une rapidité déconcertante. Ainsi, il constate les effets cicatrisants et antiseptiques de la lavande, il décide alors d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés. Ainsi, on assiste à la naissance de l'aromathérapie moderne.

Cependant, la concurrence des laboratoires de produits chimiques de synthèse, financièrement beaucoup plus puissants est l'une des raisons du demi-succès de l'aromathérapie à cette époque. (<http://lessentiieldeshuilesessentielles.e-monsite.com/pages/la-composition-des-huiles-essentielles/histoire-et-origine-des-huiles-essentielles.html>)

### 1.3 Définition d'une huile essentielle

D'abord, le terme "huile essentielle" a été défini par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) :

*« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou 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. »*

Mais il a été également défini par l'Organisation internationale de normalisation (Norme ISO) :

# Partie 1 Etude bibliographique

« Produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. »

L'huile essentielle est la sécrétion naturelle de la plante aromatique. Elle est fabriquée par les organes sécréteurs qui sont dans différentes parties de la plante: semence, racine, bois, feuilles, fleurs, fruits...

Alors qu'une huile essentielle est obtenue par la distillation de l'essence. Elle est donc l'essence de la plante distillée. Contrairement à ce que son nom indique, il n'y a aucun corps gras dans les huiles essentielles : une goutte déposée sur un papier s'évaporerait sans laisser de trace contrairement à une huile végétale. (Nicolas, CONSEILS ET UTILISATIONS DES HUILES ESSENTIELLES LES PLUS COURANTES EN OFFICINE Directeur de thèse : )

## 1.4 Les Propriétés des huiles essentielles

### 1.4.1 Les Propriétés biologiques

La diversité des constituants présents dans les huiles essentielles entraîne des Activités :

- **Propriété de diurèse** : faisant fonctionner les quatre grands émonctoires (peau avec ses trois glandes, reins, poumons et intestins) et facilitant le drainage des déchets et des Résidus hormonaux solubles et insolubles vers leurs émonctoires.
- **Propriétés spasmolytiques et sédatives** : de très nombreuses drogues à huiles essentielles (badiane, menthe, verveine,...) sont efficaces pour diminuer ou supprimer les Spasmes gastro-intestinaux.
- **Propriétés irritantes** : augmentent les mouvements de l'épithélium cilié au niveau de l'arbre bronchique et l'élimination rénale d'eau par effet local directe.

### 1.4.2 Propriétés physiques des huiles essentielles

En ce qui concerne les propriétés physique, les HE forment un groupe très homogène; les principales caractéristiques sont :

- Les HE sont liquides à température ambiante.
- Sont volatils contrairement aux huiles fixes ; d'où leur extraction est faite par la vapeur d'eau.
- Sont rarement colorées.

# Partie 1 *Etude bibliographique*

- Ont une odeur aromatique.
- Ont une densité inférieure à celle de l'eau sauf les essences de Cannelle, Safran, Camomille, Girofle.
- Leur indice de réfraction est élevé.
- Ils sont insolubles ou peu solubles dans l'eau.
- Sont solubles dans les huiles fixes, l'eau les alcools et solvants organiques apolaires.
- Leur volatilité augmente avec la chaleur.
- Leur consistance est huileuse mais non grasse. (Imene, 2016)

## ➤ **Notion de Chémotype**

Les huiles essentielles: **Que signifie la notion de Chémotype ?**

Les huiles essentielles sont souvent qualifiées de Chémotype, **mais qu'est-ce que cela signifie vraiment?**

En effet, une huile essentielle contient des corps chimiques très complexes, plus concrètement chacune des molécules présentes dans ce corps dispose de propriétés différentes. C'est pour cela qu'une connaissance approfondie de ces constituants chimiques est fondamentale pour un thérapeute. Des techniques d'analyse chimique très performantes ont donc été mises à disposition des chercheurs pour ainsi permettre d'avoir cette connaissance approfondie des constituants chimiques. Ces techniques vont nous permettre de définir précisément la nature des sous-espèces, des variétés, des cultivars et des taxons des plantes aromatiques.

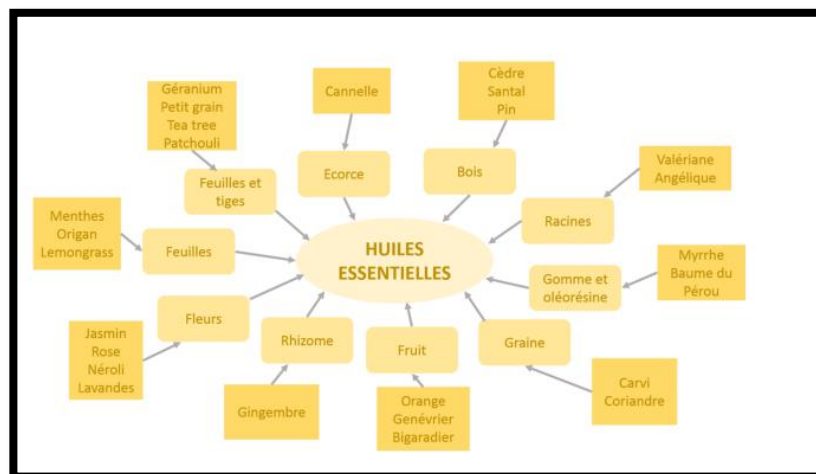
Enfin, c'est cette étude capitale en aromathérapie qui va générer la notion de Chémotype ou Race Chimique.

On peut parler alors d'une Huile Essentielle Chémotypée (H.E.C.T) lorsqu'elle appartient à une classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans l'huile essentielle. Les facteurs directement liés à cette classification sont tout d'abord, les conditions de vie spécifiques de la plante dont est extraite l'huile essentielle c'est-à-dire : le pays, le climat, le sol, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte. (DESCHEPPER, 2017 )

# Partie 1 Etude bibliographique

## 1.4.3 Rôle des huiles essentielles

- Les huiles essentielles sont des messagers chimiques utilisés par les plantes aromatiques pour interagir avec leur environnement.
- Les huiles essentielles permettent d'éloigner les maladies, les parasites, mais aussi jouent un rôle protecteur face aux rayonnements du soleil.
- Les huiles essentielles jouent un rôle important dans la reproduction et la dispersion des espèces végétales puisqu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs.
- Les huiles essentielles constitueraient enfin un moyen de défense de la plante vis-à-vis des prédateurs tels que les micro-organismes (bactéries et champignons) et les herbivores.
- Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant que substances antibactériennes, antivirales, antifongiques, insecticides et aussi contre les herbivores en réduisant leurs appétits pour une telle plante. Elles peuvent attirer aussi des insectes en favorisant la dispersion de pollens et graines, ou au contraire repousser d'autres indésirables. **(Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008).**



**Figure 1:**Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes

## 1.5 Critères de qualité des huiles essentielles

Il existe plusieurs critères qui permettent de vérifier la qualité d'une huile essentielle. Il est donc important de les respecter pour choisir une bonne huile. (Nicolas)

# *Parie 1 Etude bibliographique*

- Tout d'abord, il faut seulement choisir des huiles essentielles : 100% pures et 100% naturelles puisque les huiles synthétiques, en plus de n'avoir aucune vertu thérapeutique, peuvent être toxiques avec l'appellation HEBBD (Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définies).
- Il faut que leurs espèces botaniques soient identifiées et que leur nom soit inscrit en français mais aussi en latin. Avec l'organe producteur utilisé ainsi que leur origine géographique indiquée.
- En effet, ils apportent des précisions intéressantes sur les facteurs environnementaux (aussi appelés biotype) de la plante aromatique et permettent de déterminer une composition biochimique particulière.
- Avec l'ensemble des molécules, qui composent majoritairement l'HE (aussi appelé chémotype) détaillé avec le mode de récolte et de culture indiqué → celui-ci nous indiquera si la plante est sauvage ou cultivée et issue d'une agriculture biologique. Mais, le fait que la plante soit sauvage ne suffit pas, si l'HE est utilisée pour des raisons thérapeutiques.

Le mieux est qu'elles portent le label "bio" ou le label "simple" qui assurent que ces plantes ont été cultivées ou cueillies à l'abri des pollutions extérieures et avec un suivi strict.

Enfin, le mode d'extraction qui peut être : l'hydrodistillation, l'extraction par expression à froid, l'extraction par solvant, l'extraction par enfleurage ou encore l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique influence également la composition de l'huile essentielle. (Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Ma)



Figure 2: Des étiquettes d'huiles essentielles conformes

## 1.6 Conservation des huiles essentielles

La conservation des huiles essentielles nécessite de respecter obligatoirement certaines

### Règle :

- Les huiles essentielles se conservent bien à condition de ne pas les exposer à la lumière, c'est pourquoi il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre ambre ou foncé.
- Il faut les tenir loin des sources de chaleur.
- L'espace d'air dans un bocal favorise leur oxydation, c'est pour cela qu'on préfère plusieurs petits contenants lors de l'embouteillage et l'achat.
- Il faut bien refermer les flacons après usage, car les huiles essentielles sont volatiles, par conséquent elles s'évaporent dans l'atmosphère et perdent progressivement leurs propriétés et leur arôme.
- Les flacons doivent être stockés en position verticale, car en position horizontale il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles essentielles ont une action corrosive sur le plastique).

Dans ces conditions, 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 deux ans (BAUDOUX, 2002 ; ABADLIA et CHEBBOUR, 2014).

# Partie 1 *Etude bibliographique*

L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. (<https://123dok.net/document/eqo3320q-evaluation-activite-antibacterienne-essentielle-syzygiumaromaticumvis-bacterieresponsable-infections-urinaires.html> )

## 1.7 Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive.

Elle engendre des effets secondaires plus ou moins néfastes dans l'organisme (allergies, coma, épilepsie, etc....) .Principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques) (DEGRYS , 2008).

L'accumulation des essences dans l'organisme par des prises répétées peut conduire à des nausées, des céphalées,...L'ingestion de plus de 10 ml d'huile essentielle est neurotoxique et épiléptogène par inhibition de l'apport d'oxygène au niveau des tissus encéphaliques (BAUDOUX, 1997)

### ➤ Toxicité aigüe :

En général les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale faible ou très faible.

Anis, Eucalyptus, Girofle. Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo peuvent provoquer des convulsions.

### ➤ Toxicité chronique :

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue, au moins en ce qui concerne leur utilisation dans le cadre de pratique comme l'aromathérapie et ce quelle que soit la voie d'administration : les éventuelles effets secondaires ne sont que rarement signalés, on dispose par contre de beaucoup de données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi

# *Parie 1 Etude bibliographique*

## ➤ **Toxicité dermiques :**

L'application locales de certaines huiles essentielle peuvent être responsable d'éventuelles toxicité tel que le pouvoir irritant (Moutarde, Thym) ; sensibilisant (Saussurea) ou photo toxique (Angélique, Bergamote). (<https://123dok.net/document/eqo3320q-evaluation-activite-antibacterienne-essentielle-syzygiumaromaticumvis-bacteriesresponsable-infections-urinaires.html> )

**Chapitre 2**  
**Généralité sur les cloux de girofle et**  
**la pierre d'alun**

## 1 Origine

Originaire des îles Moluques, dans l'océan Indien, le giroflier, *Syzygium aromaticum*, est un arbre de 20 mètres de haut, d'une forme conique ou pyramidale. Il se développe sur des zones tropicales et maritimes aux sols bien drainés. Le giroflier appartient à la famille des Myrtacées, il est également appelé girofle.

Les clous de girofle sont en réalité les boutons de ses fleurs avant leurs éclosion. Ses feuilles de couleur vert foncé sont effilées, coriaces et persistantes. Ses fleurs sont blanches, légèrement rosées. Elles sont groupées en petites cymes compactes et ramifiées. Le calice, rouge et long, contient un bouton de fleur, qui s'ouvre en révélant quatre pétales.

Si elle est fécondée, la fleur du giroflier donne un fruit appelé mère de girofle ou antofle. La partie la plus aromatique, et donc la plus prisée, n'est pas le fruit mais le bouton non éclos aux pétales encore soudés les uns aux autres. (Barbelet, 2015)

### 1.1 Définition

Le clou de Girofle appelé ainsi à cause de sa forme en clou, est le bourgeon non-ouvert ou bouton floral séché du Giroflier.

Les boutons floraux présentent des propriétés antiseptiques et anesthésiques qui sont reconnues depuis très longtemps et proposées dans les douleurs dentaires.

Il entre dans la composition du khôl, primitivement onguent ophtalmique.

En cuisine, il est utilisé comme épice pour lever le goût des repas, il est présent dans le pain d'épices, les biscuits en mélange avec la cannelle.

Au Pays-Bas, le Clou de Girofle entier est utilisé pour parfumer un vieux fromage maigre de frise à pâte dure appelé Nagelkaas (fromage à clou) ou Kanterkaas. (Barbelet, 2015)

En Afrique du nord, le clou de girofle est utilisé en infusion avec le thé.

Le clou de girofle sert de parfum d'ambiance sous forme d'une version végétale de la pomme d'ambre que l'on fabrique en piquant toute la surface d'une orange de clous de girofle. (Fatiha & Ouarda, 2016/2017)

# Parie 1 *Etude bibliographique*

Les clous de girofle contiennent un composant chimique aromatique l'Eugénol.

Le giroflier est cultivé de façon industrielle dans d'autres pays que celui d'où il est originaire. L'arbre du giroflier peut vivre plus de 100 ans mais il commence à porter des fruits seulement vers sa septième ou huitième année d'existence, avec une production maximale qui se situe entre dix et vingt ans. Les boutons floraux du giroflier, de 1,5 à 2 cm de longs et odoriférants, sont d'abord d'une couleur pâle, et peu à peu, c'est le vert, après quoi il se transforment en rouge vif, quand ils sont prêts pour la collecte. Le giroflier atteint rarement la floraison, car ses bourgeons floraux non-ouverts sont récoltés avant l'éclosion de la fleur, puis ils sont séchés au soleil jusqu'à obtenir une teinte brune foncée devenant le clou de girofle. Les chinois en 206 av.J-C mâchaient les clous de girofle pour avoir une meilleure haleine. (Barbelet, 2015)

Le clou de girofle aurait de multiples propriétés curatives et diverses vertus médicinales. C'est un puissant antiseptique, antibactérien, antiparasitaire, anesthésique, anti-inflammatoire, antinévralgique, antispasmodique, stimulant immunitaire, stomachique et carminatif. Le clou de girofle est utilisé notamment pour traiter les troubles digestifs, le choléra, l'asthme, rhum et grippe, le mal de dents, les crampes musculaires, le mal d'oreille. On utilise les clous de girofle infusés dans de l'eau pour le traitement de malaises gastriques, des vomissements et les diarrhées (Fatiha & Ouarda, 2016/2017)



**Figure 3:**l'arbre de Girofle (giroflier)



**Figure 4:** boutons de clous de girofle sec

## 1.2 Description du giroflier

Le giroflier (*Syzygium aromaticum*) est un arbre persistant de la famille des Myrtacées portant une luxuriante couronne conique de 10-12 m, allant parfois jusqu'à 20 m de haut, et débutant assez bas, si bien que son port est plutôt buissonnant. Les feuilles opposées sont de forme allongée, élargie vers le sommet et terminée en pointe, mesurant 8 à 12 cm de long. Le limbe présente des nervures nombreuses peu apparentes avec un teint vert sombre lustré, d'un joli rose cuivré à leur naissance. Les racines sont peu développées et plutôt superficielles, certaines racines traçantes atteignent 4 à 5 m de long ce qui permet à l'arbre de puiser aisément les minéraux de la litière. Le pivot mesure jusqu'à 2 à 3 m de profondeur, mais cela reste insuffisant pour résister à la violence de cyclones. Le bois est dur, mais assez cassant.

