

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMEN**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de  
l'Univers

**Département de Biologie**

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à  
L'Environnement «LAMAABE»

**Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de

**Master**

En Biologie

**Option : Microbiologie Fondamentale**

**Thème**

*Contribution à l'étude de l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de  
Syzygium aromaticum sur des souches de bactéries à Gram négatif  
d'origine hospitalière*

Présentée par: **Lakhdari Halima & Maouedj Amel**

**Soutenue le 24/07/2019**

**Devant le jury**

Présidente	<b>Mme. BENDIMERAD Nahida</b>	<b>Maitre de conférences</b>	<b>U.de Tlemcen</b>
Examinatrice	<b>Melle. CHERIF ANNTAR Asmaa</b>	<b>Maitre de conférences</b>	<b>U.de Tlemcen</b>
Encadreur	<b>Mr. KHADIR Abdelmounaim</b>	<b>Maitre de conférences</b>	<b>U. d'Oran</b>

**Année Universitaire : 2018 – 2019**

## **Remerciements**

*Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu le tout Puissant de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien*

*ce modeste travail*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements pour notre grand et respectueux promoteur Monsieur **Khadir Abdelmounaim**, Maitre de conférences A à l'université Oran 1 Ahmed Ben Bella, de nous avoir guidés tout au long de ce travail pour son encadrement, son soutien moral, son confiance et ses conseils.*

*Nous vous remercions monsieur*

*Nos respects et Nos sincères remerciements à Madame **BENDIMERAD Nahida**, Maitre de conférence B à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant la présidence de notre jury de thèse.*

*Nos vifs remerciements à Melle **CHERIF-ANTAR Asma**, Maitre de conférences B à l'université de Tlemcen. Nous vous sommes très reconnaissants de l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

*Nous remercions chaleureusement personnel tout le personnel du laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement « LAMAABE » pour leur aide*

## *Dédicaces-1-*

*Je remercie dieu tout puissant*

*Je dédie le fruit de ce présent labeur en signe de reconnaissance et respect*

### *À la mémoire de mon père Mohammed*

*Ce travail est dédié à le premier homme de ma vie, décédé tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. Mais aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon immense gratitude et mon plus grand respect; car je ne pourrais oublier sa tendresse et son amour dévoué depuis mon enfance. Puisse Dieu avoir pitié de toi*

*Je t'aime PAPA*

### *À ma Mère Rachida*

*Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.  
Tout ce que je peux t'offrir e pour exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte.  
En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée. Puisse dieu le tout puissant t'accorder meilleur santé et longue vie*

### *Je dédie spécial MPT MED*

*Pour leur encouragement permanent*

*À mon cher frère Mohammed et son épouse Audrey Yasmina*

*Pour leur amour infini et leur soutien tout au long de ce parcours*

*À ma chère sœur Meriem*

*A mes petits amoureux Adam, Rayan, Chahyn et Aymene*

*A mes tout familles sans exception*

*Sans oublier mon binôme Lakhdari Halima*

*AMEL LA ROSE*

## *Dédicaces-2-*

*Je dédie ce modeste travail*

*À ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*À l'âme de mon cher père AHMED: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*Repose en paix PAPA.*

*À la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère FOUZIA.*

*Je dédie spécial Mon mari FETHALLAH qui n'a jamais cessé de croire source d'amour et tendresse sans toi ce mémoire n'aurait jamais un le jour...*

*Et à Ma belle mère NASSIRA*

*À ma chère sœur AMEL et son mari*

*À mon cher frère FAUDEL et sa femme*

*À mes adorables AMIR et NADJET*

*Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*À mon aimable amoureux ISLAM*

*Sans oublier mon binôme MAOUEDJ Amel*

*Halima*

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie I. Synthèse bibliographique</b>	
1. Les plantes aromatiques et médicinales .....	4
2. L'aromathérapie anti-infectieuse.....	5
3. Les alicaments.....	6
4. Le Giroflier <i>sezyguim aromaticum</i> .....	7
4.1. Origine.....	7
4.2. Description.....	7
4.3. Systématique.....	9
4.4. Exigences écologiques.....	10
4.5. Les productions économiques de giroflier.....	10
5. Les huiles essentielles.....	11
5.1. Définition.....	11
5.2. Classification.....	11
5.3. Différence entre essence et l'huile essentielle.....	11
5.4. Chimie des huiles essentielles.....	12
5.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	13
6. L'huile essentielle de clou de girofle et ses propriétés médicinales.....	13
6.1. Définition.....	13
6.2. Composition chimique.....	13
6.3 Conservation de l'huile de clou de girofle.....	14
6.4. Toxicologie.....	14
6.5. Les propriétés médicinales.....	14
7. L'effet antimicrobien de <i>Syzygium aromaticum</i> .....	15
8. Les bactéries à gram négatif.....	16
8.1. Les infections nosocomiales.....	16
8.2. Les germes pathogènes à Gram négatifs responsables d'infection nosocomiale.....	17
9. Résistance des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques.....	18
9.1. Origine de la résistance.....	18
9.1.1. La résistance naturelle.....	18
9.1.2. La résistance acquise.....	19
9.2. Mécanisme de résistance.....	20

<b>Partie 2. Matériel et méthodes</b>	
1. Matériel.....	22
1.1. Matériel biologique.....	22
1.1.1. Les souches.....	22
1.1.2. Matériel végétale.....	22
1.1.3. Les produits utilisés.....	23
2. Méthodes.....	24
2.1. Extraction de l'huile essentielle de clous de girofle.....	24
2.2. Préparation de la suspension bactérienne, repiquage et conservation.....	25
2.2.1. Revivification des souches.....	25
2.2.2. Repiquage.....	25
2.2.3. Conservation.....	25
2.3. Identification.....	26
2.4. Méthode de diffusion en milieu solide : (technique de l'aromatogramme).....	26
2.4.1. Principe générale.....	26
2.4.2. Technique.....	26
2.4.2.1. Préparation de l'inoculum.....	26
2.4.2.2. Ensemencement.....	26
2.4.3. Lecture.....	27
2.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles par la méthode de microplaque.....	28
2.6. La détermination de la concentration minimale inhibitrice en utilisant la résazurine.....	29
2.6.1. La préparation de résazurine.....	29
<b>Partie 3. Résultats et discussions</b>	
1. Résultats et discussion.....	32
1.1. La coloration de Gram.....	32
1.2. Extraction de l'huile essentielle.....	32
1.3. Diamètres des zones d'inhibition.....	32
1.4. Concentration minimale inhibitrice de la croissance bactérienne.....	36
<b>Conclusion</b> .....	40
<b>Référence</b> .....	42
<b>Annexe</b> .....	50

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Situation botanique de l'espèce <i>Syzygium aromaticum</i> .....	9
<b>Tableau 2 :</b> Les souches bactériennes utilisées pour les tests.....	22
<b>Tableau 3:</b> Caractères organoleptiques.....	32
<b>Tableau 4:</b> Résultats des diamètres des zones d'inhibitions en (mm).....	33
<b>Tableau 5 :</b> Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI %) de <i>S.aromaticum</i> obtenues sur microplaque.....	36

## *Liste des Figures*

<b>Figure1:</b> exemple d'un alicament naturel (L'huile de clou de girofle).....	7
<b>Figure 2:</b> Arbre de giroflier.....	8
<b>Figure 3:</b> Feuilles et fleurs du giroflier et quelques boutons floraux.....	9
<b>Figure 4:</b> Unité d'isoprène.....	12
<b>Figure 5:</b> Structure chimique de l'eugénol.....	14
<b>Figure 6:</b> Mécanisme de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	20
<b>Figure 7:</b> Le clou de girofle (photo originale).....	23
<b>Figure 8:</b> Montage de type Clevenger pour l'hydrodistillation et l'extraction de l'huile essentielle de <i>S. aromaticum</i> .....	25
<b>Figure 9:</b> le principe d'un test d'aromatogramme méthode de diffusion sur disque.....	27
<b>Figure 10:</b> Schéma de préparation des dilutions d'HE.....	28
<b>Figure11:</b> Les Procédures de la méthode de microdilution par le résazurine.....	30
<b>Figure12 :</b> Histogramme des diamètres d'inhibition de <i>S. aromaticum</i> .....	34
<b>Figure 13:</b> zones d'inhibitions d'huile essentielle de <i>S.aromaticum</i> sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 de trois volumes.....	35
<b>Figure14 :</b> Les valeurs de CMI obtenue par microplaque.....	37
<b>Figure 15:</b> Résultats sur microplaque montrant les différentes concentrations inhibitrices.....	38
<b>Figure 16 :</b> la microplaque après l'incubation dans le dosage de la résazurine.....	39

## *Liste des abréviations*

**AFNOR:** Association française de normalisation

**ATB:** Antibiotique

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BGN:** Bactérie Gram Négatif

**BHIB :** Bouillon de cœur de cerveau

**BN :** Bouillon nutritif

**CMI :** Concentrations minimales inhibitrices

**DMSO :** Dimethyl sulfoxyde

**H E :** Huiles essentielles

**PAM :** Plantes aromatiques et médicinales

***S. aromaticum:*** *syzyguim aromaticum*

**Vol:** volume

**°C :** Degré Celsius.

**µl:** Microlitre

**% :** Pourcentage.

## **Résumé :**

Les plantes aromatiques et médicinales sont toujours la source fiable d'ingrédients actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques. Notre travail porte sur l'étude et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* connue sous le nom de giroflier.

Pour répondre à cet objectif, une extraction de l'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum* est réalisée par la méthode d'hydro distillation de type Clevenger. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur sept souches bactériennes de référence (*Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella montevideo* ATCC 3581, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) et trois souches bactériennes d'origine clinique (*Pseudomonas aerogenosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* 962), selon deux techniques l'aromatogramme et la concentration minimale inhibitrice.

Les résultats obtenus indiquent que l'huile essentielle de girofle a une activité antibactérienne élevée, il induit des diamètres d'inhibition allant de 12 à 26 mm et des valeurs de CMI comprises entre 0,125 % et 0,5% pour le test sur souches bactériennes.

**Mots clés :** L'huile essentielle, *Syzygium aromaticum*, Clou de girofle, Activité antimicrobienne.

## **Abstract :**

Aromatic and medicinal plants are always the reliable source of active ingredients known for their therapeutic properties. Our work is concerned with the study and demonstration of the antimicrobial activity of the Essential Oil of *Syzygium aromaticum* known as clove.

To realize this objective, an extraction of the essential oil from the flower buds of *Syzygium aromaticum* is carried out by the Clevenger type hydro distillation method. Antimicrobial activity was determined on seven reference bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumonia* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella montevideo* ATCC 3581, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453 and *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) and three clinical bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* 962), according to two techniques the aromatogram and the minimal inhibitory concentration.

The results obtained indicate that the essential oil of clove has a high antibacterial activity; it induces inhibition diameters ranging from 12 to 26 mm and MIC values between 0.125 % and 0.5% for the bacterial strain test.

**Key words:** Essential oil, *Syzygium aromaticum*, Clove, Antimicrobial activity

## المخلص

تعتبر النباتات العطرية والطبية دائماً مصدراً موثوقاً للمكونات النشطة المعروفة بخصائصها العلاجية يركز عملنا على دراسة وإظهار نشاط مضادات الميكروبات للزيوت الطيارة لنبات *mucitamora muiyzyS* والمعروف بالقرنفل

لتحقيق هذا الهدف، يتم استخراج الزيت الأساسي من براعم الزهور ل *Syzygium aromaticum* بواسطة طريقة التقطير المائي من النوع

.Clevenger

تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على سبع سلالات بكتيرية مرجعية (*Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853),

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 و *Salmonella montevideo* ATCC 3581)

و ثلاث سلالات بكتيرية سريرية (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* 962) وفقاً لتقنيتين

l'aromatogramme و la concentration minimale inhibitrice.

النتائج المتحصل عليها توضح ان الزيوت الطيارة لأعواد القرنفل تمتلك فعالية قوية ضد البكتيريا حيث كان معدل التثبيط يتراوح بين 12 ملم إلى 26 ملم اما بالنسبة الى قيم CMI فهي تتراوح ما بين 0.125 % الى 0.25 % للاختبار على السلالات البكتيرية

**كلمات مفتاحية :** الزيوت الطيارة ،أعواد القرنفل ،نشاط مضادات الميكروبات



# *Introduction*

### **Introduction**

Le monde végétal et sa diversité en espèces de plantes constituent un domaine intéressant pour la recherche en biologie et des molécules bioactives. Les plantes aromatiques et médicinales sont désormais une source indispensable de molécules médicamenteuses et ayant des activités biologiques diverses, du fait que les substances naturelles ont été utilisées depuis longtemps sans remarquer d'effets indésirables ou secondaires sur les patients traités contrairement à beaucoup de molécules thérapeutiques qui ont été utilisées en pharmacologie actuelle ensuite retirée du marché à cause de leurs effets indésirables observés avec le temps.