Les fleurs sont disposées en cymes bipares terminales et présentent près de 25 boutons renflés en extrémité, de 12 à 18 mm de long, qui donnent le fameux clou de girofle. Ces boutons persistent plusieurs mois entre mars et mai avant d'éclorre et se cueillent avant l'ouverture de la fleur pour être séchés. La fleur est constituée d'un calice à long tube pourvu de 4 sépales rouges, soudés entre eux et persistants, renfermant de nombreuses glandes sécrétrices. Leur couleur s'intensifie lors de l'éclosion. Une sorte de capuchon appelé « tête du clou », formé par 4 pétales blanc rosé, est expulsé à ce même moment. Un gros bouquet d'étamines jaunes se déploie alors comme un feu d'artifice autour d'un pistil à 2 loges comportant de nombreux ovules. La floraison intervient au printemps ou en été en fonction du climat.

# *Parie 1 Etude bibliographique*

Les fruits rouges, appelés « mères de girofle » ou « anthofles », mesurent 3 cm sur 1 cm de large avec le reste du calice au sommet. Ils renferment généralement une seule graine de 1,3 cm, baignant dans une chair pourpre. Ces baies comestibles apparaissent vers la fin de l'été et sont consommées en Indonésie, confites dans le sucre. (Barbelet, 2015)



**Figure 5:** giroflier (les feuilles d'arbre)

# Partie 1 Etude bibliographique

## 1.3 Classification systématique

Le tableau représente la classification du giroflier selon L. Merrill & Perry.

**Tableau I:** classification botanique du *Syzygium aromaticum* (Soraya)

Classification selon l'INPN	
<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Viridiplantae
<b>Infra-règne</b>	Streptophyta
<b>Classe</b>	Equisetopsida
<b>Clade</b>	Trachiophyta
<b>Clade</b>	Spermatophyta
<b>Sous-classe</b>	Magnoliidae
<b>Super-ordre</b>	Rosanae
<b>Ordre</b>	Myrtales
<b>Famille</b>	Myrtaceae
<b>Sous-famille</b>	Myrtoideae
<b>Tribu</b>	Syzygiae
<b>Genre</b>	Syzygium
Espèces	
Syzygium aromaticum	
(L.) Merr & L.M PERRY 1939	

## 1.4 Culture (Plantation du Giroflier)

La culture du giroflier n'est possible qu'en zone équatoriale marine avec une température comprise entre 22°C et 30°C, des précipitations de l'ordre de 1 500 à 3 000 mm/an et une saison sèche de moins de 3 mois. La quantité de pluie devra diminuer au cours de la production de boutons, sinon la plante aura tendance à faire des feuilles. Le climat de Zanzibar est de ce point de vue plus favorable que la côte est de Madagascar.

Plantez-le dans une aire abritée du vent par des haies. L'essence tolère malgré tout quelques faibles gelées passagères. Il est également possible de faire pousser le giroflier dans une serre chauffée et brumisée pour obtenir une humidité atmosphérique de 80 %.

# Parie 1 *Etude bibliographique*

Placez-le en situation ensoleillée pour obtenir un maximum de boutons.

Offrez à votre plant un sol riche, acide ou neutre (pH voisin de 6,8) et suffisamment frais, pas trop sableux et bien drainés.

Le giroflier pousse généralement jusqu'à 300 à 400 m d'altitude avec une préférence pour les sols d'origine volcaniques ou sédimentaires comme les flancs de collines ferrallitiques à Madagascar.

Pensez à sa future croissance : le giroflier a une croissance assez lente, cependant, en culture, il est maintenu à 7-10 m de haut.

## 1.5 Récolte

- Les feuilles sont récoltées en vue de la distillation grâce à la taille de rameaux de 30-40 cm de long réalisée tous les 3-4 ans sur chaque sujet.
- Cette taille s'étale sur 6 mois et se fait sur des arbres dont on ne récolte pas les clous cette année-là.
- Les griffes de clou de girofle se récoltent une à deux fois par an, à la main au sol (dès la mi-octobre à Madagascar) ou en grim pant dans l'arbre. Les boutons sont ensuite séparés de la griffe, c'est-à-dire du bouquet de pédoncules, sur l'aire de séchage. La pleine production est obtenue sur des plants âgés de 15 à 20 ans. Les rendements atteignent 2-3 kg par arbre âgé de 10 à 12 ans, jusqu'à 30 kg sur un arbre de 30 à 40 ans. L'arbre produit environ jusqu'à l'âge de 75 ans, cependant la récolte n'abonde qu'une année sur trois. Les rendements sont en général de 900 kg à 2 tonnes par hectare.

## 1.6 La conservation du clou de girofle

Les clous sont mis à sécher au soleil pendant 3 à 5 jours jusqu'à devenir brun rouge, mais pas noirs, puis triés avant d'être conditionnés en bocal ou réduits en poudre. Le séchage entraîne une perte de poids de 70 %. Si le produit est mouillé au cours du séchage, il brunit et se déprécie.

100 kg de griffes distillées donnent 4 à 5 kg d'essence jaune clair à conserver à l'abri de l'air et de la lumière pour ne pas brunir.

## Parie 1

## Etude bibliographique

Cette essence contient 83 à 90 % d'eugénol et d'autres composés (de type caryophyllène, alcool méthylique, furfurol, methylamicétone) voire 100 % sur une récolte survenue aux Seychelles. Les rendements sont meilleurs qu'avec des clous distillés. (Soraya)



**Figure 6:** les clous de girofle conserves

## Pierre d'Alun

### 2 Composition de la pierre d'Alun

Un alun est un type de composé chimique, en général un sel double de sulfate d'aluminium hydraté, de formule générale  $XAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ , où X est un cation monovalent tel que le potassium ou l'ammonium<sup>1</sup>. En lui-même, le terme «Alun» est souvent utilisé pour désigner l'alun de potassium, de formule  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ . Les autres aluns sont désignés via le nom de leur cation monovalent, par exemple l'alun de sodium ou l'alun d'ammonium.

La pierre d'alun est un cristal translucide et blanc, d'apparence similaire à un glaçon et inodore. Elle peut provenir de certaines roches qui en contiennent naturellement: l'alunite (source traditionnelle), l'alun-K (source plus rare) et la kalunite (encore plus rare). Après extraction de la roche dans les mines, elle doit subir une transformation : les minéraux sont séparés et recristallisés pour obtenir la pierre d'alun. (Alexis Mahieu, 2014)



**Figure 7:** Pierre d'alun

## **2.1 Les trois catégories d'aluns**

Il existe plusieurs types de pierre d'alun (naturelle ou synthétique) qui subissent toutes un procédé de transformation mais plus ou moins naturel (avec ou sans produit chimique).

### **2.1.1 La pierre d'alun naturelle**

Extraite de l'alunite et composée de potassium d'alun, élément provenant de la nature. Elle est purifiée et recristallisée avant d'être mise sur le marché. On la reconnaît par son aspect final plus ou moins translucide.

### **2.1.2 La pierre d'alun "d'origine naturelle"**

Elle est obtenue après avoir subi plusieurs procédés chimiques. C'est la majorité des pierres d'alun vendues sur le marché. Obtenue à partir d'alun de potassium synthétisé, elle est opaque et toujours sous la même forme dans le commerce. Elle est un peu plus blanchâtre car il reste dans le produit synthétisé un peu d'hydroxyde d'aluminium.

### **2.1.3 La pierre d'alun synthétique**

Elle est composée d'ammonium d'alun et fabriquée, à bas coûts, par les industries chimiques asiatiques. Elle en ressort très opaque et blanche. Certaines sont même produites à partir de sulfate d'ammonium obtenu par synthèse, sous-produit de l'industrie chimique du nylon. Elles n'ont donc rien de naturelles et sont mêmes très dangereuses pour la santé. (Fatiha & Ouarda, 2016/2017)

# Partie 1 *Etude bibliographique*

## 2.2 Les propriétés de la pierre d'alun

Elle possède des propriétés astringentes, antiseptiques et anti transpirantes. Elle laisse un fin film transparent qui crée une barrière aux mauvaises odeurs et au développement des bactéries.

La poudre d'alun est une substance qui inhibe les bactéries et nettoie la bouche en permanence. Faire des bains de bouche quotidiennement avec de l'alun peut prévenir l'apparition des caries. Par ailleurs, les propriétés astringentes de l'alun aident à réduire instantanément la douleur et l'inflammation des gencives lorsqu'il est appliqué localement. Elle peut soigner les aphtes ou tous les autres problèmes buccaux-dentaires.

Des études suggèrent que l'alun resserre les vaisseaux sanguins dans les gencives, ce qui contribue également à réduire les saignements des gencives. (Alexis Mahieu, 2014) (Fatiha & Ouarda, 2016/2017)

### 2.2.1 Hémostatique

La pierre d'alun est utile pour stopper les petits saignements des coupures et permet d'apaiser les éraflures ou encore pour guérir un aphte ou tous les autres problèmes buccaux-dentaires. On utilise la pierre d'alun avec succès sur les piqûres d'insectes pour éviter les démangeaisons.

### 2.2.2 Hypoallergénique

La pierre d'alun est un produit parfaitement toléré par tous, même par les peaux les plus sensibles.

- ❖ **Sans odeur** : La pierre d'alun n'a pas d'odeur et n'interagira pas avec votre parfum.
- ❖ **Economique** : Une pierre d'alun de 60 g a une durée d'utilisation d'environ une année.  
Remarquablement efficace : La pierre d'alun assure fraîcheur et propreté tout au long de la journée. Ceux qui l'ont essayé l'ont définitivement adopté .

### 2.2.3 L'alun pour guérir un bouton de fièvre

Un petit bouton de fièvre pointe le bout de son nez. Préparez une solution d'eau et d'alun que vous appliquerez sur votre herpès labial.

### 2.2.4 L'alun pour un ongle incarné

# *Parie 1 Etude bibliographique*

Que ce soit pour les ongles des pieds ou des mains, si vous avez un ongle incarné et qu'il cause de petites plaies, vous pouvez faire des bains d'eau et d'alun. L'alun est reconnu pour ses propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires.

# **Chapitre 3**

## **Les infections de la bouche**

# Partie 1 Etude bibliographique

## 1 Les infections de la bouche et des dents

La bouche, comme toutes les surfaces de l'organisme est colonisée par une flore bactérienne, dite commensale, dont le rôle est de les protéger contre des invasions par des agents pathogènes. Cette flore n'est pas pathogène mais peut le devenir dans certaines circonstances, lorsque les bactéries sont déplacées vers des zones habituellement stériles (suite à une blessure, une chirurgie...) ou lorsqu'elles se multiplient à la surface d'un corps étranger...

### Deux types de flores coexistent :

- ✓ La flore supra-gingivale et la flore sous-gingivale, vivant en parfait équilibre. En cas de modification de cet équilibre, un risque de pathologies bucco-dentaires peut apparaître.
- ✓ La flore supra-gingivale est alors à l'origine de la déminéralisation acide des tissus durs dentaires, tandis que la flore sous-gingivale est responsable des pathologies du parodonte. (<https://www.antibio-responsable.fr/maladies/infections-bouche> )

Les caries dentaires et les maladies parodontales sont des maladies infectieuses qui surviennent lors du déséquilibre de l'activité bactérienne de l'écosystème buccal.

La plupart des infections dentaires sont dues aux bactéries anaérobies. Les espèces les plus fréquemment impliquées sont : *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium species*, *Fusobacterium nucleatum* et *Peptostreptococcus micros*.

Mais dans ce type d'infections, les antibiotiques sont réservés à des situations peu fréquentes, le traitement des foyers infectieux est le plus souvent non médicamenteux. L'hygiène orale revêt un caractère fondamental dans la prévention des infections en médecine bucco-dentaire.

Dans le cas des infections bucco-dentaires, les antibiotiques sont réservés à des situations peu fréquentes. Une antibioprofylaxie peut être recommandée lors de certains actes invasifs (traitement des caries, détartrage, soin parodontal, chirurgie parodontale, chirurgie osseuse, chirurgie implantaire, ...) en fonction du profil du patient. Une antibiothérapie curative peut aussi être indiquée dans certaines circonstances en complément d'un traitement local efficace.

# Partie 1 Etude bibliographique

Mais d'une manière générale, le traitement des foyers infectieux est le plus souvent non médicamenteux, et l'hygiène orale revêt un caractère fondamental dans la prévention des infections bucco-dentaires (<https://www.antibio-responsable.fr/maladies/infections-bouche> )

La carie dentaire est actuellement classée par les experts de l'Organisation Mondiale de la Santé(O.M.S) au troisième rang des fléaux mondiaux, immédiatement après les affections cancéreuses et les maladies cardio-vasculaires.

La thérapie par les plantes, encore appelée phytothérapie, nous permet de prévenir et même de guérir certains troubles de l'organisme de façon naturelle.

Cette thérapie exige cependant des précautions car d'un mauvais usage d'une plante peut résulter la maladie ; le dosage doit tenir compte de la plante (sèche ou fraîche), du type de préparation souhaitée (infusion, macération...) et de la quantité désirée (une tasse, un litre...).

De ce fait, nous étudierons les propriétés antibactériennes du clou de girofle et du pierre d'alun ainsi que son activité sur *Streptococcus mutans* (<https://www.antibio-responsable.fr/maladies/infections-bouche> )

## 2 Définition de la carie dentaire

La carie dentaire est une maladie infectieuse. L'émail de la dent est le premier touché. Une cavité se forme dans la dent puis la carie se propage en profondeur. Si la carie n'est pas soignée, le trou s'agrandit et la carie peut atteindre la dentine (couche sous l'émail). Des douleurs commencent à se faire sentir, notamment avec le chaud, le froid ou le sucré. La carie peut gagner la pulpe de la dent. On parle alors de rage de dents. Enfin, un abcès dentaire peut apparaître lorsque les bactéries attaquent le ligament, l'os ou la gencive.

Les caries dentaires, très fréquentes, touchent les dents de lait (une dent de lait cariée doit être soignée même si elle est amenée à tomber) et les dents définitives. Elles atteignent plutôt les molaires et les prémolaires, qui sont plus difficiles à nettoyer lors du brossage. Les caries ne guérissent jamais spontanément et peuvent entraîner la chute des dents.



**Figure 8:** carie de sillon

## 2.1 Causes

Les sucres seraient l'un des principaux responsables de l'attaque de l'émail. En effet, les bactéries présentes dans la bouche, principalement la bactérie *Streptococcus mutans* et les lactobacilles, décomposent les sucres en acides. Elles se lient aux acides, aux particules alimentaires et à la salive pour former ce qu'on appelle la plaque dentaire, à l'origine de la carie dentaire. Le brossage des dents enlève cette plaque.

## 2.2 Symptômes

Les symptômes de la carie dentaire sont très variables et dépendent notamment du stade d'évolution de la carie et de sa localisation. Au tout début, lorsque l'émail est le seul atteint, la carie peut être indolore.

**Les symptômes les plus fréquents sont :**

- Douleurs dentaires, qui s'accroissent avec le temps
- Dents sensibles
- Douleurs aiguës en mangeant ou en buvant quelque chose de froid, chaud, sucré
- Douleurs en mordant
- Point brun sur la dent
- Pus autour de la dent

## 2.3 Facteurs de risque

L'hygiène bucco-dentaire est un paramètre très important dans l'apparition de caries dentaires. Une alimentation riche en sucre augmente aussi considérablement le risque de développer des caries.

# Partie 1 *Etude bibliographique*

Un manque de fluor serait également responsable de l'apparition de caries. Enfin, les désordres alimentaires comme l'anorexie et la boulimie ou les reflux gastro-oesophagiens sont des pathologies qui fragilisent les dents et facilitent l'installation des caries.

## **2.4 Diagnostic**

Le diagnostic est facilement réalisé par le dentiste puisque la carie est souvent visible à l'oeil nu. Il pose des questions sur la douleur et la sensibilité des dents. Une radiographie peut confirmer la présence d'une carie.

## **2.5 Prévalence**

Les caries sont très fréquentes. Plus de neuf personnes sur dix auraient eu au moins une carie. En France, plus d'un tiers des enfants de six ans et plus de la moitié des enfants de 12 ans l'auraient été concernés par cette infection. Au Canada, 57 % des enfants âgés entre 6 et 12 ans ont au moins eu une carie.

La prévalence des caries qui touchent la couronne de la dent (la partie visible qui n'est pas recouverte par les gencives) augmente jusqu'à la quarantaine et se stabilise ensuite. La prévalence des caries qui touchent la racine de la dent, souvent par déchaussement ou érosion de la gencive, continue à augmenter avec l'âge et sont fréquentes chez les aînés. (GG & MC)

## **3 Notions générales sur streptococcus mutans**

### **3.1 Introduction**

La flore microbienne buccale humaine constitue un bio film très diversifiée. Vingt-cinq espèces de streptocoques buccaux résidents dans la cavité buccale humaine et représentent à peu près 20 % du total des bactéries buccales.

La taxonomie de ces bactéries est complexe et reste provisoire. Les streptocoques buccaux englobent à la fois des bactéries inoffensives et dangereuses. Chaque espèce a développé des propriétés spécifiques pour coloniser les différents sites buccaux soumis à de constants changements de conditions, pour combattre les compétiteurs et pour résister aux agressions externes (système immunitaire de l'hôte, chocs physico-chimiques, frictions mécaniques).

Les déséquilibres dans la flore indigène sont la cause de maladies buccales et sous des conditions propices, des streptocoques commensaux peuvent devenir des pathogènes opportunistes initiateurs de maladies et de dommages chez l'hôte. Le groupe des «

# Partie 1 Etude bibliographique

streptocoques mutans » inclue les principales bactéries impliquées dans la formation de la carie dentaire. L'espèce *Streptococcus mutans*, bien que naturellement présente dans la microflore buccale humaine, est considérée comme responsable de l'initiation des lésions carieuses (P, Thomas, M, & M)

## 3.2 Définition

*Streptococcus mutans* est une bactérie cocciforme de type Gram positif. Elle fait partie de la flore commensale de la cavité buccale. Il s'agit de la bactérie la plus souvent en cause dans les caries dentaires

*Streptococcus mutans* ne signifie pas forcément caries. Celles-ci seraient la conséquence du régime alimentaire, principalement le saccharose, qui engendre une acidité ainsi qu'une production de glucanes insolubles dans l'eau (par la présence de *Streptococcus mutans*), puis fragilise l'émail dentaire avec la formation d'un biofilm, entraînant une virulence des streptocoques mutans.

## 3.3 Morphologie

*Streptococcus mutans* est une bactérie cocci gram positif, immobile, de forme arrondie ou ovoïde, non capsulée, sporulé, anaérobie strict ou facultatif de 0,5 à 1 Micron, disposée en chaînette.

### 3.3.1 Habitas et pouvoir pathogène

*Streptococcus mutans* s'installent dans la bouche qu'après la naissance des dents, en plus d'être à la base de la formation des caries, elles sont associées aux endocardites, gingivite... Ce sont des commensaux de la bouche et de l'intestin.

Ils représentent 30 à 60% de la population bactérienne des surfaces des dents, des joues, de la langue et de la salive. Les dents sont couvertes par la plaque dentaire constituée d'une agrégation de bactéries, de glycoprotéines salivaires, de sels inorganiques et de dextrane à partir du saccharose présent dans l'alimentation. La plaque dentaire adhère à la surface de l'émail des dents et aux gencives ; ces tissus sont perméables aux bioproduits microbiens (acides, antigènes et enzymes) et deviennent vulnérables à l'invasion microbienne.

# Partie 1 Etude bibliographique

La plaque dentaire joue un rôle étiologique prédominant dans la formation des caries et des parodontopathies. Ces liaisons sont à l'origine d'endocardites infectieuses, notamment après des soins ou des extractions dentaires (4).

50 à 60% des endocardites infectieuses sont dues aux streptocoques non groupables (*S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius* et *S. milleri*).

## 3.3.2 Caractéristiques biochimiques

- Absence de catalase
- Croissance sur milieux hostiles
- Résistance à l'optochine et de la lyse des cultures par la bile
- Résistance sans gaz de nombreux hydrates de carbone (étude sur eau peptoné additionnée de bleu de bromothymol en 72H)
- Facilement différenciées par la caractérisation de ces polysides sur des milieux hyper saccharoses. Le principe du test est basé sur l'hydrolyse du saccharose en ses composants mono saccharidiques par ces streptocoques. Certaines formes du dextrane à partir du glucose .

## 3.3.3 Caractéristique antigéniques

Sur le plan antigénique, nous distinguons chez les streptocoques :

- Une nucléoprotéine P spécifique du genre et correspondant à l'appareil nucléaire et au cytoplasme
- Le polyside C, responsable de la spécificité du groupe (Lancefield) correspond à un acide teichoïque. Ainsi les différents groupes de streptocoques sont désignés par les lettres majuscules (A à H et K à U). certaines espèces ne possèdent pas de polyside C(streptocoques non regroupables).

## 3.3.4 Caractère culturaux

Les streptocoques sont des germes très exigeants qui repoussent difficilement sur les milieux usuels pour streptocoques après leur isolement d'une hémoculture (trouble uniforme du milieu liquide). La mise en évidence de ces souches est possible en milieux de culture thiolés(L-cystéine, acide thioglycolique, etc....) de pyridoxine et D-alanine. Le phénomène de

# Partie 1 Etude bibliographique

satellitisme est caractérisé par la croissance des streptocoques déficients sous la forme de colonies minuscules entourant la culture en touche du genre révélateur.

- Aéroanaérobie facultatif
- Fragile et exigeant (géluse au sang) .

## 3.4 Résistance aux antibiotiques

La capacité pour une souche bactérienne de supporter une concentration d'antibiotiques notablement plus élevée que celle qui inhibe la majorité des autres souches de la même espèce définit la résistance.

## 3.5 Résistance naturelle

C'est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Les streptocoques sont tous résistants à l'azide de sodium, au cristal violet, à l'acide nalixidique, aux polymyxines et aux aminosides (résistance naturelle de bas niveau). Cette résistance est due à un défaut de pénétration à travers la paroi cellulaire streptococcique. Les aminosides n'atteignent pas alors leur cible, c'est-à-dire les sous-unités ribosomiques 30S. La résistance naturelle de bas niveau des aminosides rend compte de l'inefficacité de ces produits en monothérapie.

La résistance naturelle serait alors sous la dépendance d'un gène ; l'A.D.N de la bactérie résistante ne code pas un des éléments intervenant dans le mécanisme d'action, au niveau de la paroi ou du cytoplasme.

## 3.6 Résistance acquise

Elle apparaît chez certaines souches d'une espèce considérée habituellement sensible. Elle intervient soit lors d'une mutation chromosomique, soit lors d'une acquisition de gène par transfert génétique (plasmide ou transposon) . (W, A, D, B, & A) (GG & MC)

## 4 Pathologies liées à streptococcus mutans

*Streptococcus mutans* provoque les pathologies suivantes : carie dentaire, gingivite, parodontopathies, endocardites.... Seule la carie dentaire est développée dans ce travail.

# Parie 1 Etude bibliographique

## 4.1 Parodontopathies :

Depuis quelques années, il est désormais avéré que la bactérie responsable des caries, le *streptococcus mutans*, se retrouve parfois **dans les tissus cardiaques**. Naturellement présente dans la microflore buccale de l'homme, ce micro-organisme ne se contenterait pas uniquement d'attaquer les dents dont l'émail est fragilisé. Opportuniste, la bactérie s'insinuerait bien plus loin dans notre corps. Certaines analyses font état de sa présence au niveau du cœur. Un constat d'autant plus alarmant puisque cet invité non-désiré serait à l'origine d'une **inflammation des valves du cœur**. Une pathologie potentiellement mortelle si elle n'est pas traitée à temps.

S. mutans c'est un agent étiologique majeur de la carie dentaire sont, premièrement, sa capacité à produire rapidement des polysaccharides insolubles en présence de sucrose. Ces glucans, en permettant l'adhésion à la structure dentaire, favorisent la colonisation des dents par S. mutans en présence de sucrose ; Deuxièmement, il y a sa capacité à produire de l'acide.

## 4.2 Prévention des caries

Afin de prévenir de nombreuses infections buccales, le contrôle mécanique, par un brossage régulier, de ce biofilm est essentiel.

Des agents antimicrobiens peuvent être utilisés en complément du brossage pour inhiber davantage le développement du biofilm et par conséquent prévenir l'apparition des caries.

Les propriétés d'un antiseptique oral utilisé dans la prévention des caries sont:

- Une capacité à interférer avec une ou plusieurs étapes de développement de la carie,
- Une non-toxicité pour les cellules hôtes,
- Une activité résiduelle durable,
- Le produit ne doit pas provoquer de déséquilibre dans la microbiologie orale. (GG & MC)

## 5 Le clou de girofle et le pierre d'alun et prévention des caries.

Les pierres d'alun ainsi que le clou de girofle sont des produits naturels qui pourraient être une bonne alternative à la chlorhexidine. Elle serait aussi efficace que la chlorhexidine

# *Parie 1 Etude bibliographique*

comme agent antibactérien et anti plaque dentaire tout en étant moins nocifs pour l'organisme.

## ❖ Inhibition de la croissance de S mutans

Plusieurs études in vitro, réalisées dans différents pays du monde, ont montrées que le clou de girofle inhibe la croissance de S mutans. Le mécanisme d'action de la pierre d'alun n'est pas encore complètement élucidé. Tandis que le clou de girofle, grâce à ses composants (notamment les flavonoïdes), désorganiserait le cytoplasme et la membrane bactérienne, inhiberait la synthèse protéique et provoquerait une bactériolyse partielle.

(Etude de sensibilité de streptococcus mutans aux extraits totaux de khaya nyasica par Dieumerci DISADILA ) (manel, 2016)

Dans cette partie, nous décrivons les méthodes utilisées ainsi que le matériel ayant servi dans l'élaboration, la réalisation et l'aboutissement de notre étude.

## 1 Objectifs

De ce fait, nous étudierons les propriétés antibactériennes du clou de girofle et de la pierre d'alun ainsi que son activité sur *Streptococcus mutans* et *streptococcus beta hemolytiques*.

## 2 Lieu et période d'étude

Ce travail a été réalisé durant la période allant de février à juin 2021 à la faculté de sciences de la nature et de la vie, Université Djilali liabes sidi bel Abbas.

## 3 Type d'étude

Il s'agit d'une étude antibactérienne, antifongique, antiseptique et antioxydant du clou de girofle et pierre d'alun vis-à-vis les bactéries de la plaque buccale.

## 4 Extraction de clous de girofle par hydro-distillation

### 4.1 Instruments et appareillage

- ★ Extracteur : Cl evenger.
- ★ Ampoule a décanté.
- ★ Rota vapeur.
- ★ Microscope optique.
- ★ Etuve.
- ★ Jarre anaérobie.

### 4.2 Matériels utilisés

- ★ Boites de pétrie.
- ★ Ecouvillons.
- ★ Pipettes pasteurs.
- ★ Lames et lamelles.
- ★ Pense métallique.
- ★ Anse de platine.

### 4.3 Produits et réactifs

- ★ Diéthyl éther
- ★ NaCl
- ★  $\text{KMnSO}_4$

### 4.4 Extraction de clou de girofle (mode opératoire)

**Matériel végétal :** Le matériel est présenté par des boutons de clou de girofle.

➤ **1<sup>ère</sup> étape : extraction**

- ✓ Introduire dans un ballon de 1000 ml, 100 g de clous de girofles broyés, quelques grains de pierre ponce, 500 ml d'eau environ.
- ✓ Réaliser le montage d'hydro distillation et chauffer (ébullition modérée) jusqu'à recueillir environ 80 ml de distillat.
- ✓ Les clous de girofle contenant l'eugénol sont placés dans de l'eau en ébullition ("décoction").
- ✓ En se vaporisant, l'eau entraîne l'huile essentielle.
- ✓ Les vapeurs arrivent dans le réfrigérant où elles se condensent. Elles s'écoulent à l'état liquide et forment le distillat.
- ✓ Ajouter au distillat une spatule de chlorure de sodium.
- ✓ Agiter jusqu'à dissolution.