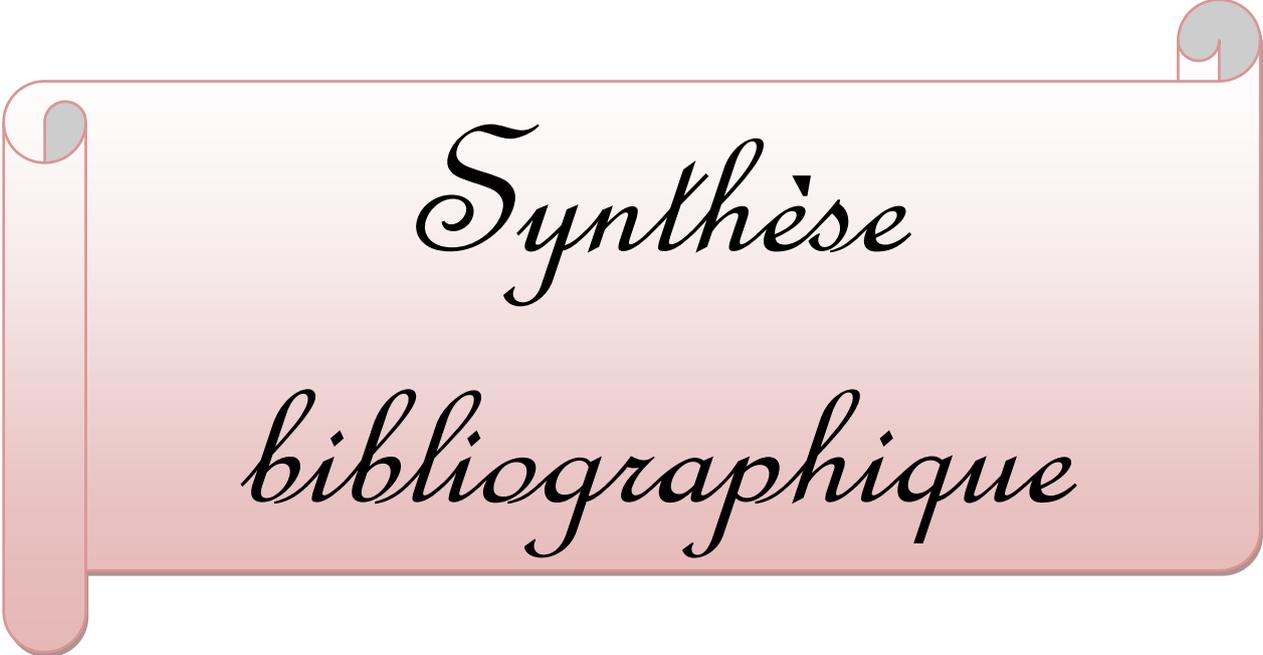
L'activité antimicrobienne est parmi les activités biologiques les plus recherchées actuellement du fait que beaucoup de molécules d'antibiotiques ne sont plus efficaces à cause de la propagation de la résistance et des germes nosocomiaux (**Cos et al., 2006**).

Les huiles essentielles sont des extraits naturels utilisées depuis le temps ancien pour se soigner et pour lutter contre les infections. Cependant beaucoup d'huiles sont active contre les bactéries à Gram positif alors qu'elles ne présentent aucun effet sur les bactéries à Gram négatif ou des effets très faibles sachant que ces derniers sont le groupe des bactéries le plus incriminé dans les infections nosocomiales mortelles (**Bakkali et al., 2008**)

*Syzygium aromaticum* est une plante aromatique et médicinale connue par ses bienfaits et ses vertus thérapeutiques contre plusieurs pathologies, c'est une plante qui fait partie des alicaments puisqu'elle est utilisée comme épice dans toutes les cuisines mondiales. (**Cortés-Rojas et al., 2014**).

Plusieurs travaux antérieurs ont montré l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* contre les bactéries à Gram positif, mais aussi des effets intéressants contre les bactéries à Gram négatif.

Pour cela et dans ce travail nous avons évalué l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* uniquement sur les bactéries à Gram négatif d'origine hospitalières, mais aussi sur des souches bactériennes de référence.



*Synthèse  
bibliographique*

## **1. Les plantes aromatiques et médicinales**

L'Algérie est l'un des pays reconnue par sa richesse variée en plantes médicinales et aromatiques (PAMs), et surtout l'utilisation de ces plantes dans différents domaines. Ce remède traditionnel est sollicité par les études scientifiques (**Blama et Mamine, 2013**).

Les PAMs sont des réservoirs d'éléments curatifs utilisés par une grande population dans le traitement de diverses maladies telles que le paludisme, le diabète, les troubles mentaux, l'hypertension (**Okigbo et al., 2009**).

Des extraits spécifiques tels que les huiles essentielles, les produits pharmaceutiques, les colorants, les produits cosmétiques et les biocides sont obtenus à partir des PAMs qui sont considérées comme des sources d'utilisations industrielles (**Lubbe et Verpoorte, 2011**).

Les principes actifs des PAMs se composent de plusieurs éléments thérapeutiques, ces éléments actifs se trouvent dans différentes parties de la plante parmi ces éléments actifs: les phénols, les flavonoïdes, les tanins, les anthocyanes, les vitamines, les saponines, les glucosides et les minéraux (**Costa et al., 2015**).

Les plantes sont reconnues comme un élément de biodiversité dans le monde médicinale. Elles sont considérées comme des ressources importantes de la planète puisque elles améliorent la vie en fournissant de l'oxygène pour l'environnement (**Zeyneb et Meriem, 2018**).

Une vaste catégorie des plantes ont une grande importance économique et culturelle, par la fourniture de la nourriture, des médicaments, du carburant, des vêtements et des abris pour l'homme. Les plantes sont la pièce maitresse qui maintien l'équilibre écologique sur la surface terrestre et aide à stabiliser l'écosystème. Elles représentent des habitats pour les animaux et les insectes (**Djoghla et al., 2009**).

La majorité des espèces végétales qui poussent dans le monde entier ont des vertus thérapeutiques puisqu'elles possèdent des facteurs actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi en médecine classique qu'en phytothérapie: elles présentent donc des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Chevallier, 2001**).

Le mot phytothérapie signifie essentiellement «appliquer des soins avec les plantes». Car c'est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. Il s'agit d'une pratique basée sur un savoir empirique qui s'est transmis au fil des générations (**Gahbich, 2009**).

Les médicaments proposés par la médecine moderne sont remplis par des produits chimiques et des molécules mortels pour l'organisme humain c'est pourquoi les patients tournent vers la phytothérapie pour les bien qu'elle donne à l'organisme car les plantes sont un remède moins dangereux pour l'anatomie humaine (**Chevallier, 2001**).

### **2. L'aromathérapie anti-infectieuse**

L'aromathérapie, branche de la phytothérapie est considérée comme une médecine alternative qui fait ces preuves depuis des années. Actuellement et de plus en plus, elle fait l'objet d'études cliniques où elle a pour but de palier ce que la médecine conventionnelle n'est pas ou plus capable d'apporter (**Pierron, 2014**).

Le terme « aromathérapie » est créé en 1928 par un pharmacien français René Maurice Gattefossé. Il désigne l'utilisation des aromates, c'est à dire la manière de prendre ces huiles essentielles extraites de plantes aromatiques (**Verbeke, 2006**). Ce terme savant est composé de deux mots grecs: «aroma» signifiant parfum et «thérapie», méthode de soins (**Scimeca et Tétou, 2005**).

L'aromathérapie a pour but de fortifier et stimuler le système immunitaire de l'individu. Son utilisation vise la prévention de la maladie (**Roque, 2011**). Une nouvelle manière d'aborder l'aromathérapie anti-infectieuse. Il paraît que l'effet antimicrobien d'huile essentielle in vivo et en particulier en cas d'application externe se fait par des mécanismes principaux qui donnent l'action antimicrobienne, l'action anti-inflammatoire et l'action immunostimulante empruntant les stimuli olfactifs (**Inouye et Abe, 2007**).

### **3. Les alicaments**

Les alicaments sont des aliments qui possèdent des propriétés médicales. La différence entre complément alimentaire, alicament et médicament repose sur les allégations portées, la dose et la présentation du produit (**Cynober, 2008**).

Les alicaments, contraction d'aliment et de médicament, parfois synonymes de nutraceutique ou d'aliments fonctionnels, ne sont pas bien définis. Ce sont des «aliments ou nutriments considérés comme un remède curatives ou préventives vis à vis des maladies humaines», on peut citer des yaourts au probiotiques ou des margarines enrichies en phytostérols (**Derbré, 2010**).

Il est dur d'obtenir une classification des différents types d'aliments, on peut les classer en quatre classes suivant leurs procédés de fabrication tels que les aliments possédant des effets indésirables (Le riz), les aliments avec une augmentation concentrée d'un composé déjà présent dans l'aliment naturelle (céréales), les aliments dans lequel on a incorporé un nouveau composant (œuf aux oméga 3) et les aliments dont on a substitué un composant néfaste pour la santé par un autre ayant une action bénéfique sur l'organisme (**Callias, 2007**).

Ils sont considérés, principalement, comme des produits ayant des bienfaits sur une ou plusieurs fonctions cibles dans l'organisme, au-delà des effets nutritionnels habituels, et pouvant soit améliorer l'état de santé et le bien être d'un individu soit réduire le risque d'une maladie (**Bouyahya, 2016**).

Les alicaments naturels sont très nombreux, la nature fait souvent bien les choses et nous fournit des aliments bons pour la santé (**Ferris, 2013**) (voir figure 1).



**Figure 1:** exemple d'un alicament naturel (L'huile de clou de girofle)

#### **4. Le Giroflier *sezyguim aromaticum***

##### **4.1. Origine**

Le Giroflier, du nom latin *Syzygium aromaticum* appartenant à la grande famille des Myrtacées, il est largement cultivé en Inde, Indonésie, à Madagascar, au Pakistan et au Sri Lanka et sont utilisés comme épices dans tout le monde (**Allahverdiyev *et al.*, 2013**).

##### **4.2. Description**

C'est un arbre pérenne d'une hauteur de douze mètres qui peut aller jusqu'à quinze mètres de haute et peut vivre plus de 100 ans (voir figure 2). Son système racinaire est de type racinaire, peu développé (**Maistre, 1964**), il présente un port pyramidal et au tronc gris clair ridé. Ces feuilles sont aromatiques et dégagent une odeur de clou de girofle au froissement, pouvant atteindre 8 à 10cm de long,. Les inflorescences en cymes (4–5 cm) du giroflier, sont regroupées en panicules terminaux portant trois à cinq petites fleurs parfumées, au calice tubulaire blanc cassé, puis rouge et à la corolle blanc rosé (**Ghedira *et al.*, 2010**) (voir figure 3).



**Figure 2** : Arbre de giroflier (**Danthu *et al.*, 2014**)

Giroflier en mois de Janvier et Février donne des clous de girofle, ou les boutons floraux, groupés en cymes terminales. Ils sont choisis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée, puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante. Les clous de girofle sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, dans trois jours, avant de procéder à l'égriffage pour éliminer les pédicelles ou griffes (**Richard, 1974; Loo et Richard, 1992**).

Un séchage rapide produit une meilleure qualité d'épice, Le rendement annuel moyen en gousses séchées par arbre est d'environ 3 kg, mais les rendements de 18 kg ou plus par arbre ne sont pas rares. Enfin, ils sont emballés dans des sacs appelés «tapis» de feuilles de coco et stockés dans un local sec. Un stockage prolongé peut entraîner une perte d'huiles volatiles (**Bagchi et Srivastava, 2003**).

Comme le nom de clou l'indique, Le bouton floral séché a la forme de marteau mesurant environ 16-20 mm de long, La tige consiste en un hypanthium légèrement aplatie et se rétrécissant au-dessous de 10-13 mm de long, 4 mm de large et 2 mm d'épaisseur, la tête est constituée de quatre sépales de calice saillants et de nombreuses étamines incurvées entourant un grand style (**Sharada et Lalitha, 2017**).



**Figure 3:** Feuilles et fleurs du giroflier et quelques boutons floraux (Sharada et Lalitha, 2017).

### 4. 3. Systématique

**Tableau 1:** Situation botanique de l'espèce *S. aromaticum* (Ghedira et al., 2010).

Classification botanique	
<b>Famille</b>	Myrtaceae
<b>Genre</b>	<i>Syzygium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Syzygium Aromaticum</i> (L) Merr.et Perry
<b>Nom commun</b>	Giroflier
<b>Nom Anglais</b>	Clove
<b>Nom Arabe</b>	قرنفل , Qaranful
<b>Synonymes</b>	<i>Eugenia Caryophyllus</i> C <i>Eugenia Cryophyllata</i> Thunb

### **4.4. Exigences écologiques**

Les conditions nécessaires au bon développement du giroflier sont un climat de type tropical (plusieurs de chaleur et d'eau) avec une altitude ne dépassant pas 300 mètre, Il a également besoin d'une saison sèche pour coïncider avec la floraison, l'arbre pousse et fructifie complètement loin du rivage (**Leroy, 1946**). Les rendements restent beaucoup plus élevés sur des terrains plus riches, à l'exception des terres argileuses humides et des anciens marais car il nécessite un bon drainage (**Tourneur, 1947**).

Les contraintes que connaît directement le giroflier sont des cyclones et l'andretra. En effet, son système racinaire est faible et se répartit principalement en surface donc, il fait sa résistance faible aux vents et notamment aux cyclones. Andretra est une chenille creuse dans le bois des galeries longues de 30 à 40 cm, qui cause les plus grands dégâts (**Leroy, 1946**).

### **4.5. Les productions économiques de giroflier**

Le giroflier est à l'origine de deux productions économiquement intéressantes: les clous et l'essence.

Les clous correspondant aux bourgeons floraux séchés, ils sont principalement utilisés en Indonésie pour la fabrication de kretek, cigarettes traditionnelle indonésiennes composées d'un mélange de tabac et de girofle .75% des clous sont absorbés par ce marché. Le clou est également utilisé en tant qu'épice en particulier dans les cuisines orientales ou occidentales (currys, pains d'épice...) (**Danthu et al., 2014**).

L'essence est produite à partir de la hydrodistillation des feuilles, des griffes ou des clous de girofle et des tiges, Le principal emploi est la fabrication de l'eugénol, également connue pour ses propriétés antibactériennes, antiseptiques et anesthésiques.... L'huile de girofle est utilisée en pharmacie, en médecine humaine, vétérinaire et en dentisterie, mais aussi en aromathérapie (**Tiollier et al., 2014**).

### **5. Les huiles essentielles**

#### **5.1. Définition**

Le terme «huiles essentielles» (HE) a été inventé pour la première fois au 16ème siècle par le médecin suisse Paracelsus Von Hoenheim, qui a nommé le composant efficace d'un médicament, «Quinta essential» (**Edris, 2007**), ce sont des mélanges naturels complexes et volatils, caractérisés par une odeur plus ou moins forte, et aussi formés par les plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires (**Bakkali et al., 2008**).

Les HE ont un aspect huileux et peuvent être produites par différentes parties de la plante: feuilles, bourgeons, graines, fleurs, brindilles, écorce, herbes, bois, fruits et racines. Du point de vue chimique, ils sont constitués de différents composants comme les terpènes et de leurs composés oxygénés qui contribuent à des effets bénéfiques ou indésirables (**Prabuseenivasan et al., 2006**).

Les HE sont extraites par plusieurs méthodes; soit par distillation sèche, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, Les HE sont isolées de la phase aqueuse par des procédés physiques (**Afnor, 2000**).

#### **5.2. Classification**

Grâce à l'indice aromatique obtenu par aromatogramme et selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, Les HE sont constituées de trois classes: (**Pibiri, 2006**)

- ❖ Les huiles majeures
- ❖ Les huiles médiums
- ❖ Les huiles terrains

#### **5.3. Différence entre essence et H.E**

Au début, il est nécessaire de clarifier la différence entre l'HE et l'essence d'une plante. L'essence de l'arbre du giroflier est une sécrétion naturelle trouvée dans les poches schizogènes par contre l'HE du giroflier est obtenue par distillation à la vapeur d'eau. Bien que le but soit

d'obtenir de l'huile très près de l'essence de la plante. Il y a encore des phénomènes d'oxydoréduction dus à la distillation, et certaines particules très lourdes ne peuvent pas être déplacées par la vapeur d'eau. Cela modifie la composition de l'HE Par rapport à l'essence (Barbelet, 2015).

### 5.4. Chimie des huiles essentielles

Les HE ont une composition chimique généralement assez complexes, Ils sont composés principalement par deux groupe exclusive: les terpènes et les composés aromatiques (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

Le premier groupe est celui Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (voir figure 4) d'une structure de base à cinq carbones (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Ils représentent le groupe le plus nombreux des métabolites secondaires, végétaux, et comprennent les monoterpènes (C<sub>10</sub>), les sesquiterpènes (C<sub>15</sub>), mais il existe également des diterpènes (C<sub>20</sub>) et triterpènes en C<sub>30</sub>. En général, les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie dans la composition de la plupart des HE (Couic-Marinier et Lobstein, 2013; Calsamiglia *et al.*, 2007).

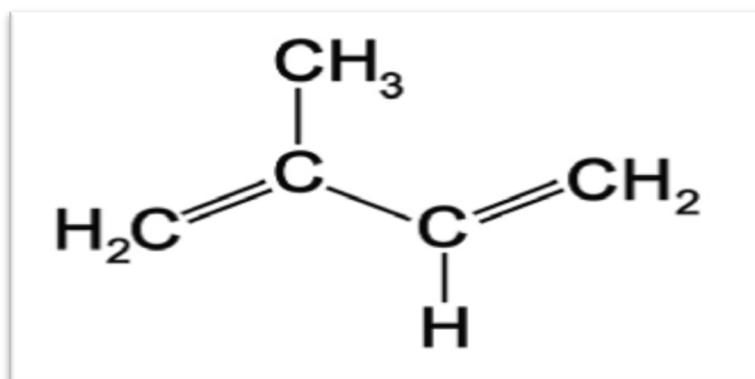


Figure 4: Unité d'isoprène

Le second groupe et celui des composés aromatiques dérivés de phénylpropane, sont beaucoup moins fréquents dans les HE par rapport aux terpènes. Les voies de biosynthèse des terpènes et des dérivés phénylpropaniques sont généralement isolées chez les plantes (Bakkali *et al.*, 2008).

### 5.5. Méthodes d'extractions des huiles essentielles

Les HE sont formées dans toutes les parties aériennes de la plante. Parfois, elles ne sont pas formées dans la plante elle-même. Mais, elles sont produites par l'hydrolyse des composés présents dans la plante (**Ríos, 2016**). La quantité d'HE contenue dans les plantes est très faible, il faut plusieurs distillations pour obtenir un rendement (**Kabera et al., 2005**).

Ainsi les différentes techniques d'extraction les plus courantes sont l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur, la technique de l'enfleurage et l'extraction par solvant organique. Alors que l'entraînement à la vapeur d'eau ou l'hydrodistillation reste la technique la plus utilisée (**Charles et Simon, 1990**). D'autre part, de nouvelle méthode telle que l'extraction par les gaz supercritiques (**Ríos, 2016**) l'extraction à l'eau surchauffée, par ultrasons et par micro-ondes (**Wang et al., 2008**).

## 6. L'huile essentielle de clou de girofle et ses propriétés médicinales

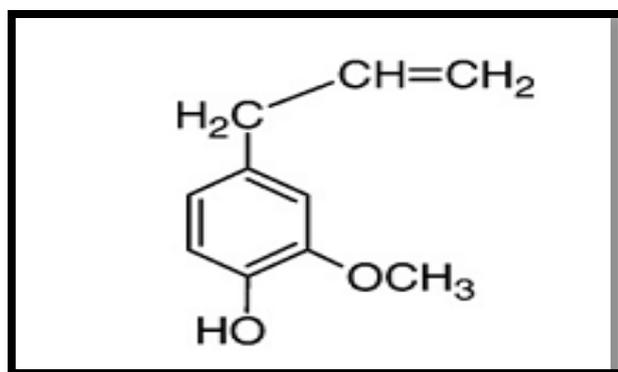
### 6.1. Définition

L'huile de clou de girofle est un naturel analgésique qui utilisée majoritairement en dentisterie pour sa molécule actif l'eugénol. C'est une HE de l'arbre de girofle (**Singh et al., 2018**) et aussi ne présente pas un risque chimique pour l'utilisateur ou pour l'environnement. De plus, L'HE de girofle est examinée comme étant sûre et n'est pas très chère puisqu'elle est utilisée comme additif alimentaire depuis longtemps pour la consommation humaine (**Kheawfu et al., 2018**).

### 6.2. Composition chimiques

Plusieurs études ont été faites pour trouver divers composant de *S. aromaticum*, les clous renferment environ 15à 20% d'HE qui contient: (**Mittal et al., 2014**)

- 70 à 85% d'eugénol.
- 15% d'acétate d'eugényle.
- 5 à 12% de  $\beta$ -caryophyllène.



**Figure 5:** Structure chimique de l'eugénol.

### 6.3. Conservation de l'huile de clou de girofle

A cause de leurs évaporations rapides, ces huiles nécessitent certaines précautions de conservation. En effet, elles doivent être conservées dans des tubes en verre opaque brun secs et fermés hermétiquement pour la préserver de la lumière et de l'air, elles peuvent être préservées à une température proche de 4°C (**Burt, 2004**).

### 6.4. Toxicologie

L'usage abusif de l'huile de girofle est toxique pour les cellules humaines, il a été prouvé que cela entraîne des complications fatales potentielles, si avalé ou injecté dans quantité suffisante, y inclus un syndrome de détresse respiratoire, système nerveux central désordre et insuffisance hépatique fulminante. 3,752 g / kg de poids corporel est la dose orale mortelle (**Aneja et Joshi, 2010**).

L'eugénol est aussi indiqué comme toxique en quantité assez faible. Par exemple, une dose de 5 à 10 ml a été retrouvée, comme une dose à peu près létale chez des enfants de 2 ans (**Mbaveng et Kuete, 2017**).

### **6.5. Les propriétés médicinales**

L'HE de *S. aromaticum* appréciée pour ses activités antalgiques et désinfectantes, elle est efficace contre les douleurs dentaires et permet de désinfecter les plaies. Elle peut être également utilisée pour traiter des troubles digestifs comme ballonnement épigastrique, flatulences et utilisée dans le traitement de l'hyperglycémie (**Goetz et Ghedira, 2012**). Elle confère également des activités antibactériennes antihistaminiques et anthelminthiques (**Iwu, 2014**).

Les principes composants présent dans le clou de girofle augmente la motilité du tractus gastro-intestinal et améliore le pouvoir de digestion en augmentant les sécrétions d'enzymes gastro intestinales. Donc, elle aide à soulager les problèmes d'indigestion et de constipation (**Bhowmik et al., 2012**). Les maladies inflammatoires: l'allergie, les rhumatismes et les douleurs liées à l'arthrite sont souvent soulagées par l'utilisation de la thérapie de massage à l'HE, elles peuvent procurer une agréable sensation de confort psychique aux patients grâce à leur odeur agréable (**El Asbahani et al., 2015**).

L'HE de clou de girofle contiennent de bonnes quantités de vitamine A et de bêta-carotène. On sait que ces composés sont connus pour leurs propriétés antioxydantes. La vitamine A est également nécessaire au maintien de la santé des muqueuses et de la peau ainsi que pour la vision. La consommation d'aliments naturels riches en flavonoïdes aide à protéger l'organisme contre les cancers du poumon et de la cavité buccale et la consommation d'aliments riches en vitamine C aide le corps à développer une résistance contre les agents infectieux et à éliminer les radicaux libres d'oxygène nuisibles (**Bhowmik et al., 2012**)

### **7. L'effet antimicrobien de *Syzygium aromaticum***

Le composant majeur «L'eugénol» est un composé antifongique, antiallergique, anticancérogène, et aussi possède un effet pesticide contre plusieurs parasites (**Kumar et al., 2011**).

L'huile de *S. aromaticum* exerce des effets antimutagènes et utilisée comme un local anesthésique pour l'homme (**Kheawfu et al., 2018**). Elle possède également un effet anesthésique

naturel pour aquaculture (Uehara *et al.*, 2019), effets larvicides de l'huile sur les moustiques *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus* (Fayemiwo *et al.*, 2014). Les extraits à l'éthanol de boutons floraux ont été testés pour leurs effets anti-nociceptifs chez des souris et des rats Wistar. ces essais ont été effectués par utilisation des contractions abdominales induites par l'acide acétique chez des souris et un oedème de la patte postérieure induit par le formol chez des rats Wistar. (Sharada et Lalitha, 2017).

Cette l'huile avait des effets anti-inflammatoires comparables à ceux d'étodolac à 0,025 et 0,1 mL / kg et à ceux de l'indométhacine à 0,05 et 0,2 mL / kg (Agyare *et al.*, 2013), en raison de sa teneur élevée en composés phénoliques, elle présente un effet antioxydant élevé (Ben-Arfa *et al.*, 2019) des effets analgésiques (Kamatou *et al.*, 2012).

En ce qui concerne les effets anti-arthritiques de l'eugénol l'administration d'eugénol (33 mg / kg) par voie orale pendant 26 jours à des rats souffrant d'arthrite induite par l'administration de bacilles morts de *Mycobacterium tuberculosis* provoquait une suppression significative de la patte et de l'enflure articulaire, indiquant ses propriétés anti-inflammatoire et antirhumatismale (Baliga *et al.*, 2015).

### 8. Les bactéries à gram négatif

Les bactéries à gram négatifs (BGN) représentent plus de 66 % des bactéries répertoriées dans la classification de Bergey. Elles possèdent une paroi qui donne à la cellule sa forme. Cette paroi est formée d'une couche de peptidoglycane comprise entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique. Sur une base morphologique on distingue dans cette division les groupes suivants: les bacilles à gram négatif (ce sont des bactéries en forme de bâtonnets) et les Cocci à gram négatif (de forme sphérique arrondie) (Bernard *et al.*, 1973).

Chez les BGN, l'enveloppe comprend la membrane externe et la membrane cytoplasmique ou interne. Elles constituent à la fois une barrière de protection contre les agents toxiques présents dans le milieu, et une structure complexe qui contient divers mécanismes protéiques assurant le transport d'éléments indispensables à la survie et à la croissance bactérienne. L'activité des diverses familles d'antibiotiques est fortement dépendante de ces mécanismes de transport

membranaire, puisqu'ils interviennent en modulant la concentration intracellulaire de la molécule antibactérienne (**Pagés et Garnotel, 2003**).

### **8.1. Les infections nosocomiales**

L'infection hospitalière ou nosocomiale, constitue un problème important de santé publique par sa fréquence et son retentissement humain et économique. Elle se définit comme une infection acquise à l'hôpital qui n'était ni en incubation, ni présente à l'admission du malade et dont les manifestations cliniques apparaissent habituellement après la 48<sup>ième</sup> heure d'hospitalisation (**Tasseau et Baron, 1989**).

Certaines infections nosocomiales ne se manifestent cliniquement qu'après la sortie de l'Hôpital ou même ne sont diagnostiquées que lors d'une nouvelle admission. C'est ainsi que pour les infections de la plaie opératoire, on accepte nosocomiale les infections survenues dans les 30 jours suivants l'intervention ou s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant dans l'année qui suit l'intervention. (**Dubernard et al., 2006**)

On distingue plusieurs types d'infection nosocomiale, avec des modes de transmission différents.

**\*Transmission endogène:** les sites normalement stériles sont contaminés puis colonisés par la flore dont le patient s'infecte avec ses propres germes à la faveur d'un acte invasif ou d'un terrain particulier.

**\*Transmission exogène:** associée à la colonisation du patient par des bactéries extérieures, provenant du personnel hospitalier ou liée à l'environnement transmises de manière indirecte (aérosols, matériel médical...) (**Faure et al., 2002**)

### **8.2. Les germes pathogènes à Gram négatifs responsables d'infection nosocomiale**

Les bacilles à Gram négatif sont en cause dans 60 à 70% des cas, les cocci à Gram Positif dans 25% et les anaérobies dans 3 à 4% seulement (**Tasseau et Baron, 1989**).

*Pseudomonas aeruginosa*, *E coli*, *Klebsiella pneumoniae* , et *Acinetobacter baumannii* sont souvent incriminées dans ces infections dites« nosocomiales» (**Curvale-Fauchet et al., 2004**).

*E. coli* provoque 40 à 50% de toutes les infections nosocomiales(**De Rauw et al., 2014**).

de nombreuse épidémies nosocomiales causées par *K. pneumoniae* ont été décrites, notamment chez des patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs pédiatriques (**Biran et al., 2010**).