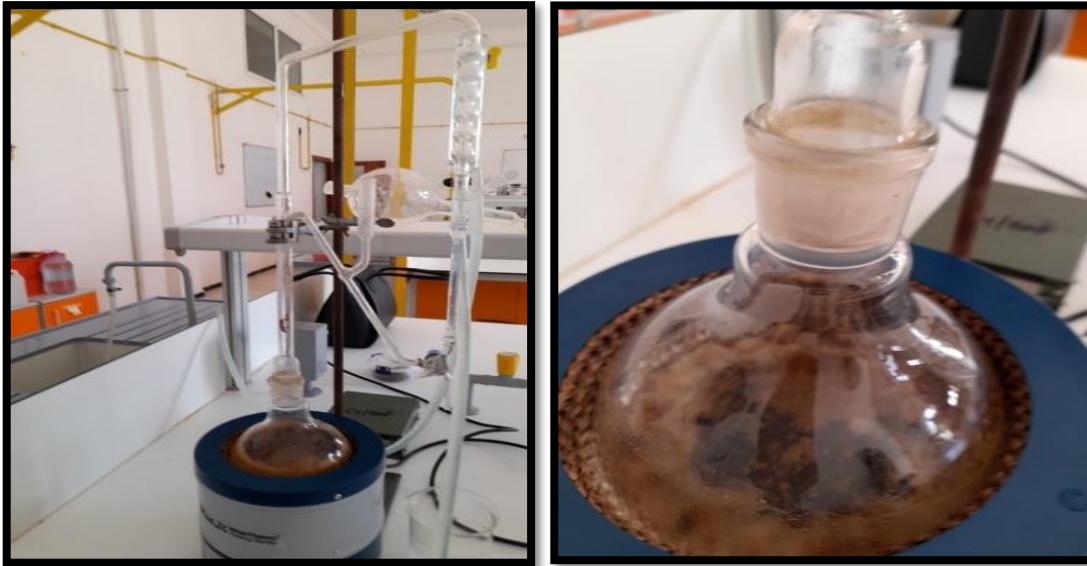
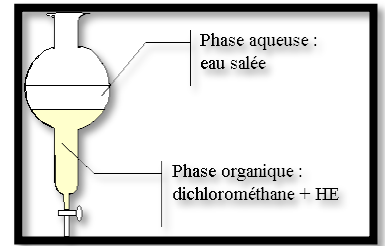


Figure 9:Extraction par hydro-distillation du clou de girofle

➤ **2<sup>ème</sup> étape : la décantation**

- ✓ Verser le distillat dans une ampoule à décanter.
- ✓ Agiter et laisser décanter.
- ✓ Ajouter 15 ml de diéthyle éther dans l'ampoule à décanter.
- ✓ Agiter en effectuant, de temps à autre, un dégazage.
- ✓ Laisser décanter.
- ✓ La phase organique se trouve sous la phase aqueuse car le dichlorométhane est plus dense que l'eau.
- ✓ Extraire la phase organique (cette solution contient de l'eugénoï et de l'acétylougénoï).



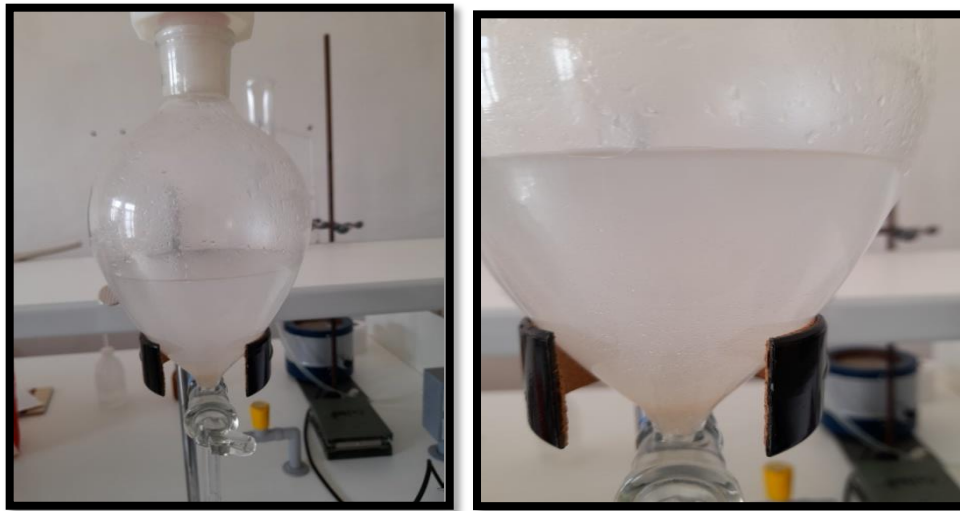


Figure 10: Décantation

➤ **3<sup>ème</sup> étape : séparer le solvant de l'HE :**

- ✓ Après la décantation on a passé au rota vapeur (L'évaporateur rotatif) afin d'éliminer l'excès du diéthyl éther et séparer l'huile essentielle du clou de girofle pure.
- ✓ Placer la solution contenant le solvant à évaporer dans le ballon 1 et le mettre ensuite sous rotation.
- ✓ Ouvrir le robinet d'eau froide reliait au réfrigérant.
- ✓ Fermer ensuite la vanne reliant le montage à la pression extérieure (vanne de fermeture) et faire le vide à l'intérieur de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau.
- ✓ Si l'évaporation n'est pas assez rapide, plonger le ballon 1 dans le bain marie d'eau chaude. Procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant.
- ✓ Ouvrir la vanne de fermeture pour remettre la pression atmosphérique à l'intérieur du dispositif.
- ✓ Couper l'eau du réfrigérant et de la trompe à eau.
- ✓ On ajuste le rota vapeur à 34°C / 100 rotation pendant presque  $\frac{3}{4}$  d'heure.
- ✓ A la fin de l'évaporation, retirer le ballon du système de chauffage du bain-marie.
- ✓ Attendre le refroidissement du ballon.
- ✓ Couper la rotation.
- ✓ Fermer la trompe à eau et la circulation d'eau dans le réfrigérant.
- ✓ Eteindre le thermostat du bain-marie et le système de rotation.



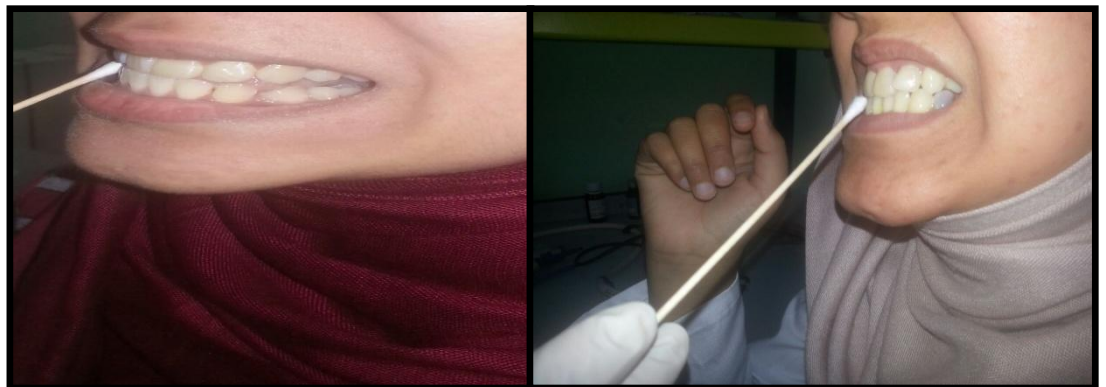
**Figure 11:**Séparation du solvant avec le rota vapeur

## 5 Prélèvement buccale humain des échantillons

### 5.1 Echantillonnage

Deux règles importantes sont à respecter :

- Il ne faut pas contaminer l'échantillon prélevé par une flore normale.
  - Il faut réduire au maximum le contact avec l'oxygène de l'air.
- 
- ✓ Les prélèvements concernent des sujets présentant des dents cariées et des sujets enfants entre 1 et 10ans présentant des caries dentaires avec 2 sujets streptocoques beta hémolytique a positif (engins répétitifs ) un adulte et un enfant, ces prélèvements ont été soigneusement effectués dans des conditions d'asepsie, et transportés immédiatement au laboratoire pour être analysés.
  - ✓ Ils doivent être effectués le matin, 12h après le dernier brossage des dents, et 2h après le dernier repas.
  - ✓ Le prélèvement se fait à l'aide d'un écouvillon stérile pour chaque sujet.
  - ✓ Ce dernier doit être frotté sur les surfaces dentaires et inter-dentaires chez les sujets indemnes de carie, et aussi dans les lésions carieuses pour ceux qui ont des caries (**voir figure 12**) puis le mis dans son couvercle prés à manipuler.



**Figure 12:**Photos de prélèvement (prise par un Smartphone Galaxy s3).

## 5.2 Les critères d'inclusion et d'exclusion

### 5.2.1 Les critères d'inclusion

- Notre étude concerne des sujets âgés de 20-25 ans, Les 05 adultes et 3 enfants.
- Sujets ne présentant aucune atteinte parodontale (aucun signe d'inflammation ou de rougeur de la gencive) et/ou pathologie au niveau de l'état général.

### 5.2.2 Les critères d'exclusion

- L'antibiothérapie dans les derniers 3 semaines.
- Avoir moins de 24 dents permanentes.
- Patients avec mauvaise hygiène (ne se brossent pas les dents).
- Application de fluor dans les 48 heures qui précèdent le prélèvement.

## 5.3 Analyse des prélèvements

Au niveau de laboratoire, l'inoculum va êtreensemencé, et cultivé en anaérobiose surmilieu gélose au sang.

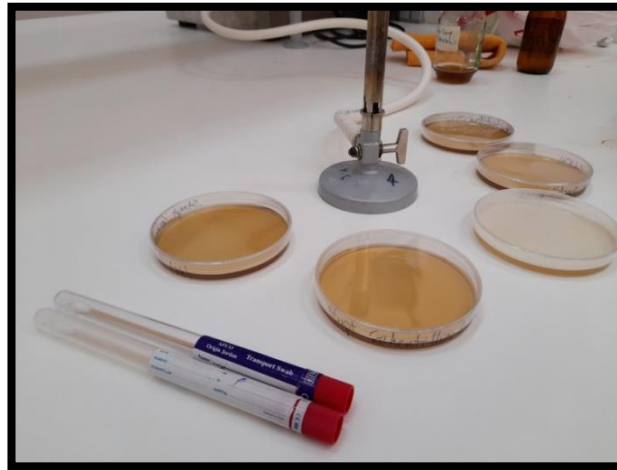
### 5.3.1 Milieux de culture

- a) **Gélose au sang** : Est un milieu enrichi utilisé pour la culture des bactéries ou des micro-organismes qui ne se développent pas facilement. Ces bactéries sont dites "fastidieuses" car elles exigent un environnement nutritionnel spécial et enrichi par rapport aux bactéries courantes. La gélose au sang est utilisée pour cultiver un large éventail d'agents pathogènes.
- b) **Milieu Muller Hinton** : Utilisée pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

### 5.3.2 Isolement

Les prélèvements fait d'un écouvillon sont ensemencés sur des boites de Pétri contenant la gélose au sang.

Puis, les boites sont incubées en anaérobiose dans des jarres à 37°C pendant 5 jours enutilisant des sachets générateurs d'anaérobiose.

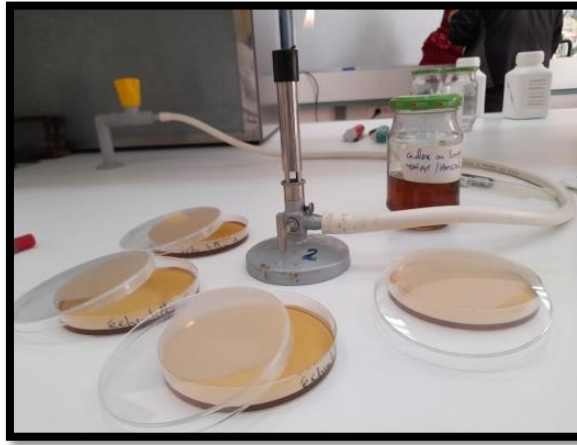


**Figure 13:** Isolement des souches

### 5.3.3 Repiquage

A partir des boites de pétri incubées, on effectue plusieurs repiquages en se basant sur l'aspect macroscopique des colonies dont chaque colonie fait l'objet de deux repiquages sur gélose au sang frais par la méthode des stries.

Qui ont ensuite incubées dans la jarre en anaérobiose à 37°C pendant 5 jours.



**Figure 14:**Repiquage des souches bactériennes

## 6 Identification phénotypique des isolats

L'identification bactérienne est basée sur l'examen microscopique et macroscopique, les tests biochimiques (galeries commercialisées API 20 Strep) et le test de sensibilité aux antibiotiques.

### 6.1 Caractères microscopiques

Les techniques d'examen microscopique permettent d'établir une pré-identification «carte d'identité » pour les micro-organismes étudiés.

#### 6.1.1 L'état frais

- Une goutte de l'eau distillée est déposée au centre de la lame,
- Puisensemencé par une pipette Pasteur contenant la culture pure de colonies suspectes
- Puis la recouvrir par une lamelle au-dessous en évitant de créer de bulles d'air.
- L'observation se fait par microscope optique (grossissement x100) et (grossissement×40).



**Figure 15:** Observation microscopique d'un frottis

### 6.1.2 Coloration de Gram :

Cette coloration de Gram se réalise en 7 étapes:

1. On réalise un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne:
  - on agite la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube.
  - Avec l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé (en le passant sous le bec benzène).
  - on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de l'anse dans le tube à essai.
2. On dépose ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
3. On procède à la fixation du frottis soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.
4. La coloration au violet de Gentiane (colorant basique):
  - la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane.
  - Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.
5. Mordantage au lugol (solution iodo-iodurée) :
  - étaler le lugol et laisser agir 20 secondes
  - Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

6. Décoloration à l'alcool:

- verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement.
- Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration.
- Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.
- L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

7. Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine:

- laisser agir de 30 secondes à 1 minute.
- Laver doucement à l'eau déminéralisée.
- Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

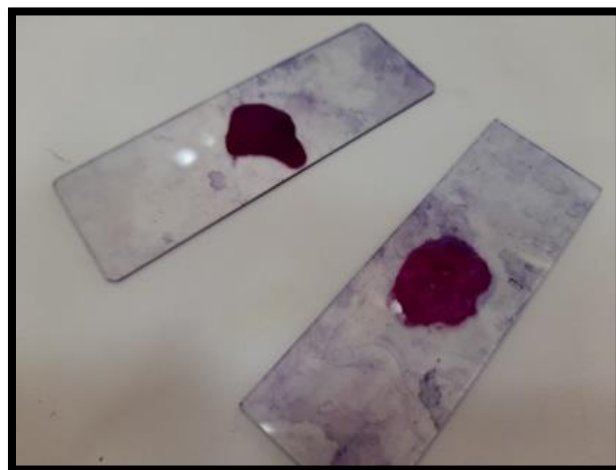


Figure 16:Coloration de gram

## 6.2 Caractères macroscopiques

L'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, couleur) est déterminé après incubation à 37°C sur gélose au sang pendant 5 jours.