Parmi les bactéries très répandue dans les infections nosocomiales, l'espèce *P. aeruginosa* c'est une bactérie pathogène opportuniste qui infecte préférentiellement les sujets hospitalisés immunodéficients. Chez le nouveau-né, l'infection à *P. aeruginosa* le plus souvent d'origine exogène (**Foca, 2002**).

*Acinetobacter baumannii* est également une bactérie connue ces dernières années dans les secteurs de santé, elle est responsable d'épidémies nosocomiales probablement en raison de sa survie à long terme sur des surfaces inertes (**Garlantézec et al., 2011**) et de sa résistance fréquente aux ATB , les infections à *A. baumannii* ont été tenues pour responsable de séjour prolongé et de taux de mortalité en augmentation (**Falagas et al., 2006**).

### **9. Résistance des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques**

Les antibiotiques (ATB) sont parmi des médicaments prioritaires et la résistance des bactéries est devenue un problème majeur de santé publique. La consommation d'ATB est un facteur clé de cette résistance, même si les relations sont complexes. (**Goossens et al., 2006**).

Actuellement, L'évolution rapide de ce phénomène a été observée en Algérie, ce qui indique une résistance inquiétante et préoccupante particulièrement aux bacilles Gram-négatifs (**Baba et Arlet, 2014**) par l'adaptation génomique et protéique de ces bactéries. L'Organisation mondiale de santé a récemment publié un rapport sur la résistance aux ATB et ses risques pour les pays. Les sociétés pharmaceutiques n'ont pas cessé d'élaborer des solutions et des stratégies depuis que le premier cas de cette résistance a été découvert afin de réduire son occurrence (**Lemaoui et al., 2017**).

Pour lutter contre cette résistance, des stratégies importantes ont été utilisées, notamment l'amélioration de la structure des ATB anciens, la substitution par les peptides antimicrobiens cationiques, l'association d'inhibiteurs de la bêta-lactamase, l'utilisation du sel de bismuth, utilisation de nanoparticules et thérapie génique et aussi Inhibition de l'ATP synthase (**Lemaoui et al., 2017**).

### **9.1. Origine de la résistance**

La résistance bactérienne aux ATB à deux origines essentielles, peut être naturelle, ou bien acquise. La première est programmée au niveau du génome et la deuxième résistance est développée en fonction des conditions métaboliques (**Bouyahya et al., 2017**).

#### **9.1.1. La résistance naturelle :**

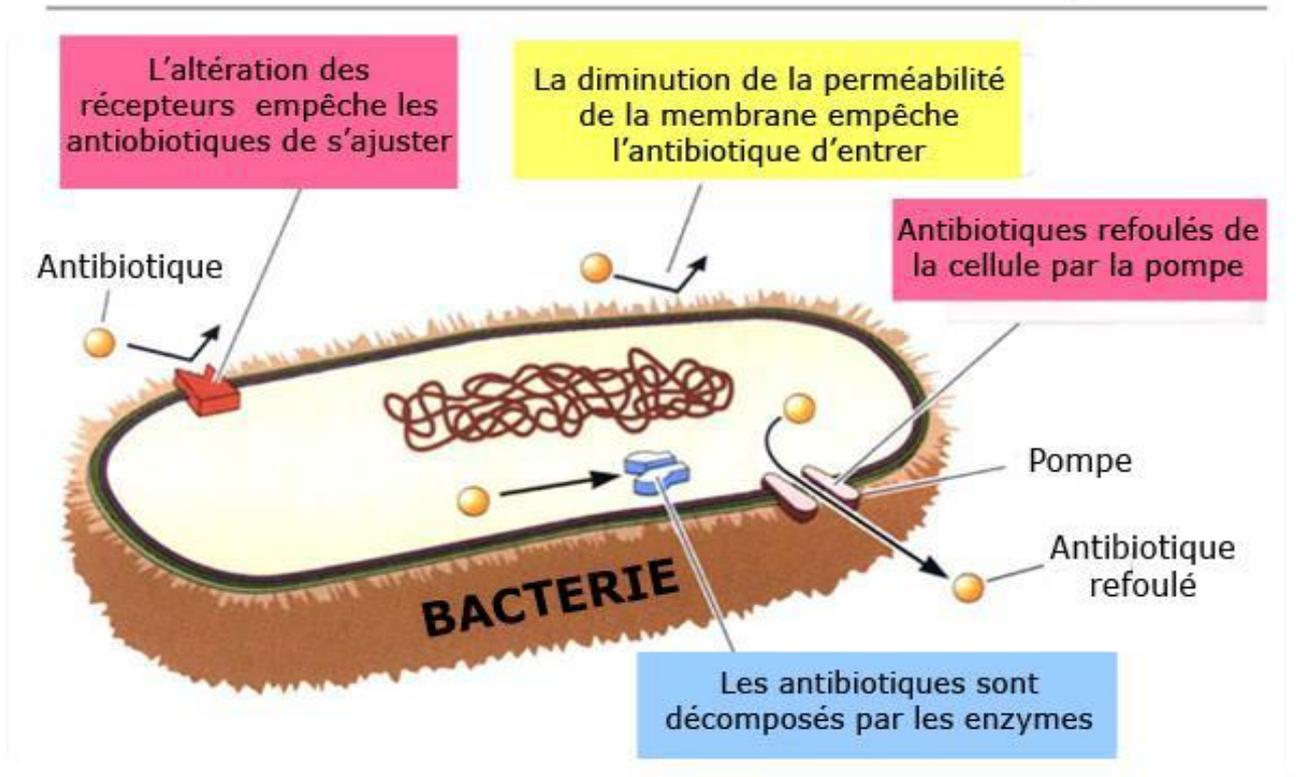
C'est une résistance intrinsèque qui signifie un caractère présent chez toutes les bactéries du même genre bactérien. Cette résistance est stable, alors la transmission verticale à la descendance lors de la division cellulaire. La résistance naturelle est permanente et d'origine chromosomique et aussi peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'ATB. Par exemple, la résistance des BGN à la vancomycine est naturelle (**Carle, 2009**).

#### **9.1.2. La résistance acquise :**

la résistance acquise n'existe que chez certaines souches bactériennes du même genre ou de la même espèce, cette résistance peut être acquise essentiellement par deux voies. Elle est basée sur des mutations dans le génome, transmise à la descendance de façon verticale ou l'acquisition d'information génétique étrangère, en provenance d'autres souches, par transfert horizontal (**Courvalin, 2008**).

## 9.2. Mécanisme de résistance

### Mécanismes de résistance à l'antibiotique



**Figure 6:** Mécanisme de résistance bactérienne aux antibiotiques (Schaechter *et al.*, 1999)



*Matériel  
et Méthodes*

Ce travail a été fait au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE) de l'université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen entre Février et Mai 2019.

## 1. Matériel

### 1.1 Matériel biologique

#### 1.1.1. Les souches

Dix souches ont fait l'objet de notre travail, il s'agit de sept souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) et trois souches cliniques d'origine hospitalière.

**Tableau 2:** Les souches bactériennes utilisées pour les tests

Souches clinique	Souches de référence	Milieus de culture
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Mac Conkey
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC70603	Mac Conkey
<i>E. coli</i> 962	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mac Conkey
/	<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	Mac Conkey
/	<i>S. montevideo</i> ATCC 3581	Salmonella-Shigella
/	<i>S. enteritidis</i> ATCC 2453	Salmonella-Shigella
/	<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	Salmonella-Shigella

### **1.1.2 Matériel végétale:**

La plante utilisée pour ce travail est le clou de girofle qui est des boutons floraux du giroflier, ces derniers ont été séché après les avoir acheté d'herboristes en Mars 2019(voir figure7).

Nous avons testé l'HE de clou de girofle sur des BGN d'origine clinique et de référence.



**Figure 7:** Le clou de girofle (photo originale)

## 2. Méthodes

### 2. 1. Extraction de l'huile essentielle de clous de girofle

L'extraction de l'HE de clou de girofle a été faite par hydro-distillation en utilisant un appareil de type Clevenger selon la pharmacopée européenne (**European–Pharmacopoeia, 2005**) (voir figure 8).

Le procédé est basé sur le mélange clous de girofle – eau est porté à ébullition grâce à un chauffe- ballon. Les cellules de la plante éclatent et libèrent les molécules odorantes qui sont entraînées par la vapeur d'eau, elles passent ensuite dans le réfrigérant à eau ou elles sont condensées, puis le distillat est récupéré dans un récipient ensuite il est versé dans une ampoule à décanter. A la fin, le distillat est agité en effectuant, de temps à autre, un dégazage et on le laisse décanter. Ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est organique (HE) et l'autre est aqueuse. Enfin l'HE est recueilli dans une burette gradué ou le volume est lu directement puis conserver dans un flacon en verre stérile et bien fermé à l'abri de l'air et de la lumière.

Le rendement en l'HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue et la masse du matériel végétal traité (**AFNOR, 1986**).

Le rendement est exprimé en pourcentage :

$$\text{Rendement (\%)} = \text{poids de l'HE} / \text{poids de la plante} \times 100$$



**Figure 8:** Montage de type Clevenger pour l'hydrodistillation et l'extraction de l'HE de *S. aromaticum*

## **2. 2. Préparation de la suspension bactérienne, repiquage et conservation**

### **2.2.1. Revivification des souches**

Les souches bactériennes ont été ensemencés dans des tubes contenant 5ml de TSB, après elles sont incubées à une température de 37°C pendant 24h. Le but est l'enrichissement des souches (voir annexe 1).

### **2.2.2. Repiquage**

Par la technique d'épuisement, les souches bactériennes ont été repiquées sur la gélose Macconkey et Salmonella-Shigella (ensemencements en strie) pour obtenir des colonies isolées, afin de déterminer leurs purifications (voir annexe 2).

### **2.2.3 Conservation**

Les cultures des différentes espèces microbiennes ont été ensemencées dans des éppendorfs stérile contenus de glycérol + BHIB. Après une agitation au vortex les éppendorfs ont été placés dans un réfrigérateur à -20°C ou parfois laissés à une température ambiante.

### **2.3. Identification**

L'identification des trois souches d'origine clinique a été réalisée par la coloration de Gram ayant pour but de déterminer le type de paroi d'une bactérie, c'est-à-dire si elle est Gram+ ou Gram-, Ceci a été possible après avoir coloré un frottis bactérien. Ensuite par système API biomérieux

### **2.4. Méthode de diffusion en milieu solide: (technique de l'aromatogramme)**

#### **2.4.1. Principe générale**

L'aromatogramme est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des HE. La technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des ATB.

Sur des géloses Muller-Hinton préalablement ensemencées sont disposés des disques imprégnés d'HE de clou de girofle. Après 24 h à 37°C, il est possible de mesurer en millimètres le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques.

#### **2.4.2. Technique**

##### **2.4.2.1. Préparation de l'inoculum**

À partir d'une culture jeune et pure, on ensemence 5 ml de BN avec des colonies de la souche à tester. On incube pendant 24h à 37°C. Ensuite on dilue l'inoculum en ajoutant BN stérile s'il est trop concentré ou bien de la culture s'il est moins concentré, à la fin on mesure sa densité optique qui doit être entre 0.08-0.1 à une longueur d'onde de 625nm ce qui correspond approximativement de  $10^8$  UFC/ml.

##### **2.4.2.2. Ensemencement**

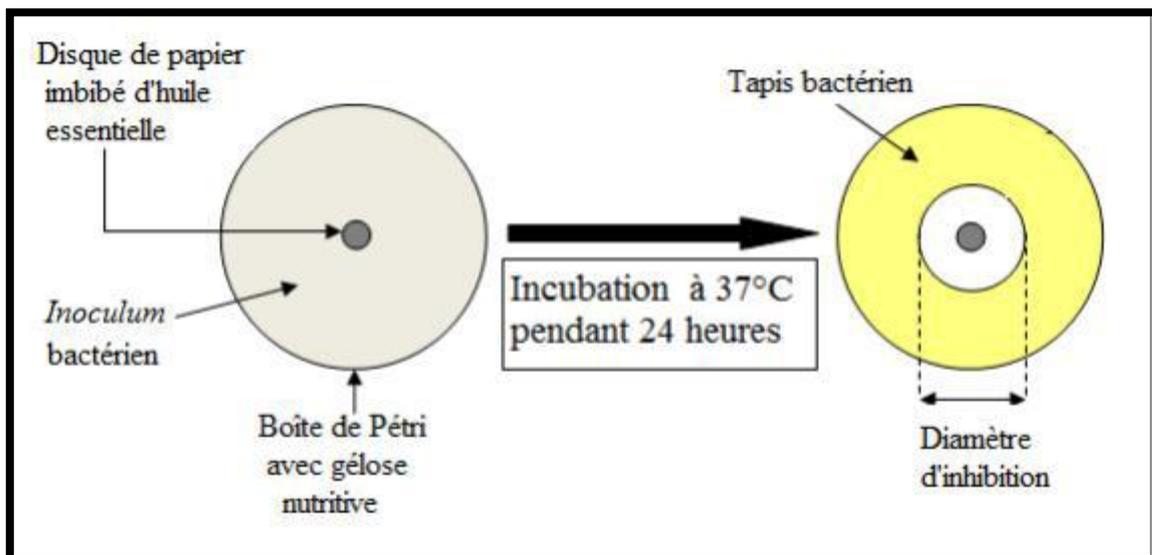
L'ensemencement de l'inoculum est fait par écouvillonnage sur toute la surface gélosée de Muller-Hinton séchée. Les stries d'ensemencement doit être très serrées en occupant toute la surface de la boîte, cette action est refaite trois fois en tournant à chaque fois la boîte par un angle de 60° il faut pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Puis à l'aide d'une pince stérile les disques stérile (papier Whatman) imprégnés d'une quantité d'HE (5, 10, 15 µl) sont déposés sur la gélose en respectant une certaine distance entre les disques de 25 jusqu'à 30mm.

Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer le contact uniforme avec la gélose. Les boîtes ainsi préparées sont laissées quelques minutes à la température ambiante pour permettre la diffusion de disque puis les incubent à 37°C pendant 18 à 24h.

### 2.4.3. Lecture:

Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition qui apparaît autour des disques et on compare ces résultats aux valeurs critiques. A la fin on classe les bactéries dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistante (Wilkinson et Ahmad, 2006).

- Les diamètres inférieurs à 8mm = non sensible.
- Les diamètres 9-14mm = Sensible.
- Les diamètres 15-19mm = très sensible.
- Les diamètres supérieurs à 20mm = extrêmement sensible.

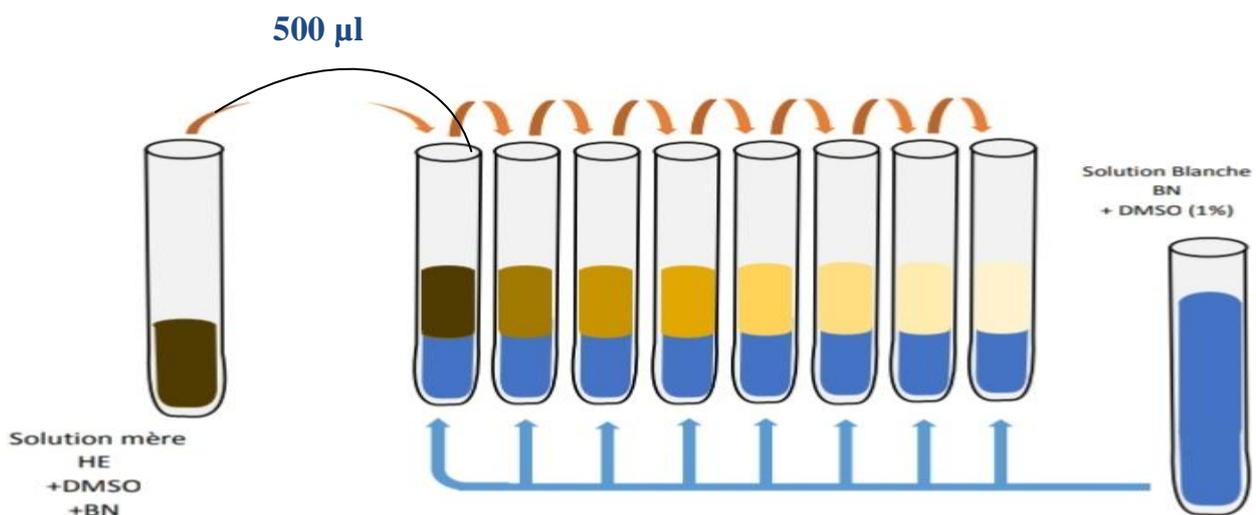


**Figure 9:** le principe d'un test d'aromatogramme méthode de diffusion sur disque (Guinoiseau, 2010)

## 2.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles par la méthode de microplaque

A la différence de la méthode de diffusion, la méthode de dilution est une technique quantitative qui permet d'évaluer la plus faible concentration en huile capable d'inhiber toute croissance bactérienne. C'est une méthode qui permet la mise en contact entre l'HE à tester et plusieurs souches bactériennes utilisées. Une microplaque à fond en U (plaque à micro titration) est utilisable pour la détermination des CMI, cette microplaque à 96puits contient 12 puits horizontaux et 8 verticaux.

Au premier temps les souches sont revivifiées dans 5 ml de BN. L'inoculum doit être mesuré par le colorimètre en diluant le volume avec un bouillon stérile pour le préparer à la concentration  $10^8$  UFC/ml, une deuxième dilution est faite par l'ajout de 100  $\mu$ l de l'inoculum à 10 ml de bouillon. La CMI consiste à faire des dilutions successives de l'HE dans des microtubes stériles contenant le BN et le DMSO avec une concentration de 1%, l'ajout de DMSO a pour but de mélanger l'HE avec le BN (**Khadir et al., 2013**). Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le BN et le DMSO avec une concentration de 1%. Cette solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contient l'H.E et afin que la concentration de DMSO reste la même à 1% dans les différentes concentrations préparées.



**Figure 10:** Schéma de préparation des dilutions d'HE

La préparation de la microplaque est réalisée de la manière suivante:

Chaque puits est inoculé avec une quantité de 180µl de l'inoculum préparé précédemment. La concentration de l'inoculum finale est réduite à  $10^5$  UFC/ml avec 20µl d'HE dans chaque puits, le volume final dans chaque puits est de 200µl, pour les puits de 1 à 8 les concentrations d'H.E seront de 4% jusqu'à 0,0312%.

Pour les 2 témoins positif et négatif sont testés dans les puits (10,12) respectivement

- Les puits de la première rangé (10) sont remplis uniquement 200 µl de l'inoculum, représentent le témoin positif
- Les puits de la deuxième rangé verticale (12) de la microplaque représentent le témoin négatif contient 200 µl de BN.

La microplaque est couverte est incubée à 37°C pendant 24h.

### **2.6. La détermination de la concentration minimale inhibitrice en utilisant la résazurine**

La résazurine est un indicateur d'oxydoréduction utilisée pour l'évaluation de la croissance cellulaire, en particulier dans divers tests de cytotoxicité. C'est un colorant bleu non-fluorescent et non toxique qui devient rose et fluorescent lorsqu'il est réduit à la résorption des oxydoréductases dans les cellules viables (McNicholl *et al.*, 2007).

#### **2.6.1. La préparation de résazurine**

La préparation de résazurine est réalisée en dissolvant une quantité de 270 mg dans 40 ml d'eau distillée stérile, ensuite la solution est mélangée à l'aide d'un vortex afin d'assurer que la solution est bien dissoute et homogène. Après la préparation le produit est stocké à 4 °C (Sarker *et al.*, 2007).

Dans notre travail, nous avons utilisés la résazurine afin de mesurer la CMI de l'HE de *S. aromaticum*, car cette dernière se caractérise par une couleur bleu foncé qui empêche la lecture de la CMI sur la microplaque. Le protocole de dilution pour faire la CMI reste le même, mais

## Synthèse bibliographique

dans la microplaque de 96 puits, on a déposé 160  $\mu\text{l}$  de l'inoculum, ensuite 20 $\mu\text{l}$  de l'HE et 10 $\mu\text{l}$  de résazurine a été ajouté. La lecture a été faite après une incubation à une température de 37°C pendant 24h.



**Figure11** : Les procédures de la méthode de microdilution par la résazurine



*Résultats  
et Discussion*

## 1. Résultats et discussion

### 1.1. La coloration de Gram

La coloration de Gram nous a permis de s'assurer que certaines souches de références et d'origine cliniques sont pures (voir annexe 3).

### 1.2. Extraction de l'huile essentielle

L'hydrodistillation de *S. aromaticum* a permis d'obtenir un rendement en HE important de 9.10%, qui présente des caractéristiques organoleptiques sont illustrés par le tableau (3)

**Tableau 3:** Caractères organoleptiques de l'HE de *S. aromaticum*

Caractéristiques	L'odeur	La couleur	L'aspect	La saveur
<i>S. aromaticum</i>	Aromatique, forte	Jaune clair	Liquide, limpide	piquante, amère

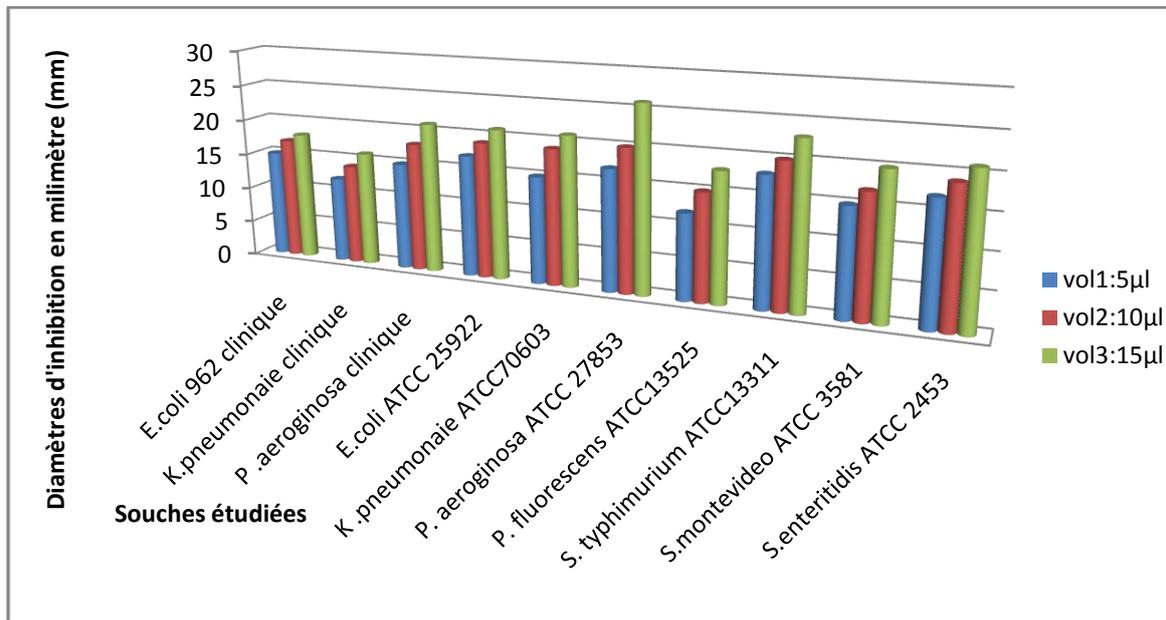
### 1.3. Diamètres des zones d'inhibition obtenue par la diffusion en gélose:

La méthode de diffusion est basée sur la mesure du diamètre des zones d'inhibition à l'extérieur de la boîte de pétri fermée. Les résultats des diamètres des zones d'inhibition sont mentionnés dans le tableau (4) et sous forme d'histogramme (figure12), (voir figure13), (voir annexe 4).

**Tableau 4:** Résultats des diamètres des zones d'inhibitions en millimètre (mm)

Volumés			
Souches	Vol 1:5µl	Vol 2:10µl	Vol 3:15µl
<i>E. coli</i> 962 d'origine clinique	15	17	18
<i>K. pneumoniae</i> d'origine clinique	12	14	16
<i>P. aeruginosa</i> d'origine clinique	15	18	21
<i>E. coli</i> ATCC 25922	17	19	21
<i>K. pneumoniae</i> ATCC70603	15	19	21
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	17	20	26
<i>P. fluorescens</i> ATCC13525	12	15	18
<i>S. typhimurium</i> ATCC13311	18	20	23
<i>S. montevideo</i> ATCC 3581	15	17	20
<i>S. enteritidis</i> ATCC 2453	17	19	21

D'après les résultats ci-dessus, on note que l'HE de Clou de girofle a une activité inhibitrice chez toutes les souches Gram négatif étudiées, les diamètres varient d'une souche à une autre. Nous avons remarqué que l'effet antimicrobien de l'huile augmente avec l'augmentation du volume (vol) de l'huile utilisé. Donc pour chaque souche, il est clair que les zones d'inhibition de vol 5µl sont petites par rapport aux zones obtenues par vol 10µl et ces derniers sont également petites que les autres zones de vol 15µl. Donc les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne augmentent avec l'augmentation des doses de l'huile (**Emiroğlu et al., 2010**).



**Figure12** : Histogramme des diamètres d'inhibition de *S. aromaticum*

L'histogramme montre que les diamètres d'inhibition sont différents entre les souches bactériennes d'origine cliniques et les souches bactériennes de références. D'après le vol 15µl, la bactérie *E. coli* 962 d'origine clinique était très sensible avec une zone d'inhibition de 18 mm par contre *E. coli* ATCC 25922 était extrêmement sensible avec une zone d'inhibition de 21 mm et de même pour *K. pneumoniae* d'origine clinique et *K. pneumoniae* ATCC 70603 avec des diamètres de 16mm et 21mm respectivement, alors pour l'espèce *P. aeruginosa* d'origine clinique et *P. aeruginosa* ATCC 27853 on a enregistré un diamètre supérieur à 20 mm (21-26mm) donc selon **Ponce et al., (2003)** une huile donnant une valeur supérieure à 20 mm signifie que la souche est extrêmement sensible.

En revanche, on constate que les bactéries d'origine cliniques ont des zones d'inhibition plus faible que celles des bactéries de références.

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien de l'huile de *S. aromaticum* par méthode de diffusion en milieu gélosé et selon **Biyiti et al., (2004)** cette méthode de diffusion a considéré une huile active lorsqu'elle stimule une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm.

En comparant nos résultats du test d'aromatogramme avec les travaux antérieurs, on constate que; par exemple les résultats obtenus avec trois espèces *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui ont des diamètres d'inhibition compris 17 mm et *S. typhimurium* ATCC13311 18 mm, sont en discordance avec les résultats obtenus par **Sameer et Badri, (2017)** où il a trouvé des diamètres d'inhibition pour les espèces *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui sont respectivement 12 et 0 mm et *S. typhimurium* ATCC 6539 qui est de 11 mm.

Il en résulte que la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 testé est résistante par rapport à notre souche *P. aeruginosa* ATCC13311 qui est plus sensible.

Finalement, d'après les travaux de VALERO et GINER en 2006, qui ont démontré que l'eugénol est l'un des composés majoritaire qui provoque l'inhibition de la croissance des bactéries, l'activité bactéricide de l'HE de girofle 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 (**Rhayour, 2002**).



**Figure 13:** zones d'inhibition d'huile essentielle de *S.aromaticum* sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 de trois volumes.

#### 1.4. Concentration minimale inhibitrice de la croissance:

Dans cette partie du travail, nous avons utilisé la méthode de microdilution en BN pour déterminer la concentration minimale inhibitrice .les résultats sont enregistré dans le tableau (5) et ainsi dans l'histogramme (figure14), figure (15 et 16) (voir annexe 5 et 6).