## 6.3 Caractères biochimiques

### 6.3.1 Test de catalase

Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase

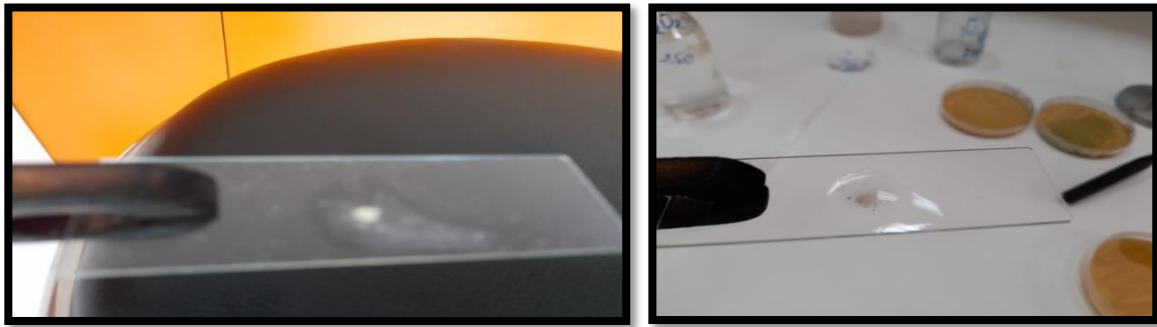


Figure 17: Test catalase

### 6.3.2 Galerie API 20 Strep

#### 6.3.2.1 Préparation de la galerie

- ✓ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- ✓ Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- ✓ Sortir la galerie de son emballage individuel et placer la galerie dans la boîte d'incubation.

#### 6.3.2.2 Préparation de l'inoculum

- ✓ Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml).
- ✓ A l'aide d'un écouvillon, prélever, toute la culture préalablement préparée.
- ✓ Réaliser une suspension très dense.

#### 6.3.2.3 Inoculation de la galerie

- Dans la première moitié de la galerie (tests **VP** à **ADH**), nous avons réparti la suspension précédente en évitant la formation de bulles :
  - Pour les tests **VP** à **LAP** : environ 100 µl dans chaque cupule.
  - Pour les tests **ADH** : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie tests **RiB** à **GLYG** :
  - Nous avons ouvert une ampoule d'APiGP Medium et y avons transféré le

reste de la suspension, soit environ 0,5 ml.

- Nous avons réparti cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- Nous avons rempli les cupules des tests soulignés **ADH** à **GLYG** avec de l'huile de paraffine puis refermé la boîte d'incubation à 37°C en anaérobie pendant 24h.

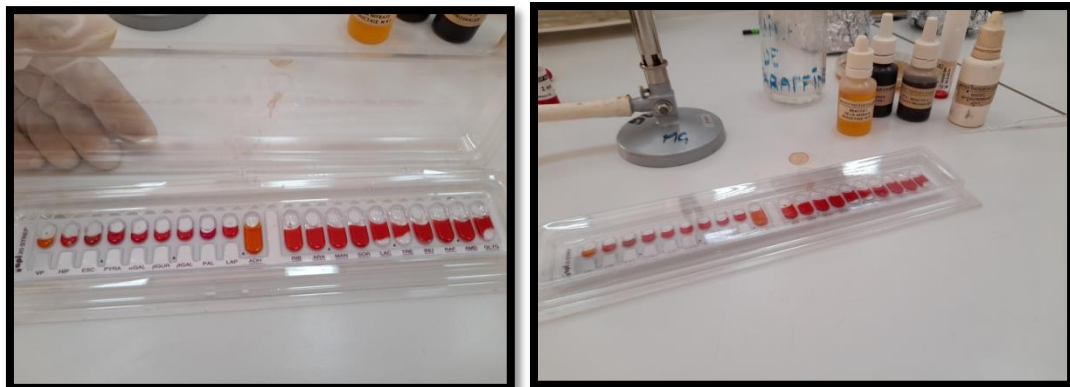
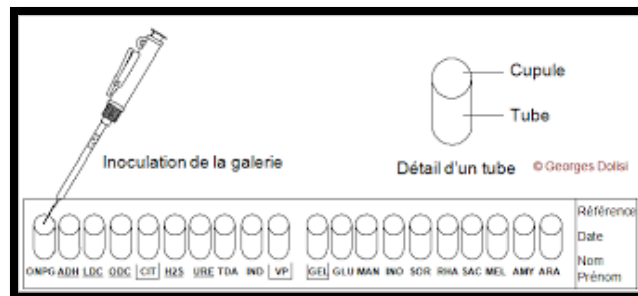


Figure 18: inoculation de la galerie api 20 strept

## 7 Test de sensibilité aux antibiotiques ou Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches antibiotiques aux a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Meller Hinton (**V, . G, P, & P, 2002**)

### 7.1 Disques d'antibiotiques

- Erythromycine
- Pénicilline G
- Chloramphénicol
- Tétracycline
- Pristinamycin

## 7.2 Mode opératoire

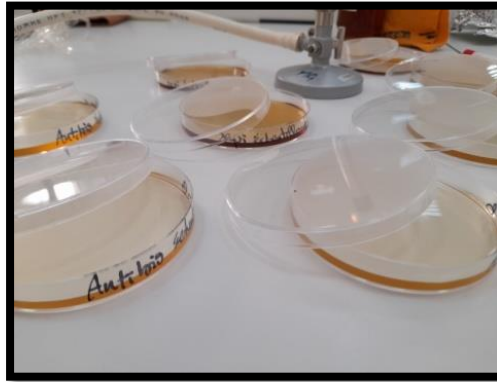
- ✓ A partir de la suspension bactérienne repiquer auparavant.
- ✓ Avec un écouvillon essoré,ensemencer toute la surface du milieu Muller Hinton en stries serrées (successivement 3 orientations décalées de 60°).
- ✓ Déposer les disques à la surface de la gélose en les appliquant délicatement à la pince stérile
- ✓ Incuber les boites des souches anaérobies ou anaérobies facultatives en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.
- ✓ Dans notre antibiogramme on a utilisé juste 5 disques d'antibiotiques (pénicilline g, érythromycine, chloramphénicol, tétracyclin,pristinamycin) pour cause de la non-disponibilité.

## 8 Aromatogramme

La technique consiste à utiliser des disques stériles en cellulose de 6 mm de diamètre, imprégnés dans les produits et déposés à la surface d'une gélose inoculée avec les souches microbiennes testées.

### 8.1 Revivification des souches microbiennes

- ✓ La revivification des souches microbiennes est une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité biologique est nulle, à la raison d'obtention d'une culture jeune et pure.
- ✓ on aensemencé en stries la surface de la gélose muller hinton préalablement coulée et solidifiée dans les boites de pétrie quelques colonies des souches conservées pour les bactéries.
- ✓ Les boites de pétrie renfermant chacune une souche microbienne sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries.



**Figure 19:**Préparation du milieu de culture pour l'aromatogramme

## 8.2 Préparation des disques

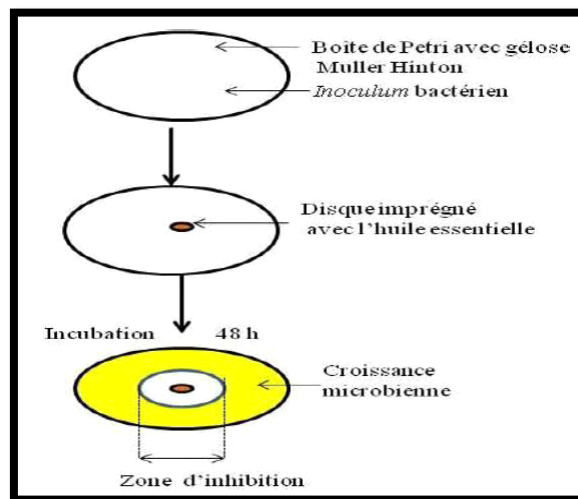
Des disques de 6 mm du papier wattman sont mis dans l'autoclave pendant 20 minutes à 120 °C.

## 8.3 Préparation des milieux de culture avec des suspensions microbiennes

- ✓ Cette étape consiste à liquéfier les milieux gélosés, le milieu Muller-Hinton (MH) pour les bactéries.
- ✓ Dans un bain-marie à 95° C, puis nous coulons aseptiquement le milieu en surfusion dans des boîtes de pétrie à raison de 15 ml par boîte.
- ✓ Nous laissons refroidir et solidifier sur la paillasse puis nous réalisons l'ensemencement par écouvillonnage à l'aide d'un coton-tige stérile contenue des suspensions microbiennes.

## 8.4 Dépôt de disque

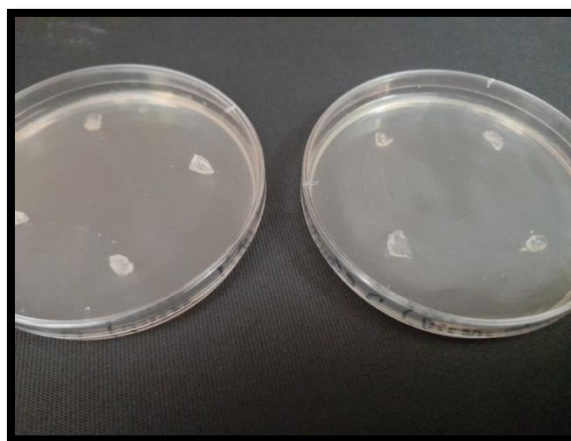
- ✓ Une fois le milieu de culture qui contient les suspensions microbiennes est solidifié.
- ✓ Nous prélevons aseptiquement à l'aide d'une pince stérile un disque absorbant stérile de 6 mm et l'imbiber avec l'huile essentielle de clou de girofle jusqu'à imprégnation totale du disque, puis nous le déposons sur la gélose préalablement préparée.
- ✓ Enfin, les boîtes sont ensuite fermées et laissés diffuser sur la paillasse pendant 30 min.



**Figure 20:** Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de disque

### 8.5 Préparation d'un antibiogramme pour la pierre d'alun

- ✓ A partir des cultures jeunes préparées, nous prélevons quelque colonie des bactéries, à l'aide d'un écouvillon stérile ou d'une anse de platine.
- ✓ Puis on ensemence notre boîtes contenant la gélose Muller Hinton, une fois le milieu s'est solidifier on prend quelques petit pierre déjà préparer et on les dépose aseptiquement a l'aide d'un pince stérile sur la gélose qui contient la suspension microbienne presque la méthode des disques sauf que au lieu de déposer des disques d'antibiotiques on posera des petites pierres d'alun (le même concept qu'un antibiogramme ou un aromatoigramme)



**Figure 21:** dépôt de pierre d'alun sur la culture bactérienne

### 8.5.1 Incubation

Les boîtes de pétrie ont été incubées à 37° C pendant 24 h pour les bactéries.

### 8.5.2 Résultat

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en mm.

## 9 Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles

Les méthodes qu'on a choisies pour sa facilité de mise en œuvre et sa fiabilité pour l'évaluation de l'activité antioxydant des HE. Il s'est agi du test au 1,1-Diphényl -2- picrylhydrazyle (DPPH).

Le test DPPH° permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle.

### 9.1 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Verrerie, pipettes...
- Spectrophotomètre visible et cuves
- Méthanol 96° (qualité spectrophotométrie ou HPLC)
- Solutions de DPPH° (M=394,3 g/mol)

### 9.2 Préparation de la solution de DPPH

- ✓ Le 1,1-Diphényl -2- picrylhydrazyle (DPPH) est solubilisé dans du méthanol absolu à raison de 2,4 mg dans 100 ml.
- ✓ Peser 0,0025 g de DPPH° dans une fiole jaugée de 10 ml.
- ✓ Ajouter 100ml de méthanol à l'obscurité.

### 9.3 Solutions d'huiles essentielles

Pour les tests antioxydants, les échantillons ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu. Pour notre huiles essentielles, on prépare des solutions dans du méthanol absolu à raison de 250ul pour l'huile essentielle de clou de girofle.

Ces solutions dites solution mère, subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de microgramme par ml.

Ainsi, à partir d'une solution mère d'huile essentielle de 0,1 mg/ml, des solutions filles (diluées) de concentrations ont été préparées par double dilution successive dans du méthanol.

Puis à chaque concentration, un volume de solution méthanolique de DPPH a été ajouté. Les mélanges ont été agités au vortex et incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min à la température du laboratoire.

L'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc (solution d'éthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV-VIS (<http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>)

## 9.4 Réglage de spectrophotomètre

- Faire le zéro du spectrophotomètre avec du méthanol. Dans une première cuve du spectrophotomètre chaque minute pendant 15 minutes puis toutes les 15 minutes). Cette cuve sera appelée cuve témoin et sera conservée à l'obscurité entre deux mesures.
- Dans une seconde cuve du spectrophotomètre, placer 3 ml de la solution fille de DPPH° à  $6.10^{-5}$  mol/L. Ajouter 77 µl de solution contenant l'antioxydant (molécule pure ou extrait).
- Déclencher le chronomètre et mesurer régulièrement l'absorbance à 515 nm (ex : chaque minute pendant 15 minutes puis toutes les 15 minutes jusqu'à atteinte d'une valeur constante).
- Cette cuve sera appelée cuve échantillon et sera conservée à l'obscurité entre deux mesures.
- Préparer autant de cuves de spectrophotomètre que d'échantillons antioxydants à tester (différentes concentrations, différents antioxydants). (HADJER & KAOUTHER)

## 10 Identification des constituants par chromatographie sur couche mince (C.C.M.)

### 10.1 Principe Une chromatographie sur couche mince (CCM en abrégé)

Est basé sur la plus ou moins grande solubilité des espèces à analyser avec le solvant, appelé éluant, et sur leur plus ou moins grande affinité avec la phase fixe (la couche de silice de la plaque).

Lors d'une chromatographie, l'éluant monte par capillarité le long de la plaque, entraînant la migration des espèces. Sur le chromatogramme, les espèces sont séparées, la hauteur de migration est une caractéristique physique unique, spécifique à chaque espèce pure trouvée. Ce qui permet une identification par mesure et calcul des R<sub>f</sub>, ou par simple comparaison.

## 10.2 Matériels et produits

Huile essentielle de clou de girofle commerciale

Extrait obtenu

Di éthyle éther

Pence métallique

Cuve ou bécher

Une règle et un crayon

Acétate d'éthyle

Plaque de silice



Figure 22:matériels utilisés dans la CMM

## 10.3 Préparation de la cuve d'éluion

Dans une cuve à chromatographie, introduire du diéthyle ether sur une hauteur de 0,5 à 0,8 cm. Un papier filtre, plongeant dans le diéthyle ether et appliqué verticalement contre la paroi, contribue à saturer l'atmosphère de la cuve en vapeur d'éluant.

## 10.4 Préparation des solutions diluées à analyser

La méthode de révélation utilisée ci-après nécessite la dilution des substances à analyser.