La lecture des résultats de microplaque sans résazurine se fait par une évaluation visuelle de turbidité des puits qui nous accède de déterminer CMI, le premier puits qui ne montre pas une croissance (trouble) (voir figure 15).

Alors que la lecture des résultats de microplaque avec résazurine se fait par l'utilisation de l'indicateur visuel résazurine et le changement de couleur du bleue au rose permet la détermination des valeurs des CMI des H.E (voir figure 16).

**Tableau 5:** Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI %) de *S. aromaticum* obtenues sur microplaque

Souches	CMI sans résazurine	CMI avec résazurine
<i>E. coli</i> 962 d'origine clinique	0.25	0.125
<i>K. pneumoniae</i> d'origine clinique	0.25	0.125
<i>P. aeruginosa</i> d'origine clinique	0.25	0.25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.25	0.25
<i>k. pneumoniae</i> ATCC70603	0.125	0.125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.25	0.125
<i>P. fluorescens</i> ATCC13525	0.25	0.25
<i>S. typhimurium</i> ATCC13311	0.25	0.125
<i>S.montevideo</i> ATCC 3581	0.5	0.25
<i>S.enteritidis</i> ATCC 2453	0.25	0.125

La CMI de l'huile de clou de girofle pour les souches bactériennes a été déterminée par test sur microplaque à 96 puits, les valeurs obtenues comprises entre 0.125 % jusqu'à 0.5% sans résazurine et de 0.125% jusqu'à 0.25% avec résazurine. Nous avons observé que la souche *K. pneumoniae* ATCC70603 présente la plus faible CMI à 0.125 % avec et sans résazurine tandis que la valeur de la CMI pour *K. pneumoniae* d'origine clinique est entre 0.125% et 0.25 % avec et sans résazurine respectivement et aussi nous avons remarqué que *E. coli* ATCC 25922 a une concentration de 0.25% sans et avec résazurine alors que *E. coli* d'origine clinique 0.125% avec résazurine et 0.25% sans résazurine , tandis que pour l'espèce *P. aeruginosa* ATCC 27853 nous avons obtenu la valeur 0.125% et 0.25% avec et sans résazurine et pour *P. aeruginosa* d'origine clinique possède une concentration de 0.25% avec et sans résazurine et *P. fluorescens* ATCC13525 à une CMI de 0.25 %.

Pour les espèces *S. typhimurium* ATCC13311 et *S. enteritidis* ATCC 2453 nous avons enregistré des valeurs entre 0.125% et 0.25 % avec et sans résazurine par contre la CMI la plus élevée était 0.25 % à 0.5 %, pour l'espèce *S. montevideo* ATCC 3581 avec et sans résazurine.

L'histogramme traduit les mêmes résultats de tableau (05):

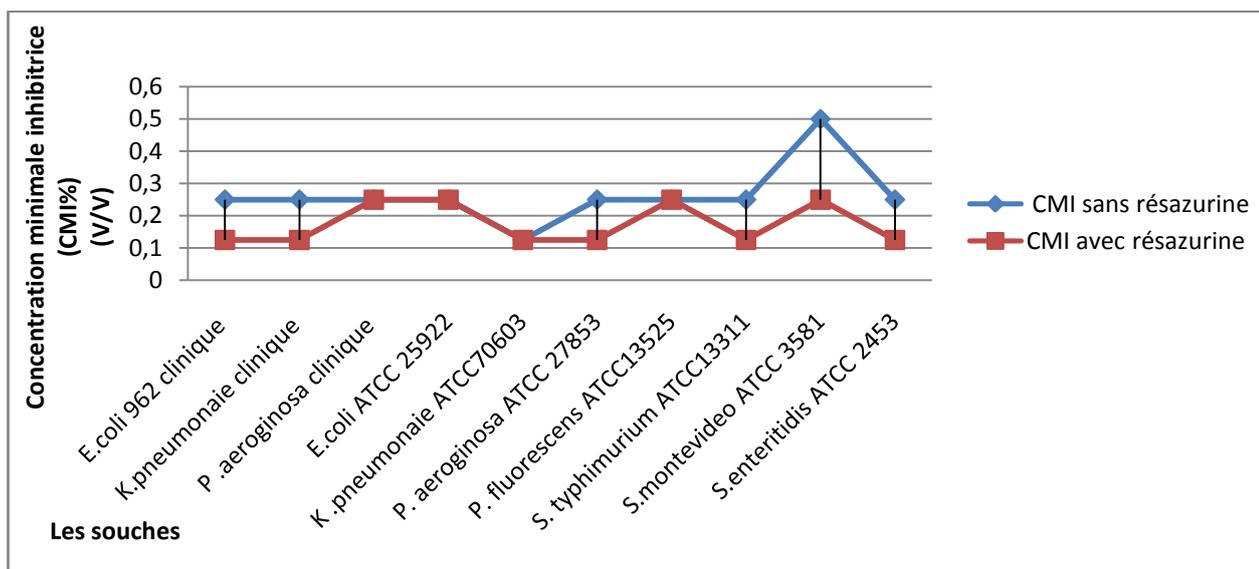
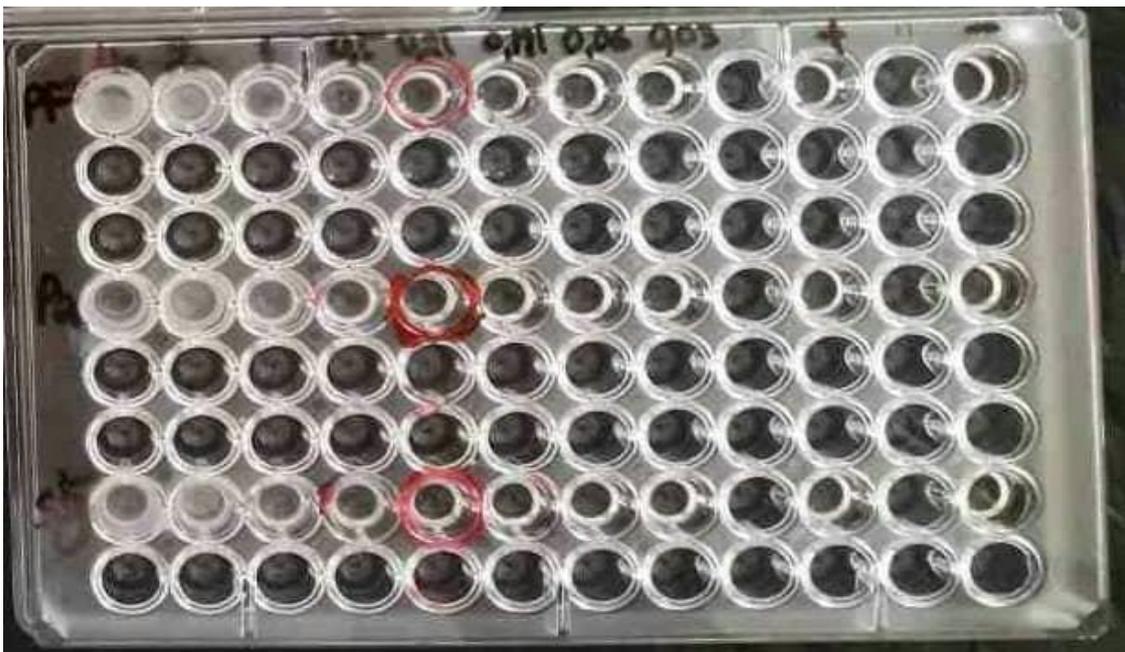


Figure14 : Les valeurs de CMI obtenue par microplaque

L'étude qui a été faite par **Utchariyakiat *et al.*, (2016)** a montré que l'HE de clou de girofle est active contre *P.aeruginosa* avec une CMI de 1,8 % alors que pour *P.aeruginosa* d'origine clinique la CMI obtenue est de l'ordre de 0.25 %.

La méthode de diffusion sur disque est une bonne méthode pour la détection de la sensibilité d'une souche à une HE mais l'ajout d'une méthode plus précise comme la détermination de la CMI est très importante et obligatoire puisque parfois l'HE a des polarités des composés naturels différentes. Pour l'évaluation d'effet antimicrobien sous forme de valeurs de Concentrations, la méthode de dilution en agar est un bon moyen mieux que la méthode de diffusion (**Klančnik *et al.*, 2010**).



**Figure 15:** Résultats sur microplaque montrant les différentes concentrations inhibitrices.

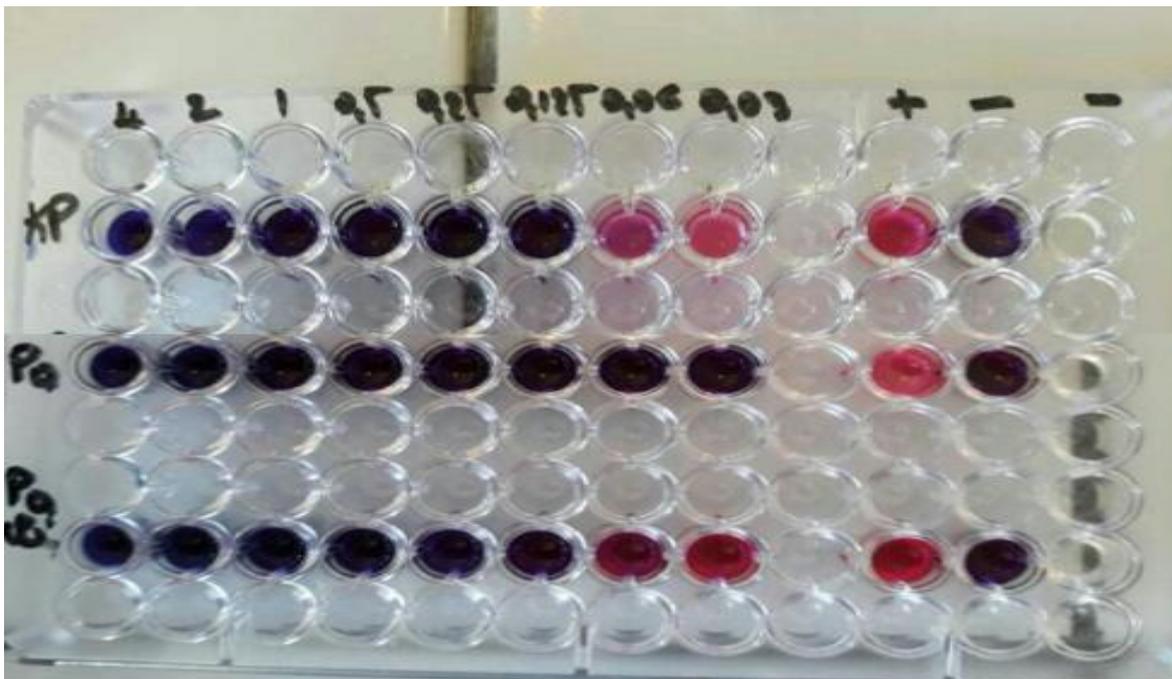
La méthode de résazurine s'est avérée efficace par la facilité de la lecture, En microplaque, les puits de couleur rose indiquent qu'il y a une croissance microbienne lorsque l'oxygène dans le milieu est limité mais les puits de couleur bleue indiquent qu'il y a une inhibition de la croissance microbienne (**Vandal *et al.*, 2015**)

## Résultats et Discussion

Dans cette étude toutes les bactéries testées ont réduits la résazurine et évalué des valeurs terminales spécifiques (CMI). Nos résultats est en accord avec les résultats de la méthode de microdilution sans résazurine, car ils sont presque similaire et la différence des concentrations était due à la sensibilité de résazurine et également à des erreurs de manipe (figure14).

Par ailleurs, Il semble que la méthode de CMI sur microplaque en résazurine est une méthode prometteuse car en plus des avantages de la technique de microplaque, elle a la capacité de visualiser facilement la croissance de bactéries en culture.

Alors en conclusion, on peut dire que l'HE de *S. aromaticum* testés contre ces souches bactériennes a montré des activités antimicrobiennes intéressantes lors de la méthode de diffusion et lors de la méthode de CMI.



**Figure 16:** la microplaque après l'incubation dans le dosage de la résazurine



# Conclusion

*Syzygium aromaticum* est une plante médicinale riche en HE, ce caractère a été confirmé par les rendements obtenus lors de nos extractions. Nos résultats ont montré une très bonne activité sur les souches de références, mais aussi les souches cliniques avec des zones d'inhibition qui était dans un intervalle 12 jusqu'à 17 mm avec seulement 5 µl d'HE testé et des zones d'inhibition arrivant à 21 mm avec 15µl d'HE testé. La CMI a montré que les souches testées présentaient une bonne sensibilité aux concentrations testée comme nous avons enregistré des CMI faible de l'ordre de 0,125% jusqu'à 0,5%. La méthode de détermination de la CMI en utilisant l'indicateur fluorescent résazurine a montré plus de sensibilité et plus d'efficacité puisque dans certains cas on a trouvé des difficultés pour déterminé visuellement la CMI alors que par cette méthode le changement de la couleur bleue en rose permet une détermination de la CMI clair et sur. A la lumière de ces résultats obtenus, on peut conclure que l'HE de *S. aromaticum* semble efficace contre les BGN même si ces derniers sont résistants aux antibiotiques et même sur l'espèce *P. aeruginosa* la plus connue par sa résistance. Cela ouvre plusieurs perspectives sur son usage médical pour lutter contre les bactéries multirésistantes, mais aussi dans le domaine alimentaire du fait que cette plante est un alicament qui peut être additionné a des produits alimentaires afin de les conserver.





# *Références*

### Références

Afnor., 2000. Recueil de Normes: Les Huiles Essentielles, Tome 1. Echantillonnage et Méthodes d'Analyse, Association Française de Normalisation Paris, France.

Afnor, E., 1986. Méthodes d'essai. Recueil des normes françaises.

Allahverdiyev, A. M., M. Bagirova, et al., 2013. Development of New Antiherpetic Drugs Based on Plant Compounds. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components, Elsevier, 245-259.