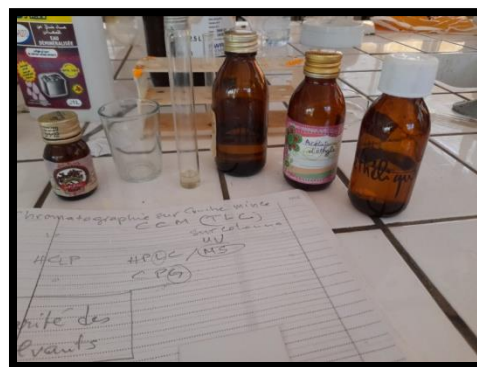
- ✓ Prélever environ 1 mL (c.à.d. un fond de bécher) dans **2 béchers distincts**, de la solution de dépôt (1 mL d'acétate d'éthyle dans 5 mL de cyclohexane) puis ajouter respectivement une goutte d'huile essentielle commerciale (obtenue en pharmacie) et une goutte d'huile essentielle obtenue en TP.

Ces 2 mélanges constituent les solutions à déposer sur votre plaque

## 10.5 Dépôt des substances à analyser sur la plaque

**Attention: la couche de silice est très fragile.**

- ✓ Sur une plaque de silice, tracer un léger trait de crayon parallèle au bord de la plaque à une distance de 1 cm environ, C'est sur cette ligne que l'on effectuera les dépôts.
- ✓ Marquer 2 croix sur cette ligne (pas trop près des bords) pour repérer les positions des dépôts. Réaliser les dépôts.
  - En premier de l'huile essentielle du clou de girofle commerciale
  - En deuxième une goutte de l'huile de clou de girofle préparé



**Figure 23:** Produits utilisés dans CCM

## 10.6 Elution

- ✓ Placer délicatement la plaque dans la cuve et surveiller la montée de l'éluant. Lorsqu'il arrive à environ 1 cm du bord supérieur, retirer la plaque et repérer immédiatement au crayon le front de l'éluant.
- ✓ Laisser "sécher" à l'air libre.

## 10.7 Révélation (sous UV ou par réaction chimique)

Sous UV : la plaque a été introduite après séchage dans une chambre noire

Révélation du chromatogramme à UV est observé à une longueur comprise entre 254nm et 356nm  
 cerclez les taches

## 1 Description de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* obtenue



**Figure 24:** résultats final de l'huile essentielle du clou de girofle extrait par la méthode d'hydro distillation

### 1.1 Le rendement

Le rendement de l'H E extraite par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire à partir des grains de Clous de girofle est mentionné dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II:**Résultat du rendement d'HE de l'espèce *Syzygium aromaticum*

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	maximum
Rendement (%)	4.5	5	8

Ce faible rendement qui est de 4,5 est probablement dû à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et pour la simplicité de notre dispositif d'hydro distillation.

On peut dire qu'en termes de quantité, malgré que ce pourcentage semble inférieur par rapport aux normes AFNOR, ce rendement reste dans la pratique satisfaisant pour mener bien à une telle étude.

En termes de valeurs, le rendement en H.E. de Clous de Girofle est significativement ( $P < 5\%$ ) meilleur par rapport aux rendements obtenus en H.E par Adli, (2015) qui a obtenu un rendement égale à 0.84%. Selon certains auteurs, la composition chimique et le rendement en H.E. varient suivant diverses conditions :

La méthode employée, les parties végétales utilisées et les produits et réactifs utilisés pendant l'extraction, l'environnement, le génotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte

de cette plante, le degré de séchage, les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, présence de parasites, de virus et mauvaises herbes (Naili,2013).

## 1.2 Etude des propriétés organoleptiques

Les résultats mentionnés dans le tableau2, montrent une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des boutons de clous de girofle avec les normes d'AFNOR.

**Tableau III:**Caractéristiques organoleptiques de l'HE de l'espèce *Syzygium aromaticum*.

	Aspect	Couleur	Odeur
<b>Norme AFNOR</b>	Liquide mobile parfois légèrement visqueux	Limpide Jaune très claire	Epicée (caractéristique de l'eugéno)
<b>HE étudiée</b>	Liquide mobile	limpide Jaune clair	Epicée



**Figure 25:**HE extrais de clou de girofle

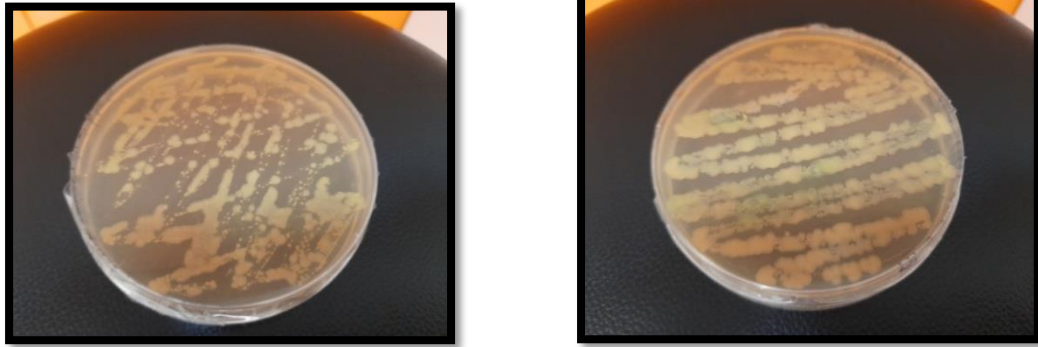
Selon ces résultats obtenus, On remarque que notre huile essentielle obtenu par hydrodistillation présente plusieurs caractéristiques à savoir : l'aspect, la couleur et l'odeur qui sont identiques à celles décrites par les normes d'AFNOR.

## 2 Activité anti microbienne

Nous avons obtenu 10 isolats dont 3 souches ont des aspects différents.

### 2.1 Isolement et purification des isolats

Les colonies des souches bactériennes prélevés de la flore buccale poussées sur le milieu gélose au sang pendant 18/24 h à T° de 37°C sont d'aspects différents, de ce fait sont repiquées dans le milieu d'isolement Muller Hinton.



**Figure 26:**isolement des souches buccales (streptocoques b hémolytique A)



**Figure 27:**isolement des souches buccales (streptocoques mutans )

## 2.2 Caractérisation phénotypique des isolats

### 2.2.1 Aspect macroscopique de colonies obtenues

#### ➤ Sur gélose au sang

Ils donnent de petites colonies grisâtres, translucides, en grain de semoule, entourées d'une zone d'hémolyse totale (hémolyse bêta) pour les strepto-coques des groupes A, tandis que les autres streptocoques donnent une hémolyse partielle (hémolyse alpha) ou pas d'hémolyse du tout.

### 2.3 Caractérisation microscopique

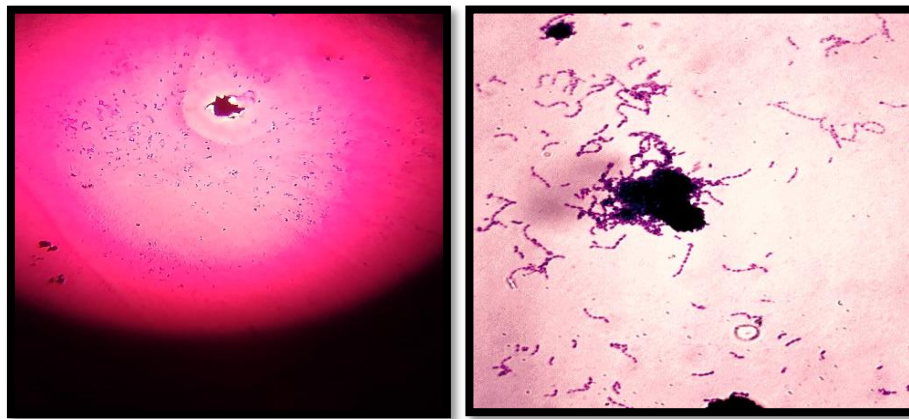
La détermination de la morphologie, l'arrangement cellulaire, la mobilité et le Gram des isolats.

#### 2.3.1 L'état frais

Les résultats montrent que toutes les bactéries sont immobiles avec des formes différentes (cocci, bacille, coccobacille) regroupées en courte chaînette ou en amas (voir tableau 01)

### 2.3.2 Coloration de Gram

Les Résultats de la coloration de Gram pour chaque genre montrent la présence des coques ou des bacilles homogènes violets ne présentant des formes bactériennes étrangères



**Figure 28:** observation microscopique de coloration de Gram (photo prise par appareil

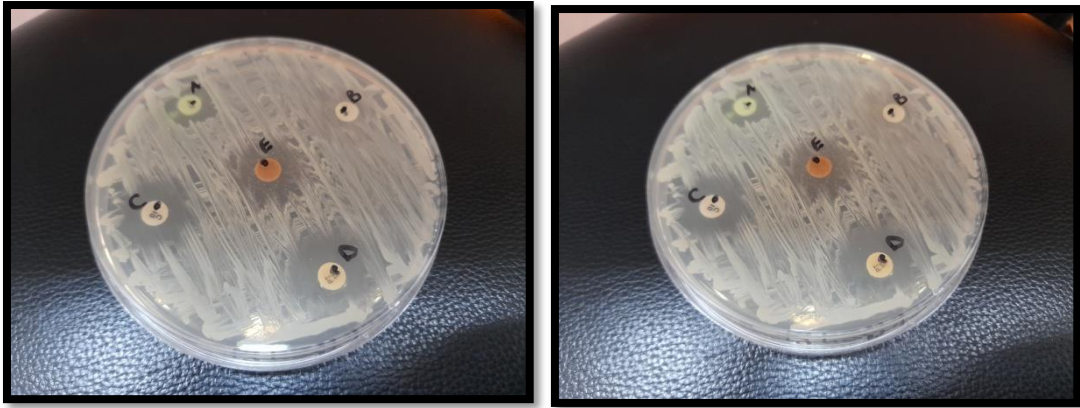
### 2.3.3 Activité anti bactérienne

Cette étude est basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition de l'extrait du *Syzygium aromaticum* obtenus dont on a mesuré avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'extérieur de la boîte de pétri fermée.

**Le Classement des bactéries se fait dans l'une des catégories :** sensible ou résistante.

La souche ayant un diamètre :

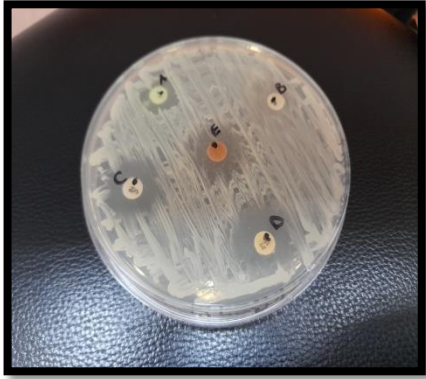
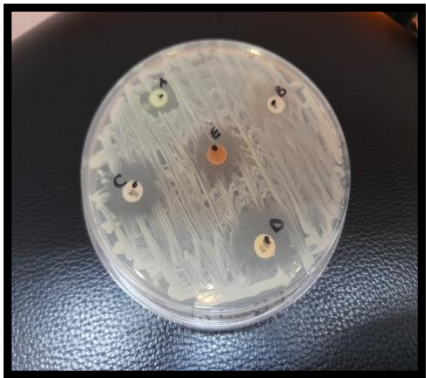
- $D < 8\text{mm}$  : Souches résistante (-).
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$  : Souches sensible (+).
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$  : Souches très sensible (++)
- $D > 20\text{ mm}$  : Souches extrêmes sensible (+++) (<http://www.dr-karazaitri-ma.com/pages/pour-les-professionnels/divers/divers/coloration-de-gram-1.html>)



**Figure 29:**Sensibilité des bactéries vis-à-vis antibiotiques (antibiogramme)

Les résultats du pouvoir anti bactérien de l'HE de *Syzygium aromaticum* sur les souches étudiées sont représentés dans le (tableau 6) :

**Tableau IV:** Résultats de l'antibiogramme de l'HEC sur les trois souches bactériennes.

Souche bactérienne	Gram	Antibiotiques	Diametre en mm	Sensible(+) / Résistante(-)	
Streptocoques mutans		A :penicilline	4.7	+	
		B :erythromicyne	/	-	
		C :chloramphénicol	4	+	
		D :pristinamycine	3.7	+	
		E :tetracycline	4.2	+	
Streptocoques b hémolytique A		A :penicilline	4.7	+	
		B :erythromicyne	/	-	
		C :chloramphénicol	4	+	
		D :pristinamycine	3.7	+	
		E :tetracycline	4.2	+	

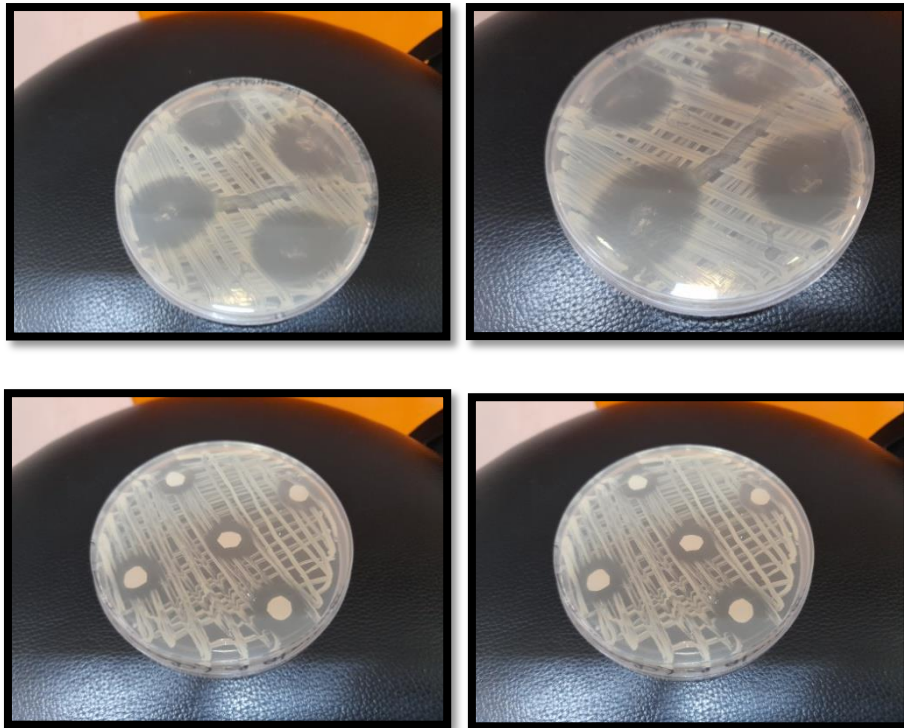
L'Huile essentielle du clou de girofle présente un effet positif c'est-à-dire sensible sur les souches bactériennes de la flore bucco-dentaire : streptocoques mutans , streptocoques b hémolytique A

En comparant les résultats des disques, il est clair que les bactéries à gram positif ont des zones d'inhibition plus grandes pour l'huile essentielle

De nombreuses études, ont démontré que les H.E. de Clou de Girofle sont fortement antibactérienne. Cette activité pourrait être attribuée à son composé majoritaire qui est "l'eugénol". Les travaux de Valero et Giner en 2006, ont prouvé que l'eugénol parmi d'autres composés a provoqué l'inhibition de la croissance des bactéries. Par ailleurs, l'étude de Rhayour (2016), a montré que l'HE de girofle exerce son activité bactéricide principalement grâce à son constituant majoritaire qui est l'eugénol qui appartient à la famille des phénols. Il semble donc que l'activité bactéricide des HE débiterait

par une fixation de ces molécules sur les membranes bactériennes provoquant des altérations de structure et de perméabilité, conduisant à la perte de constituants cellulaires due à une lyse importante des cellules bactériennes.