Aneja, K. R. and R. Joshi., 2010. Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* and its bud oil against dental cares causing microorganisms. *Ethnobotanical Leaflets* 14, 960-975.

Baba, Z. A.-K. T. and G. Arlet., 2014. News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathologie-biologie* 62(3), 169-178.

Bagchi, G. D. and G. N. Srivastava., 2003. SPICES AND FLAVORING (FLAVOURING) CROPS | Leaf and Floral Structures. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). B. Caballero. Oxford, Academic Press, 5477-5486.

Bakkali, F., S. Averbeck, et al., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology* 46(2), 446-475.

Baliga, M. S., P. P. Mane, et al., 2015. Dietary Spices in the Prevention of Rheumatoid Arthritis: Past, Present, and Future. *Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults*, Elsevier, 41-49.

Barbelet, S., 2015. Le giroflier: historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle, Université de Lorraine.

Ben-Arfa, B. A., I. M. M. Salvado, et al., 2019. Clove and cinnamon: Novel anti-oxidant fuels for preparing magnetic iron oxide particles by the sol-gel auto-ignition method. *Journal of Alloys and Compounds* 786, 71-76

Bernard, M.-C., J. Brisou, et al., 1973. Métabolisme phospholipasique chez les bactéries à gram négatif: purification et étude cinétique de la phospholipase A2 soluble d'E. coli 0118. *Biochimie* 55(4), 377-388.

Bhowmik, D., K. S. Kumar, et al., 2012. Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(1), 13-23.

Biran, V., A. Gaudin, et al., 2010. Infections néonatales tardives à entérobactéries multirésistantes. *Archives de pédiatrie* 17, S150-S153.

- Biyiti, L., D. Meko'o, et al., 2004. Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr* 13, 11-20.
- Blama, A. and F. MAMINE, 2013. Etude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques dans le sud algérien: le Touat et le Tidikelt. 5. Symposium international des plantes aromatiques et médicinales: SIPAM, Marrakech, MAR, 2013-11-14-2013-11-16.
- BOUYAHYA, A., 2016. Alicaments: des aliments aux médicaments, quel apport pour la santé? *Annales des sciences de la santé* 1(4), 1-3.
- Bouyahya, A., Y. Bakri, et al., 2017. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology* 94(3), 223-253.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, et al., 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science* 90(6), 2580-2595.
- Callias, C., 2007. Les alicaments dans la lutte contre l'hypercholestérolémie. *Bull Soc Ens Neuch Sci* 30, 1-18.
- Carle, S., 2009. La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important! *Pharmactuel* 42.
- Charles, D. J. and J. E. Simon., 1990. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115(3), 458-462.
- Cortés-Rojas, D. F., C. R. F. de Souza, et al., 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 4(2), 90-96.
- Cos, P., A. J. Vlietinck, et al., 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology* 106(3), 290-302.
- Costa, D. C., H. Costa, et al., 2015. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology* 45(2), 336-354.
- Couic-Marinier, F. and A. Lobstein., 2013. Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques* 52(525), 22-25.
- Council, O. E., 2005. *European Pharmacopoeia. General Text* 5.

- Courvalin, P., 2008. La résistance des bactéries aux antibiotiques: Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Curvale-Fauchet, N., F. Botterel, et al., 2004. Frequency of intravascular catheter colonization by *Malassezia* spp. in adult patients. *Mycoses* 47(11-12), 491-494.
- Cynober, L., 2008. Complément alimentaire, alicament, médicament: Qui est qui? Ou faust revisité. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 43(1), 15-21.
- Danthu, P., E. Penot, et al., 2014. Le giroflier à Madagascar: une «success story»... à l'avenir incertain. *Bois et forêts des tropiques* 35.
- De Rauw, K., S. Vincken, et al., 2014. Enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104: H4 in Belgium and Luxembourg. *New microbes and new infections* 2(5), 138-143.
- Derbré, S., 2010. Médicaments, compléments alimentaires, alicaments ou nutraceutiques, comment y voir clair? *Actualités pharmaceutiques* 49(496), 14-19.
- Djoudi, H. L'activité antibactérienne des alcaloïdes et mécanisme d'action de la berbérine.
- DUBERNARD, M. J.-M., M. J.-M. Dubernard, et al., 2006 Prévenir les infections nosocomiales: une exigence de qualité des soins hospitaliers.
- Edris, A. E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 21(4), 308-323.
- El Asbahani, A., K. Miladi, et al., 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics* 483(1-2), 220-243.
- Emiroğlu, Z. K., G. P. Yemiş, et al., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat science* 86(2), 283-288.
- Falagas, M. E., I. A. Bliziotis, et al., 2006. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Critical care* 10(2), R48.
- Faure, O., H. Fricker-Hidalgo, et al., 2002. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. *Journal of hospital infection* 50(2), 155-160.
- Fayemiwo, K. A., M. A. Adeleke, et al., 2014. Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 4(1), 30-34.

- Ferris, P., 2013. Les meilleurs alicaments naturels, Marabout.
- Foca, M. D., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* infections in the neonatal intensive care unit. *Seminars in perinatology*, Elsevier.
- Garlantézec, R., C. Bourigault, et al., 2011. Investigation and management of an imipenem-resistant oxa-23 *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Médecine et maladies infectieuses* 41(8), 430-436.
- Ghedira, K., P. Goetz, et al., 2010. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie* 8(1), 37-43.
- Goetz, P. and K. Ghedira., 2012. *Phytothérapie anti-infectieuse*, Springer Science & Business Media.
- Goossens, H., D. Guillemot, et al., 2006. National campaigns to improve antibiotic use. *European journal of clinical pharmacology* 62(5), 373-379.
- Guinoiseau, E., 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action.
- Inouye, S. and S. Abe., 2007. Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie* 5(1), 2-4.
- Iwu, M. M., 2014. *Handbook of African medicinal plants*, CRC press.
- Kabera, J., K. Koumaglo, et al., 2005. Caractérisation des huiles essentielles d'*Hyptis spicigera* Lam., *Pluchea ovalis* (Pers.) DC. et *Laggera aurita* (LF) Benth. Ex. CB Clarke, plantes aromatiques tropicales. *Etudes rwandaises* 10, 7-18.
- Khadir, A., M. Bendahou, et al., 2013. Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie. *Phytothérapie* 11(6), 353-358.
- Kheawfu, K., S. Pikulkaew, et al., 2018. Development and characterization of clove oil nanoemulsions and self-microemulsifying drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 46, 330-338.
- Klančnik, A., S. Piskernik, et al., 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods* 81(2), 121-126.
- Kumar, P., P. Jaiswal, et al., 2011. Medical, Therapeutic and pharmacological effects of *syzygium aromaticum* (LAU G), *Pharmacologyonline*.

Labrecque, J., C. Bodet, et al., 2006. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(2), 439-443.

Lemaoui, C.-E., H. Layaida, et al., 2017. Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux* 19(1), 12-19.

Leroy, J.-F., 1946. Le Giroflier et les Plantes à parfums. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* 26(286), 425-429.

Loo, A. and H. Richard., 1992. Nature, origine et propriétés des épices et des aromates bruts. *Épices et Aromates*. richard H.(ed.). paris, Lavoisier, 18-22.

Lubbe, A. and R. Verpoorte., 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials.

*Industrial crops and products* 34(1), 785-801.

Maistre, J., 1964. *Les plantes à épices*, Maisonneuve et Larose.

Mbaveng, A. and V. Kuete., 2017. *Syzygium aromaticum*. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Elsevier, 611-625.

McNicholl, B. P., J. W. McGrath, et al., 2007. Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water research* 41(1), 127-133.

Mittal, M., N. Gupta, et al., 2014. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: a comprehensive review. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 6(8), 67-72.

Okigbo, R., C. Anuagasi, et al., 2009. Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(2), 086-095.

Pagés, J.-M. and E. Garnotel., 2003. Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à gram négatif. *Revue Française des laboratoires* 2003(352), 57-63.

Pibiri, M.-C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, EPFL.

Ponce, A., R. Fritz, et al., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology* 36(7), 679-684.

Pierron, C., 2014. *Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France: exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs*, Université de Lorraine.

Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar, et al., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine* 6(1), 39.

- Rhayour, K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.
- Richard, H., 1974. Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles.
- Ríos, J.-L., 2016. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. *Essential oils in food preservation, flavor and Safety*, Elsevier, 3-10.
- Roque, M.-C., 2011. Comprendre et traiter une douleur physique d'origine somatique.
- Sameer G Mohamed and Ali M Badri., 2017. Antimicrobial Activity of *Syzygium aromaticum* and *Citrus aurantifolia* Essential Oils Against Some Microbes in Khartoum, Sudan *EC Microbiology* 12.6, 253-259.
- Sarker, S. D., L. Nahar, et al., 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42(4), 321-324.
- Schaechter, M., G. Medoff, et al., 1999. *Microbiologie et pathologie infectieuse*, De Boeck Supérieur.
- Scimeca, D. and M. Tétou., 2005. *Votre santé par les huiles essentielles*, Alpen Editions sam.
- Sharada, R. and B. Lalitha., 2017. *Lavanga (Syzygium aromaticum LINN.)-A Spicy boon* .
- Sharman, J. E., R. Lim, et al., 2006. Validation of a generalized transfer function to noninvasively derive central blood pressure during exercise. *Hypertension* 47(6), 1203-1208.
- Singh, S. P., V. S. Chandel, et al., 2018. Dielectric study of Clove oil. *Journal of Ayurveda and integrative medicine* 9(1), 53-56.
- SULTAN, L., 2006. Utilisation en odontologie. *Le chirurgien-dentiste de france* 23(1281).
- Tasseau, F. and D. Baron., 1989. *Infections nosocomiales*. Paris, Bruker Get Fassin.
- Tiollier, M., T. Michels, et al., 2014. The clove tree of Madagascar: a success story with an unpredictable future. *Bois et forêts des tropiques*(320), 2.
- Tourneur, M., 1947. *Épices et aromates. Madagascar et Réunion*.
- Uehara, S., D. Andrade, et al., 2019. The effectiveness of tricaine, benzocaine, clove oil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus argenteus*. *Aquaculture* 502, 326-331.

Utcharykiat, I., S. Surassmo, et al., 2016. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC complementary and alternative medicine* 16(1), 158

Vandal, J., L. G. Leduc, et al., 2015. Activité antimicrobienne de produits naturels originaires du Nord de l'Ontario. Actes de la 21 e Journée Sciences et Savoirs aux frontières de la connaissance, 220.

VERBEKE, N., 2006. L'Aromatherapie comme alternative credible a l'antibiotherapie. Préparatrice en pharmacie, p20.

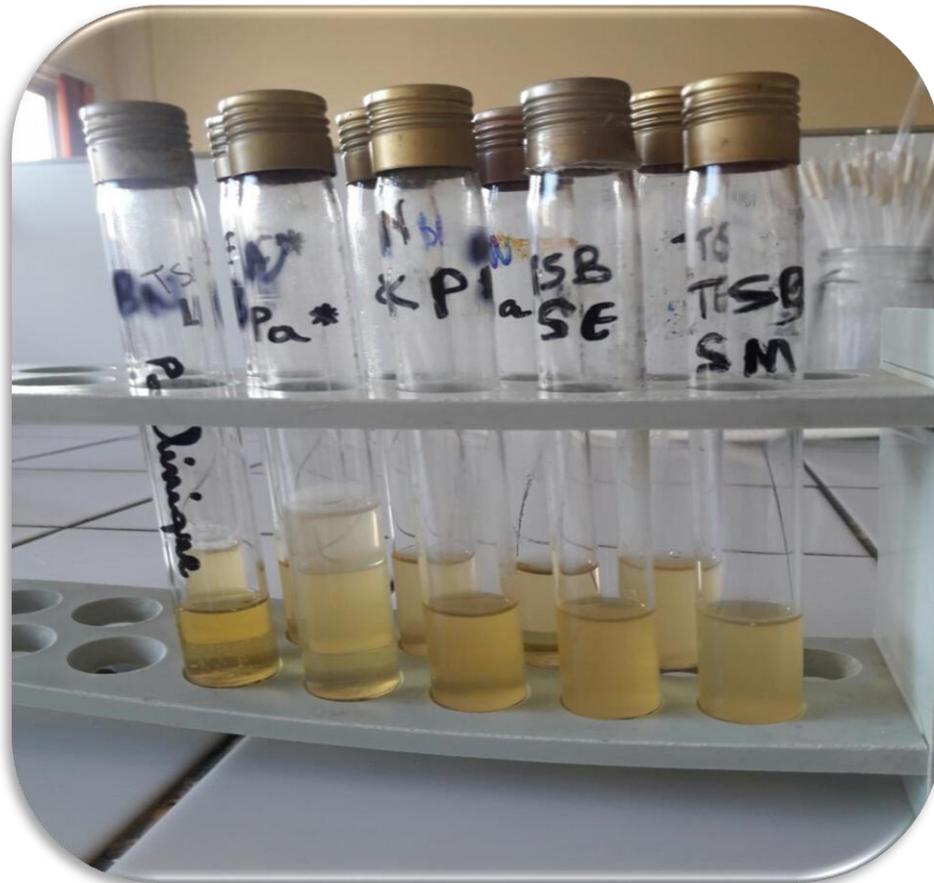
Wang, J., B. Sun, et al., 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry* 106(2), 804-810.

Zeyneb, T. A. T. and B. Meriem., 2018. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des trois plantes médicinales *Salvia sclarea*, *Syzygium aromaticum* et *Allium cepa*.