Résultats Aromatogramme clou de girofle : Les résultats de l'activité antibactérienne de huile essentielle est positif sur toutes les bactéries testées

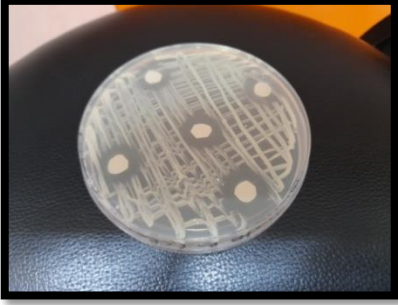
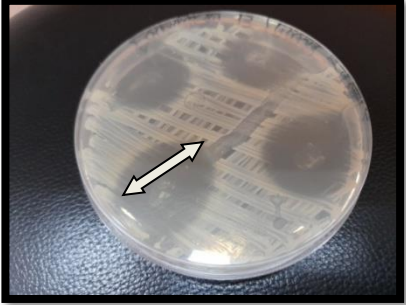
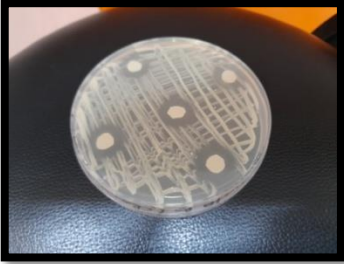
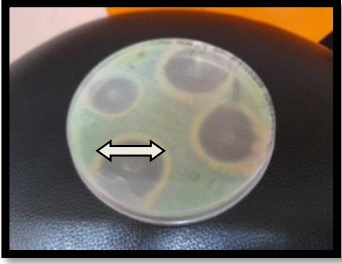


**Figure 30:** Effet de l'H. ES du clou de girofle sur les souches bactériennes testées.

La lecture a été effectuée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Selon **PONCE et al. ,2003** la sensibilité des souches vis à-vis des H.ES est déterminée comme suit :

- Non sensible (-) ou résistante, si le diamètre est inférieur à 08 mm ;
- Sensible (+) si le diamètre est compris entre 09 mm et 14 mm ;
- Très sensible (++) si le diamètre est compris entre 15 mm et 19 mm ;
- Extrêmement sensible (+++) si le diamètre est supérieur à 20 mm.

**Tableau V:** Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes

La souche testé	Diametre en mm	Resultats		Diametre en mm
		HE de clou de girofle	Pierre d'alun	
Streptocoques mutans	4			5
Streptocoques b hemolytique A	4			5

### 3 Resultats aromatogramme « pierre d'alun »

Pour chaque souche testée, nous avons mesuré le diamètre d'inhibitions dont la valeur moyenne résulte de trois essais.

L'étude antibacterienne a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose muller hinton . Elle montre que le bio bain de bouche à base de la pierre d'alun possèdent une activité antibacterienne sur les différentes souches testées.

A remarque que la sensibilité des souches varie d'une souche à l'autre.

D'après ces resultats obtenues nous pouvons conclure que : Le bio bain de bouche à base de la pierre d'alun inhibent les souches étudiées et entraînent des variations de diamètre, et ce, en fonction de l'espèce considéré.

Le bio bain bouche à base du pierre d'alun est fortement actif sur les souches bacteriennes de la flore bucco-dentaire.

le bio bain de bouche possèdent des capacités hautement bactéricides. Ils sont particulièrement efficaces contre les streptocoques (bactérie gram positives)

➤ Galerie api 20 strept :



**Figure 31:** résultats d'identification biochimique galerie API 20 strept

Nous avons obtenu 8 isolats dont l'aspect est différent, ces isolats appartiennent aux genres suivants (on n'a pas pu aller jusqu'à l'espèce pour quelques isolats pour cause de la quasi-rareté des plaques Api 20 Strep) :

Chez les adultes indemnes de caries, on a trouvé : deux souches seulement : *Streptococcus mutans* ,, et d'*Enterococcus faecium*.

Chez l'enfant on a trouve streptocoque b hémolytique A

La caractérisation macroscopique de la famille des Streptocoques nous a permis d'observer de petites ou moyennes colonies blanchâtres ou parfois jaunâtres avec une activité hémolytique sur gélose au sang frais a été constaté. L'aspect de l'hémolyse permet de distinguer les Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques et les non  $\beta$ -hémolytiques (Loubinoux, 2014).

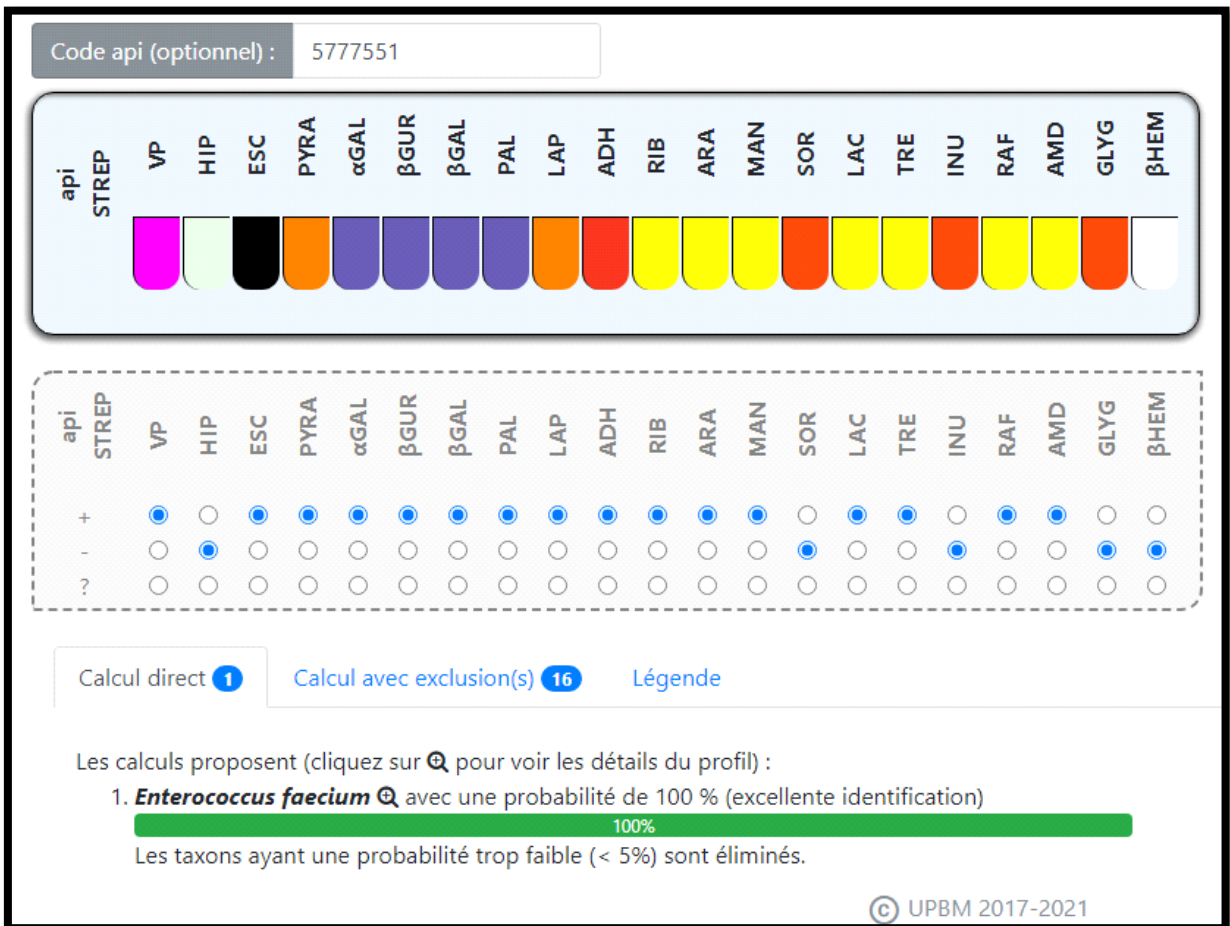


Figure 32: résultats et identifications de l'espèce enterococcus faecium par la galerie api 20 strept

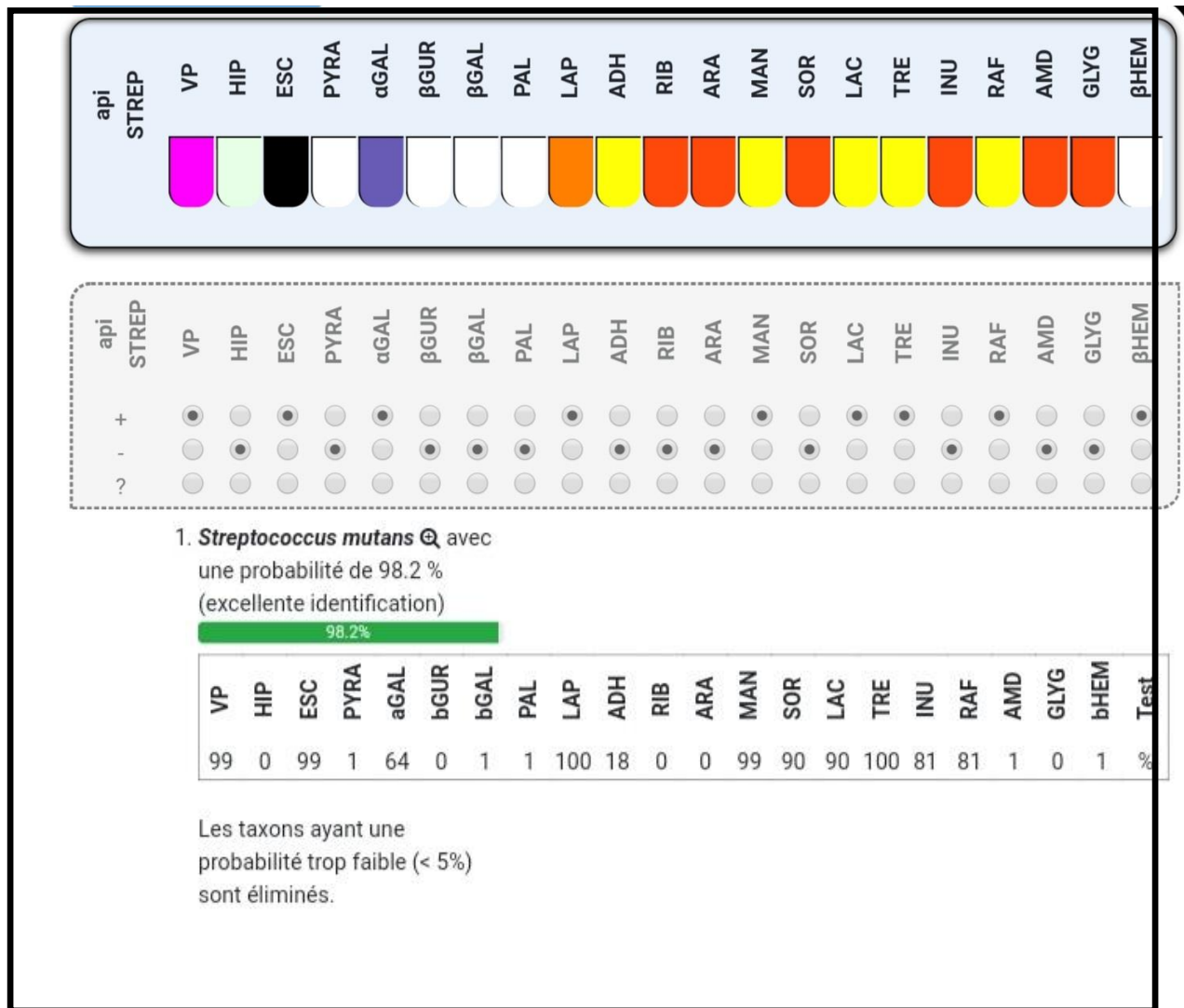


Figure 33: résultats et identifications de l'espèce S;M par la galerie api 20 strept

#### 4 Activité anti fongique

L'activité antifongique doit être expérimenté sur une souche de candida albicans dans notre recherche a partir de notre prélèvement on a pas trouver des champignons donc on l'a pas expérimenté mais on sais que :

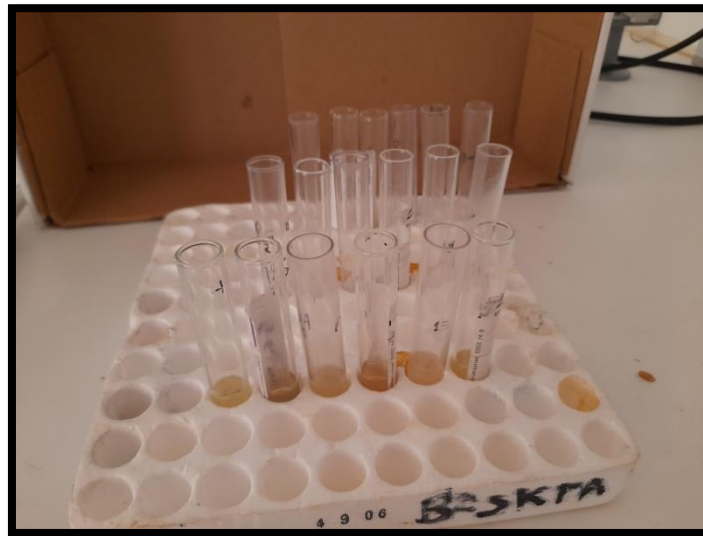
l'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre le pathogène fongique opportuniste, d'après les travaux d'Eugénia et ces collaborateurs (2009) sur le Candida albicans et d'autre pathogènes fongiques.

D'autres travaux, ont montré que l'HE du clou de girofle, ainsi, l'Eugénol montre une grande activité fongicide contre Candida albicans.

## 5 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles du clou de girofle a été évaluée par les méthodes de DPPH

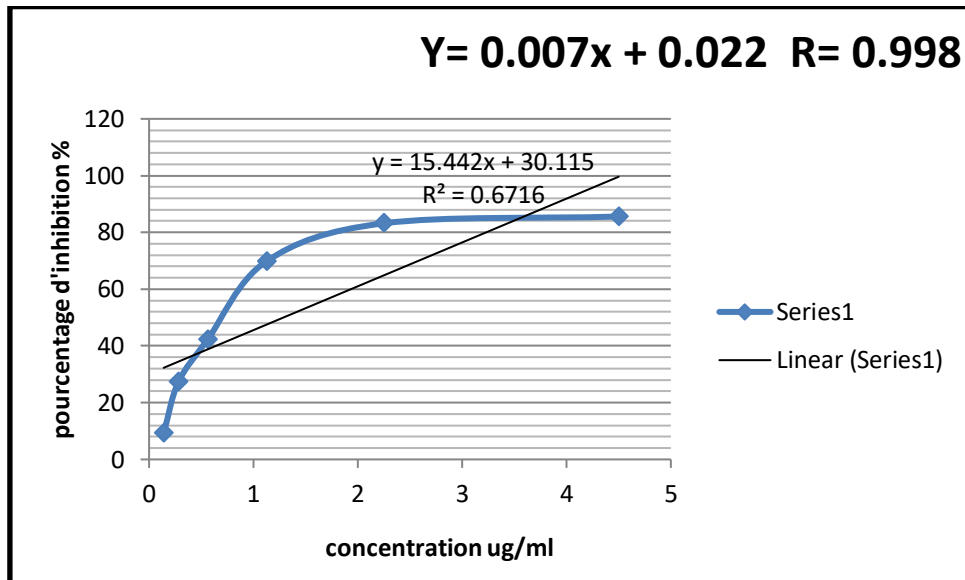
L'activité antioxydante de HE de clou de girofle vis à vis le radical DPPH a été évaluée par spectrophotomètre en fonction de sa réduction par un virage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm (**figure 34**)



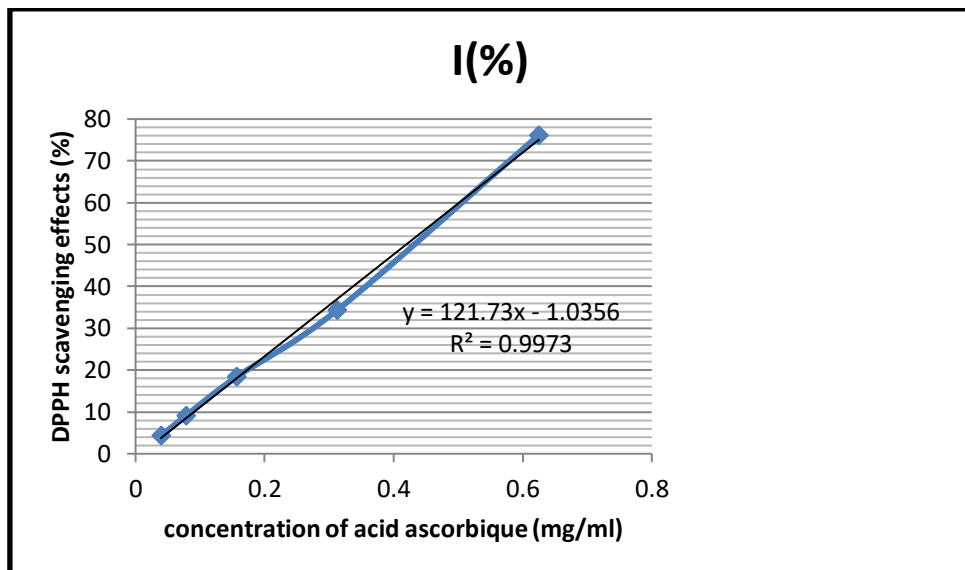
**Figure 34:** résultats du test DPPH

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm, à partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant.

Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer la courbe qui représente les variations de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits, la détermination graphique d'IC50 se fait à partir de la courbe, qui constitue l'activité antioxydant des extraits de clou de girofle.



**Figure 35::** Pourcentage de réduction du radical libre DPPH par l'huile essentielle du clou de girofle



Ic 50 d'acide ascorbique :

0,402238

Résultats Tous les extraits de plantes étudiés montrent une capacité à diminuer l'absorbance à 515 nm, et donc à diminuer la concentration du radical DPPH en solution.

On a vu précédemment qu'en présence d'un antioxydant, le radical DPPH est réduit : on observe une décoloration de la solution.

Les propriétés antioxydantes sont mesurées et mises en évidence par la concentration efficace CE50. Cela correspond à la réduction de 50% de la concentration du DPPH• dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE50 est petite.

### Partie 3

### Résultats et discussion

Nos résultats permettent de mettre en évidence par le test du DPPH que notre huile essentielle du clou de girofle étudiées possèdent une activité antioxydante. Cependant, les valeurs de la CI50 varient de 0,04 à 1,51 mg.ml-1.

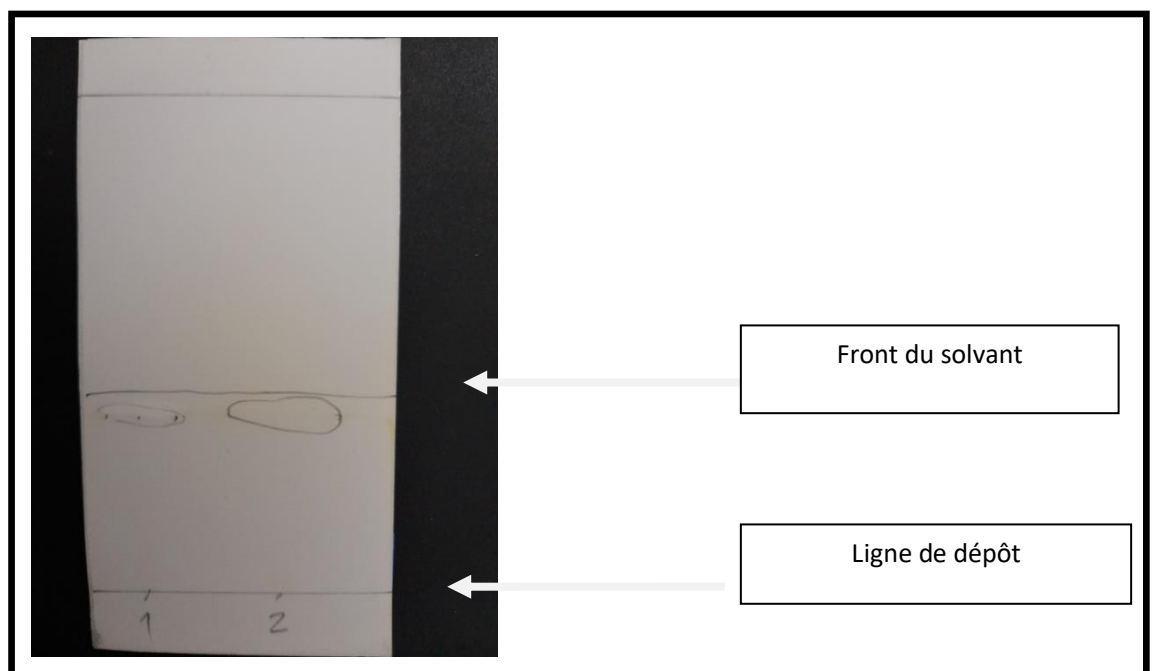
L'acide ascorbique a été utilisé comme un antioxydant de référence avec une CI50 trouvé de 0,402238 mg .

Les résultats de l'activité anti radicalaire ont montré que les extraits de clou de girofle présentent une forte activité anti radicalaire avec une valeur IC50 des extraits.

Les valeurs IC50 des extraits sont inférieure à valeur de l'acide ascorbique .

## 6 Résultats CCM

1. Huile essentielle du clou de girofle
2. Huile obtenu



**Figure 36:** plaque de ccm observer sous la lampe uv a 250nm



**Figure 37:** aperçu de la plaque de CCM obtenu avec l'huile essentielle de *syzygium aromaticum* après révélation aux UV

- On observe la présence de deux taches sombres ayant un rapport frontal presque identique : la première au niveau du témoin et la deuxième au niveau de l'HE.
- On a constaté que notre produit (HE du clou de girofle) est :
  - ✓ Pur
  - ✓ A 99% qu'on a le même produit que le HE commerciale

**Remarque :** le cercle bien visible dans le point (2) est due à une très grande quantité de l'échantillon déposé

**Facteur de rétention :**

$$R_f = \frac{\text{la distance parcourue par l'eluant}}{\text{la distance parcourue par le solvant}}$$

$$R_f = \frac{3.5}{8.5} = 0.41$$

- La zone idéale de séparation se trouve entre les valeurs  $0,1 \leq R_f \leq 0,4$ , là où les facteurs de rétention correspondent à  $2 \leq k \leq 10$  en chromatographie sur couche mince

### *Discussion générale*

Notre travail a pour but de rechercher l'activité antibactérienne, antioxydant et antiseptique du clou de girofle et pierre d'alun vis-à-vis la flore bucco-dentaire

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'ensemble a donné une efficacité sur les streptocoques bucco testées.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Boukhatem Fadhila** a propos de l'Activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux épices : *Syzygium Aromaticum et Illicium Verum* ; **Boukartaba Halima/ Hammoum Karima**( Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygiumaromaticum L*)

Par comparaison entre les résultats d'aromatogramme, d'antibiogramme , nous constatons que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est la plus active. En effet, celle-ci a exercé une activité supérieure à celle des antibiotiques étant donné qu'elle a pu inhiber la croissance de toutes les souches bactériennes testées, alors que certains antibiotiques tels que, Erythromycine a été inactifs.

La même observation est faite en comparant l'huile aux pierre d'alun qui avait une forte activité antibactérienne. En effet, la pierre d'alun a été plus sensible à l'huile (5 mm de diamètre) qu'à ces derniers (3 mm et 4 mm, respectivement).

Une étude menée par (Cillet et lacroit, 2007) indique que les huiles essentielles ont majoritairement un effet antibactérien. Cet effet se résume en trois phases générales : Premièrement, les molécules de l'huile essentielle vont attaquer la membrane de la bactérie. Deuxièmement, l'huile essentielle va acidifier l'intérieur de la bactérie pour bloquer la production d'énergie et de composantes de structure. Enfin, si la bactérie survit, l'huile attaquera directement le matériel génétique de cette dernière.

Cependant, la détermination exacte de l'espèce utilisée est nécessaire pour éviter toute erreur possible.

A la suite de notre présente étude, on recommande le développement d'une réglementation algérienne concernant les huiles essentielles et une étude approfondit sur les HE des plantes algériennes.

Aussi, il serait intéressant de faire des campagnes d'information et de sensibilisation de la population sur la meilleure façon d'utiliser les plantes et leurs huiles essentielles. Car les huiles essentielles

peuvent être utilisées par presque toutes les voies d'administration, surtout locale, mais avec grandes précautions.

## Conclusion

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

Le présent travail avait pour objectif d'étudier l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. L'extraction de l'huile essentielle du clou de girofle par hydrodistillation a révélé un rendement de 4.5%.

Les résultats de l'antibiogramme nous ont permis de constater que était sensible à l'action de quatre antibiotiques (penicilin (p), erythromycine (E), chloramphénicol (C), tetracycline (T) et pristinamycine (p) Les diamètre des zones d'inhibition varient de 4 mm à 5 mm.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a été évaluée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé (aromatogramme).

Les résultats montrent que l'huile a exercé un très grand effet inhibiteur sur les trois souches microbiennes de références, à savoir, streptocoques mutans , streptocoques b hemolytique et enterocoques facium , Ces deux dernières souches se sont avérées être les plus sensibles à l'huile essentielle ; le diamètre de leur zone d'inhibition respectif est de 4 mm et 4.5 mm.

En comparant les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle du clou de girofle avec les résultats de l'aromatogramme du pierre d'alun , il est clair que la pierre d'alun possède un pouvoir antimicrobien supérieur à celui des agents antimicrobiens standards utilisés.

En effet, les diamètres des zones d'inhibitions enregistrés sont plus grands.

De plus, la croissance de toutes les souches microbiennes a été inhibée par l'huile essentielle ; ce qui n'est pas le cas de tous les antibiotiques.

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

Toutefois, ce travail ne constitue qu'une étape préliminaire dans la recherche des substances naturelles biologiquement actives.

Il serait intéressant d'approfondir et de compléter cette étude en :

## *Conclusion*

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

# Références bibliographique

## Références bibliographique :

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Ma. (s.d.).
- Alexis Mahieu, A. (2014). Bains de bouche : Quelle classification adopter afin d'en faciliter la prescription?.Chirurgie. 2014.
- Barbelet, S. (2015).
- barbelet, S. (2015, Juin). Le giroflier : historique , description et utilisation de la plante et son l'huile essentielle .
- Benjilali.B. (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation.
- DESCHEPPER, R. (2017 ). ; VARIABILITÉ DE LA COMPOSITION DES HUILES ESSENTIELLES ET INTÉRÊT DE LA NOTION DE CHÉMOTYPE EN AROMATHÉRAPIE .
- Etude de sensibilité de streptococcus mutans aux extraits totaux de khaya nyasica par Dieumerci DISADILA . (s.d.).
- Fatiha, A., & Ouarda, R. (2016/2017). Etude de pierre d'alun d'Algérie : En vue d'une application pharmaceutique. (.
- GG, N., & MC, L. (s.d.). Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. Can J Microbiol. décembre 2010.
- HADJER, B., & KAOUTHER, D. (s.d.). MALDI -TOF spectrométrie de masse : Un outil efficace pour l'identification rapide et fiable des souches bactérienne/.
- <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>. (s.d.).
- <http://lessentieldeshuileseessentielles.e-monsite.com/pages/la-composition-des-huiles-essentielles/histoire-et-origine-des-huiles-essentielles.html>. (s.d.).
- <http://www.dr-karazaitri-ma.com/pages/pour-les-professionnels/divers/divers/coloration-de-gram-1.html>. (s.d.).
- <https://123dok.net/document/eqo3320q-evaluation-activite-antibacterienne-essentielle-syzygiumaromaticumvis-bacteriesresponsable-infections-urinaires.html> . (s.d.).
- <https://www.antibio-responsable.fr/maladies/infections-bouche> . (s.d.).
- Imene, F. (2016). Les huiles essentielles et l'aromathérapie. Cas de la menthe poivrée (Mentha x piperita) .

## Références bibliographique

manel, z. (2016). etude de la flore constitue de la plaque supra-gingivale chez les adulte sains et caries.

Nicolas, F. (s.d.). CONSEILS ET UTILISATIONS DES HUILES ESSENTIELLES LES PLUS COURANTES EN OFFICINE Directeur de thèse .

Nicolas, F. (s.d.). CONSEILS ET UTILISATIONS DES HUILES ESSENTIELLES LES PLUS COURANTES EN OFFICINE Directeur de thèse : .

P, A., T. M., M, K., & M, M. (s.d.). . Effect of spices in preventing gingivitis and dental caries in patients undergoing orthodontic treatment. Saudi Dent J. juill 2014;26(3):108-14. 52.,. Propolis and Its Potential Uses in Oral Health [Interne.

Soraya, M. O. (s.d.). Essentielle de Syzygium aromaticum vis-à-vis des Bactéries responsable d'infections urinaires 2018.

V, B., . G, R. C., P, V., & P, M. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles, Université de Toulouse. volume.

W, K., A, J., D, K., B, B., & A, S. (s.d.). The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014.