*Annexes*

Annexe 1



**Figure :** Les suspensions bactériennes après l'incubation  
(L'enrichissement et la revivification)

Annexe 2

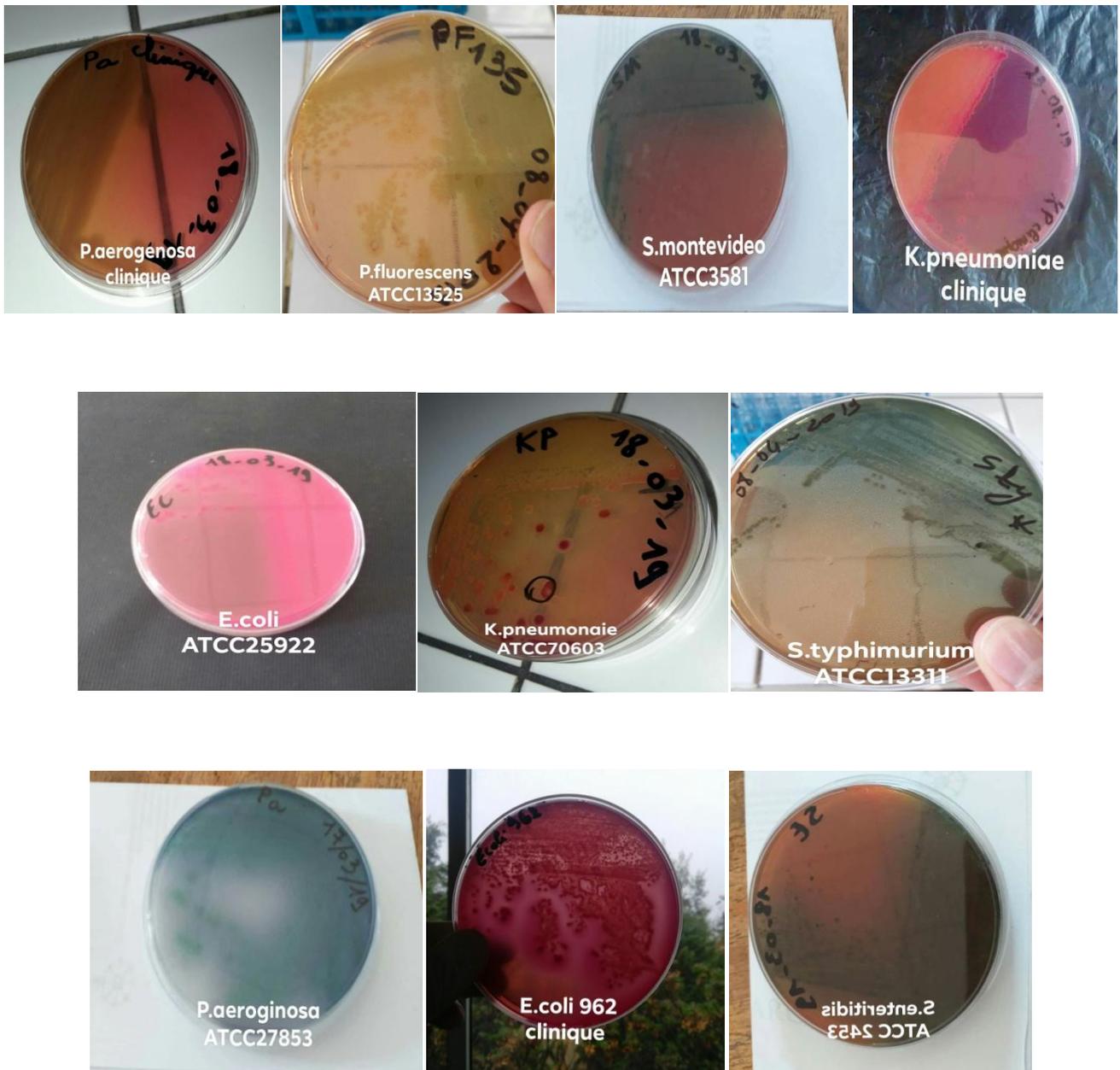
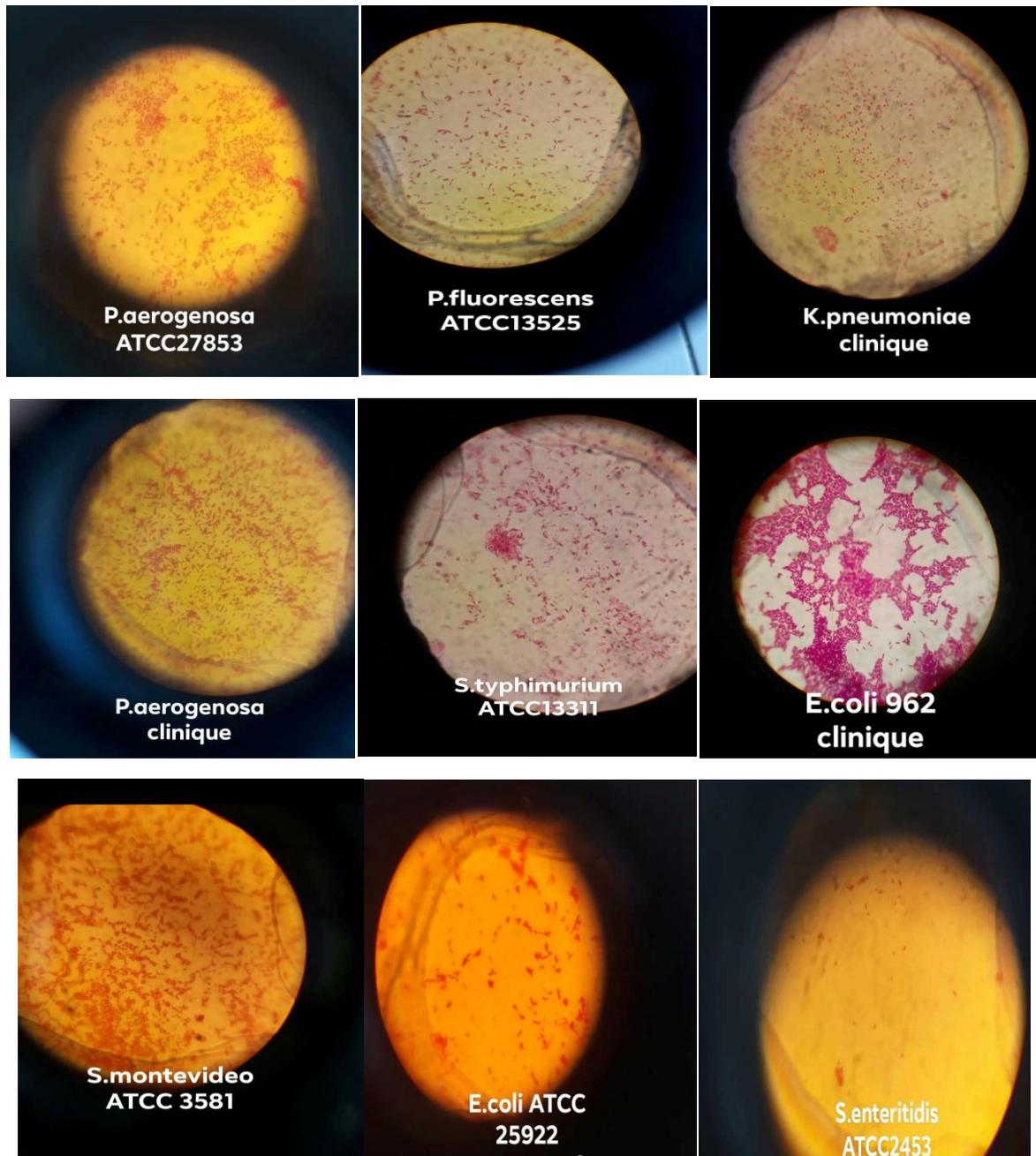


Figure: Aspect des bactéries après 24h d'incubation

Annexe 3



**Figure :** Observation microscopique des bactéries après la coloration de Gram  
(G x100)

Annexe 4



Annexe 5



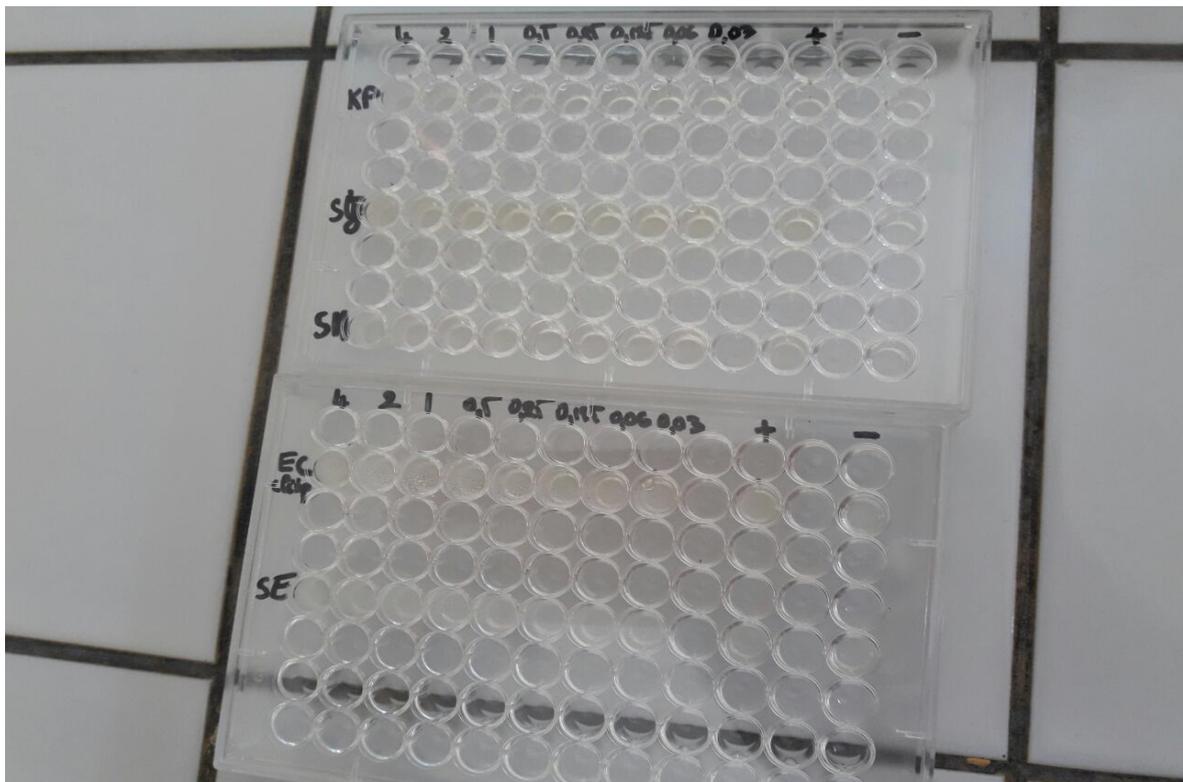


Figure : CMI par la méthode de microplaque après l'incubation

## Annexe 6



**Figure :** Méthode de CMI sur microplaque par l'utilisation de résazurine

## **Résumé :**

Les plantes aromatiques et médicinales sont toujours la source fiable d'ingrédients actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques. Notre travail porte sur l'étude et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* connue sous le nom de giroflie.

Pour répondre à cet objectif, une extraction de l'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum* est réalisée par la méthode d'hydro distillation de type Clevenger. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur sept souches bactériennes de référence (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella montevideo* ATCC 3581, *Salmonella n enteritidis* ATCC 2453 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) et trois souches bactériennes d'origine clinique (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* 962), selon deux techniques l'aromatogramme et la concentration minimale inhibitrice.

Les résultats obtenus indiquent que l'huile essentielle de girofle a une activité antibactérienne élevée, il induit des diamètres d'inhibition allant de 12 à 26 mm et des valeurs de CMI comprises entre 0,125 % et 0,5% pour le test sur souches bactériennes.

**Mots clés :** L'huile essentielle, *Syzygium aromaticum*, Clou de girofle, Activité antimicrobienne.

## **Abstract :**

Aromatic and medicinal plants are always the reliable source of active ingredients known for their therapeutic properties. Our work is concerned with the study and demonstration of the antimicrobial activity of the Essential Oil of *Syzygium aromaticum* known as clove.

To realize this objective, an extraction of the essential oil from the flower buds of *Syzygium aromaticum* is carried out by the Clevenger type hydro distillation method. Antimicrobial activity was determined on seven reference bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella montevideo* ATCC 3581, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453 and *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) and three clinical bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* 962), according to two techniques the aromatogram and the minimal inhibitory concentration.

The results obtained indicate that the essential oil of clove has a high antibacterial activity; it induces inhibition diameters ranging from 12 to 26 mm and MIC values between 0.125 % and 0.5% for the bacterial strain test.

**Key words:** Essential oil, *Syzygium aromaticum*, Clove, Antimicrobial activity.

## **المخلص:**

تعتبر النباتات العطرية والطبية دائما مصدرا موثوقا للمكونات النشطة المعروفة بخصائصها العلاجية. يركز عملنا على دراسة وإظهار نشاط مضادات الميكروبات للزيوت الطيارة لنبات *muyzyS* و *mucitamora* والمعروف بالقرنفل

لتحقيق هذا الهدف، يتم استخراج الزيت الأساسي من براعم الزهور ل *Syzygium aromaticum* بواسطة طريقة التقطير المائي من النوع Clevenger

تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على سبع سلالات بكتيرية مرجعية (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella montevideo* ATCC 3581, *Salmonella enteritidis* ATCC 2453, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311

(*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) و ثلاث سلالات بكتيرية سريرية (*Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* 962) وفقا لتقنيتين l'aromatogramme و la concentration minimale inhibitrice .

و النتائج المتحصل عليها توضح ان الزيوت الطيارة لأعواد القرنفل تمتلك فعالية قوية ضد البكتيريا حيث كان معدل التثبيط يتراوح بين 12 ملم إلى 26 ملم اما بالنسبة الى قيم CMI فهي تتراوح ما بين 0.125 % الى 0.25 % للاختبار على السلالات البكتيرية

**كلمات مفتاحية :** الزيوت الطيارة ،أعواد القرنفل ،نشاط مضادات الميكروبات